

PATOGENE BAKTERIJE IZ RODU *Pseudomonas* NA SADNEM DREVJU

Tanja DREO¹, Manca PIRC², Maja RAVNIKAR³

^{1,2,3}Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

IZVLEČEK

Bakterije rodu *Pseudomonas* so v naravi pogoste in prisotne na rastlinah, v tleh, vodah in tudi v ozračju. Njihova vloga v življenju rastlin je zelo raznolika, nekatere sodelujejo pri obrambi pred škodljivci, izboljšujejo rast, druge povzročajo bolezni. Te se večinoma kažejo kot črtavost listov pri enokaličnicah ali s pegami na listih in sadežih dvokaličnic. Na sadnem drevju jih najpogosteje opisujemo kot škodljivce, ki povzročajo manjšo škodo, ker lahko zmanjšajo kvaliteto sadja, čeprav lahko v povezavi z zmrzaljo povzročijo tudi odpadanje cvetov in s tem občutno zmanjšanje pridelka ali oslabijo drevesa s povzročanjem razjed na vejah in deblih. V zadnjih letih smo opazili porast bolezenskih znamenj, ki jih povzročajo te bakterije, pogosto so le-ta tudi izrazitejša. Predvsem pri jablanah so lahko na videz in po obsegu neločljiva od znamenj bakterijskega hruševega ožiga. Iz obolelih rastlin smo izolirali večje število sevov bakterij iz rodu *Pseudomonas*, ter z različnimi laboratorijskimi metodami preverili njihove lastnosti ter jih primerjali s kontrolnimi sevi. V prispevku bomo predstavili rezultate primerjav.

ABSTRACT

BACTERIA FROM *Pseudomonas* spp. PATHOGENIC ON FRUIT TREES

Bacteria of *Pseudomonas* spp. are common in nature. They are present on plants, in soil, water and in atmosphere. Their role in the life of plants is very diverse. While some contribute to the plant fitness, promoting growth and protecting from harmful organisms, others cause diseases. Usual symptoms include leaf streaks in monocotyledonous and leaf and fruit spots in dicotyledonous plants. In fruit trees *Pseudomonas* spp. is usually considered a minor pathogen causing only qualitative damage. In fact damage can be high when associated with frost damage. Blossom blast can cause high economic losses while twigs and bark cankers weaken general fitness of trees increasing their susceptibility. In the last years we have observed an increase in frequency and severity of the symptoms caused by *Pseudomonas* spp. In apple trees they can be indistinguishable from fire blight both in severity and extent. A large number of isolates was obtained from diseased plants, characterized with various laboratory methods and compared with control strains. Results of these comparisons will be presented.

1 UVOD

Bakterije rodu *Pseudomonas* so v naravi zelo razširjene. V povezavi z rastlinami imajo zelo različne vloge, od pospeševanja rasti do povzročanja bolezni. Značilno za povzročitelje bolezni je, da navadno na jablanah in drugih pečkarjih ne povzročajo večje škode. Velik del svojega življenja preživijo na površju rastlin v tako imenovani epifitski fazi v kateri ne povzročajo bolezni, kljub temu da so prisotni v zelo velikih koncentracijah in si pri tem delijo življenjski prostor z drugimi bakterijami ter s svojimi sorodniki, ki niso

¹ univ. dipl. mikrobiol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

² univ. dipl. biol., prav tam

³ prof., dr. biol. znan., prav tam

sposobni povzročati bolezni. Kaj vpliva nanje, da nenadoma izrazijo svojo patogenost in povzročijo bolezen, ni natančno znano. Čeprav raziskave kažejo, da na to vpliva kombinacija številnih dejavnikov: temperatura, koncentracija bakterij, snovi, ki se sproščajo iz rastlin, vlažnost zraka,.. pa zaenkrat ne znamo napovedati kdaj oziroma v kakšnih razmerah bo prišlo do razvoja bolezni, niti kako obsežne bodo posledice.

V zadnjih letih smo opazili, da v vzorcih sadnega drevja, ki jih prejmemo v laboratorijsko analizo, čedalje pogosteje izoliramo bakterije rodu *Pseudomonas*, hkrati pa so znamenja bolezni na teh vzorcih izrazitejša. Izolirane *Pseudomonas* spp. smo zato podvrgli različnim testom v katerih smo jih primerjali s kontrolnimi bakterijami, da bi ugotovili ali je njihovo obsežnejše pojavljanje povezano s širjenjem specifičnega seva bakterije ali gre za kombinacijo različnih dejavnikov.

Glede na prejete vzorce smo sklepali, da je problem najobsežnejši na jablanah, zato smo se pri analizah osredotočili na patovarje rodu *Pseudomonas*, ki so že bili opisani na jablanah. Dodatno smo pri izoliranih sevih testirali odpornost na baker, kar je povezano z manjšo učinkovitostjo škropljenja z bakrovimi pripravki in povzročeno škodo.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Rastlinski material z izraženimi različnimi znamenji bolezni je bil vzorčen v okviru sistematskega nadzora škodljivih organizmov rastlin, ki ga vrši Fitosanitarna uprava RS (FURS) v sodelovanju s Fitosanitarno inšpekcijo RS. Večina testiranih vzorcev so bili poganjki jablan, testirali pa smo tudi nekatere druge gostiteljske rastline.

2.2 Izolacija bakterij iz rastlinskega tkiva in gojenje na gojiščih

Ekstrakt smo pripravili tako, da smo izbrano tkivo z izraženimi znamenji bolezni površinsko sterilizirali s 70-odstotnim etanolom, razrezali v fosfatnem puftru (1,07 g Na_2HPO_4 , 0,4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na liter, pH 7,0), vorteksirali in po nekaj minutah odstranili rastlinski material. Pripravljen ekstrakt smo z dodatkom glicerola (10 vol. %) do testiranja hranili pri temperaturi 80 °C.

Ekstrakt smo nanašali na hranilne plošče Kingovega gojišča B (na liter bidestilirane vode: proteozni pepton 20 g, K_2HPO_4 1,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g, glicerol 15 mL, agar 15 g, pH = 7,0-7,2). Gojišče smo inkubirali pri temperaturi 25° C. Kolonije z morfologijo značilno za rod *Pseudomonas* smo iskali in precepljali od tretjega do petega dneva inkubacije. Skupno smo izolirali več kot 200 sevov pri čemer smo iz enega vzorca izolirali tudi po več izolatov, če so se le-ti morfološko razlikovali. Poleg novo izoliranih sevov smo v izbrane teste vključevali tudi izolate iz prejšnjih let.

2.3 Kontrolne bakterije

Kot kontrolno bakterijo smo uporabljali tipski bakterijski sev NCPPB 281, to je sev *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, izoliran iz španskega bezga leta 1950 v Veliki Britaniji. V nekatere teste smo vključili tudi druge kontrolne seve kot so NCPPB 2684 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izoliran iz fižola leta 1975 na Novi Zelandiji), CFBP 1754 (patotipski sev *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, izoliran iz *Malus sylvestris* leta 1973 v Kanadi), CFBP 2351 (patotipski sev *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, izoliran iz *Prunus domestica* v ZDA) in druge.

2.4 Identifikacijski in potrditveni testi

Na izolatih smo izvajali LOPAT teste (Lelliot in sod., 1966) s katerimi seve uvrščamo v verjetno vrsto. Vključujejo opazovanje tvorbe levana, oksidazo, sposobnost pektinolitične razgradnje, arginin dihidrolazni test in test hipersenzitivnostne reakcije na tobaku (HR). S tem testom potrjujemo patogenost izoliranih bakterij. Bakterijske suspenzije testiranih in kontrolnih sevov v koncentraciji 10^6 do 10^7 celic ml^{-1} ter negativno kontrolo smo vbrizgali v medcelični prostor v listih tobaka. Sev, ki je sposoben povzročiti bolezen spodbudi odziv rastline, ki ga vidimo po 6 do 12 urah v obliki rjavenja in sušenja tkiva. Izvajali smo tudi teste, ki so v literaturi navedeni kot razlikovalni med različnimi patovarji vrste *Pseudomonas syringae*: test hidrolize arbutina (Lelliot in Stead, 1987), test utekočinjanja želatine ter druge teste (Pirc in sod., 2005).

2.5 Testiranje sevov na njihovo odpornost na baker

Seve smo testirali na odpornost na baker tako, da smo jih gojili na gojiščih, ki so vsebovala različne koncentracije $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Lim in Cooksay, 1993). Testirali smo koncentracije 30, 60, 90, 120, 150, 180, 200 in 220 μM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Minimalna inhibitorna koncentracija je koncentracija, ki je preprečila konfluentno rast bakterij, nanešenih v koncentraciji 10^8 celic mL^{-1} po treh dneh inkubacije pri temperaturi 28 °C.

3 REZULTATI

3.1 Bolezenska znamenja

V literaturi so v povezavi s *Pseudomonas* spp. najpogosteje opisana bolezenska znamenja ožiga cvetov ter peg na listih in plodovih. Medtem ko smo ožig cvetov v nekaterih vzorcih opazili, pa vzorcev s pegami na plodovih nismo prejeli. Najpogostejša znamenja boleznih v prejetih vzorcih iz katerih smo izolirali bakterije rodu *Pseudomonas* so vključevala propadanje mladih poganjkov, ki ga na videz ni bilo mogoče ločiti od znamenj bakterijskega hruševega ožiga, o čemer smo že poročali (Pirc in sod., 2005).



Slika 1: Razjede različnega obsega na olesenelih poganjkih jablan v letu 2006

Poleg propadanja vejic smo opazili povečan pojav razjed na olesenelih delih. Razjede so bile različnih velikosti, od večjih, vidnih na prvi pogled do manjših, ki so bile opazne šele ob podrobnejšem pregledu in jih v nasadu zlahka prezremo (slika 1).

Mlajša drevesa z razjedami so kazala splošno oslabelost. V nekaterih primerih so vršički poganjkov veneli in se sušili, enoletni poganjki so bili slabo priraščeni in so se z napredovanjem znamenj boleznj posušili in odpadali.

3.2 Izolacija bakterij

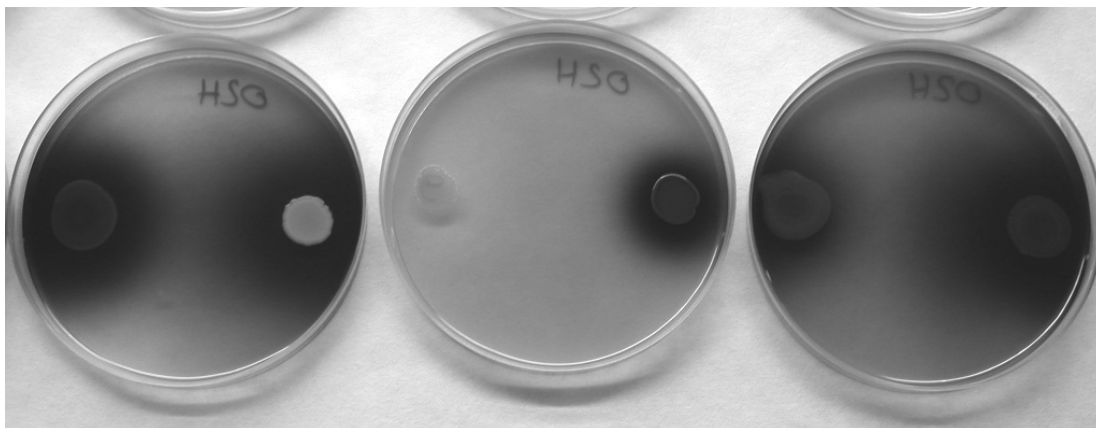
Od skupno 8 prejetih vzorcev z razjedami različnega obsega smo v letu 2006, bakterije iz rodu *Pseudomonas* izolirali iz 7. Iz ovenelih vršičkov bakterij rodu *Pseudomonas* nismo izolirali, prisotne pa so bile v spodnjih delih takšnih poganjkov, kar kaže na možnost, da je pri bolezni vključen toksin, ki se prevaja po žilnem sistemu rastline.

3.3 Rezultati identifikacijskih in potrditvenih testov

Dosedanje analize so pokazale, da iz vzorcev rastlin, med katerimi prevladujejo jablane z nekrotiziranimi poganjki, najpogosteje izoliramo vrsto *Pseudomonas syringae*. Kakor smo že poročali (Pirc in sod., 2005) je raznovrstnost sevov glede na molekularno biološke metode zelo velika.

Izolirali smo tako seve, ki na gojiščih s saharozo delajo veliko eksopolisaharida levana ter tudi takšne, ki tega polisaharida ne proizvajajo, kar je manj običajno in značilno za *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*.

V testu hidrolize arbutina je večina izolatov (97 % od 234 testiranih izolatov) hidrolizirala to snov, kar je bilo vidno kot rjavenje gojišča okoli nacepljene bakterije (Slika 2). Rezultat se ujema z rezultati ostalih testov, saj je pozitivna reakcija pričakovana za *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, kamor naj bi spadala večina izolatov.



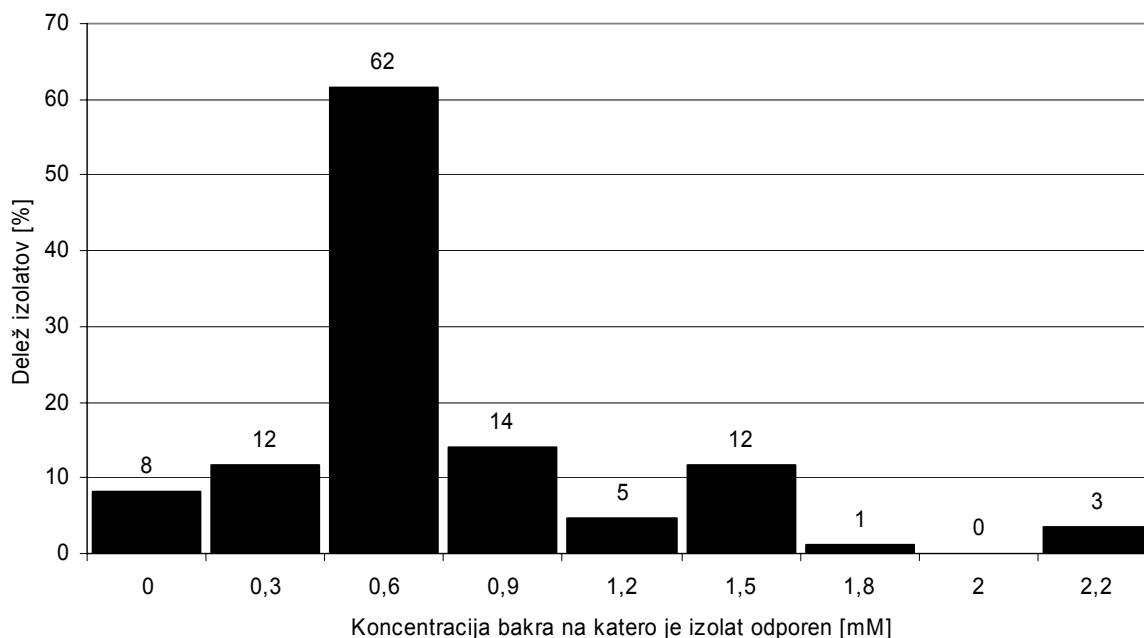
Slika 2: Test hidrolize arbutina. Na vsako ploščo sta nacepljena pod dva izolata. Tretji izolat od leve proti desni kaže negativno reakcijo, ostali pozitivno.

Med izolati, ki arbutina niso hidrolizirali (6 izolatov) so bili izolati iz jablan, fižola, kutin, vrtnic in gloga. Izolati vrste *Pseudomonas syringae*, ki kažejo takšno reakcijo, so redki in jih pravilo ne najdemo na jablanah. Po podatkih iz literature so takšni opisani na fižolu, koščičarjih in leskah.

Razen enega izolata iz rodu *Cotoneaster* so vsi testirani izolati razgrajevali želatino, torej bi jih glede na podatke iz literature uvrstili v vrsto *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

3.4 Odpornost na baker

Na odpornost na baker smo testirali 86 izbranih izolatov. Večina izolatov je občutljiva na 0,9 mM baker ali na višje koncentracije (slika 3). Petina izolatov je kazala vsaj delno odpornost na baker, od tega so trije izolati rasli tudi ob najvišji testirani koncentraciji. Vsi so bili izolirani iz jablan iz različnih nasadov.



Slika 3: Odpornost sevov *Pseudomonas* spp. na baker (N = 100)

4 RAZPRAVA

Med testiranjem sadnega drevja na bakterijske povzročitelje bolezni, smo opazili, da so bakterije rodu *Pseudomonas* v Sloveniji zelo razširjene in občasno povzročajo znamenja bolezni po obsegu in izrazitosti podobna bakterijskemu hruševemu ožigu. V zadnjih letih opažamo izrazitejša in pogostejša znamenja bolezni.

Večji del izoliranih bakterij iz nekrotiziranih poganjkov in razjed spada v vrsto *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Manjše število izolatov ima za ta patovar netipične značilnosti, kot so negativni rezultati testov hidrolize arbutina in utekočinjanja želatine. Rezultati identifikacijskih testov za netipične izolate se ne ujemajo z opisi patovarjev v literaturi. Potrebno je omeniti, da razvrščanje sevov v sistem patovarjev ni dorečeno za vse patovarje in predvsem za patovar *syringae* velja, da vključuje mnoge seve za katere se raziskovalci niso mogli odločiti kam spadajo. Glede na omenjena odstopanja v testih je možna prisotnost bakterij *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*. Te so sicer opisane kot povzročitelji peg na plodovih (angl. »blister spot«), predvsem pri sorti jablane Mutsu in naj ne bi povzročale izrazitejših znamenj bolezni kot so razjede, opisano pa je propadanje brstov in poškodbe vršičkov (Burr, 1982; Burr in Katz, 1984). Možna je prisotnost tudi nekaterih drugih patovarjev vrste *Pseudomonas syringae* (pv. *morsprunorum* in pv. *phaseolicola*) ali še nevrščenih izolatov. Diagnostika omenjenih bakterij je raziskovalne narave, kar je v veliki meri posledica nedorečene taksonomije in bo potrebno za njihovo razlikovanje opraviti nadaljnje raziskave.

Kljub temu, da nekateri izolati po svojih lastnostih odstopajo od podatkov, ki jih najdemo v literaturi, na osnovi dobljenih rezultatov zazdaj ne moremo trditi, da se bakterije izolirane iz izrazitejših znamenj bolezni, kakršne opažamo v zadnjih letih, na kakršenkoli način razlikujejo od drugih bakterij rodu *Pseudomonas*.

Praviloma lahko iz posameznega vzorca izoliramo več patogenih sevov *Pseudomonas* spp., ki se med sabo razlikujejo v morfologiji kolonij. Vidne posledice okužbe so lahko tudi kombinacija več povzročiteljev, torej mešanih okužb. Dejstvo, da bakterij ne moremo vedno izolirati iz tkiva z izraženimi znamenji bolezni, na primer iz ovenelih vršičkov, medtem ko so le-te prisotne v spodnjih delih poganjkov, nakazuje na možnost, da je del znamenj bolezni posledica proizvodnje toksina.

Splošna razširjenost vrst rodu *Pseudomonas*, podobnosti med njimi in njihovo življenje na površini rastlin, ne da bi povzročale bolezen, otežuje iskanje izvora okužbe. Možni izvori so:

- okolje / druge rastline: vrsta *Pseudomonas syringae* ima zelo širok krog gostiteljev, en sev lahko povzroča bolezen na zelo različnih rastlinah. Hkrati se bakterije dobro širijo po zraku z dežjem in domnevno tudi v majhnih kapljicah vode. Možen vir bakterij so tako sosednje in tudi bolj oddaljene rastlin različnih vrst, ki kažejo znamenja bolezni ali pa na njih bakterije živijo le na površini. Bakterije rodu *Pseudomonas*, ki lahko povzročijo bolezen, so našli celo v okoljih, o katerih običajno ne razmišljamo v kontekstu rastlin: filmih na rečnem dnu, sveže zapadlem snegu in oblačnih vodah. Koliko so ta okolja pomembna za pojav bolezni, ni znano.

- cepiči: bakterije so lahko dlje časa prisotne na rastlinskem tkivu ali v njem, ne da bi povzročale bolezen. Ko takšen material prestavimo v okolje, ki je ugodno za razvoj bolezni, pa se lahko bakterije v kratkem času zelo namnožijo in povzročijo razvoj znamenj bolezni.

- podlage: bakterije so lahko dlje časa prisotne na rastlinskem tkivu ali v njem, ne da bi povzročale bolezen. Če je podlaga okužena in nanjo cepimo bolj občutljiv material, lahko pride do močno izraženih znamenj bolezni le na cepiču.

Medtem ko okolja praktično ne moremo nadzorovati, lahko do določene mere nadzorujemo zdravstveno stanje cepičev in podlag.

Pri samem pojavu bolezni povezanih s *Pseudomonas* spp. igra zelo veliko vlogo okolje. Bolezen je običajno bolj izrazita v hladnem, vlažnem vremenu. Bakterije *Pseudomonas syringae* na površju rastlin ali v medceličnih prostorih delujejo kot jedra za razvoj ledenih kristalov. Do poškodb zaradi zmrzali zato lahko pride pri višjih temperaturah kot je to običajno (med -5°C in 0°C), poškodbe omogočijo širjenje bakterij po rastlini. Pri različnih vrstah rastlin so opazili, da je bila pozeba, poleg splošne občutljivosti rastline na zmrzal, neposredno povezana s koncentracijo takšnih bakterij.

Večja razširjenost bolezni v zadnjih letih bi lahko bila posledica kombinacije splošne razširjenosti bakterij *Pseudomonas* spp. in z njimi povezanimi poškodbami zaradi zmrzali. Pogostejša in izrazitejša znamenja bolezni na sadnem drevju, povezana s *Pseudomonas* spp., opažajo tudi v sosednjih državah (Italija, Balkan), kar pomeni, da gre za obsežnejši pojav. Občutljivost rastlin tako na zmrzal kot tudi na okužbe s *Pseudomonas* spp. je sortno specifična in gojenje bolj občutljivih sort ali sort, ki aktivno rastejo v času zmrzali, poveča možnosti za širjenje bolezenskih znamenj.

Škropljenje z bakrom, ki je eno najpogosteje uporabljanih sredstev za omejevanje bakterijskih okužb, pogojuje razvoj odpornosti pri *Pseudomonas* spp. Od testiranih izolatov jih je bila večina občutljivih, pojavljajo pa se tudi sevi z večjo odpornostjo. Trije sevi so bili odporni na najvišjo testirano koncentracijo bakra. Bakterije so znotraj

rastlinskega tkiva dodatno zavarovane pred kemijskimi sredstvi, zato kemično zatiranje ni učinkovito, odstranjevanje obolelih delov rastlin in njihov sežig pa je nujno za vzdrževanje zadovoljivega zdravstvenega stanja v nasadih.

5 SKLEPI

Obsežnejše pojavljanje znamenj bolezní na sadnem drevju, ki jih povzročajo patogene bakterije iz rodu *Pseudomonas* v Sloveniji, so v zadnjih letih opazili tudi v sosednjih državah. Večina bakterij, ki smo jih izolirali iz nekrotiziranih poganjkov in razjed spada v vrsto *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Manjše število izolatov ima za ta patovar netipične značilnosti, vendar nedorečena taksonomija ne dopušča natančnejše določitve.

Kljub temu, da nekateri izolati po svojih lastnostih odstopajo od podatkov, ki jih najdemo v literaturi, na osnovi dobljenih rezultatov zazdaj ne moremo trditi, da se bakterije izolirane v zadnjih letih, značilno razlikujejo od drugih bakterij rodu *Pseudomonas*.

Večja razširjenost bolezní v zadnjih letih bi lahko bila posledica kombinacije splošne razširjenosti bakterij *Pseudomonas* spp. in z njimi povezanimi poškodbami zaradi zmrzali. Gojenje sort občutljivih na okužbo in zmrzal, poveča možnosti za širjenje bolezní.

Ob pomanjkanju ustreznega zatiranja bolezní in relativno pogosti odpornosti *Pseudomonas* spp. na baker, je odstranjevanje in uničevanje obolelih delov rastlin nujno za vzdrževanje zadovoljivega zdravstvenega stanja v nasadih.

6 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Fitosanitarni upravi RS, fitosanitarnim inšpektorjem Fitosanitarné inšpekcije Inšpektorata RS za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, ter drugim strokovnjakom s področja varstva rastlin za nabrane vzorce ter zanimive diskusije, zlasti mag. Gabrijelu Seljaku, Barbari Ambrožič Turk in Emi Pavlič Nikolič, Ministrstvu za šolstvo znanost in šport za sofinanciranje raziskave ter Lidiji Matičič, Špeli Prijatelj Novak in Alešu Blatniku za pomoč pri izvedbi laboratorijskih testov.

7 LITERATURA

- Burr TJ. 1982. Blister spot of Apples. NY Food and Life Sciences Bulletin. No. 95.
- Burr TJ in Katz BH. H. 1984. Overwintering and distribution pattern of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* and pv. *syringae* in apple buds. Plant Disease 68: 383-385.
- Lim CK in Cooksey DA. (1993). Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. Journal of bacteriology, 175: 4492-4498.
- Lelliott RA, Billing E in Hayward AC. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads Journal of Applied Bacteriology, 29, 470-489.
- Lelliott RA in Stead DE. (1987) Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants - Methods in Plant Pathology vol. 2. Blackwell Scientific Publications, Oxford (GB).
- Pirc M, Dreó T, Rupnik M, Gorkink-Smits P, Janse JD in Ravníkar M. (2005) *Pseudomonas* ssp. na vzorcih z bolezenskimi znamenji ožiga = *Pseudomonas* ssp. from samples with blight symptoms. V: MAČEK, Jože (ur.). 7. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin / 7th Slovenian Conference on Plant Protection, 8.-10. marec 2005, Zreče, Slovenija. Zbornik predavanj in referatov. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2005, str. 508-512.