

DETERMINACIJA POVZROČITELJEV KROMPIRJEVE ČRNE NOGE IN MEHKE GNILOBE GOMOLJEV (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. c.* subsp. *atroseptica*)

Andrej POTOČNIK
Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Povzročitelji krompirjeve črne noge in mehke gnilobe gomoljev iz okolice Kranja so bili determinirani na osnovi klasičnih postopkov preverjanja patogenosti in biokemično-fizioloških lastnosti. Test patogenosti je temeljil na umetnem okuževanju krompirjevih rastlin in koščkov gomoljev, dokaz za pektinolitične vrste rodu *Erwinia* pa predvsem na preverjanju 3 biokemično-fizioloških lastnosti (razlikovanje po Gramu, presnova glukoze in ugotavljanje fluoresciranja na Kingovem B gojišču). Osnova za razlikovanje posameznih vrst in podvrst znotraj rodu *Erwinia* je bilo 6 lastnosti: sinteza indola, preverjanje reducirajočih snovi iz saharoze, nastanek kisline iz alfa-metil glukozida, sinteza lecitinaze in fosfataze ter opazovanje rasti na Loganovem gojišču. Ugotovljeno je bilo, da so bili iz obolelih uskladiščenih gomoljev in iz rastlin, kjer je bil posajen domač semenski krompir, osamljeni povzročitelji, ki večinoma pripadajo *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Povzročitelji, osamljeni iz obolelih rastlin z njiv, kjer je bil posajen uvožen semenski krompir pa večinoma pripadajo podvrsti *E. c.* subsp. *atroseptica*. Vrsta *E. chrysanthemi* ni bila zastopana.

ABSTRACT

DETERMINATION OF PATHOGENIC AGENTS OF POTATO BLACK LEG AND SOFT ROT OF POTATO TUBERS (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. c.* subsp. *atroseptica*).

Pathogenic agents of potato black leg and soft rot of tubers from the surroundings of Kranj were determined on the basis of classical methods for the verification of pathogenicity and biochemical-physiological properties. The pathogenicity test was based on the artificial infection of plants and parts of potato tubers while the proof of pectolytic species of the genus *Erwinia* was based on the verification of 3 biochemical-physiological properties (Gram stain, glucose metabolism and fluorescent pigmentation on King's Medium B). The basis for the distinction of particular species within the genus *Erwinia* were the following 6 tests: synthesis of indol, reducing substances from sucrose, development of

acid from alpha-methyl glucoside, synthesis of lecithinase and phosphatase and growth on Logan medium. It was found out that from the diseased stored tubers and plants of domestic seed production pathogenic agents were isolated of which the majority belonged to the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Pathogenic agents isolated from diseased plants of imported seed potato belonged mostly to the *E. c.* subsp. *atroseptica*. *E. chrysanthemi* was not represented.

UVOD

Bakterijske bolezni so skupina bolezni, ki so v Sloveniji zelo slabo raziskane. Znanje o njih temelji predvsem na tujih raziskavah, domačih proučevanj te skupine bolezni ne zasledimo, čeprav lahko povzročijo veliko gospodarsko škodo. Sedaj je opisano okoli 300 vrst in podvrst fitopatogenih bakterij, ki so jih osamili iz več kot 1000 različnih rastlinskih vrst, njihovih naravnih gostiteljev. Najnevarnejši povzročitelji krompirjeve črne noge in mehke gnilobe gomoljev, ki povzročijo bolezen z gospodarsko pomembno škodo so trije in spadajo v skupino pektinolitičnih bakterij rodu *Erwinia*, skupine "carotovora" (*Erwinia carotovora* (Jones 1901) Bergey et al. 1923 subsp. *atroseptica* (van Hall 1903) Dye 1969, *Erwinia carotovora* (Jones 1901) Bergey et al. 1923 subsp. *carotovora* (Jones 1901) Bergey et al. 1923, *Erwinia chrysanthemi* Burkholder et al. 1953). Povzročitelji iz ostalih skupin (npr. *Pseudomonas marginalis*, *Bacillus polymixa*) v običajnih razmerah pridelovanja in skladiščenja krompirja ne povzročajo bolezni, ki bi bile gospodarsko pomembne ali pa prej naštete vrste samo spremljajo.

V zadnjih letih, razen na posameznih njivah ali skladiščih, bolezen ni pogosto zastopana, toda kljub temu smo se odločili za podrobnejšo determinacijo njenih povzročiteljev. Razlog je bilo popolno nepoznavanje njihove vrstne sestavljenosti in lastnosti v našem okolju in to ne samo povzročiteljev krompirjeve črne noge in mehke gnilobe, ampak katerihkoli povzročiteljev bakterioz. Poleg tega pa obstaja možnost, da z večjim uvozom semenskega krompirja postane tudi ta bolezen gospodarsko pomembna.

MATERIAL IN METODIKA DELA

V letih 1990 in 1991 smo na njivah, posajenih s krompirjem, v okolici Kranja in v skladišču krompirja v Šenčurju zbirali rastline in gomolje z značilnimi bolezenskimi znamenji črne noge in mehke gnilobe gomoljev. Po osamljenju povzročiteljev smo

najprej preverili patogenost dobljenih izolatov. Patogenost smo preverjali z umetnim okuževanjem koščkov krompirjevega gomolja (cv. *desirée*) in z umetnim okuževanjem stebel na krompirjevih rastlinah vzgojenih *in vitro* (cv. *saskia*). Za dokaz pektinolitičnih vrst rodu *Erwinia* in za razlikovanje od vrst, ki ne pripadajo temu rodu omenjamo 3 najpomembnejše biokemično-fiziološke teste: razlikovanje po Gramu, presnova glukoze in preverjanje sposobnosti fluoresciranja na Kingovem B gojišču. Na osnovi preverjanja patogenosti in testov za dokaz pektinolitičnih vrst rodu *Erwinia* smo odbrali nekaj več kot 30 izolatov za nadaljnjo determinacijo in proučevanje. Najpomembnejša testiranja za razlikovanje podvrste *E. c.* subsp. *atroseptica* od podvrste *E. c.* subsp. *carotovora* so preverjanje zastopanosti reducirajočih snovi iz saharoze, preverjanje nastanka kisline iz alfa-metil glukozida in rast na diferencialnem Loganovem gojišču. Vrsto *E. chrysantehemi* pa dokažemo s preverjanjem sposobnosti sinteze indola, sinteze lecitinaze in sinteze fosfataze. Za kontrolo rezultatov pri testiranjih vseh biokemično-fizioloških lastnosti smo uporabili izolate vseh treh povzročiteljev z Agronomske fakultete iz Novega Sada.

REZULTATI IN KOMENTAR

Bakterijske kulture se na umetnih gojiščih običajno zelo hitro razvijajo. Tudi v našem primeru so se razvile že v 24 do 48 urah po osamljanju. Prav tako je bila zelo hitra reakcija pri preverjanju patogenosti posameznih izolatov. Po umetnem okuževanju koščkov krompirjevega gomolja se je gnitje v primeru pozitivne reakcije začelo razvijati že prej kot v 24 urah, vendar smo jih zaradi večje zanesljivosti, še posebno negativnih primerov, opazovali dlje, to je 3 do 4 dni. Pri pozitivnih reakcijah je tkivo postalo mehko, blede rumeno do temno rjavo, sproščala se je voda, nastale spremembe je spremljal nekoliko neprijeten vonj in v 24 do 48 urah je popolnoma propadlo.

Nekaj več časa je zahtevalo preverjanje patogenosti z umetnim okuževanjem krompirjevih rastlin. Prve spremembe smo opazili že po 24 do 48 urah po okuževanju, tretji dan pa so bila, če je prišlo do pozitivne reakcije, že popolnoma oblikovana bolezenska znamenja, podobna naravno okuženim rastlinam. Prav tako smo zaradi večje zanesljivosti opazovali dlje, to je do 7 dni po umetnem okuževanju.

Če je katerikoli izolat pri preizkušanju patogenosti na koščku krompirja povzročil gnitje, so se bolezenska znamenja pojavila tudi po umetnem okuževanju stebel na krompirjevih rastlinah, le da je bil

njihov obseg različen. Tako smo opazovali od zelo šibkih bolezenskih znamenj do popolnega propada posameznih rastlin.

Ugotavljamo, da glede zanesljivosti med postopkoma ni razlik, glede enostavnosti izvedbe in potrebnega časa pa je primernejše umetno okuževanje koščkov krompirjevega gomolja.

Za ponazoritev rezultatov preverjanj biokemično-fizioloških lastnosti smo v razpredelnici 1 odbrali 9 lastnih izolatov.

Razpredelnica 1: Fiziološko biokemične lastnosti nekaterih povzročiteljev krompirjeve črne noge in mehke gnilobe gomoljev

Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Izolat									
G1-2	-	O,F	-	-	-	R	-	-	-
G3-1		O,F	-	-	-	R	-	-	-
R15-2	-	O,F	-	+	+	B	-	-	-
R16-3	-	O,F	-	+	+	B	-	-	-
R17-2	-	O,F	-	-	-	R	-	-	-
R24-1	-	O,F	-	-	-	R	-	-	-
R32-2	-	O,F	-	-	-	R	-	-	-
R34-1	-	O,F	-	-	-	R	-	-	-
G39-1	-	O,F	-	-	-	R	-	-	-
Eca	-	O,F	-	+	+	B	-	-	-
Ecc	-	O,F	-	-	-	R	-	-	-
Echr	-	O,F	-	-	-	R	+	+	+

LEGENDA:

1 - Razlikovanje po Gramu

2 - Presnova glukoze:

O oksidativna

F fermentativna

3 - Fluoresciranje

4 - Reducirajoče snovi iz saharoze

5 - Kislina iz alfa-metil glukozyda

6 - Rast na Loganovem gojišču:

R rdeča (Ecc, Echr)

B bela (Eca)

7 - Sinteza indola

8 - Sinteza lecitinaze

9 - Sinteza fosfataze

Izolati osamljeni iz:

- G1-2** Uskladiščen gomolj, cv. jaerla, Sorško polje
- G3-1** Uskladiščen gomolj, cv. jaerla, Velesovo
- R15-2** Steblo, cv. ulster sc., Šenčur, uvožen semenski krompir
- R16-3** Steblo, cv. uslter sc., Šenčur, uvožen semenski krompir
- R17-2** Steblo, cv. jaerla, Cerklje, domač semenski krompir
- R24-1** Steblo, cv. resy, Kranj, domač semenski krompir
- R32-2** Steblo, cv. jaerla, Prezrenje, domač semenski krompir
- R34-1** Steblo, cv. jaerla, Cerklje, domač semenski krompir
- G39-1** Gomolj z njive, cv. jaerla, Cerklje, domač semenski krompir
- Eca** Kontrolni izolat za podvrsto *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*
- Ecc** Kontrolni izolat za podvrsto *E.c.* subsp. *carotovora*
- Echr** Kontrolni izolat za vrsto *E.chrysanthemi*

Na osnovi preverjanj biokemično-fizioloških lastnosti smo ugotovili, da izolati, ki so bili osamljeni iz obolelih stebel, kjer je bil posajen domač semenski krompir in iz obolelih uskladiščenih gomoljev pripadajo podvrsti *E. c.* subsp. *carotovora*. Podvrsto *E. c.* subsp. *atroseptica* smo osamili samo iz stebel, kjer je bil posajen uvožen semenski krompir. Vrste *E. chrysanthemi* med proučevanimi izolati nismo odkrili.

V zadnjih letih se uvoz semenskega krompirja povečuje in utemeljeno lahko predvidevamo, da se bo vrstna sestavljenost povzročiteljev krompirjeve črne noge in mehke gnilobe gomoljev spremenila v prid večje zastopanosti podvrste *E. c.* subsp. *atroseptica* ali celo vrste *E. chrysanthemi*. S tem pa tudi obstaja možnost, da bo bolezen povzročala večjo gospodarsko škodo kot sedaj.

LITERATURA

- 1 Cother, E. J., Sivasithamparam, K. *Erwinia: The "Carotovora" Group*, v: Fahy, P. C., Persley, G. J. *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide.*- Academic Press, Sydney, Australia, (1983) s. 87 - 106
- 2 Lelliot, R. A., Stead, D. E., *Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants.*- British Society for Plant Pathology, London, (1987) 216 s.

- 3 Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. Methods in Phytobacteriology.- Akademiai Kiado, Budapest, (1990) 568 s.
- 4 Arsenijević, M. Rod *Erwinia*, grupa "carotovora", v: Arsenijević, M. Bakterioze biljaka.- 2. izdaja, Naučna knjiga Beograd, 1988, s. 366 - 396
- 5 Tanii, A. Studies on the blackleg disease of potato in Hokkaido.- Report of Hokk. prefect. agric. exp. stations No. 45, Hokkaido, Japan, (1984), s. 78 - 104
- 6 Karnjanarat, s. et al. Physiological, biochemical and pathological differentiation among strains of *Erwinia carotovora* isolated from Japan and Thailand.- Annals of the Phytopathological Society of Japan, 53(1987)4, s. 459 - 469