

RASPROSTRANJENOST I KARAKTERIZACIJA FITOPATOGENIH BAKTERIJA NA MERKANTILNIM USEVIMA PASULJA U VOJVODINI

TATJANA POPOVIĆ¹, JELICA BALAZŽ¹, VELJKO GAVRILOVIĆ², GORAN ALEKSIĆ²

¹ POLJOPRIVREDNI FAKULTET, NOVI SAD

² INSTITUT ZA ZAŠTITU BILJA, BEOGRAD

U radu su proučavane bakterioze pasulja, njihovo prisustvo i intenzitet pojave na teritoriji Vojvodine. Izolacijama iz prikupljenih obolelih uzoraka pasulja (list) na standardne hranljive podloge, dobijene su kolonije *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* iz svih ispitivanih uzoraka i lokaliteta, što ukazuje na dominantno prisustvo ove bakterije na proizvodnim parcelama i okućnicama pasulja kod nas. Bakterija *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* je izolovana kod manjeg broja uzoraka, što pokazuje da nije široko rasprostranjena u našim uslovima gajenja pasulja. Identifikacija izolata ovih bakterija je dokazana korišćenjem klasičnih fitobakterioloških (patogene, morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike izolata) i brzih, savremenih metoda (serološke-ELISA i molekularne-PCR).

Ključne reči: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, pasulj, identifikacija

UVOD

Pasulj (*Phaseolus vulgaris* L.) ima veliki značaj u poljoprivrednoj proizvodnji i ishrani stanovništva u svetu i kod nas. U uslovima intenzivne proizvodnje, kod nas su i pored savremene tehnologije gajenja pasulja prinosi još uvek niski i kolebljivi (Vasić, 2004). Najčešći uzročnici ove pojave su fitopatogene bakterije, koje osim što redukuju i smanjuju kvalitet ukupnog prinosa pasulja, patogeni su i semena (seedborne), tako da prisustvo obolelih biljaka u semenskom usevu utiče na podobnost sertifikata semena, definisanog prema pravilnicima i regulativni (Frank, 1998).

Prema ranijim istraživanjima (Arsenijević i Balaž, 1984; Balaž, 1985, 1989), najveći problem u proizvodnji pasulja i boranije kod nas je bakterija *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Gardan et al. (oreolna plamenjača). U godinama sa prohladnim i kišovitim prolećem, u Vojvodini su beleženi slučajevi potpunog propadanja i preoravanja useva boranije (Balaž, 1989). U SAD-u ova bakterija je 1960-70-ih godina, uvođenjem u proizvodnju osetljivog sortimenta i trgovačkom razmenom semena na velike distance, dobila veliki ekonomski značaj, zbog čega je otpočet intenzivan rad na selekciji i stvaranju otpornih sorti boranije. Poslednjih decenija ova bakterioza ne predstavlja veći problem pri gajenju boranije kod nas. Tome su verovatno doprineli vremenski uslovi (nicanje i prve faze razvoja boranije uglavnom prati toplije i suvlje vreme), kao i izmena sortimenta boranije otpornog prema *P. s.* pv. *phaseolicola*. Balaž (1985) navodi da su iznalaženjem otpornijih i otpornih genotipova boranije štete od ove bakterije znatno smanjene.

Od sredine 1980-ih veći značaj ima fitopatogena bakterija *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin et al. (obična bakteriozna plamenjača) i njen varijetet *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Burkholder) Starr et Burkholder (fuskozna bakteriozna plamenjača), koja se kod nas sve više širi na pasulju tako da sada ima dominantan značaj (Balaž, 1996; Balaž i sar., 2005; Popović i sar., 2006, 2007; Todorović, 2006). 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). *X. a.* pv. *phaseoli* je termofilna vrsta, tako da nastavlja intenzivno širenje i tokom leta, naročito ukoliko je vreme kišovito, kada se često zapaža i potpuno sušenje useva (Balaž et al., 1995; Popović i sar., 2007). Simptomi koje prouzrokuje su veoma slični sušenju koje nastaje usled visokih temperatura, što otežava dijagnostiku. Prema EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), ova bakterija se nalazi na A2 listi karantinskih patogena (OEPP/EPPO, 2003).

Bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall (mrka bakteriozna pegavost) i *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins et Jones (bakteriozna uvelost i patuljavost) su kod nas konstatovane na pasulju (Tešić, 1946; Arsenijević i Paravil, 1988), ali u novijem periodu o prisustvu ovih bakterija nema podataka u našoj literaturi.

Cilj istraživanja ovog rada je da se utvrdi sadašnji status fitopatogenih bakterija koje se javljaju na pasulju u našim uslovima gajenja.

MATERIJAL I METODE RADA

Tokom 2006. godine vršen je pregled proizvodnih parcela pasulja u Vojvodini. Prikupljeni su uzorci obolelog lišća sa karakterističnim simptomima bakterioza sa različitih sorti iz 15 lokaliteta, poznatih po proizvodnji pasulja (Rimski Šančevi, Bački Jarak, Bački Petrovac, Gajdobra, Žabalj, Gospođinci, Kovilj, Ruma, Žarkovac, Stejanovci, Zrenjanin, Ravni Topolovac, Žitište, Kikinda, Melenci). S obzirom da su u polju simptomi bakterioza prouzrokovani različitim bakterijama na pasulju vrlo slični, za identifikaciju bakterija su neophodna detaljna laboratorijska ispitivanja (Lelliott i Stead, 1987; Frank, 1998; IPM, 2000).

Izolacija na hranjive podloge

Izolacija bakterija je vršena iz macerata biljnih fragmenata dobijenih sa prelaza zdravog i obolelog tkiva na hranjive podloge NA (Nutrient Agar; Fahy i Hayward, 1983), NSA (Nutrient Sucrose Agar; Lelliott i Stead, 1987) i YDC (Yeast Extract Dextrose Calcium Carbonate Agar; Schaad, 1988).

Nakon tri dana razvoja na hranljivim podlogama, pojedinačne bakterijske kolonije su presejane u epruvete, i to žute na kosu YDC podlogu, a bele na King B (King's B agar, King et al., 1954). Za dalji rad je odabrano 46 reprezentativnih izolata (tab. 1). Tokom izvođenja svih oglada korišćeni su izolati starosti 24-48 sati.

Za uporedna ispitivanja su korišćeni i kontrolni izolati bakterija *X. a. pv. phaseoli* (GSPB 1241, Goettinger Sammlung Phytopathogener Bakterien, Deutschland), *X. a. pv. phaseoli var. fuscans* (CFBP 6165, La Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, France), *P. s. pv. phaseolicola* (Ps12, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad), *P. s. pv. syringae* (GSPB Goettinger Sammlung Phytopathogener Bakterien, Deutschland) i *C. f. pv. flaccumfaciens* (NCPPB 559, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom).

Morfološke i odgajivačke odlike izolata

Reakcija po Gramu je izvedena pomoću KOH testa (Suslow et al., 1982). Izgled, boja, veličina i oblik kolonija posmatrani su gajenjem bakterija na NA i YDC tokom 3-5 dana pri temperaturi od 28°C. Za stvaranje zelenog pigmenta - fluorescenciju, korišćena je King B podloga. Stvaranje levana je praćeno na osnovu izgleda kolonija zasejanih bakterija na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze - NSA (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1997).

Patogene odlike izolata

Provera patogenosti ispitivanih izolata vršena je infiltracijom bakterijske suspenzije (koncentracije 10^6 - 10^7 ćel/ml) mladih mahuna boranije pomoću medicinske igle (Balaž et al., 1995).

Hipersenzitivna reakcija je ispitana na lišću duvana i muškatle, koje je inokulisano infiltracijom bakterijske suspenzije (koncentracije 10^7 - 10^8 ćel/ml) pomoću medicinske igle (Klement et al., 1990).

Biohemijsko-fiziološke odlike izolata

Za proučavanja biohemijsko-fizioloških odlika ispitivanih izolata izvedeni su sledeći testovi: aktivnost oksidaze (Kovacs, 1956), aktivnost katalaze (Dye, 1962), oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze (Hugh i Leifson, 1953), redukcija nitrata (Király et al., 1970), razlaganje želatina (Lelliott i Stead, 1987), hidroliza skroba i eskulina (Lelliott i Stead, 1987), stvaranje sumpor vodonika iz peptona (Goszczyńska et al., 2000), stvaranje indola (Király et al., 1970) i stvaranje kiseline iz ugljenih hidrata (Dye, 1968).

U radu su korišćeni i diferencijalni testovi za razlikovanje *P. s. pv. phaseolicola* od *P. s. pv. syringae* i to: hidroliza eskulina, razlaganje želatina i korišćenja sorbitola, inositola i eritritola kao izvora ugljenika (Lelliott i Stead, 1987).

Serološke metode identifikacije

Identifikacija izolata bakterija *X. a. pv. phaseoli* i *P. s. pv. phaseolicola* vršena je serološkim metodama PTA ELISA (Plate Trapped Antigen ELISA) i DAS ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA). Testovi su izvođeni prema uputstvima proizvođača antiseruma (ADGEN Phytodiagnosics, U.K. i LOEWE Biochemica GmbH, Germany). Kao pozitivne kontrole poslužili su kontrolni izolati, a kao negativna kontrola korišćena je bakterija *Erwinia amylovora* (NCPB 595). Za svaki izolat i kontrole korišćena su po dva otvora na ploči.

Očitavanje rezultata je vršeno pomoću ELISA čitača (BIO-TEK ELx800UV) na talasnoj dužini od 405 nm. Rezultati za svaki uzorak su preračunati kao prosečna vrednost dva ponavljanja (dva otvora), a pozitivnim su se smatrali svi uzorci čija je vrednost apsorpcije bila dva ili više puta veća od negativne kontrole.

Molekularne metode identifikacije

U cilju identifikacije izolata bakterija *X. a. pv. phaseoli* i *P. s. pv. phaseolicola*, korišćena je metoda lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction - PCR). Umnožavanje DNK fragmenata je vršeno u PCR aparatu (Mastercycler ep gradient S, Eppendorf, Germany). PCR proizvodi su razdvojeni elektroforezom na 2% agaroznom gelu, posmatrani na UV transiluminatoru i fotografisani. Na osnovu DNK markera (DNA Ladder Sigma, 50 baznih parova /bp/) određena je približna molekulska masa PCR proizvoda.

Determinacija izolata *X. a. pv. phaseoli* vršena je prema protokolu koji navode Audy et al. (1994) i Schaad et al. (2001) korišćenjem prajmera X4c: 5'-GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG-3' i X4e: 5'-CGC CCG GAA GCA CGA TCC TCG AAG-3' (Metabion GmbH, Germany), koji daju proizvod veličine 730 bp. Umnožavanje DNK fragmenata je vršeno po sledećem programu: inicijalna denaturacija DNK (94°C - 3 minuta) - 1 ciklus; denaturacija DNK (94°C - 1 minut), vezivanje prajmera (65°C - 1 minut), ekstenzija (72°C - 2 minuta) - 30 ciklusa; dodatna ekstenzija (72°C - 5 minuta) - 1 ciklus. Za pozitivnu kontrolu poslužili su kontrolni izolati *X. a. pv. phaseoli*, a za negativnu izolat bakterije *E. amylovora* (NCPFB 595). Pozitivnim je ocenjen svaki uzorak u kome je amplifikovan fragment veličine 730 bp.

Identifikacija bakterije *P. s. pv. phaseolicola* pomoću PCR-a vršena je prema protokolu koji navode Schaad et al. (1995, 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, čime je povećana osetljivost reakcije (Schaad et al., 2001). Za pripremu uzoraka DNK korišćena je modifikovana metoda amplifikacije gena za fazeolotoksin opisana od Güven et al. (2004). Prvi PCR je izveden sa prajmerima P 5.1: 5'-AGC TTC TCC TCA AAA CAC CTG C-3' i P 3.1: 5'-TGT TCG CCA GAG GCA GTC ATG-3', koji daju proizvod veličine 500 bp, a drugi sa P 5.2: 5'-TCG AAC ATC AAT CTG CCA GCC A-3' i P 3.2: 5'-GGC TTT TAT TAT TGC CGT GGG C-3', koji daju proizvod veličine 450 bp. Umnožavanje DNK fragmenata je vršeno u PCR aparatu po sledećem programu: inicijalna denaturacija DNK (80°C hold, 94°C - 3 minuta) - 1 ciklus; denaturacija DNK (94°C - 1 minut), vezivanje prajmera (58°C - 1 minut), ekstenzija (72°C - 1 minut) - 25 ciklusa; dodatna ekstenzija (72°C - 10 min) - 1 ciklus. Kao pozitivna kontrola korišćen je kontrolni izolat *P. s. pv. phaseolicola*, a kao negativna kontrola *E. amylovora* (NCPFB 595). Pozitivnim je ocenjen svaki uzorak u kome je amplifikovan fragment veličine 450 bp.

REZULTATI I DISKUSIJA

Pregledom proizvodnih parcela i okućnica pasulja u 15 lokaliteta u Vojvodini tokom 2006. godine, potvrđeno je da su bakterioze široko rasprostranjene na ovoj biljnoj vrsti. Intenzitet zaraze je bio različit, krećući se najčešće od 10-25%.

Na hranljivim podlogama NA, NSA i YDC, koje su se pokazale podesnim za izolaciju bakterija, su se iz svih ispitivanih uzoraka razvijale brojne žute kolonije, tipične za vrstu *X. a. pv. phaseoli*, a u ređim slučajevima i bele kolonije, koje su ukazivale na prisustvo bakterije *P. s. pv. phaseolicola* (tab. 1). S obzirom da je *X. a. pv. phaseoli* izolovana iz svih uzoraka i ispitivanih lokaliteta u Vojvodini, može se zaključiti da je ova bakterija dominantna i široko rasprostranjena na domaćem sortimentu pasulja, što je u skladu sa postojećim literaturnim izvorima objavljenim kod nas (Arsenijević i sar., 1985; Balaž, 1996; Todorović, 2006; Popović i sar., 2007). Obična bakteriozna plamenjača pasulja je rasprostranjena širom sveta i jedan je od glavnih ograničavajućih faktora uspešne proizvodnje ove biljne vrste (Mabagala i Saettler, 1992). *X. a. pv. phaseoli* prouzrokuje štete od 10-40%, u zavisnosti od osetljivosti sorte i uslova spoljašnje sredine (Saettler, 1989). Fourie (2003) navodi da je prilikom utvrđivanja pojave, rasprostranjenosti i štetnosti bakterioza pasulja tokom trogodišnjih istraživanja (1995-1998) na području Južne Afrike konstatovano prisustvo bakterije *X. a. pv. phaseoli* na 83-85% lokaliteta.

Bakterija *P. s. pv. phaseolicola* je izolovana samo iz tri uzorka (sorte Oplenac, Slavonski žutozeleni i Zlatko) u tri ispitivana lokaliteta, na osnovu čega se može zaključiti da oreolna plamenjača ne predstavlja veći problem pri gajenju pasulja kod nas. U prilog ovome može se istaći da su sorte Oplenac i Zlatko selekcionisane iz starih domaćih populacija pasulja, kao što je i Slavonski žutozeleni, te je u njima isključivo gerplazma dugo prisutna na ovim područjima, bez mešanja sa savremenim genetskim materijalom kojeg ima u ostalom sortimentu (Vasić, 2004).

Bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* nisu izolovane ni iz jednog ispitivanog uzorka.

XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. *PHASEOLI*

Simptomi bolesti

Početni simptomi na obolelom lišću pasulja se zapažaju u vidu sitnih vlažnih pega, koje se vremenom povećavaju, a centar postaje nekrotičan i mrk, često okružen uskim oreolom jasno žute boje (sl. 1a i 1b). Schwartz (2004) navodi da

se simptomi na pasulju koje prouzrokuje *X. a. pv. phaseoli* najčešće ispoljavaju na srednje-starom ili starijem lišću.

Infekcija stabla započinje pojavom vlažnih pega, koje kasnije dobijaju crvenkasto-bron boju, često bez hloroze (sl. 1c). S obzirom da se bakterija nalazi u ksilemu, u slučaju masovnog prisustva može se pojaviti i uvenuće.

Na zaraženim mahunama se takođe obrazuju vlažne pege, koje vremenom postaju ugnute, crvenkastomrke boje (sl. 1d). U uslovima visoke vlažnosti stvara se žućkast bakterijski eksudat.

Izolacija na hranljive podloge

Nakon tri dana razvoja na hranljivoj podlozi NA iz svih prikupljenih obolelih uzoraka pasulja obrazovane su kolonije okruglastog oblika, žute, sjajne, blago ispupčene, prečnika oko 1-2 mm. Na YDC podlozi su nakon tri dana razvoja formirane kolonije žute, okrugle, krupne, sluzaste, ispupčene i sjajne, prečnika oko 3-4 mm. Na hranljivoj podlozi NSA, nakon tri dana razvoja takođe su obrazovane bakterijske kolonije žute, krupne, sjajne, sluzaste, glatke, izrazito ispupčene, prečnika oko 3 mm. Za dalji rad je odabrano 40 reprezentativnih izolata: TX1, TX2, TX6, TX7, TX11, TX12, TX16, TX17, TX21, TX22, TX26, TX27, TX31, TX32, TX36, TX37, TX41, TX42, TX46, TX47, TX51, TX52, TX56, TX57, TX61, TX62, TX66, TX67, TX71, TX72, TX76, TX77, TX81, TX82, TX86, TX87, TX91, TX92, TX96 i TX97 (tab. 1).

Svi proučavani i kontrolni izolati *X. a. pv. phaseoli* su na kosoj YDC podlozi obrazovali žute i sluzaste kolonije. Samo se u slučaju kontrolnog izolata *X. a. pv. phaseoli* var. *fuscans* (CFBP 6165) posle više od 5 dana inkubacije, stvarao mrki pigment u podlozi.

Prema ranijim navodima (Bradbury, 1986) bakterija *X. a. pv. phaseoli* i varijetet *X. a. pv. phaseoli* var. *fuscans* su se smatrali istim patogenom. Međutim, u današnje vreme postoji podela u tri grupe: var. *fuscans*, koji stvara mrki pigment u podlozi obogaćenoj tirozinom (Goodwin i Sopher, 1994), var. *indica*, produkuje mrki pigment u podlozi koja nije obogaćena tirozinom (Dye, 1962; Bradbury, 1986) i *X. a. pv. phaseoli*, koji ne produkuje pigment u podlozi. Stvaranje mrkog pigmenta kod *X. a. pv. phaseoli* var. *fuscans* rezultat je lučenja i oksidacije homogenistične kiseline u procesu katabolize tirozina (Goodwin i Sopher, 1994).

Bakteriološke odlike

Morfološke i odgajivačke odlike – Rezultati ispitivanja morfoloških odlika su pokazali da su svi naši izolati štapićastog oblika sa monotrihim, polarnim ra-



Sl. 1. - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*: (a) simptom na listu, (b) masovna zaraza lišća, (c) simptom na stablu, (d) simptom na mahunama (foto Popović, T.)

Fig. 1. - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*: (a) symptom on the leaf, (b) mass leaves infection, (c) symptom on the stem, (d) symptom on the pods (photo Popović, T.)

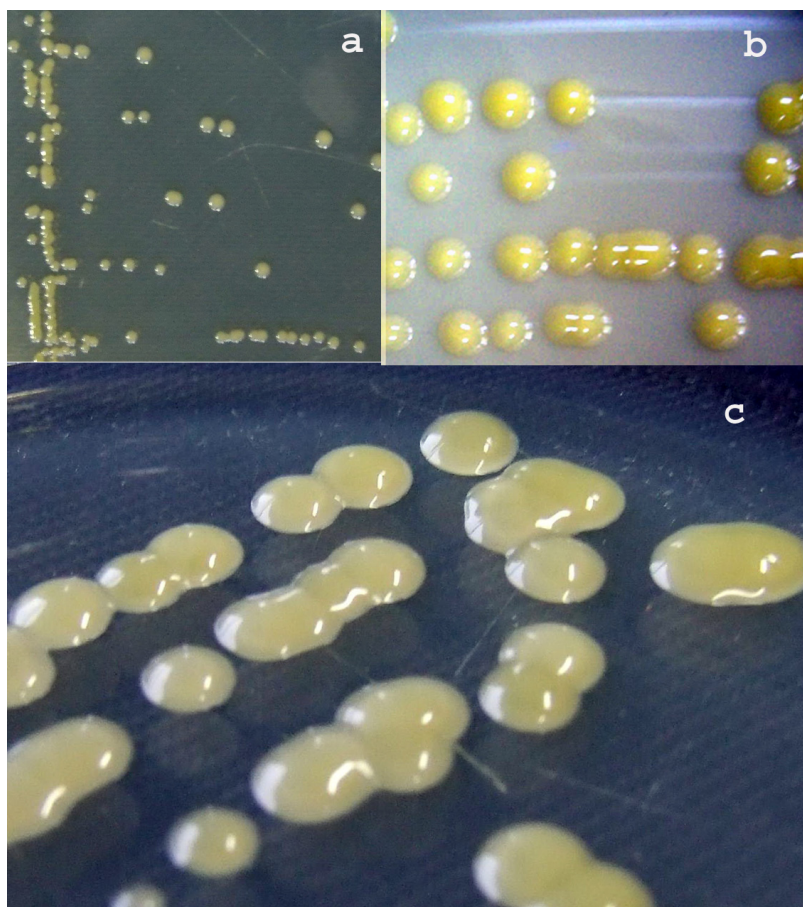
Tabela 1. - Izolacija iz obolelih uzoraka lista pasulja

Table 1. - Isolation from diseased samples of bean leaves

Šifra izolata Cipher of isolate	Boja kolonije Colonia colour	Lokalitet Locality	Sorta Cultivar
TX1	žuta - yellow	Rimski Šančevi	Zlatko
TX2	žuta - yellow	Rimski Šančevi	Zlatko
TX6	žuta - yellow	Rimski Šančevi	Oplenac
TX7	žuta - yellow	Rimski Šančevi	Oplenac
TP5	bela - white	Rimski Šančevi	Oplenac
TP6	bela - white	Rimski Šančevi	Oplenac
TX11	žuta - yellow	Bački Jarak	Domaća populacija
TX12	žuta - yellow	Bački Jarak	Domaća populacija
TX16	žuta - yellow	Gajdobra	Slavonski žutozeleni
TX17	žuta - yellow	Gajdobra	Slavonski žutozeleni
TP11	bela - white	Gajdobra	Slavonski žutozeleni
TP12	bela - white	Gajdobra	Slavonski žutozeleni
TX21	žuta - yellow	Bački Petrovac	Domaća populacija
TX22	žuta - yellow	Bački Petrovac	Domaća populacija
TX26	žuta - yellow	Žabalj	Dvadesetica
TX27	žuta - yellow	Žabalj	Dvadesetica
TX31	žuta - yellow	Gospodinci	Panonski tetovac
TX32	žuta - yellow	Gospodinci	Panonski tetovac
TX36	žuta - yellow	Kovilj	Bergold
TX37	žuta - yellow	Kovilj	Bergold
TX41	žuta - yellow	Kovilj	Belko
TX42	žuta - yellow	Kovilj	Belko
TX46	žuta - yellow	Kovilj	Sremac
TX47	žuta - yellow	Kovilj	Sremac
TX51	žuta - yellow	Kovilj	Dvadesetica
TX52	žuta - yellow	Kovilj	Dvadesetica
TX56	žuta - yellow	Kovilj	Zlatko
TX57	žuta - yellow	Kovilj	Zlatko
TP16	bela - white	Kovilj	Zlatko
TP17	bela - white	Kovilj	Zlatko
TX61	žuta - yellow	Ruma	Domaća populacija
TX62	žuta - yellow	Ruma	Domaća populacija
TX66	žuta - yellow	Žarkovac	Slavonski žutozeleni
TX67	žuta - yellow	Žarkovac	Slavonski žutozeleni
TX71	žuta - yellow	Stejanovci	Slavonski žutozeleni
TX72	žuta - yellow	Stejanovci	Slavonski žutozeleni
TX76	žuta - yellow	Ravni Topolovac	Spinel
TX77	žuta - yellow	Ravni Topolovac	Spinel
TX81	žuta - yellow	Žitište	Domaća populacija
TX82	žuta - yellow	Žitište	Domaća populacija
TX86	žuta - yellow	Zrenjanin	Domaća populacija
TX87	žuta - yellow	Zrenjanin	Domaća populacija
TX91	žuta - yellow	Kikinda	Sremac
TX92	žuta - yellow	Kikinda	Sremac
TX96	žuta - yellow	Melenci	Domaća populacija
TX97	žuta - yellow	Melenci	Domaća populacija

sporedom flagela, gramnegativni i asporogeni, odnosno ispoljavaju karakteristike koje za bakteriju *X. a. pv. phaseoli* navode i drugi autori (Hayward i Waterston, 1965; Pazos i Hevesi, 1975; Arsenijević, 1997; Balaž et al., 1995; Todorović, 2006; Karavina et al., 2008).

Svi ispitivani izolati obrazuju kolonije žute boje, koje su na NA podlozi sitne i sjajne, a na YDC i NSA krupne, sluzave i ispupčene (sl. 2a, 2b i 2c). Ovi podaci odgovaraju karakteristikama koje za bakteriju *X. a. pv. phaseoli* navode Pazos i Hevesi (1975), Balaž et al. (1995), Arsenijević (1997) i Todorović (2006).



Sl. 2. - Izgled kolonija *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* na hranljivim podlogama: (a) NA, (b) YDC, (c) NSA (foto Popović, T.)

Fig. 2. - View of colonia of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on medium: (a) NA, (b) YDC, (c) NSA (photo Popović, T.)

Patogene odlike - Na mladim inokulisanim mahunama boranije su se već trećeg dana nakon inokulacije u okviru tkiva infiltriranog suspenzijom ispitivanih izolata javile vlažne i masne pege. U okviru ovih vodenastih pega obrazovao se i žučkast bakterijski eksudat. Posle pet do šest dana od inokulacije, pege su postajale mrke, a tkivo u okviru njih se izdizalo u vidu "plika" i često pucalo, uz obrazovanje jasno izraženog prstena (oko pege) crvene boje. Ovaj metod inokulacije i pojavu karakterističnih simptoma pri proveru patogenosti izolata *X. a. pv. phaseoli* u svojim istraživanjima navode i Arsenijević i sar. (1985) i Balaž et al. (1995).

Hipersenzitivna reakcija na listu duvana i muškatle je bila negativna, što je i karakteristično za ovu bakteriju (Gilbertson et al., 1990; Todorović, 2006).

Biohemijsko-fiziološke odlike - Rezultati proučavanja biohemijsko-fizioloških odlika su pokazali da je kod svih ispitivanih izolata oksidaza negativna, katalaza pozitivna i da glukozu metabolišu samo u aerobnim uslovima, tj. oksidativnim putem (tab. 2). Izolati razlažu želatin, hidrolizuju skrob i eskulin i stvaraju sumpor vodonik iz peptona, a ne redukuju nitrate i ne stvaraju indol (tab. 2). Kiselinu stvaraju iz glukoze, manoze, saharoze, glicerina, maltoze, skroba i eskulina, a ne stvaraju iz dulcita, sorbitola i salicina (tab. 3). Rezultati proučavanja biohemijsko-fizioloških odlika u skladu su sa literaturnim podacima koje za bakteriju *X. a. pv. phaseoli* navode Dye (1962), Hayward i Waterston (1965), Pazos i Hevesi (1975), Arsenijević i sar. (1985), Gilbertson et al. (1990), Balaž et al. (1995), Abo-Elyousr (2006), Todorović (2006) i Karavina et al. (2008).

Serološke metode identifikacije

Na osnovu dobijenih rezultata PTA i DAS ELISA testova potvrđeno je da svi proučavani izolati reaguju sa specifičnim antitelima za *X. a. pv. phaseoli*. Prema literaturnim izvorima, od seroloških metoda za identifikaciju bakterije *X. a. pv. phaseoli* koristi se još i test difuznog agara (Trujillo i Saettler, 1979) i imunofluorescencija – IF (Malin et al., 1983; Shepard et al., 1989). Savremeni dijagnostički testovi (ELISA, IF) se u današnje vreme često koriste za brzu identifikaciju, kako izolata dobijenih sa hranljivih podloga tako i za utvrđivanje prisustva patogena u biljnom materijalu. Prednost seroloških metoda u odnosu na druge konvencionalne metode je u brzini i preciznosti izvođenja, ispitivanju većeg broja uzoraka (Trigalet et al., 1978) kao i u višem nivou specifičnosti i osetljivosti (Van Vuurde, 1987a, 1987b). Na tržištu su dostupni razni serološki testovi za identifikaciju *X. a. pv. phaseoli*, kako čistih kultura bakterije tako i patogena u biljnom materijalu (Express, Identikit, Fluorescan-IF, ELISA).

**Tabela 2. - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.
Biohemijsko-fiziološke odlike**

**Table 2. - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.
Biochemical-physiological characteristics**

Šifra izolata Cipher of isolate	Oksidaza Oxidase	Katalaza Catalase	O/F test O/F test	Redukcija nitrata Nitrate reduction	Razlaganje želatina Gelatine liquefaction	Hidroliza skroba Starch hydrolysis	Hidroliza eskulina Aesculin hydrolysis	Stvaranje H ₂ S H ₂ S production	Stvaranje indola Indole production
TX1	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX2	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX6	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX7	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX11	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX12	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX16	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX17	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX21	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX22	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX26	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX27	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX31	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX32	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX36	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX37	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX41	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX42	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX46	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX47	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX51	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX52	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX56	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX57	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX61	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX62	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX66	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX67	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX71	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX72	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX76	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX77	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX81	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX82	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX86	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX87	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX91	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX92	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX96	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
TX97	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
X24	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
GSPB 1241	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-
GSPB 1142	-	nt	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt
NCPBP 595	nt	nt	+/+	nt	nt	nt	nt	nt	nt
P.fl.	+	nt	+/-	nt	nt	nt	nt	nt	nt
E.coli	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	+

Legenda: + = pozitivna reakcija, - = negativna reakcija, nt = nije testirano, X24, GSPB 1241 = *X. a. pv. phaseoli*, GSPB 1142 = *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, NCPBP 595 = *Erwinia amylovora*, P.fl. = *Pseudomonas fluorescens*, E.coli = *Escherichia coli*

Legend: + = positive reaction, - = negative reaction, nt = not tested, X24, GSPB 1241 = *X. a. pv. phaseoli*, GSPB 1142 = *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, NCPBP 595 = *Erwinia amylovora*, P. fl. = *Pseudomonas fluorescens*, E.coli = *Escherichia coli*

Tabela 3. - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.
Stvaranje kiseline iz ugljenih hidrata

Table 3. - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.
Acid production from carbohydrates

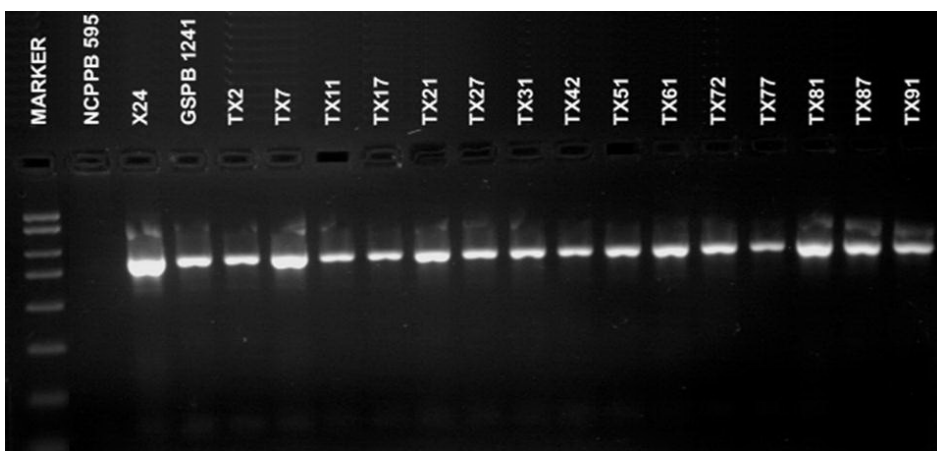
Šifra izolata Cipher of isolate	Stvaranje kiseline iz - Acid production from											
	glukoze glucose	manoze mannose	saharoze sucrose	glicerina glycerin	maltoze maltose	skroba starch	eskulina aesculin	dulcita dulcite	sorbitola sorbitol	salicina salicine		
TX1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX12	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX16	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX17	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX22	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX26	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX27	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX31	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX32	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX36	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX37	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX41	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX42	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX46	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX47	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX51	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX52	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX56	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX57	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX61	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX62	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX66	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX67	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX71	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX72	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX76	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX77	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX81	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX82	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX86	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX87	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX91	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX92	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX96	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TX97	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
X24	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
GSPB 1241	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Legenda: + = pozitivna reakcija, - = negativna reakcija, nt = nije testirano, X24, GSPB 1241 = *X. a. pv. phaseoli*

Legend: + = positive reaction, - = negative reaction, nt = not tested, X24, GSPB 1241 = *X. a. pv. phaseoli*

Molekularne metode identifikacije

Prema rezultatima PCR-a izvedenog sa prajmerima preporučenim od Audy et al. (1994) i Schaad et al. (2001), potvrđeno je da svi proučavani izolati pripadaju bakteriji *X. a. pv. phaseoli* jer je kao i kod kontrolnog izolata (GSPB 1241) amplifikovani fragmenti nukleinske kiseline veličine 730 bp (sl. 3). Amplifikaciju fragmenata DNA veličine 730 bp, korišćenjem prajmera X4c/X4e prilikom identifikacije bakterije *X. a. pv. phaseoli* takođe navode Halfeld-Vieira et al. (2001) i Todorović (2006).



Sl. 3. - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*: amplifikacija fragmenta DNA veličine 730 bp korišćenjem prajmera X4e/X4c (foto Popović, T.).

Fig. 3. - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*: amplification of a 730 bp DNA fragment using X4e/X4c primers (photo Popović, T.).

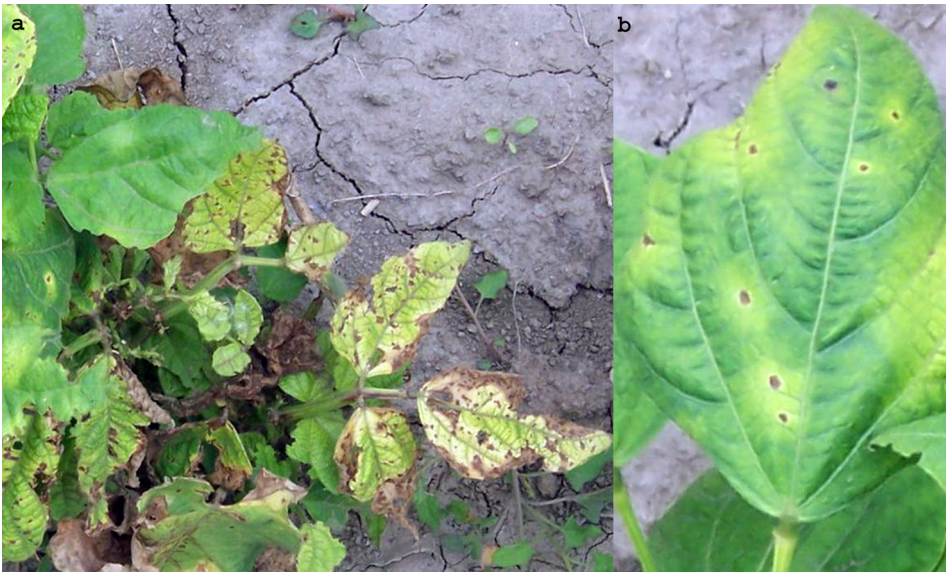
Specifična identifikacija *X. a. pv. phaseoli* je postignuta korišćenjem DNA hibridizacije (Gilbertson et al., 1989). Viši nivo osetljivosti se postiže pomoću PCR metoda, specifičnih za *X. a. pv. phaseoli* i *X. a. pv. phaseoli* var. *fuscans* (Audy et al., 1994). Ovom metodom moguće je brzo i pouzdano izvođenje kako identifikacije čistih kultura bakterija, tako i dokazivanje patogena u biljnom materijalu, pa samim tim u današnje vreme predstavlja najpouzdaniju, najbržu, najosetljiviju i najspecifičniju metodu detekcije patogena (Audy et al., 1994). PCR se može koristiti za detekciju i 1 cfu (colony-forming unit). Toth et al. (1998) navode PCR ogled specifičan za detekciju *X. a. pv. phaseoli* var. *fuscans* iz biljnog materijala, pomoću kojeg je moguća detekcija ove bakterije 10 dana pre nego što se pojave simptomi bolesti. Isti autori su za detekciju bakterije koristili prajmere Xf1 i Xf2 za amplifikaciju DNA fragmenata veličine 450 baznih parova, navodeći pri tom

da ovaj metod može poslužiti za diferencijaciju *X. a. pv. phaseoli* var. *fuscans* od *X. a. pv. phaseoli*. Rezultati nekoliko genetskih studija, zasnovanih na PCR, PFGE, RFLP i RAPD su pokazali da se *X. a. pv. phaseoli* var. *fuscans* genetski razlikuje od *X. a. pv. phaseoli*, te je predloženo razdvajanje u dve podgrupe i pripadanje posebnom taksonomskom statusu (Mkandawire et al., 2004).

PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *PHASEOLICOLA

Simptomi bolesti

Simptomi na obolelom lišću pasulja se uočavaju u vidu vlažnih pega koje vremenom prelaze u crvenkasto-braon boju i nekrotiraju. Često se oko nekrotičnih pega obrazuju krupni žuto-zeleni oreoli (sl. 4a i 4b). Tipičan simptom oreolne



Sl. 4. - *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*: (a) primarna infekcija, (b) - simptom na listu (Orig.)

Fig. 4. - *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*: (a) primary infection, (b) symptom on the leaf (Orig.)

plamenjače na listu rezultat je delovanja toksina tzv. fazeolotoksina, koji sadrži N-fosfosulfamilornitin kao glavnu funkcionalnu komponentu (Schwartz, 1989).

Sistemično zaražene biljke su žuto-zelene boje, često zaustavljenog porasta, menjajući pri tom svoj oblik. Na zaraženom stablu se stvaraju tipične masne pege. Simptom oreolne plamenjače na mahunama se javlja u vidu vlažnih, masnih pega, koje mogu varirati u veličini. Oko pega se često obrazuje mrka margina.

Izolacija na hranljive podloge

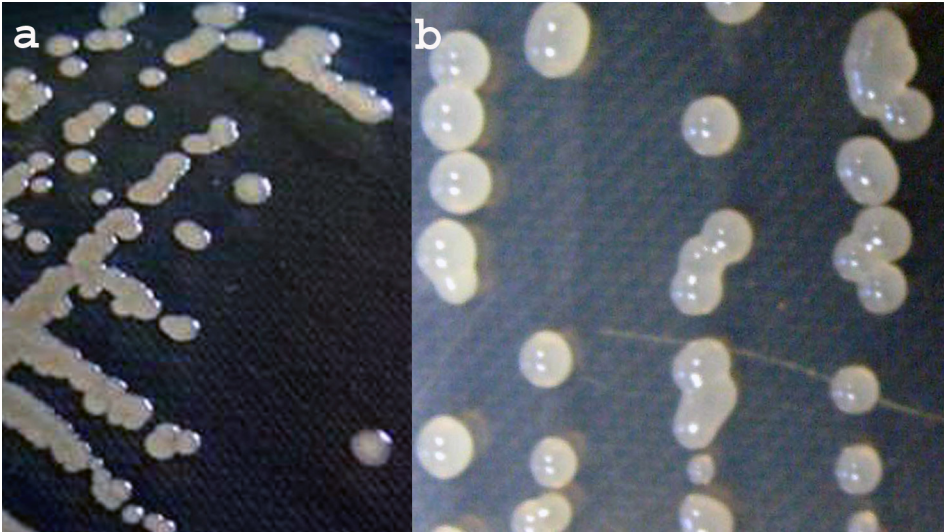
Iz tri obolela uzorka pasulja (sorte Oplenac, Zlatko i Slavonski žutozeleni), nakon tri dana razvoja na hranljivoj podlozi NA obrazovale su se kolonije bele boje, okruglastog oblika, ravne, prečnika oko 2 mm. Na hranljivoj podlozi NSA nakon tri dana razvoja obrazovale su se kolonije, biserno-bele, krupne, sluzave, konveksne, prečnika oko 3 mm, levane pozitivne. Karakterističan izgled kolonija bakterije *P. s. pv. phaseolicola* na podlogama NA i NSA navodi više autora (Balaž, 1985; Schaad, 1988; Arsenijević, 1997). Za dalji rad je odabrano 6 reprezentativnih izolata: TP5, TP6, TP11, TP12, TP16 i TP17 (tab. 1).

Bakteriološke odlike

Morfološke i odgajivačke odlike – Rezultati ispitivanja morfoloških odlika su pokazali da su svi naši izolati štapićastog oblika sa lofotrihim i amfitrihim rasporedom cilija, gramnegativni i asporogeni, odnosno ispoljavaju karakteristike koje za bakteriju *P. s. pv. phaseolicola* navode Balaž (1985) i Arsenijević (1997).

Svi ispitivani izolati su na NA podlozi obrazovali kolonije bele boje, sitne i ravne (sl. 5a), a na NSA podlozi kolonije su krupne, sluzave, ispučene, levane pozitivne (sl. 5b). Na hranljivoj podlozi King B svi izolati obrazuju zeleni fluorescentni pigment. Ovi rezultati odgovaraju karakteristikama koje za *P. s. pv. phaseolicola* navode Balaž (1985) i Arsenijević (1997).

Patogene odlike - Na inokulisanim mahunama boranije su se u okviru tkiva infiltriranog bakterijskom suspenzijom ispitivanih izolata trećeg dana nakon inokulacije pojavile vlažne i masne pege. U okviru pega se obrazovao beličast bakterijski eksudat posle nekoliko dana od inokulacije, a ivični deo je u većini slučajeva dobijao crvenkastu boju. Lelliott i Stead (1987) navode inokulaciju nezrelih mahuna pasulja za proveru patogenosti izolata bakterije *P. s. pv. phaseolicola*, a za pozitivnu reakciju ističu pojavu karakterističnih vlažnih pega. Balaž (1985) je prilikom provere patogenosti *P. s. pv. phaseolicola* koristila metod uboda iglom u perikarp mahuna u fazi pred nalivanje zrna, kao i metod prskanja pomoću atomizera na mlađim mahunama, pri čemu je utvrđeno da su najmlađe mahune najosetljivije.



Sl. 5. - Izgled kolonija *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* na hranljivim podlogama: (a) NA, (b) NSA (foto Popović, T.)

Fig. 5. - View of colonia of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on medium: (a) NA, (b) NSA (photo Popović, T.)

Svi ispitivani izolati su prouzrokovali hipersenzitivnu reakciju na lišću duvana i muškatele, koja se ispoljila tokom 24 časa od inokulacije, što je u skladu sa navodima drugih autora (Balaž, 1985; Van Vuurde i Van den Bovenkamp, 1989; Arsenijević, 1997).

Biohemijsko-fiziološke odlike - Prema rezultatima proučavanja biohemijsko-fizioloških karakteristika, utvrđeno je da ispitivani izolati ne stvaraju oksidazu, stvaraju katalazu i da pripadaju aerobnim bakterijama jer glukozu metabolišu samo u aerobnim uslovima, tj. oksidativnim putem (tab. 4). Izolati ne redukuju nitrate, ne stvaraju indol, ne razlažu želatin, ne hidrolizuju skrob niti eskulin i ne stvaraju sumpor vodonik iz peptona (tab. 4). Kiselinu stvaraju iz glukoze, manoze, saharaže, glicerina, a ne stvaraju iz maltoze, skroba, eskulina, dulcita, sorbitola, inositola i eritritola (tab. 5). Rezultati proučavanja biohemijsko-fizioloških odlika u skladu su sa literaturnim podacima koje za bakteriju *P. s.* pv. *phaseolicola* navode Sands et al. (1980), Fahy i Hayward (1983), Arsenijević i Balaž (1984), Balaž (1985, 1989), Lelliott i Stead (1987), Van Vuurde i Van den Bovenkamp (1989).

Na osnovu reakcija dobijenih korišćenjem diferencijalnih testova (Lelliott i Stead, 1987), utvrđeno je da svi ispitivani izolati pripadaju vrsti *P. s.* pv. *phaseolicola* jer ne hidrolizuju eskulin, ne razlažu želatin i ne koriste sorbitol, inozitol i

eritritol kao izvore ugljenika, dok kontrolni izolat vrste *P. s. pv. syringae* (GSPB 1142) hidrolizuje eskulin, razlaže želatinu i koristi sorbitol, inositol i eritritol kao izvore ugljenika (tab. 4 i 5).

Tabela 4. - *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*.
Biohemijsko-fiziološke odlike

Table 4. - *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*.
Biochemical-physiological characteristics

Šifra izolata Cipher of isolate	Oksidaza Oxidase	Katalaza Catalase	O/F test O/F test	Redukcija nitrata Nitrate reduction	Razlaganje želatina Gelatine liquefaction	Hidroliza skroba Starch hydrolysis	Hidroliza eskulina Aesculin hydrolysis	Stvaranje H ₂ S H ₂ S production	Stvaranje indola Indole production
TP5	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
TP6	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
TP11	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
TP12	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
TP16	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
TP17	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
Ps12	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
GSPB 1142	-	nt	nt	nt	nt	nt	+	nt	nt
GSPB 1241	nt	nt	nt	nt	+	+	nt	+	nt
NCPPB 595	nt	nt	+/+	nt	nt	nt	nt	nt	nt
P.fl.	+	nt	+/-	nt	nt	nt	nt	nt	nt
E.coli	nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	+

Legenda: + = pozitivna reakcija, - = negativna reakcija, nt = nije testirano, Ps12 = *P. s. pv. phaseolicola*, GSPB 1142 = *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, GSPB 1241 = *X. a. pv. phaseoli*, NCPPB 595 = *Erwinia amylovora*, P.fl. = *Pseudomonas fluorescens*, E.coli = *Escherichia coli*

Legend: + = positive reaction, - = negative reaction, nt = not tested, Ps12 = *P. s. pv. phaseolicola*, GSPB 1142 = *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, GSPB 1241 = *X. a. pv. phaseoli*, NCPPB 595 = *Erwinia amylovora*, P.fl. = *Pseudomonas fluorescens*, E.coli = *Escherichia coli*

Tabela 5. - *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*.
Stvaranje kiseline iz ugljenih hidrata**Table 5.** - *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*.
Acid production from carbohydrates

Šifra izolata Cipher of isolate	Stvaranje kiseline iz - Acid production from											
	glukoze glucose	manoze mannose	saharoze sucrose	glicerina glycerin	maltoze maltose	skroba starch	eskulina aesculin	dulcita dulcite	sorbitola sorbitol	inozitola inositol	eritritola erythritol	
TP5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
TP6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
TP11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
TP12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
TP16	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
TP17	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
Ps12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
GSPB 1142	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	+	+	

Legenda: + = pozitivna reakcija, - = negativna reakcija, nt = nije testirano, Ps12 = *P. s. pv. phaseolicola*,
GSPB 1142 = *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

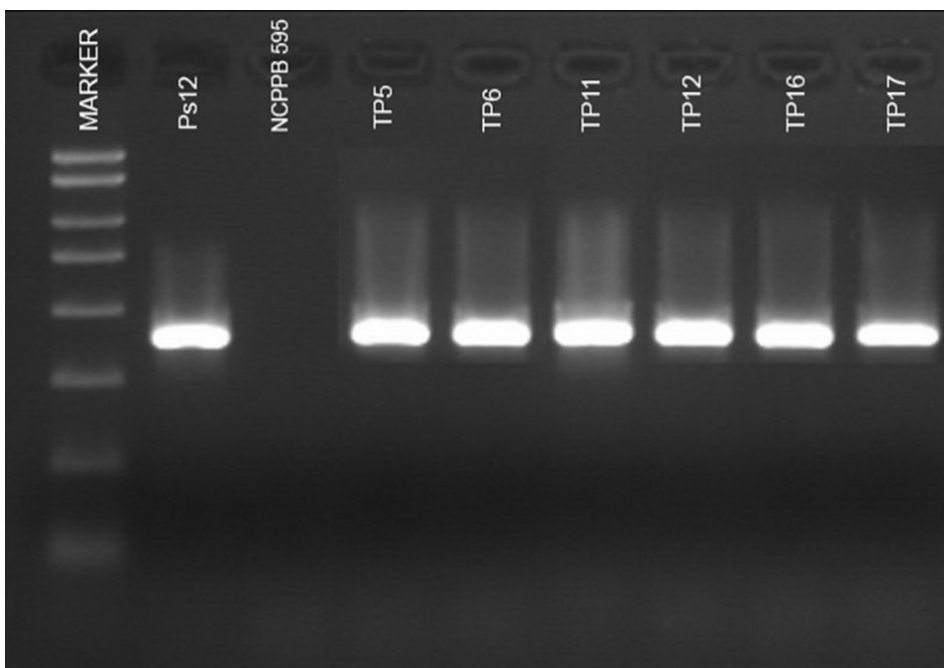
Legend: + = positive reaction, - = negative reaction, nt = not tested, Ps12 = *P. s. pv. phaseolicola*, GSPB 1142
= *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Serološke metode identifikacije

Prema rezultatima PTA i DAS ELISA testova utvrđeno je da su svi proučavani izolati reagovali sa specifičnim antitelima za *P. s. pv. phaseolicola*. Primenu ELISA testova za identifikaciju ove bakterije takođe navode Barzic i Trigalet (1982). Osim toga, u literaturi se navode i druge serološke metode identifikacije *P. s. pv. phaseolicola* i to: test aglutinacije (Guthrie et al., 1965), test difuznog agara (Guthrie et al., 1965) i imunofluorescencija (Van Vuurde i Van den Bovenkamp, 1989). Wyatt et al. (1989) takođe, navode primenu imunoloških metoda za brzu i specifičnu detekciju bakterije *P. s. pv. phaseolicola* i ističu da izolati ove bakterije ispoljavaju serološku uniformnost za razliku od drugih fitopatogenih bakterija. Razni serološki testovi za identifikaciju *P. s. pv. phaseolicola* (čistih kultura bakterije i patogena u biljnom materijalu) postoje na tržištu (Express, Identikit, Fluorescan-IF, ELISA).

Molekularne metode identifikacije

Rezultati izvedenog Nested PCR-a pokazuju da su kod svih proučavanih izolata amplifikovani fragmenti nukleinske kiseline veličine 450 bp, čime je potvrđeno da pripadaju bakteriji *P. s. pv. phaseolicola* (sl.6). Amplifikaciju gena za fazeolotoksin prilikom identifikacije bakterije *P. s. pv. phaseolicola* pomoću PCR-a navode Schaad et al. (1995) i Güven et al. (2004). Identifikaciju izolata *P. s. pv. phaseolicola* pomoću PCR navode i drugi autori (Borowicz et al., 2002; Rico et al., 2003).



Sl. 6. - *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*; amplifikacija fragmenta DNA veličine 450 bp iz fazeolotoksin gena korišćenjem prajmera P 5.1/P 3.1 i P 5.2/P 3.2 (foto Popović, T.)

Fig. 5. - *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*; amplification of a 450 bp DNA fragment from the phaseolotoxin gene using P 5.1/P 3.1 i P 5.2/P 3.2 primers (photo Popović, T.)

LITERATURA

- Abo-Elyousr, K.A.M. (2006): Induction of Systemic Acquired Resistance against Common Blight of Bean (*Phaseolus vulgaris*) Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Egypt. J. Phytopathol., Vol. 34, No.1, pp. 41-50.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. S Print, Novi Sad.
- Arsenijević, M., Balaž, J. (1984): *Pseudomonas phaseolicola* Burkholder (Dowson) (*Ps. syringae* pv. *phaseolicola* /Burkholder/ Young, Dye et Wilkie) kao parazit boranije i pasulja. Zaštita bilja, Vol. 35(3), 169: 283-291.
- Arsenijević, M., Balaž, J., Ozorak, G. (1985): *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye kao parazit boranije i pasulja u nas. Zaštita bilja, Vol. 36(3), 173: 273-285.
- Arsenijević, M., Paravil, M. (1988): Identifikacija nekih izolata bakterija poreklom sa pasulja. Zaštita bilja, Vol. 39(2), 184: 203-210.
- Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H.C., Gilbertson, R.L. (1994): 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.
- Balaž, J. (1985): Otpornost i priroda otpornosti boranije i pasulja prema *Pseudomonas phaseolicola* Burkholder (Dowson). Doktorski rad, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Balaž, J. (1989): Bakteriološke karakteristike i fiziološke rase *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye et Wilkie u Jugoslaviji. Zaštita bilja, Vol. 40 (2), 188: 187-194.
- Balaž, J. (1996): Bakterioze na pasulji i boraniji. Biljni lekar, 4: 337-342.
- Balaž, J., Popović, T., Vasić, M., Davidović, M. (2005): Utvrđivanje osetljivosti raznih genotipova *Phaseolus vulgaris* prema bakterijskoj plamenjači (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) na osnovu reakcije listnog tkiva. Sedmo savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar, str. 164-165.
- Balaž, J., Vasić, M., Pecić, J., Doroški, H. (1995): Contribution to the Study of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* as Parasite of Bean in Yugoslavia. Breeding and Cultivation of Wheat, Sunflower and Legume Crops in the Balkan Countries. Albena – IWS, Bulgaria, 356-359.
- Barzic, M.R., Trigalet, A. (1982): Detection de *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson par la technique ELISA. Agronomie, 2(4): 389-398.
- Borowicz, B.P., Mackowiak, A., Pospieszny, H. (2002): Improved Identification of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* at the Molecular Level. EPPO Bulletin, Vol. 32, 3: 467.
- Bradbury, J.F. (1986): Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International, Wallingford, UK.
- Dye, D.W. (1962): The Inadequacy of the Usual Determinative Tests for the Identification of *Xanthomonas* spp. N.Z.J. Sci., 5: 393-416.

- Dye, D.W. (1968): The taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The „amylovora“ group. N.Z.J. Sci. 11, 4: 590-607.
- Fahy, P.C., Hayward, A.C. (1983): Media and Methods for Isolation and Diagnostic Tests. In: Plant Bacterial Diseases, A Diagnostic Guide. Fahy, P.C., Persley, G.J. (ed). Academic Press, Australia.
- Fourie, D. (2003): Distribution and Severity of Bacterial Diseases on Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. Journal of Phytopathology, Vol. 150, 4-5: 220-226.
- Franc, G.D. (1998): Bacterial Diseases of Beans. Cooperative Extension Service, University of Wyoming.
- Gilbertson, R.L., Maxwell, D.P., Hagedorn, D.J., Leong, S.A. (1989): Development and application of a plasmid DNA probe for detection of bacteria causing common bacterial blight of bean. Phytopathology, 79(5): 518-525.
- Gilbertson, R.L., Rand, R.E., Hagedorn, D.J. (1990): Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *X. campestris* in bean debris. Plant Disease, 74(4): 322-327.
- Goodwin, P.H., Sopher, C.R. (1994): Brown pigmentation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* associated with homogentisic acid. Canadian Journal of Microbiology, 40: 28-34.
- Goszczyńska, T., Serfontein, J.J., Serfontein, S. (2000): Introduction to Practical Phytobacteriology. A Manual for Phytobacteriology by SAFRINET, the Southern African (SADC) LOOP of BioNET-INTERNATIONAL, p.83.
- Guthrie, J.W., Huber, D.M., Fenwick, H.S. (1965): Serological detection of halo blight. Plant Dis.Repr., 49: 297-299.
- Güven, K., Jones, J.B., Momol, M.T., Dickstein, E.R. (2004): Phenotypic and Genetic Diversity among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J.Phytopathology, 152: 658-666.
- Halfeld-Vieira, B.A., Souza, R.M., Figueira, A.R., Boari A.J. (2001): Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. Fitopatologia Brasileira, Vol. 26, 4: 737-740.
- Hayward, A.C., Waterston, J.M. (1965): *Xanthomonas phaseoli*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 48.
- Hugh, R., Leifson, E. (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by various Gram negative bacteria. J. Bact., 66: 24.
- IPM – Integrated Pest Management (2000): Bacterial Diseases of Beans. Report on Plant Disease, RPD No. 921. Department of Crop Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Karavina, C., Chihya, J., Tigere, T. A. (2008): Detection and Characterization of *Xanthomonas phaseoli* (E. F. SM) in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L) Seeds Collected in Zimbabwe. Journal of Sustainable Development in Africa, Vol. 10, 1: 105-119.

- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301-307.
- Király, Z., Klement, Z., Solymosy, F., Vöröš, J. (1970): *Methods in Plant Pathology*, Budapest.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (1990): *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Kovacs, N. (1956): Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178: 703.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987): *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Mabagala, R.B., Saettler, A.W. (1992): An improved semiselective medium for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Plant Disease*, 76(5): 443-446.
- Malin, E. M., Roth, D. A., Belden, E. L. (1983): Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. *Plant Disease*, 67: 645-647.
- Mkandawire, A.B.C., Mabagala, R.B., Guzmán, P., Gilbertson, R.L. (2004): Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen co evolution with the common bean. *Phytopathology*, 94: 593-603.
- OEPP/EPPO (2003): *Quarantine Pests for Europe*. Second Edition. CAB International.
- Pazos, V., Hevesi, M. (1975): Common blight of beans. *Revista Cenic*, 6, 2: 291-294.
- Popović, T., Balaž, J., Vasić, M. (2007): Rasprostranjenost bakterijske plamenjače pasulja (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) u Vojvodini. XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja sa međunarodnim učešćem, Zlatibor, 26-30. novembar, str. 91-92.
- Popović, T., Balaž, J., Vasić, M., Obradović, A., Ignjatov, M. (2006): Osetljivost nekih genotipova *Phaseolus vulgaris* prema *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* i *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. VIII Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 27. novembar – 1. decembar, str. 75-76.
- Rico, A., López, R., Asencio, C., Aizpún, M., Asensio-S.-Manzanera, C., Murillo, J. (2003): Nontoxigenic strains of *P. syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods. *Phytopathology*, 93: 1553–1559.
- Saettler, A.W. (1989): Assessment of yield loss caused by common blight of beans in Uganda. *Ann. Report of the Bean Imp. Coop.*, 35: 113-114.
- Sands, D.C., Schroth, M.N., Hildebrand, D.C. (1980): *Pseudomonas*. In: *Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Schaad, N.W. (ed.). APS Press, St. Paul Minnesota.

- Schaad, N.W. (1988): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Second Edition. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA, 164p.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (2001): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS PRESS, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Schaad, N.W., Cheong, S.S., Tamaki, S., Hatziloukas, E., Panopoulos, N.J. (1995): A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*, 85(2): 243-248.
- Schwartz, H.F. (1989): Halo blight. In: Schwartz HF, Pastor-Corralles MA, eds, Bean Production problems in the Tropics. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Schwartz, H.F. (2004): Bacterial Diseases of Beans. Crop Series Diseases 2.913.
- Sheppard, J.W., Roth, D.A., Saettler, A.W. (1989): Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Bean. In: Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material ed Saettler, A. W., Schaad, N. W., Roth, D. A., pp. 17-29.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N., Isaka, M. (1982): Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72: 917-918.
- Tešić, Ž. P. (1946): Bakterioze našeg pasulja. Arhiv za poljoprivredne nauke, God.I, 1-44.
- Todorović, B. (2006): Bakteriološke karakteristike *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, patogena pasulja u Srbiji i mogućnosti suzbijanja. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Toth, I.K., Hyman, L.J., Taylor, R., Birch, P.R.J. (1998): PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. *Journal of applied microbiology*, Vol. 85, 2: 327-336.
- Trigalet, A., Samson, R., Coleno, A. (1978): A Problems Related to the Use of Serology in Phytobacteriology. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 271-288. Angers.
- Trujillo, G.E., Saettler, A.W. (1979): A combined semi-selective medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. *J. Seed Technol.*, 4: 35-41.
- Van Vuurde, J.W.L. (1987a): Detecting Seedborne Bacteria by Immunofluorescence. Proceedings of the 6th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 779-808. Martinus Nijhoff Publishers.
- Van Vuurde, J.W.L. (1987b): New Approach in Detecting Phytopathogenic Bacteria by Combined Immunoisolation and Immunoidentification Assay. *EPPO Bull.*, 17: 139-148.

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

Vasić, M. (2004): Genetička divergentnost pasulja. Zadužbina Andrejević.

Wyatt G.M., Turner, J.G., Morgan, M.R.A. (1989): Rapid and Specific Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by Immunological Methods. Food and Agric. Immun., 1: 53-63.

(Primljeno: 01.07.2009.)

(Prihvaćeno: 16.11.2009.)

DISTRIBUTION AND CHARACTERIZATION OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA ON COMMERCIAL BEAN CROP IN VOJVODINA

TATJANA POPOVIĆ¹, JELICA BALAZI¹, VELJKO GAVRILOVIĆ², GORAN ALEKSIĆ²

¹ Agricultural Faculty, Novi Sad

² Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

SUMMARY

The present paper discusses the occurrence and severity of bacterial bean diseases in the Serbian province of Vojvodina. Leaf samples of diseased bean plants were collected from a number of locations in the province. All the samples from all the locations tested positive for *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, indicating that the bacterium is widespread on commercial plots and gardens planted to bean in Vojvodina. The bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* was isolated from a smaller number of samples, which shows that it is not widespread on bean in the province. Identification of the isolates was confirmed using the classic phytobacterial methods (for the pathogenic, morphological, breeding and biochemical-physiological characteristics of the isolates) as well as the rapid modern methods (ELISA for serological and PCR for molecular properties).

Key words: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, bean, identification

(Received: 01.07.2009.)

(Accepted: 16.11.2009.)