



Detekcija *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* i *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* sa semena pasulja korišćenjem Milk-tween podloge

Tatjana Popović • Maja Ignjatov • Dragana Jošić • Mira Starović • Svetlana Živković • Goran Aleksić • Nenad Trkulja

received: 17 October 2011, accepted: 12 December 2011.

© 2012 IFVC

doi:10.5937/ratpov49-1126

Izvod: Proizvodnju pasulja ugrožavaju fitopatogene bakterije prouzrokovajući plamenjača *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) i *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Psp). S obzirom da do sada nije postignuta zadovoljavajuća hemijska zaštita za suzbijanje ovih bakterija, mere koje se preporučuju preventivnog su karaktera i uključuju upotrebu zdravog semena za setvu, plodored, duboko zaoravanje ostataka i korišćenje otpornih sorti. U ovom radu je vršena detekcija Xap i Psp na semenu pasulja metodom izolacije na poluselektivnu podlogu *Milk Tween Agar* (MT). Na ovoj podlozi Xap obrazuje žute, sluzaste i ispupčene kolonije sa dve zone hidrolize (manjim mlečnim i većim prosvetljenim), a Psp obrazuje kolonije beličasto-krem, ravne i okrugle. Identifikacija izolata Xap i Psp je potvrđena primenom ELISA i PCR. Podloga MT se zbog svoje selektivnosti, jednostavne pripreme i mogućnosti istovremene detekcije bakterija Xap i Psp može preporučiti prilikom rutinskog ispitivanja zdravstvenog stanja semena pasulja za setvu proizvedenog kod nas ili prilikom kontrole semena iz uvoza.

Ključne reči: bakterije, pasulj, *Pseudomonas*, seme, *Xanthomonas*

Uvod

Usled česte pojave i jakog intenziteta, bakterioze pasulja mogu prouzrokovati znatne gubitke čime se svrstavaju u ekonomski značajne bolesti ove biljne vrste (Tešić 1946, Zaumeyer & Thomas 1957, Kiryakov 1999, Schwartz 2004, Popović 2008). U našim uslovima gajenja pasulja bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Vauterin et al. 1995 (Xap) i *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder 1926) Gardan et al. 1992 (Psp), prouzrokovajući plamenjača imaju najveći ekonomski značaj.

Zaraženo seme je osnovni izvor inokuluma, pa se uvozu i proizvodnji semena pasulja i boranije mora posvetiti velika pažnja. Epidemiološke studije su pokazale da jedno zaraženo seme bakterijom Xap u 10.000 (Sutton & Wallen 1970) ili jedno seme zaraženo sa Psp u 2.000 ili 5.000 može rezultovati

epifitocijama u polju (Trigalet & Bidaud 1978, Webster et al. 1983). Zaraženo seme pasulja može biti sa i bez vidljivih simptoma (latentne infekcije) ili simptomi mogu biti prikriveni simptomima drugih oboljenja (Leben 1981). Detekcija bakterija na semenu zahteva ekstrakciju bakterija iz semena, a zatim njihovu identifikaciju korišćenjem raznih dijagnostičkih testova. Iako je opisano nekoliko metoda za utvrđivanje fitopatogenih bakterija na semenu, a uključuju serologiju, korišćenje bakteriofaga ili molekularnu dijagnostiku, izolacija na poluselektivne podloge predstavlja najčešće korišćen metod za ovakva ispitivanja (Schaad 1982). Standardne laboratorijske procedure zasnovane na izolacijama na poluselektivne podloge opisane su od strane International Seed Testing (ISF 2006a, 2006b), International Seed Testing Association, ISTA (Remeeus & Sheppard 2006, Sheppard et al. 2007, Kurowski & Remeeus 2007, 2008) i National Seed Health System (NSHS 2002). Od nekoliko poluselektivnih podloga koje su opisane

T. Popović* • M. Starović • S. Živković • G. Aleksić • N. Trkulja
Institute for Plant Protection and Environment, Teodora Drajzera 9,
11040 Belgrade, Serbia
e-mail: tanjaizbis@gmail.com

M. Ignjatov
Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000
Novi Sad, Serbia

D. Jošić
Institute for Soil Science, Teodora Drajzera 7, 11000 Belgrade, Serbia

Zahvalnica: Ovaj rad je deo istraživanja na projektima III 43010 „Modifikacije antioksidativnog metabolizma biljaka sa ciljem povećanja tolerancije na abiotički stres i identifikacija novih biomarkera sa primenom u remedijaciji i monitoringu degradiranih staništa“, i TR 31030 „Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i zaštićenom prostoru“ finansiranom od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

za izolaciju bakterije Xap najčešće se navode MXP (Claffin et al. 1987), M-SSM (Mabagala & Saettler 1992), Milk Tween Agar - MT (Goszczynska & Serfontein 1998), Peptone Tyrosine Starch Agar - PTSA (Van Vuurde et al. 1983) i *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* Agar - XCP1 (McGuire et al. 1986). Najčešće korišćene poluselektivne podloge za izolaciju Psp su Modified Sucrose Peptone Agar - MSP (Mohan & Schaad 1987) i MT, a neke od standardnih takođe u upotrebi su i King B (Trigalet & Bidaud 1978), Modification of King B Medium - KBC (Mohan & Schaad 1987, NSHS 2002) i Levure Peptone Glucose Agar - LPGA (Trigalet & Bidaud 1978).

Prednost MT podloge je u tome što omogućava istovremenu detekciju i diferencijaciju tri fitopatogene bakterije na pasulju: Psp, Xap i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 (Goszczynska & Serfontein 1998, Balaž i sar. 2008a, 2008b, Popović 2008). Prema Ignjatov i sar. (2010) ova podloga je takođe pogodna za identifikaciju *X. euvesicatoria* poreklom sa paprike.

Materijal i metode

U radu je korišćeno seme pasulja sorti Oplenac i Dvadesetica, na kojima je prema ranijim istraživanjima utvrđena prirodna zaraza bakterijama Xap i Psp (Popović 2008). Ekstrakcija bakterija vršena je potapanjem celog semena (5 x 1000 semena) u sterilni ekstrakcioni rastvor (8,5 g NaCl, 0,2 ml Tween 20 i 1000 ml H₂O) u odnosu 1:2. Nakon inkubacije u trajanju od jednog dana na temperaturi od 5°C, iz dobijenog ekstrakta pripremana je serija razređenja do 10⁻⁵. Izolacija je vršena na MT podlogu pripremanu rastvaranjem 10 g proteose peptona #3, 0,25 g CaCl₂, 0,5 g tirozina i 15 g agara u 1 l destilovane vode; u sterilisanu i ohlađenu podlogu do 50°C dodavano je 40 mg nistatina, 80 mg cefaleksina, 10 mg vankomicina, 10 ml Tween 80 i 10 g obranog mleka. Za uporedna proučavanja korišćeni su kontrolni izolati Xap (GSPB 1241) i Psp (Ps12).

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. Petri kutije sa zasejanim podlogama su zatim stavljene na inkubaciju u termostatu na temperaturu od 28°C tokom 4-5 dana. Ogljed je izveden u dva ponavljanja. Po završenoj inkubaciji, upoređivan je izgled kolonija dobijenih iz ekstrakta sa kolonijama kontrolnih izolata iz razređenja gde se broj kolonija u Petri kutijama kretao u rasponu 30-300. Kolonije bakterija koje su nakon razvoja na podlozi MT

ispoljavale sličnost sa kontrolnim izolatima presejane su na kosu YDC podlogu u slučaju bakterije Xap i na King B u slučaju Psp. Posle 2-3 dana inkubacije izolati su ponovo upoređeni sa kontrolnim. Za dalja proučavanja je odabrano 6 reprezentativnih izolata bakterije Xap (izolati pod šiframa TX140, TX141 i TX142 poreklom sa sorte Dvadesetica i TX155, TX156 i TX157 poreklom sa sorte Oplenac) i 6 reprezentativnih izolata bakterije Psp (izolati pod šiframa TP120, TP121 i TP122 poreklom sa sorte Dvadesetica i TP235, TP236, TP237 poreklom sa sorte Oplenac).

Patogenost odabranih izolata Xap ispitivana je na mladim biljčicama pasulja metodom uboda u nodus mladih biljčica pasulja (Sheppard et al. 1989, 2007, Kurowski 2002, ISF 2006b). Inokulisane biljčice su održavane u klima komori pri dnevnom režimu svetlosti, temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 80%.

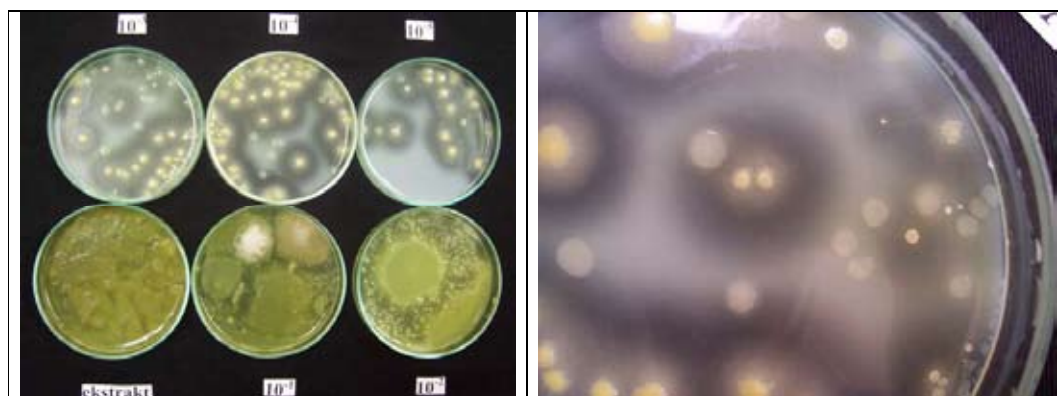
Patogenost izolata Psp dokazana je metodom uboda naklijalog semena (kotiledonih listića) pasulja (Fenwick & Guthrie 1969, Van Vuurde & Van den Bovenkamp 1987, 1989, ISF 2006a). Inokulisani sejanci su održavani u klima komori pri dnevnom režimu svetlosti, temperaturi od 20°C i relativnoj vlažnosti od 80%.

Identifikacija dobijenih izolata vršena je serološkim metodama PTA i DAS ELISA (Schaad et al. 1990) i metodom lančane reakcije polimeraze - PCR, prema protokolu koji za determinaciju Xap sa prajmerima X4c i X4e navode Audy et al. (1994) i protokolu za Psp sa prajmerima P5.1/P3.1 i P5.2/P3.2 opisanom od strane Schaad et al. (2001).

Rezultati

Prema rezultatima dobijenim tokom ovih ispitivanja, utvrđeno je da se metoda izolacije na poluselektivnu hranljivu podlogu MT može uspešno koristiti za istovremenu detekciju Xap i Psp na semenu pasulja. Pojedinačne kolonije ovih bakterija su registrovane nakon četiri dana inkubacije na temperaturi od 28°C, u razređenjima od 10⁻³ do 10⁻⁵ (Sl. 1).

Kolonije bakterije Xap su žute, ispućene i sluzaste, različite veličine (prečnika 1-3 mm) okružene sa dve zone hidrolize, većom prosvetljenom nastalom usled hidrolize kazeina i manjom mlečnom nastalom hidrolizom Tween-a 80 (Sl. 1). Ovakav izgled kolonija Xap navode i drugi autori (Kurowski 2002, ISF 2006b, Remeus & Sheppard 2006, Sheppard et al. 2007). Izolati Xap su na zakošenoj YDC podlozi obrazovali žute i sluzaste kolonije.



Slika 1. Izolacija na MT podlogu, sorta Oplenac; levo - izgled kolonija Xap i Psp u različitim razređenjima; desno - detalj

Fig. 1. Isolation on MT medium, cultivar Oplenac; left - view of colonies Xap and Psp on different dilutions; right - a detail

Kolonije bakterije Psp su beličasto-krem, ravne i okrugle, neujednačene veličine (prečnika 3-5 mm) (Sl. 1), što navode ISF (2006a) i Kurowski & Remeus (2008). Prema ISF (2006a) kolonije Psp na MT podlozi mogu da stvaraju bledo-plavi fluorescentni pigment. Dobijeni izolati Psp su na King B podlozi stvarali fluorescentni pigment.

Patogenost odabranih izolata Xap dokazana je na mladim biljčicama pasulja obrazovanjem tamnozelenih, izduženih pega, koje pucaju, pri čemu se obrazuju rak-rane (Sheppard et al. 1989, 2007, Kurowski 2002, ISF 2006b). Patogenost izolata Psp dokazana je na kotiledonim listovima pojavom tamnozelenih, masnih pega (Van Vuurde & Van den Bovenkamp 1987, 1989). Prema ISF (2006a) kod inokuliranih biljaka pasulja postoji mogućnost stvaranja hlorotičnih oreola na prvom pravom lišću, nastalih usled aktivnosti fazeolotoksina. Prilikom naših istraživanja pojava hlorotičnih oreola nije zapažena, što može biti rezultat povišene temperature u klima komori (20°C). Prema Nüske & Fritsche (1989) optimalna temperatura za stvaranje fazeolotoksina je 18°C. Za identifikaciju fitopatogenih bakterija Xap i Psp sa semena pasulja, Saettler (1971) navodi metod injektiranja medicinskim špricom ekstrakta dobijenog iz semena u nodus primarnog lišća sejanaca pasulja sorte Manitou. Autor ističe da ovaj metod može poslužiti prilikom identifikacije bakterija prouzrokovala bakterioznih plamenjača, jer se nakon 7-14 dana od inokulacije javljaju simptomi dovoljno karakteristični da se razdvoje patogene bakterije od ostalih brojnih nepatogenih, koje se mogu detektovati na ispitivanom semenu. Autor takođe navodi da se samo u slučaju injektiranja

ekstrakta dobijenog iz zaraženog semena razvija simptom na inokuliranim biljčicama pasulja.

Identifikacija dobijenih izolata je potvrđena primenom ELISA i PCR. Prema rezultatima DAS i PTA ELISA testova, utvrđeno je da su svi ispitivani izolati reagovali sa specifičnim antitelima. Rezultati PCR-a su pokazali da je došlo do amplifikacije fragmenata nukleinske kiseline veličine 730 bp kod bakterije Xap i 450 bp kod bakterije Psp, što navode i drugi autori (Schaad et al. 2001, Halfeld-Vieira et al. 2001).

Mnogi autori ističu da je standardne procedure za dokazivanje patogena na semenu potrebno dopunjavati serološkim i molekularnim metodama (Audy et al. 1994, Halfeld-Vieira et al. 2001). Van Vuurde et al. (1983) navode mogućnost primene IF i ELISA testova kao potencijalnih rutinskih testova za detekciju Psp i Xap na semenu pasulja. Serološke metode se smatraju važnim dijagnostičkim testom prouzrokovala bakterioznih plamenjača na semenu pasulja. Svakako, brojna su ograničenja i upozorenja koja se moraju ispoštovati pre nego što se ove metode standardizuju i prihvate za rutinska testiranja zdravstvenog stanja semena (Sheppard et al. 1986). Prema Taylor (1978) imunofluorescencijom je moguće detektovati 10^3 bakterija u 1 ml, dok drugi autori navode detekciju 80 ćelija u 1 ml macerata semena (Trigalet et al. 1978). Marques et al. (2005) su prilikom izvođenja DAS ELISA testa za identifikaciju izolata Xap dobijenih sa semena pasulja koristili suspenziju bakterije različitih koncentracija, od 10^8 do 10^3 cfu/ml. Roth (1988) je za detekciju Xap na semenu pasulja razvio proceduru koja uključuje imunofluorescenciju (IF), na osnovu koje je moguće detektovati jedno zaraženo seme u partiji od 10.000. Autor takođe

navodi da je metod specifičan za ciljanog patogena, da ga odlikuje brzina izvođenja i da se može kombinovati sa izolacijom ekstrakta dobijenog iz semena na selektivne podloge ili testom na biljci domaćinu, iako su prema navodima ovog autora ovi testovi manje osjetljivi. Barzic & Trigallet (1982) su korišćenjem ELISA testa pri identifikaciji Psp detektovali 10^4 bakterija u 1 ml, dok su Bazzi & Calzolari (1982) primenom IF testa detektovali 10^2 ćelija u 1 ml.

Autori Audy et al. (1996) navode mogućnost korišćenja PCR metode za istovremenu detekciju bakterija Xap i Psp na semenu pasulja. Metod uključuje brzu DNA ekstrakciju kraćim vlaženjem semena rastvorom natrijum hidroksida. Kombinacija specifičnih prajmera je korišćena za detekciju obe bakterije, dok ostale testirane bakterije nisu dale pozitivan rezultat. Pomoću ovog metoda moguće je detektovati jedno do nekoliko inficiranih semena u uzorku od 10.000. Navedeni metod može poslužiti prilikom istovremene detekcije bakterija Xap i Psp na partijama komercijalnog semena pasulja (Audy et al. 1996).

Zaključak

S obzirom da je zaraženo seme glavni izvor inokuluma, neophodna je redovna kontrola zdravstvenog stanja na prisustvo ekonomski značajnih i karantinskih parazita. Rezultati naših istraživanja su pokazala mogućnost primene MT podloge za istovremenu detekciju Xap i Psp na semenu pasulja, jer su se na ovoj podlozi prilikom izolacija u istim Petri kutijama jasno uočavale kolonije obe bakterije, pa se može zaključiti da se podloga MT zbog svoje selektivnosti i jednostavne pripreme može koristiti za rutinsko ispitivanje zdravstvenog stanja semena pasulja.

Literatura

Audy P, Braat CE, Saindon G, Huang HC, Laroche A (1996): A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathol.* 86: 361-366

Audy P, Laroche A, Saindon G, Huang HC, Gilbertson RL (1994): Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. *Phytopathol.* 84: 1185-1192

Balaž J, Popović T, Vasić M, Nikolić Z (2008a): Razrada metoda za dokazivanje *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* na semenu pasulja. *Pesticidi i fitomedicina* 23: 81-88

Balaž J, Popović T, Vasić M, Nikolić Z (2008b): Razrada metoda za dokazivanje *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* na semenu pasulja. *Pesticidi i fitomedicina* 23: 89-98

Barzic MR, Trigallet A (1982): Detection de *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson par la technique ELISA. *Agronomie* 2: 389-398

Bazzi C, Calzolari A (1982): Colorazione di immunofluorescenza (metodo indiretto) per l'individuazione di *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson nel seme di fagiolo. *Informatore Fitopatologico* 5: 55-58

Clafflin LE, Vidaver AK, Sasser M (1987): MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathol.* 77: 730-734

Fenwick HS, Guthrie JW (1969): An improved *Pseudomonas phaseolicola* pathogenicity test. *Abstract Phytopathol.* 59: 11

Goszczyńska T, Serfontein JJ (1998): Milk Tween Agar, a Semi-selective Medium for Isolation and Differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *J. Microbiol. Methods* 32: 65-72

Halfeld-Vieira BA, Souza RM, Figueira AR, Boari AJ (2001): Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. *Fitopatologia Brasileira* 26: 737-740

Ignjatov M, Gašić K, Ivanović M, Sević M, Obradović A, Milošević M (2010): Karakterizacija sojeva *Xanthomonas euvesicatoria*, patogena paprike u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina* 25: 139-149

ISF - International Seed Testing (2006a): Method for the Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on Bean seed. Nyon, Switzerland

ISF - International Seed Testing (2006b): Method for the Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on Bean Seed. Nyon, Switzerland

Kiryakov I (1999): Proučavanja vrhu bakteriozite po fasulj (*Phaseolus vulgaris* L.) u Bulgarija i sredstvata za borba s njah. Avtorreferat na disertacija za prisždane na naučna i obrazovatelna stepen „Doktor“, Dobrič

Kurowski C (2002): Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on Bean (*Phaseolus vulgaris*). *International Seed Health Initiative – Vegetables, Switzerland*

Kurowski C, Remeus PM (2007): Proposal for a new method for detecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on bean seeds. *ISTA Method Validation Reports* 4: 1-12

Kurowski C, Remeus PM (2008): Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on *Phaseolus vulgaris*. *International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland*

Leben C (1981): Bacterial pathogens: Reducing Seed and In Vitro Survival by Physical Treatments. *Plant Disease* 65: 876-878

Mabagala RB, Saettler AW (1992): An improved semiselective medium for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Plant Disease* 76: 443-446

Marques ASA, Guimaraes PM, Santos JP, Viera TM (2005): Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. *Fitopatologia Brasileira* 30: 527-531

McGuire RG, Jones JB, Sasser M (1986): Tween media for semi-selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Disease* 70: 887-891

Mohan SK, Schaad NW (1987): An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s. phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathol.* 77: 1390-1395

NSHS - National Seed Health System (2002): Seed Health Testing and Phytosanitary Field Inspection Methods Manual. Reference Manual B (RM-B), Version dated 09/18/02

Nüske J, Fritsche W (1989): Phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: the influence of temperature. *J. Basic. Microbiol.* 29: 441-447

Popović T (2008): Detekcija fitopatogenih bakterija na semenu pasulja i osjetljivost sorti. *Doktorska disertacija*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1-163

Remeus PM, Sheppard JW (2006): Proposal for a new method for detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean

- seeds. ISTA Method Validation Reports 3, 1-11, Bassersdorf, CH-Switzerland
- Roth DA (1988): Development of bean seed assays for bacterial pathogens. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 31: 76-77
- Saettler AW (1971): Seedling Injection as an Aid in Identifying Bean Blight Bacteria. Plant Disease Reporter 55: 703-706
- Schaad NW (1982): Detection of seedborne bacterial plant pathogens. Plant Dis. 66: 885-890
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS PRESS, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA
- Schaad NW, Stile S, van Vuurde JWL, Vrugink H, Alvarez AM, Benedict AA, de Wael L, van Laere O (1990): Serology. In: Methods in Phytobacteriology, Ch. 1.9. Klement Z, Rudolph K, Sands DC (eds.). Akadémiai Kiadó, Budapest. 153-190
- Schwartz HF (2004): Bacterial Diseases of Beans. Crop Series Diseases 2: 913
- Sheppard JW, Kurowski C, Remeus PM (2007): Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland
- Sheppard JW, Roth DA, Saettler AW (1989): Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Bean. In: Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material ed Saettler AW, Schaad NW, Roth DA, 17-29
- Sheppard JW, Wright PF, DeSavigny DH (1986): Methods for the evaluation of EIA for use in the detection of seed-borne diseases. J. Seed Sci. Technol. 14: 49-59
- Sutton MD, Wallen VR (1970): Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* on beans in southwestern Ontario, 1961-1968. Canadian Journal of Botany 48: 1329-1334
- Taylor JD (1978): Detection of seed-borne bacteria. In: Report on the Sixteenth International workshop on Seed Pathology, 28-29.
- Tešić ŽP (1946): Bakterioze našeg pasulja. Arhiv za poljoprivredne nauke 1: 1-44
- Trigalet A, Bidaud P (1978): Some Aspects of Epidemiology of Bean Halo Blight. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, 895-902
- 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, Angers, 271-288
- Van Vuurde JWL, Van den Bovenkamp GW (1987): ISTA Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No. 65 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*).
- Van Vuurde JWL, van den Bovenkamp GW (1989): Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean. Pages 30-40. In: Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material (ed. Saettler AW, Schaad NW, Roth DA), The American Phytopathological Society Press, St. Paul, USA
- Van Vuurde JWL, Van den Bovenkamp GW, Birnbaum Y (1983): Immunofluorescence microscopy and enzymelinked immunosorbent assay as potential routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. Seed Sci. Technol. 11: 547-559
- Webster DM, Atkin JD, Cross JE (1983): Bacterial blights of snap beans and their control. Plant Dis. 67: 935-940
- Zaumeyer WJ, Thomas HR (1957): A Monographic Study of Bean Diseases and Methods for their Control. US Dep. Agric. Tech. Bull. 868: 255

Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on Bean Seed Using a Milk-Tween Medium

Tatjana Popović • Maja Ignjatov • Dragana Jošić • Mira Starović •
Svetlana Živković • Goran Aleksić • Nenad Trkulja

Summary: Bean production is threaten by phytopathogenic bacteria causing agents of blights, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) and *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Psp). Since there is no satisfactory chemical control for the disease, the recommended measures are preventive and include use of healthy seed, crop rotation, deep plowing and use of resistant cultivars. In this work we involved a detection method for isolation of Xap and Psp from bean seed to semi-selective medium Milk Agar Tween (MT). On this medium, Xap formed yellow, mucoid and convex colonies with two hydrolysis zones (less milk and more enlightened), and Psp formed whitish-cream, flat and round colonies. The identification of Xap and Psp was confirmed using the ELISA and PCR. Due to its selectivity, easy preparation and possibility of simultaneous detection of bacteria Xap and Psp, MT medium can be recommended for routine test of seed health for local seed or seed from import.

Key words: bacteria, beans, *Pseudomonas*, seeds, *Xanthomonas*