

BAKTERIJE IZ RODU *PSEUDOMONAS* KOT PATOGENI NA FIŽOLU

Mateja Grum¹, Maja Ravnikar¹

IZVLEČEK

S kombiniranjem metod imunofluorescence, izolacije na semiselektivnem MSP gojišču in testom patogenosti na občutljivem gostitelju smo potrdili okuženost semen fižola sort 'starozagorski' in 'jeruzalemski' s povzročiteljem mastne fižolove pegavosti *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in rjave fižolove pegavosti *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Ključne besede: mastna fižolova pegavost, rjava fižolova pegavost, imunofluorescenca, test patogenosti

ABSTRACT

BACTERIA FROM GENUS *PSEUDOMONAS* AS BEAN PATHOGENS

The causal agents of halo blight *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and of bacterial brown spot *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* were determined in bean seeds of cv. Starozagorski and cv. Jeruzalemski by use of combination of methods like immunofluorescence, dilution-planting on semiselective MSP medium and pathogenicity test.

Key words: halo blight, bacterial brown spot, immunofluorescence, pathogenicity test

1 UVOD

Med številnimi predstavniki bakterij iz vrste *Pseudomonas syringae* navadni fižol okužujeta dva patogena različka. To sta pv. *phaseolicola*, ki povzroča mastno fižolovo pegavost in pv. *syringae*, povzročitelj rjave fižolove pegavosti. Oba sta najpogostejše locirana na notranji in zunanji strani teste semen. Ločimo ju predvsem po značilnih bolezenskih znamenjih, ki jih povzročata na listih okuženih rastlin (Maček, 1991; Saettler, 1991).

Prepoznavanje bolezenskih znamenj na nadzemnih delih rastlin, detekcija povzročiteljev v semenih in uporaba zdravega semena še vedno predstavljajo najboljše varstvo pred širjenjem bakterijskih bolezní. Še posebej pomembna je detekcija patogenov v semenih, pri tem je ključnega pomena hitrost in enostavnost testov. Različni avtorji navajajo kombinacije različnih postopkov, kot so testiranje ekstrakta semen z: 1./ imunofluorescenco, kombinirano z izolacijo na splošnem bakterijskem gojišču in preverjeno s testom patogenosti (Van Vuurde *et al.*, 1991); 2./ izolacijo na semiselektivnem gojišču (MSP gojišče), kombinirano s testom patogenosti (Mohan in Schaad, 1987); 3./ izolacijo na MSP gojišču, kombinirano z biotestom za fazeolotoksin (Jansing in Rudolph, 1990); 4./ detekcijo z BIO-PCR (Schaad *et al.*, 1995).

Z namenom detekcije in razlikovanja obeh patogenih različkov v semenih sort

¹ Inštitut za biologijo, Ljubljana

'starozagorski' in 'jeruzalemski' ter ugotavljanja povzročiteljev bolezenskih znamenj na strokih sorte 'ptujski maslenc', smo testirali nekatere od priporočenih metod.

2 MATERIALI IN METODE

Pri identifikaciji izolatov in detekciji z imunofluorescenco smo uporabljali kontrolne kulture *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NCPPB 1321 in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 2684.

2.1 Ekstrakcija iz strokov

Stroke fižola z bolezenskimi znamenji sorte 'ptujski maslenc' smo najprej obrisali s 70 % etanolom, nato pa s sterilnim skalpelom izrezali tkivo okoli pege in ga strli v sterilni terilnici ob dodatku 1 ml 0.01 M $MgSO_4$. Polovico ekstrakta smo redčili do 1000-krat, nato pa 0.1 ml ekstrakta in razredčin nanесли na gojišče B po Kingu.

2.2 Ekstrakcija iz semen

Pri detekciji v semenih fižola smo testirali sorti 'starozagorski' in 'jeruzalemski', ki smo ju dobili iz Selekcijskega centra Ptuj, Semenarne Ljubljana. Seme vsake sorte smo razdelili v vzorce po 1000 semen. Vzorce smo sprali z vodo in jih inkubirali 20 ur pri 4 °C v sterilni raztopini 0.85 % NaCl z dodanim 0.01% Tween 20. Po inkubaciji smo odvzeli 100 ml ekstrakta, ga centrifugirali pri 6000 x g 20 minut in pelet suspendirali v 1 ml 0.01 M PBS pufru, pH 7.2. Za vsak vzorec smo polovico suspendiranega peleta serijsko redčili v PBS do 1000-krat. Razredčine in ostanek peleta vsakega vzorca smo uporabili za pripravo objektikov za imunofluorescenco in za nacepitev na semiselektivno gojišče (Jansing in Rudolph, 1990).

2.3 Indirektni imunofluorescenčni test

Na objektivke z vzorci smo nanесли suspendirani pelet in razredčine, na titer objektivka pa suspenzije sevov NCPPB 1321 (pozitivna kontrola) in NCPPB 2684 (navzkrižna reaktivnost), ter pustili, da so se kapljice zasušile. Zasušene madeže smo fiksirali s hladnim acetonom. V opisanem postopku (Van Vuurde in Van Den Bovenkamp, 1987) smo za objektivke z vzorci uporabili primarna protitelesa, redčena 1:50, 1:100 in 1:200, za titer objektivke pa smo primarna protitelesa redčili serijsko od 1:25 do 1:6400. Sekundarna protitelesa z vezanim FITC kot fluorokromom smo redčili 1:80. Objektivke smo pregledovali z invertnim mikroskopom Nikon DIAPHOT TMD s 100-kratnim fluorescenčnim objektivom, kombiniranim z 10-kratno povečavo okularja.

2.4 Gojenje bakterijskih kultur

0.1 ml suspendiranega peleta in vsake od razredčin smo razmazali na modificirano gojišče z glukozo in s peptonom (modified sucrose pepton agar, MSP; Mohan in Schaad, 1987), plošče inkubirali pri 28 °C in po 4 dneh odbrali tipične kolonije, po 7 dneh pa le-te precepili na gojišče B po Kingu. Čiste kulture smo preverili z oksidaznim testom in jih shranili na poševna gojišča s kvasnim ekstraktom in kalcijevim karbonatom (yeast dextrose chalk agar, YDC).

2.5 Test hipersenzitivne reakcije

Razlikovanje med patogenimi sevi in saprofiti smo določili s testom hipersenzitivne reakcije listov tobaka sorte 'xanthi'. Bakterijske suspenzije, ki smo jih pripravili iz 48 ur starih kultur in so vsebovale več kot 10^7 cfu/ml v 0.01 M $MgSO_4$, smo z brizgalko vbrizgali v intercelularne prostore listov tobaka (Klement, 1983).

2.6 Test patogenosti

Za potrditev virulentnosti patogenih sevov, ki so povzročili pozitivne hipersenzitivne reakcije, smo inokulirali prve trifoliatne liste fižola občutljive sorte 'red kidney'. Bakterijske suspenzije smo pripravili iz 24 ur starih kultur v 0.01 M $MgSO_4$ in so vsebovale 10^6 cfu/ml. Rastline smo inokulirali tako, da smo suspenzije razpršili na spodnjo površino listov fižola (Klement, 1990). Testne rastline za oba testa smo gojili v rastni komori pri temperaturi 25 °C in 80 % vlagi.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 Izolacija bakterij iz bolezenskih znamenj na strokih

Za fižol patogene pseudomonade spadajo med fluorescentne pseudomonade, zanje je značilna produkcija fluoresceina na gojišču B po Kingu. Kolonije bakterijskih izolatov iz mastnih madežev na strokih sorte 'ptujski maslenec' so oblikovale, za bakterije vrste *Pseudomonas syringae* značilen, rahlo zelen, difuzibilni fluorescentni pigment na gojišču B po Kingu.

Na inokuliranih listih tobaka je tkivo najprej kolabiralo in izsušeno, nekrotična območja na mestih inokulacije so se izoblikovala v času 24 ur po začetku inokulacije. Pozitivna hipersenzitivna reakcija tobaka, kot odgovor negostiteljske rastline na inokulacijo listov kaže, da so izolirani sevi patogene rastlinske bakterije.

Za natančno razlikovanje pv. *phaseolicola* od pv. *syringae* je najbolj zanesljiv test virulentnosti na občutljivem gostitelju. Testirali smo izolirana seva M1 in M2 ter NCPPB 1321 in NCPPB 2684 kot kontrolna seva. Znamenja okužbe z izoliranima sevoma so se pojavila kot drobni mastni madeži in prve kloroze 7 dni po inokulaciji. Po 12 dneh so se razvili večji nekrotični madeži, obrobjeni s tkivom nežno rumene barve, tako imenovani "oreoli" (ang.: halo). Razvoj tipičnih znamenj mastne pegavosti fižola in primerjava znamenj s kontrolnimi sevi potrjuje izolacijo *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* iz bolezenskih znamenj na strokih.

3.2 Določanje bakterij v semenih

V semenih sorte 'jeruzalemski' letnik 1995 smo z izolacijo na MSP gojišču in testom patogenosti na občutljivem gostitelju potrdili okuženost semen s *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Po 2 dneh inkubacije na MSP gojišču so bile tipične kolonije svetlo rumene, rahlo motne, kupolaste in okrogle, po 4 dneh so robovi dvignjenih kolonij postali širši in prozorni, centri pa manj gosti, barva bolj intenzivno rumena. Morfologija kolonij se tudi po 7 dneh inkubacije ni razlikovala od videza tipičnih kolonij pv. *phaseolicola*.

Razvoj rjavih nekrotičnih peg na testnih rastlinah fižola 14 dni po inokulaciji, ki niso bile mastne in obrobjene s klorozami, je potrdil okužbo s patogenim različkom *syringae*.

Pri testiranju sort 'starozagorski' in 'jeruzalemski' letnika 1996 pa smo izolaciji na MSP gojišču priključili še detekcijo z indirektno imunofluorescenco. Titer protiteles proti pv. *phaseolicola* je 1:200, kot delovno razredčitev protiteles smo določili redčenje 1:100. Test navzkrižne reakcije protiteles proti pv. *syringae* kaže slabo reakcijo samo pri redčenju 1:25, zato pričakujemo, da so protitelesa specifična za dokaz pv. *phaseolicola*. Z indirektnim imunofluorescenčnim testom smo dokazali zastopnost pv. *phaseolicola* pri obeh sortah letnika 1996, vendar pa posameznih kolonij na MSP gojišču, zaradi velike količine saprofitskih bakterij, posebno pri sorti 'starozagorski' tudi pri 1000-kratnem redčenju vzorca, nismo uspeli izolirati. Pri preostalem vzorcu sorte 'jeruzalemski' letnik 1995 smo detekcijo pv. *phaseolicola* s protitelesi potrdili tudi z izolacijo na MSP gojišču, vendar bomo izolirane seve preverili tudi s testom patogenosti, pri nadaljnjem testiranju pa še bolj redčili

suspendirani pelet. Prednost imunofluorescence pred ostalimi metodami je hitrost in občutljivost, predpogoj pa je specifičnost protiteles za iskano bakterijo.

4 SKLEPI

Poleg že opisane karantenske bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Ravnikar *et al.*, 1996) smo pri sortah 'starozagorski' in 'jeruzalemski' potrdili okuženost semen z dvema patogenima različkoma vrste *Pseudomonas syringae*, to je pv. *phaseolicola* in pv. *syringae*.

5 LITERATURA

- Klement, Z. 1983. Detection of seedborne bacteria by hypersensitive reaction.- *Seed Sci. & Technol.*, 1983, vol. 11, s. 589-593.
- Klement, Z./Mavridis, A./Rudolph, K./Vidaver, A./Perombelon, M. C./Moore, L.W. 1990. Inoculation of plant tissues.- In: *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1990. s. 96-121.
- Jansing, H./Rudolph, K. 1990. A sensitive and quick test for determination of bean seed infestation by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.- *J. Plant Dis. Protec.*, 1990, vol. 97, s. 42-55.
- Maček, J. 1991. Bolezni poljščin.- ČZP Kmečki glas, Ljubljana, 1991, s. 193
- Mohan, S. K./Schaad, N. W. 1987. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed.- *Phytopathology*, 1987, vol. 77, s. 1390-1395.
- Ravnikar, M./Grum, M./Mavrič, I./Camloh, M. 1996. Določanje in eliminacija bakterij in virusov pri fižolu (*Phaseolus vulgaris* L.), ki se prenašajo s semenom.- V: *Novi izzivi v poljedelstvu '96: zbornik simpozija*. Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, 1996, s. 195-199.
- Saettler, A. W. 1991. Diseases caused by bacteria.- In: *Compendium of Bean Diseases*. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 1991, s. 29-32.
- Schaad, N. W./Cheong, S. S./Tamaki, S./Hatziloukas, E./Panopolous, N. J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts.- *Phytopathology*, 1995, vol. 85, s. 243-248.
- Vuurde, J. W. L. van/Bovenkamp, G. W. van den. 1987. *P.s.* pv. *phaseolicola*, bean halo blight.- Working sheet No.65; *ISTA Handbook on Seed Health Testing*, International Seed Testing Association, Zürich, Switzerland, 1987.
- Vuurde, J. W. L. van/Franken, A. A. J. M./Birbaum, Y./Jochems, G. 1991. Characteristics of immunofluorescence microscopy and of dilution-plating to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed lots and for risk assessment of field incidence of halo blight.- *Neth. J. of Plant Path.*, 1991, vol. 97, s. 233-244.