

Identifikacija *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Dye 1978 b, klasičnim bakteriološkim, serološkim i molekularnim metodama

Biljana Todorović¹, Jelica Balaz², Svetlana Milijašević¹, Bojan Duduk¹
i Emil Rekanović¹

¹Institut "Srbija", Centar za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd – Zemun i

²Poljoprivredni fakultet, Departman za zaštitu bilja, Novi Sad

REZIME

Bakterije su izolovane iz uzoraka biljaka pasulja sa nekrotičnim pegama na listu i udubljenim pegama ispunjenim bakterijskim eksudatom na mahunama, prikupljenim tokom 2003. i 2004. godine sa raznih lokaliteta gajenja ovog povrća kod nas.

Ispitivane su patogene, morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke karakteristike sojeva izolovanih bakterija. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da naši sojevi, pripadaju bakteriji *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Dye 1978b, prouzrokovaču obične plamenjače pasulja, veoma rasprostranjenom patogenu ove gajene biljke.

Primenom PTA ELISA metode, utvrđeno je da naši odabrani sojevi reaguju sa antitelima specifičnim za *X. c. pv. phaseoli*. Na ovaj način je identifikacija sojeva bakterije, urađena klasičnim bakteriološkim metodama, potvrđena i serološkom metodom.

Primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) upotrebom X4c/X4e para prajmera specifičnih za detekciju *X. c. pv. phaseoli*, došlo je do amplifikacije produkata očekivane veličine od 730 bp, čime je i ovom metodom potvrđeno da su izolovane bakterije *X. c. pv. phaseoli*.

U ovom radu su prvi put u Srbiji primenjene molekularne metode u identifikaciji bakterije *X. c. pv. phaseoli*, prouzrokovača obične plamenjače pasulja.

Ključne reči: Obična plamenjača; pasulj; *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*; identifikacija; PTA ELISA; PCR.

UVOD

Pasulj (*Phaseolus vulgaris* L.) spada u najznačajnije povrtnarske biljne vrste gajene kod nas. Međutim, proizvodnja pasulja veoma često je praćena pojavom prouzrokovaca bolesti bakteri-ozne prirode (Arsenijević i Balaž, 1974; Arsenijević i Balaž, 1980; Arsenijević, 1982; Arsenijević i Balaž, 1982).

Kao mogući prouzrokovaci bolesti pasulja bakteri-ozne prirode najčešće se navode prouzrokovaci obične plamenjače pasulja, *X. c. pv. phaseoli* (Smith 1897) Dye 1978b, i njegov varijetet *X. c. pv. phaseoli* var. *fuscans*, kao i prouzrokovac masne pegavosti, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Intenzitet oboljenja koje ove bakterije prouzrokuju, varira u zavisnosti od bioloških i klimatskih faktora, kao i primenjenih mera zaštite pasulja (Fourie, 2002).

Obična plamenjača pasulja ozbiljno ugrožava proizvodnju ove kulture širom sveta, a naročito je destruktivna tokom produženih perioda toplog i vlažnog vremena, redukujući prinos i smanjujući kvalitet semena (Wallen i Galway, 1977). Gubici od prouzrokovaca obične plamenjače pasulja procenjuju se na 10-40% kod osetljivih sorti. Iako postoje brojne hemijske i agrotehničke mere suzbijanja, uključujući i proizvodnju zdravog semena, efikasno suzbijanje nije uvek moguće, posebno u zemljama u razvoju i tropskim predelima gde je intenzitet oboljenja visok. Za razvoj uspešnih programa stvaranja otpornih sorti pasulja prema bakteri-oznoj pegavosti, neophodna je pouzdana identifikacija prouzrokovaca bolesti u određenim rejonima i na određenim sortama pasulja (Opio i sar., 1996).

U novije vreme identifikacija *X. c. pv. phaseoli* uglavnom se zasniva na: izolaciji bakterija na poluselektivne podloge (Claflin i sar., 1987; Mabagala i Saettler, 1992), korišćenju savremenih seroloških metoda kao što su imunofluorescentna metoda i imunoenzim- ska metoda na ploči (ELISA) (Lelliott i Stead, 1987; Schaad i sar., 2001) i reakcije lančanog umnožavanja specifičnog fragmenta nukleinske kiseline - PCR (Polymerase Chain Reaction) (Audy i sar., 1994; Audy i sar., 1996; Toth i sar., 1998).

Pojavom ELISA testa i imunofluorescentne metode skraćeno je vreme potrebno za detekciju *X. c. pv. phaseoli*. ELISA test ima prednosti u odnosu na druge serološke, kao i klasične metode, prilikom

ispitivanja većeg broja uzoraka (McLaughlin i Chen, 1990; Schaad i sar., 2001).

Uvođenjem savremenih molekularnih metoda, posebno metode lančane reakcije polimeraze (PCR), otkrivene su najbrže, najosetljivije i najspecifičnije metode za detekciju *X. c. pv. phaseoli* do sada (Audy i sar., 1994). Kloniranjem i delimičnim sekvencioniranjem dela DNA plazmida veličine 3,4 kb, Audy i saradnici (1994) dizajnirali su prajmere za reakciju lančanog umnožavanja specifičnog fragmenta nukleinske kiseline *X. c. pv. phaseoli* veličine 730 baznih parova (bp).

Prajmeri specifični za detekciju patogena *X. c. pv. phaseoli* nazivaju se X4c/X4e (Audy i sar., 1994; Schaad i sar., 2001). Međutim, ima podataka da se korišćenjem ovih prajmera ne mogu detektovati svi sojevi *X. c. pv. phaseoli* (Audy i sar., 1994; Toth i sar., 1998).

U ovom radu prikazana je identifikacija prouzrokovaca obične plamenjače pasulja standardnim fitobakteriološkim metodama, PTA ELISA metodom i metodom lančane reakcije polimeraze (PCR).

MATERIJAL I METODE

Izolacija patogena

Uzorci biljaka pasulja, sa karakterističnim simptomima bolesti, prikupljeni su sa raznih lokaliteta u Srbiji tokom 2003. i 2004. godine. Patogen je izolovan iz fragmenata lista, stabla ili mahuna, uzetih na prelazu zdravog i obolelog tkiva. Primenjen je standardni metod izolacije, razmazom pripremljene suspenzije na čvrstu podlogu od kvasčevog ekstrakta, glukoze i CaCO₃ (YDC) u Petri kutijama (Arsenijević, 1997).

Za dalja proučavanja odabrane su pojedinačne žute, sluzaste kolonije koje su presejane na zakošenu YDC podlogu u epruvetama. U svim testovima korišćene su čiste kulture bakterije gajene na YDC podlozi, pri 25°C tokom 24-48 sati. Kao kontrola korišćen je identifikovan soj bakterije *X. c. pv. phaseoli* (5834) iz Bugarske (dobijen od dr Ivana Kiryakova, Dobruža Agricultural Institute, General Toshevo, Bulgaria) (Tabela 1).

Provera patogenosti

Nastanak delimično udubljenih, krupnih pega, ispunjenih eksudatom na mahunama boranije,

Tabela 1. Proučavani sojevi bakterije poreklom iz listova, mahuna i stabla pasulja**Table 1.** Investigated strains originated from bean leaves, pods and stems

Redni broj Number	Soj Strain	Lokalitet Locality	Biljni organ Plant organ
1.	VS-1	Veliko Selo	stablo (stem)
2.	VS-3	Veliko Selo	stablo (stem)
3.	ZA-15	Zaječar	mahuna (pod)
4.	ZA-16	Zaječar	mahuna (pod)
5.	RŠ-5	Rimski Šančevi	list (leaf)
6.	BP-20	Bačka Palanka	mahuna (pod)
7.	Tel-32	Telečka	list (leaf)
8.	PUT-60	Putinci	stablo (stem)
9.	PA-70	Pančevo	list (leaf)
10.	PA-73	Pančevo	list (leaf)

proveren je infiltracijom suspenzije proučavanih sojeva (10^7 ćel/ml). Mahune korišćene kao kontrola infiltrirane su vodom. Inokulisane i kontrolne mahune održavane su u vlažnoj sredini u Petri kutijama (prečnika 16 cm) na 25°C , u laboratorijskim uslovima.

Patogene odlike ispitivanih sojeva proverene su i veštačkom inokulacijom mladih biljaka pasulja. Biljke pasulja u fazi razvoja prvog trolista, inokulisane su prskanjem suspenzijom bakterija (10^8 ćel/ml) ručnom prskalicom. Kontrolne biljke su tretirane, na isti način, vodom. Inokulisane i kontrolne biljke postavljene su u vlažnu komoru tokom 48 sati, a potom održavane u kontrolisanim uslovima na temperaturi od 25°C , relativnoj vlažnosti vazduha 35–40 %, u uslovima dugog dana (16 sati svetla).

Klasične metode

Bakteriološke karakteristike

Primenom standardnih testova (Arsenijević, 1997; Klement i sar., 1990; Schaad i sar., 2001) u cilju identifikacije patogena, proučene su sledeće bakteriološke karakteristike izolovanih sojeva: reakcija po Gramu, izgled kolonija na podlozi od kvasčevog ekstrakta, glukoze i CaCO_3 (YDC), oksidativno-fermentativno razlaganje glukoze, hidroliza želatina i eskulina, razlaganje skroba, redukcija nitrata, stvaranje oksidaze i katalaze, tolerantnost prema 0.02% i 0.1% trifetil-tetrazolijum hloridu, stvaranje kiseline iz ugljenih hidrata, stvaranje

levana i lipolitička aktivnost, odnosno stvaranje fermenta lipaze.

Serološke metode

Za identifikaciju 10 reprezentativnih sojeva odabranih sa svih analiziranih lokaliteta korišćena je serološka metoda PTA ELISA (Plate Trapped Antigen ELISA). U metodi je korišćen poliklonalni antiserum specifičan za detekciju *X. c. pv. phaseoli* (kit Adgen Phytodiagnostics, Scotland). PTA ELISA urađena je prema uputstvu proizvođača. Apsorpcija je merena na talasnoj dužini od 405 nm u spektrofotometru (Universal Microplate Reader EL x 800 Biotek Instruments, USA). Rezultati po uzorku i kontrolama su računati kao prosečna vrednost apsorpcije dva odgovarajuća „bunarčića”. Pozitivnom reakcijom je smatrana vrednost apsorpcije koja je dva i više puta veća od apsorpcije negativne kontrole.

Molekularne metode

Kao uzorak DNK korišćene su cele bakterijske ćelije bez prethodne izolacije DNK, iz suspenzije bakterije koncentracije 10^8 ćel/ml. Koncentracija suspenzije podešena je korišćenjem Mc Farlandove skale, a potvrđena tehnikom zasejavanja razređenja inokuluma i brojanja bakterija koje su se razvile na mesopeptonskoj podlozi posle 48 sati (Klement i sar., 1990).

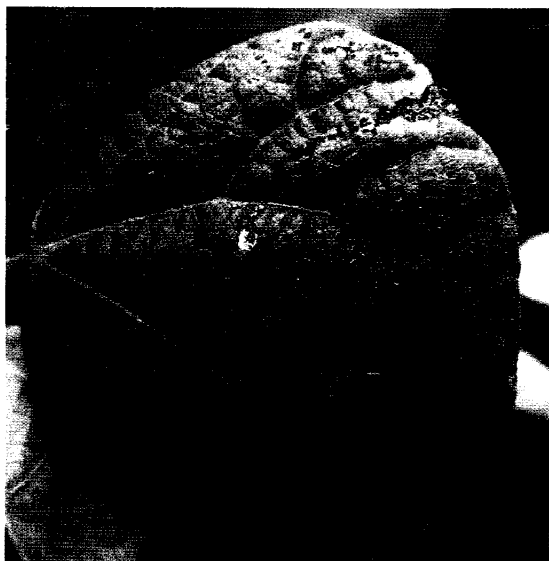
U lančanoj reakciji polimeraze korišćen je X4c (5'-GGCAACACCCGATCC CTAAAACAGG-3') / X4e (5'-CGCCGGAAGCACGATCCTC-

GAAG-3') par prajmera koji su opisali Audy i saradnici (1994). Svaka reakciona PCR smeša, ukupne zapremine 25 μ l, sadržala je 1 μ l bakterijske suspenzije koncentracije 10^8 ćel/ml, 1X PCR Master mix (Fermentas) (0.625 U Taq polimeraze, 2 mM $MgCl_2$, po 0.2 mM svakog dNTP) i po 0.4 μ M oba prajmera. Uslovi za izvođenje PCR reakcije su bili: 35 ciklusa (u aparatu Ependorf, Master Cycler), minut (dva minuta za prvi ciklus) denaturacija na 95°C, minut vezivanje prajmera na 65°C i dva minuta (10 minuta za poslednji ciklus) elongacija prajmera na 72°C. Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata urađeno je u jednoprocenatnom agaroznom gelu. Gel je bojen etidumbromidom i posmatran u UV transiluminatoru.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Simptomi oboljenja javljaju se na svim nadzemnim delovima biljaka pasulja. Najčešće promene uočavaju se na lišću i mahunama. Na lišću se uočavaju prozračne, vlažne svetlozelene pege na naličju koje tokom daljeg razvoja bolesti, postaju mrke, nekrotične i okružene uzanim hlorotičnim prstenom prečnika do 5mm (Slika 1). Širenjem i spajanjem ovakvih pega nastaju velike nekrotične površine koje često zahvataju ceo list. Ovakvo lišće se često cepa.



Sl. 1. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: Simptomi na lišću pasulja

Fig. 1. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: Symptoms on bean leaves

Na mahunama se najpre zapažaju vlažne, tamnozelenke pege. One se spajaju i nepravilno šire. Tkivo u okviru pega se neznatno udubljuje i ispunjava bakterijskim eksudatom. Takođe, oko pega se formira crvenkast prsten što je karakteristično za ovu bakteriozu (Slika 2).



Sl. 2. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: Simptomi na mahuni pasulja

Fig. 2. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: Symptoms on bean pod

Kod mladih biljaka na stablu nastaju sitne i vlažne pege, a kod starijih mrke, nekrotične pruge, usled kojih se biljke lome i izumiru.

Patogenost ispitivanih sojeva

Proučavani sojevi prouzrokovali su vlažne pege na mahunama 48 sati nakon infiltracije suspenzije bakterije. Prvi simptomi na inokulisanim listovima biljaka pasulja, uočeni su pet dana posle inokulacije. Na naličju lista zapažaju se sitne i vlažne, zelene pege. Kasnije, na licu lista nastaju manje nekrotične pege sa žutom ivicom. Pege se nepravilno šire pokrivajući ceo list, koji na kraju opada.

Identifikacija bakterije klasičnim metodama

Sojevi bakterija izolovani iz uzoraka biljaka pasulja poreklom iz Srbije, pokazali su identične bakteriološke osobine. Na podlozi od kvasčevog ekstrakta, glukoze i $CaCO_3$, tri dana od zasejavanja, kolonije su okrugle, sjajne, sluzaste, žute boje, prečnika 2-3 mm; na podlozi sa 5% saharoze kolonije su sjajne, ispupčene i sluzaste, žute boje, dok se na podlozi koja sadrži 0.02 % i 0.1% TTC ne razvijaju.

Bakterije proučavanih sojeva su Gram-negativne, a glukozu razlažu oksidativnim putem. Sojevi iz pasulja ne prouzrokuju trulež kriški krompira.

Tabela 2. Karakteristike sojeva *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli***Table 2.** Characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* strains

Test - Test	Proučavani sojevi Investigated strains	Kontrolni soj Control strain <i>X. c. pv. phaseoli</i> (5834)
Poreklo - Origin	Srbija - Serbia	Bugarska - Bulgaria
Domaćin - Host	pasulj - bean	pasulj - bean
Bojenje po Gramu - Gram stain	-	-
Sluzast razvoj na podlozi sa CaCO ₃ Mucoid growth on YDC	+	+
O/F metabolizam glukoze Glucose (O/F) metabolism	O	O
Razlaganje želatina Gelatin liquefaction	+	+
Hidroliza eskulina Aesculin hydrolysis	+	+
Stvaranje kiseline iz: Acid production from:		
• d-glukoze (d-glucose)	+	+
• d-arabinoze (d-arabinose)	+	+
• trehaloze (trehalose)	+	+
• saharoze (sucrose)	+	+
• fruktoze (fructose)	+	+
• laktoze (lactose)	+	+
• galaktoze (galactose)	+	+
• manoze (manose)	+	+
• manitola (manitol)	-	-
• inozita (inosit)	-	-
Trulež kriški krompira Pectolitic activity	-	-
Hidroliza skroba - Starch hydrolysis	+	+
Redukcija nitrata - Nitrate reduction	-	-
Aktivnost oksidaze - Oxidase activity	-	-
Stvaranje katalaze Catalase production	+	+
Porast na - Growth on:		
• 0,02% TTC	-	-
• 0,1% TTC	-	-
Lipolitička aktivnost Lipase production	+	+
Stvaranje mrkog pigmenta Brown pigment production	-	-
Stvaranje levana - Levan production	+	+
Stvaranje NH ₃ - NH ₃ production	+	+
Stvaranje H ₂ S - H ₂ S production	+	+

Legenda: + = pozitivna reakcija; - = negativna reakcija; YDC = podloga od kvašćevog ekstrakta, glukoze i CaCO₃; O/F = oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze; TTC = trifenil-tetrazolium-hlorid.

Legend: + = Positive reaction; - = Negative reaction; YDC = Yeast dextrose chalk medium; O/F = Oxidative-fermentative metabolism of glucose; TTC = Triphenyl-tetrazolium chloride.

Ispitivani sojevi stvaraju amonijak i vodonik-sulfid, ali ne poseduju sposobnost redukcije nitrata.

Proučavani sojevi kao i kontrolni soj *X. c. pv. phaseoli* (5834) iz Bugarske, razlažu želatin i eskulin, stvaraju fermente katalazu, lipazu i amilazu, ali ne stvaraju oksidazu; metabolišu d-glukozu, d-arabinozu, trehalozu, saharozu, fruktozu, galaktozu manozu i laktozu. Sojevi iz pasulja ne koriste polihidroksilne alkohole manitol i inozitol (Tabela 2). Na osnovu dobijenih rezultata, svi proučavani sojevi poseduju karakteristike bakterije *X. c. pv. phaseoli*.

Identifikacija bakterije serološkim metodama

Primenom PTA ELISA metode, pozitivna serološka reakcija sa antiserumom specifičnim za *X. c. pv. phaseoli* zabeležena je sa svim ispitivanim sojevima izolovanim iz pasulja, kao i kontrolnim sojem *X. c. pv. phaseoli* (5834) (Tabela 3).

Tabela 3. Detekcija sojeva bakterija pomoću PTA ELISA testa primenom antiseruma specifičnog za *X. c. pv. phaseoli*

Table 3. Detection of bacterial strains using PTA ELISA test with antiserum specific for *X. c. pv. phaseoli*

Soj Strain	PTA ELISA test
VS-1	+
VS-3	+
ZA-15	+
ZA-16	+
RŠ-5	+
BP-20	+
Tel-32	+
Put-60	+
PA-70	+
PA-73	+
5834	+
K +	+
K -	-

Legenda: K+ = pozitivna kontrola; K- = negativna kontrola; 5834 = kontrolni soj *X. c. pv. phaseoli*; + = pozitivna reakcija; - = negativna reakcija

Legend: K+ = positive control; K- = negative control; 5834 = control strain of *X. c. pv. phaseoli*; + = positive reaction; - = negative reaction



Sl. 3. Vizualizacija ampikona veličine 730 bp, dobijenih korišćenjem X4c/X4e para prajmera u 1% agaroznom gelu. M = 100 bp marker; 1-10 = ispitivani sojevi *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*; 11 i 12 = negativne (vodene) kontrole; 13 = kontrolni soj *X. c. pv. phaseoli* (5834) iz Bugarske.

Fig. 3. Agarose gel showing results of polymerase chain reaction (PCR) amplification obtained with X4c/X4e primer pair. M = 100 bp marker; 1-10 = tested strains of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*; 11 i 12 = negative (water) controls; 13 = control strain of *X. c. pv. phaseoli* (5834) from Bulgaria.

Pojava pozitivne reakcije, registrovana je merenjem promene boje pomoću spektrofotometra.

Identifikacija bakterije molekularnim metodama

Fragmenti očekivane veličine od 730 bp dobijeni su amplifikacijom svih 10 sojeva bakterije *X. c. pv. phaseoli* izolovanih iz biljaka pasulja poreklom iz Srbije, kao i kod kontrolnog soja *X. c. pv. phaseoli* (5834) iz Bugarske. Do amplifikacije nije došlo kod negativnih (vodenih) kontrola (Slika 3).

DISKUSIJA

Proizvodnja pasulja često je ugrožena pojavom raznih parazita, prouzrokovaca bolesti ove povrtarske gajene biljke. Pored mikoza i viroza, značajno mesto zauzimaju i bakterijska oboljenja. Više vrsta bakterija prouzrokuju patološke promene na parazitiranim biljkama pasulja; *X. c. pv. phaseoli*, *P. s. pv. phaseolicola*, *P. s. pv. syringae* i *Corynebacterium flaccumfaciens* (Arsenijević i Balaž, 1980; Arsenijević, 1982; Arsenijević i Balaž, 1982). Prema podacima iz literature, po rasprostranjenosti i štetnosti, pored *P. s. pv. phaseolicola*, najznačajnija je bakterija *X. c. pv. phaseoli*, prouzrokovac obične plamenjace ili mrke pegavosti pasulja (Arsenijević i Balaž, 1980; Arsenijević i sar., 1985; Nemeth, 1990).

U našoj zemlji proučavanjem ove bakterije bavili su se Tešić (1946, *loc. cit.* Balaž, 1989), Arsenijević i Balaž (1980), Arsenijević (1982) i Arsenijević i saradnici (1985), mada je znatno veća pažnja posvećena prouzrokovaču masne pegavosti pasulja, *P.s. pv. phaseolicola* (Burkholder 1926) Young, Dye et Wilkie 1978 (Arsenijević i Balaž, 1974; Arsenijević i Balaž, 1980; Arsenijević, 1982; Arsenijević i Balaž, 1984; Balaž, 1989. i 1990).

Pojava nekrotičnih pega sa uzanim hlorotičnim oreolom na listovima i vlažnih, tamnozelenih pega na mahunama, privukla je našu pažnju tokom leta 2003. i 2004. godine. Prikupljeni su uzorci iz obolelih biljaka pasulja u cilju proučavanja patogenih i biohemijskih odlika patogena.

Iz uzoraka obolelih biljaka pasulja izolovan je veći broj sojeva bakterije, karakterističnog izgleda kolonija na podlozi od kvašćevog ekstrakta, glukoze i CaCO_3 (YDC) tipičnog za predstavnike roda *Xanthomonas* (Arsenijević, 1988; Klement i sar. 1990; Schaad i sar. 2001).

Inokulacijom biljaka pasulja potvrđena je patogenost proučavanih sojeva. Proučavanjem biohemijskih odlika naših sojeva, ispostavilo se da oni imaju identične odlike kao i kontrolni soj (*X. c. pv. phaseoli*) poreklom iz Bugarske (Tabela 2). Poređenjem dobijenih rezultata sa navodima u literaturi (Pazos i Hevesi, 1975; Lelliott i Stead, 1987; Schaad i sar., 2001) potvrđeno je da nekrozu lišća i nepravilno rasporedene, vlažne pege na mahunama kod nas prouzrokuje bakterija *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*.

Brzo otkriće i identifikacija patogena su veoma značajni radi sprovođenja mera zaštite useva i smanjenje gubitaka u proizvodnji. Dijagnoza obične plamenjače pasulja i detekcija njenog prouzrokovača *X. c. pv. phaseoli* zasnovana na korišćenju standardnih fitobakterioloških metoda zahteva dosta vremena i materijala. Zato se u novije vreme ove metode sve više zamenjuju serološkim i molekularnim metodama (Audy i sar., 1994).

ELISA test ima prednosti u odnosu na druge serološke kao i klasične metode u detekciji bakterija. Pogodnija je za ispitivanje većeg broja uzoraka i ne zahteva razvoj bakterija na hranljivim podlogama (Alvarez i Lou, 1985; McLaughlin i Chen, 1990; Schaad i sar., 2001). Ova metoda korisna je i zbog brzine izvođenja i specifičnosti u identifikaciji ciljanih kolonija u mešanim bakterijskim kulturama. ELISA protokoli i komercijalni kitovi razvijeni su

za detekciju bakterija prisutnih čak i u niskim koncentracijama (10^3 ćel/ml).

U ovom radu, primenom PTA ELISA metode, utvrđena je pozitivna reakcija ispitivanih sojeva sa antitelima specifičnim za *X. c. pv. phaseoli*, pa je na ovaj način identifikacija sojeva bakterije urađena klasičnim bakteriološkim metodama, potvrđena i serološkom metodom.

Uvođenje molekularnih metoda, najpre hibridizacije nukleinskih kiselina, a potom i lančane reakcije polimeraze (PCR), omogućile su pouzdano i brzo utvrđivanje prisustva patogena u ispitivanom uzorcima, kao i identifikaciju bakterija do najnižih taksonomskih kategorija. PCR metoda predstavlja najbržu, najosetljiviju i najspecifičniju metodu za detekciju *X. c. pv. phaseoli* do sada (Audy i sar., 1994). Po Audy i saradnici (1994) prajmeri X4c/X4e su specifični za bakteriju *X. c. pv. phaseoli* i mogu se koristiti za njenu identifikaciju.

Kod svih 10 ispitivanih sojeva bakterije *X. c. pv. phaseoli* izolovanih iz biljaka pasulja poreklom iz Srbije, kao i kod kontrolnog soja *X. c. pv. phaseoli* (5834), amplifikovani su fragmenti očekivane veličine 730 bp specifični za sojeve *X. phaseoli*, dok do amplifikacije nije došlo kod negativne (vodene) kontrole (Slika 3). Na ovaj način je identifikacija sojeva bakterije *X. c. pv. phaseoli* standardnim bakteriološkim i serološkim metodama, potvrđena i primenom molekularne metode lančane reakcije polimeraze.

Istraživanja Toth-a i saradnika (1998) ukazuju na mogućnost da se korišćenjem ovih prajmera u nekim slučajevima mogu dobiti lažno negativni rezultati, t.j. da se neki sojevi bakterije *X. c. pv. phaseoli* ne mogu detektovati korišćenjem prajmera X4c/X4e. Međutim, svi sojevi ispitivani u ovom radu, koji su klasičnim bakteriološkim i serološkim metodama identifikovani kao *X. c. pv. phaseoli*, detektovani su i primenom PCR metode.

U ovom radu su prvi put u Srbiji primenjene molekularne metode u identifikaciji bakterije *X. c. pv. phaseoli*, prouzrokovača obične plamenjače pasulja.

LITERATURA

- Arsenijević, M. i Balaž, J.: Prouzrokovalac oreolne (masne) pegavosti pasulja. Biljni lekar, 4: 123-126, 1974.
 Arsenijević, M. i Balaž, J.: Bakterioze boranije i mogućnost njihovog hemijskog suzbijanja. IV jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja, Poreč, 1980. Glasnik zaštite bilja, 11: 380).

- Arsenijević, M.:** Bakterioze pasulja i boranije. Zaštita bilja, 161: 347-356, 1982.
- Arsenijević, M. i Balaž, J.:** Etiološka proučavanja bakteriozne pegavosti boranije. II kongres zaštite bilja, Vrnjačka Banja, 1982. (Glasnik zaštite bilja, 9/10: 402).
- Arsenijević, M. i Balaž, J.:** *Pseudomonas phaseolicola* Burkholder (Dowson) (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye et Wilkie) kao parazit boranije i pasulja. Zaštita bilja, 169: 283-291, 1984.
- Arsenijević, M., Balaž, J., i Ozorak, G.:** *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye kao parazit boranije i pasulja u nas. Zaštita bilja, 173: 273-285, 1985.
- Arsenijević, M.:** Bakterioze biljaka. Naučna knjiga, Beograd, 1988.
- Arsenijević, M.:** Bakterioze biljaka (Treće izmenjeno i dopunjeno izdanje). S – Print, Novi Sad, 1997.
- Audy, P., Laroche, A., Saidon, G., Huang H.C. and Gilbertson, R.L.:** Detection of the Bean Common Blight Bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, Using the Polymerase Chain Reaction. Phytopathology, 84: 1185-1192, 1994.
- Audy, P. Braat, C.E Saindon, G. Huang, H.C and Laroche, A.:** A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in been seed. Phytopathology, 86: 361-366, 1996.
- Balaž, J.:** Bakteriološke karakteristike i fiziološke rase *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye et Wilkie u Jugoslaviji. Zaštita bilja, 188: 187-194, 1989.
- Balaž, J.:** Prilog proučavanju osetljivosti boranije i pasulja prema *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye et Wilkie. Zaštita bilja, 194: 423-429, 1990.
- Clafin, L.E., Vidaver, A.K. and Sasser, M.:** MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Phytopathology, 77: 730-734, 1987.
- Fourie, D.:** Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. Journal of Phytopathology, 150: 220-226, 2002.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C.:** Methods in Phytobacteriology. Academia Kiado, Budapest, 1990.
- Lelliott, R.A. and Stead, D.E.:** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In: Methods in Plant Pathology. British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publications, 1987.
- Mabagala, R.B. and Saettler, A.W.:** An improved semiselective medium for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Plant Disease, 76: 443-446, 1992.
- McLaughlin, R.J. and Chen, T.A.:** Elisa methods for plant pathogenic prokaryotes. In: Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens (r. Hampton, E., Ball, and S. Boer, eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 1990.
- Nemeth, J.:** The dominance conditions of bacteria pathogenic to bean in Hungary, with special reference to widely distributed bean varieties. Növényvédelem, XXVI, Evfolyam, 351-357, 1990.
- Opio, A.F., Allen, D.J., and Teri, J.M.:** Pathogenic variation in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight in Phaseolus beans. Plant Pathology, 45: 1126-1133, 1996.
- Pazos, V. and Hevesi, M.:** Common blight of beans. Revista Cenic, 6: 291-294, 1975.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Lacy, G.H.:** *Xanthomonas*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (N. W. Shaad, J. B. Jones and W. Chun, eds.). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 175-199, 2001.
- Toth, I.K., Hyman, L.J., Taylor, R. and Birch, R.P.J.:** PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. J. Appl. Microbiol., 85: 327-336, 1998.
- Wallen, V.R. and Galway, D.A.:** Bacterial blight of field bean disease progress, yield loss, and crop canopy development in principal cultivars in Ontario. Can. Plant Dis. Surv., 57: 61-64, 1977.

Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Dye 1978 b, Using Conventional, Serological and Molecular Methods

SUMMARY

Samples of bean plants showing necrotic leaf spots and sunken spots filled with ooze on bean pods were collected during 2003 and 2004 from several localities in Serbia and bacteria were isolated.

In order to identify the isolated bacteria, their pathogenic, morfological, cultural, biochemical and physiological characteristics were studied. Based on the results of these studies, it was determined that the investigated strains belonged to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Dye 1978b, the causal agent of common blight of beans.

All investigated strains reacted with antibodies specific for *X. c.* pv. *phaseoli*. Therefore, PTA ELISA test confirmed the results of conventional bacteriological methods.

Primer pair X4c/X4e, specific for the detection of *X. c.* pv. *phaseoli*, successfully mediated the amplification of PCR products of the expected size (730 bp) in PCR-amplification assay, confirming that the isolated bacteria belonged to *X. c.* pv. *phaseoli*.

This is the first report in Serbia on the application of molecular methods in the identification of *X. c.* pv. *phaseoli*, the causal agent of common blight of beans.

Keywords: Common Blight; Bean; *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*; Identification; PTA ELISA; PCR