

## TOLERANTNOST DOMAČIH KULTIVARJEV KORUZE NA STEBELNO TROHNOBO

Ludvik ROZMAN<sup>1</sup>, Branko PALAVERŠIČ<sup>2</sup>,  
Lea MILEVOJ<sup>3</sup>, Antun. VRAGOLOVIČ<sup>4</sup>, Nevenka VALIČ<sup>5</sup>

<sup>1,3,5</sup> Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija,

<sup>2,4</sup> Bc Institut za oplemenjvanje i proizvodnju bilja d.d., Zagreb, Hrvaška

### IZVLEČEK

V skupnih dveletnih proučevanjih so bili preizkušani domači kultivarji koruze na odpornost proti stebelni trohnobi koruze. V preizkušanje sta bili vključeni 2 slovenski populaciji, 4 slovenski ter 15 hrvaških hibridov koruze. V prvem letu je bil napad bolezní znatno večji na dveh lokacijah na Hrvaškem (Rugvica, Ludbreg) kot v Sloveniji (Jable, Ljubljana). Sorazmerno s tem je bil povečan tudi lom stebela. Statistično značilne razlike so bile v tolerantnosti kultivarjev na stebelno trohnobo v razmerah naravne okužbe. Najodpornejši so bili hibridi H-13/99, H-9/99, H-5/99 in H-7/99, najboljčutljivejši pa H-4/99, H-6/99 ter obe populaciji. Leta 1999 je bil prvič v Sloveniji zabeležen tudi koruzni ožig na stebelu, ki ga povzroča gliva *Colletotrichum graminicola* ([Ces.] G. W. Wils.). V Jablah je bilo okuženo, odvisno od kultivarja, od 2% do 35% rastlin. V drugem letu preizkušanja je bilo v Jablah prvič izvedeno testiranje na imenovano glivo z umetno infekcijo. Med hibridi so bile ugotovljene nekatere signifikantne razlike samo v razmerah umetne okužbe, ki je bila občutno močnejša kot v razmerah naravne okužbe, kjer med hibridi ni bilo signifikantnih razlik. Med hibridi ni povezave na odpornost glede na lokacijo ali način okužbe, pri umetni okužbi sta najboljčutljivejša H-15/00 in H-7/00, najodpornejša pa H-2/00 in H-13/00. Pri naravni okužbi pa so občutljivi H-6/00, H-7/00 (Jable) ter H-13/00 in H-10/00 (Rugvica), odporni pa H-4/00, H-13/00 (Jable) ter H-12/00 in H-15/00 (Rugvica).

**Ključne besede:** koruza, hibridi, trohnoba stebela, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium* spp.

### ABSTRACT

#### THE TOLERANCE OF LOCAL MAIZE CULTIVARS TO STALK ROT

The resistance against stalk rot of two slovenian populations, and four slovenian and 15 croatian maize hybrids, was investigated during two years. In the first year, the attack was stronger on two locations in Croatia (Rugvica, Ludbreg), when compared with the slovenian locations (Jable, Ljubljana). The incidence of broken stalks was higher in locations where the disease was more severe. There were significant differences for stalk rot (in field conditions). The most tolerant hybrids were H-13/99, H-

<sup>1</sup> doc., dr. agr. znan., SI-1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, pp 2995

<sup>2</sup> dr. agr. znan., HR-1000 Zagreb, Marulićev trg 5/1

<sup>3</sup> red. prof., dr. agr. znan., SI-1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, pp 2995

<sup>4</sup> dr. agr. znan., HR-1000 Zagreb, Marulićev trg 5/1

<sup>5</sup> dipl. ing. kmet., SI-1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, pp 2995

9/99, H-5/99 and H-7/99, but H-4/99, H-6/99, and both populations were found to be the most susceptible. In 1999, the stalk anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum graminicola* ([Ces.] G. W. Wils.) was detected in Slovenia for the first time. In the experimental station at Jable, 2-35 % of the plants of various hybrids were affected by this fungus. The first artificial inoculation with this fungus took place in 2000. The significant differences among the studied cultivars were found only when the plants had been artificially inoculated. The most susceptible cultivars were H-15/00 and H-7/00, and the most tolerant were H-2/00 and H-13/00. However, in natural conditions the most susceptible were H-6/00 and H-7/00 at Jable, and H-13/00 and H-10/00 at Rugvica, but H-4/00 and H-13/00 (Jable), and H-12/00 and H-15/00 (Rugvica) appeared to be tolerant.

**Keywords:** maize, hybrids, stalk anthracnose, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium* spp.

## 1. UVOD

Trohnoba stebela je še vedno ena od najpomembnejših boleznih koruze v svetu (Christensen, Wilcoxson, 1966). Obolenje vpliva direktno na znižanje pridelka zaradi predčasnega venenja stebela ter skrajšanja dobe polnjenja zrnja. Indirektno pa vpliva na znižanje pridelka tudi zaradi loma stebela, kar predstavlja izgube pri mehaniziranem spravilu. Glive rodu *Fusarium*, kot so *Fusarium graminearum* (Schw.), *Fusarium moniliforme* (Sheldon) in *Fusarium subglutinans* ([Woll. et Reink.] Nelson, Toussoun et Marasas) so najpogostejši povzročitelji stebelne trohnobe na Hrvaškem (Milatović, 1969), v Sloveniji pa *Fusarium subglutinans* in *Fusarium graminearum* (Milevoj, 1978, Milevoj, 1981).

Na Hrvaškem se pojavlja tudi gliva *Colletotrichum graminicola* ([Ces.] G. W. Wils.) (Milatović, Palaveršič 1979, Milatović in sod. 1983), ki je znatno močnejši parazit in ki v razmerah umetne okužbe stebela pri občutljivih genotipih občutno poveča število strohnelih in polomljenih rastlin. Kot navajata Visvary in Warren (1982) je prezimatev te glive omejena, zaradi tega je koruzni ožig bistveno bolj razširjen v primeru ozkega kolobarjenja. Najboljši način varstva koruze pred navedenimi glivami je še vedno vzgoja odpornih kultivarjev.

Cilj raziskav je proučiti odpornost domačih hibridov in populacij koruze za glivo *Colletotrichum graminicola* v razmerah umetne okužbe ter hkrati spremljati pojav glive in jakost okužbe.

## 2. MATERIAL IN METODE DE LA

V l. 1999 smo v poljskih razmerah z naravno infekcijo proučevali odpornost proti stebelni trohnobi *Fusarium* spp. 14 kultivarjev koruze na dveh lokacijah v Sloveniji (Ljubljana, Jable) in na dveh lokacijah na Hrvaškem (Rugvica, Ludbreg). V poskus smo vključili 9 novih hibridov, dve populaciji ter tri standarde. Vsak kultivar je bil posajen po dve vrsti/parcelo v treh ponovitvah. Jakost okužbe stebela smo ocenjevali s pritiskanjem s palcem in kazalcem prvega podaljšanega internodija. Vse rastline, katerih internodiji so se pod pritiskom pokazali kot mehki, smo ocenili kot strohnele. Prikazan je odstotek strohnelih rastlin. Kjer je bilo potrebno, smo izvedli tudi transformacije podatkov z  $\arcsin \sqrt{x}$  ali  $\arcsin \sqrt{1-x}$  (Gomez in Gomez, 1984). Z analizo variance smo, na osnovi povprečnih vrednosti ter LSD, kultivarje razvrstili po odpornosti na 5 skupin (Krueger, Weiler, 1975):

povpr. posk. + > 1 LSD	--	zelo občutljiv
povpr. posk. + 1 LSD	-	občutljiv
povpr. posk. ± ½ LSD	0	srednje občutljiv
povpr. posk. - 1 LSD	+	srednje odporen
povpr. posk. - > 1 LSD	++	odporen

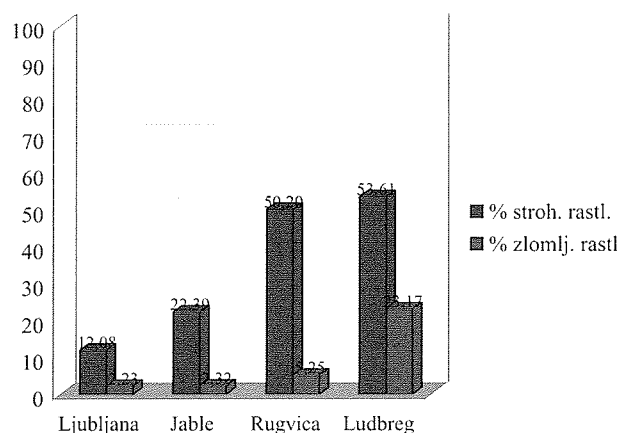
V Jablah smo v naravnih razmerah ocenili samo pojav koruznega ožiga brez ocene jakosti okužbe, prikazan v odstotku obolelih rastlin. V naslednjem letu smo posejali 12 novih hibridov in tri standarde, ki smo jih umetno okužili z glivo *C. graminicola*. Okuževali smo z veterinarsko injekcijo z iglo premera 2 mm ter s stransko luknjo. 1 ml inokuluma, ki je vseboval  $1 \times 10^6$  spor/ml (I-99 I-171) smo vbrizgali v prvi podaljšani internodij v času  $7 \pm 1$  dni po 50 % svilanju. Jakost okužbe stebela z glivo *C. graminicola* v razmerah tako naravne kot umetne infekcije smo ocenjevali vizualno na osnovi zunanjšega obolenja stebela po skali 1-9 (odporna-občutljiva).

### 3. REZULTATI IN DISKUSIJA

V prvem letu preizkušanja se je trohnoba stebela pojavila precej močneje na obeh lokacijah na Hrvaškem kot na lokacijah v Sloveniji (slika 1), zaradi česar je bil na teh lokacijah tudi večji lom stebela. Med kultivarji so ugotovljene statistično značilne razlike glede strohnelih rastlin in loma stebela (pregl. 1 in 2). Odporni hibridi so H-13/99, H-9/99, H-5/99 in H-7/99, občutljivi pa H-6/99 in populacije H-10/99 in H-3/99. V l. 1999 je bil v Sloveniji prvič zabeležen tudi koruzni ožig na stebelu, ki ga povzroči gliva *C. graminicola*, čeprav je bila gliva, ki povzroča to bolezen, izolirana iz listov koruze že prej (Milevoj, 1991).

**Slika 1:** Povprečne vrednosti % strohnelih in polomljenih rastlin 14 kultivarjev koruze v l. 1999.

**Figure 1:** Mean values of % rot and broken stalk of 14 maize cultivars in 1999.



**Preglednica 1:** Tolerantnost 14 kultivarjev koruze na stebelno trohnobo v poskusih na 4 lokacijah v Sloveniji in na Hrvaškem v l. 1999.

**Table 1:** Tolerance of 14 maize cultivars against stalk rot on 4 locations in Slovenia and in Croatia in 1999.

% strohnelih rastlin				
Kultivar	Ljubljana	Jable	Rugvica	Ludbreg
H-13/99	0,6+	0+	16,0++	11,1++
Stand. 2	0,6+	1,8+	26,2+	6,2++
H-9/99	0++	1,1+	17,0++	19,2+
Stand. 3	0++	0+	18,8++	20,3+
H-5/99	0,6+	2,8+	10,1++	30,6+
H-7/99	0	0+	22,8++	26,7+
H-2/99	8,0+	7,2+	63,0-	21,6++
H-15/99	2,3+	19,4	63,7-	51,6
Stand.	12,4+	17,8	72,9--	77,1-
H-12/99	0++	21,3	87,5--	87,5--
H-3/99	32,4--	53,4--	58,4-	95,8--
H-6/99	32,0--	44,8--	90,1--	90,8--
H-10/99	34,4--	58,5--	80,1--	97,1--
H-4/99	55,8--	85,2--	76,2--	89,5--

**Preglednica 2:** Tolerantnost 14 kultivarjev koruze na lom stebela na 4 lokacijah v Sloveniji in na Hrvaškem v l. 1999.

**Table 2:** Tolerance of 14 maize cultivars against stalk lodging on 4 locations in Slovenia and in Croatia in 1999.

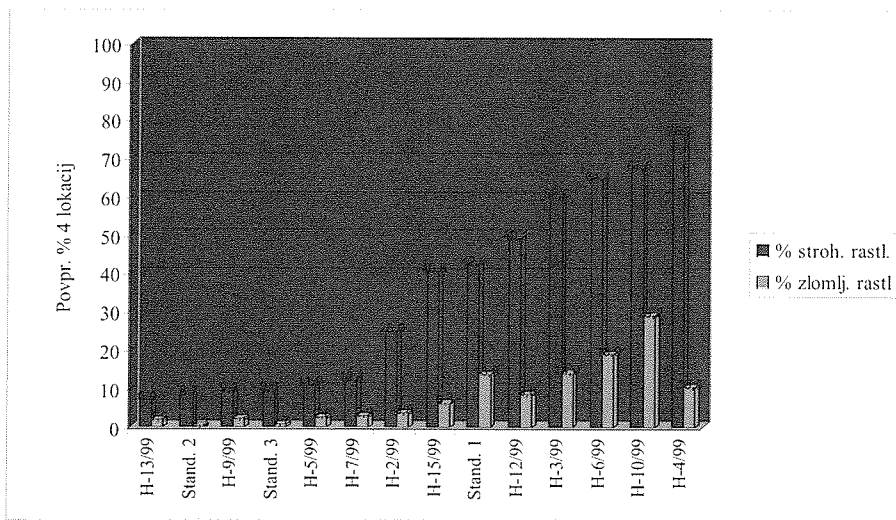
% zlomljenih rastlin				
Kultivar	Ljubljana	Jable	Rugvica	Ludbreg
Stand. 2	0	0	0,5+	0,5++
Stand. 3	0	0	1,1+	1,6++
H-13/99	0	0	3,8	3,8++
H-9/99	0,6	0	3,3	5,4+
H-5/99	0	0	4,4	6,0+
H-7/99	0	0	3,8	7,6+
H-2/99	0	0	4,9	10,3+
H-15/99	0	0	3,8	20,7
H-12/99	0	1,1	3,3	29,9-
H-4/99	1,1	1,2	1,1	38,6-
Stand. 1	0,6	2,4	5,4	46,7--
H-3/99	7,6	3,6	7,1-	37,5--
H-6/99	2,7	0,6	6,5	65,8--
H-10/99	18,6	23,6	24,5--	50,0--

Odstotek okuženih rastlin s koruznim ožigom je prikazan na sliki 2.

Med odstotkom strohnelih rastlin in rastlinami, na katerih se je pojavil koruzni ožig, smo dobili pozitivno korelacijo ( $r=0,83$ ) (slika 3). Najobčutljivejša na koruzni ožig sta bila H-4/99 in populacija H-10/99 s 36,4 oz. 35,1 % okuženih rastlin. V drugem letu smo v Sloveniji preizkušali odpornost na glivo *C. graminicola* v poljskih razmerah z umetnim okuževanjem. Dobili smo majhne, vendar statistično značilne razlike v stopnji odpornosti preizkušanih hibridov (pregl. 3).

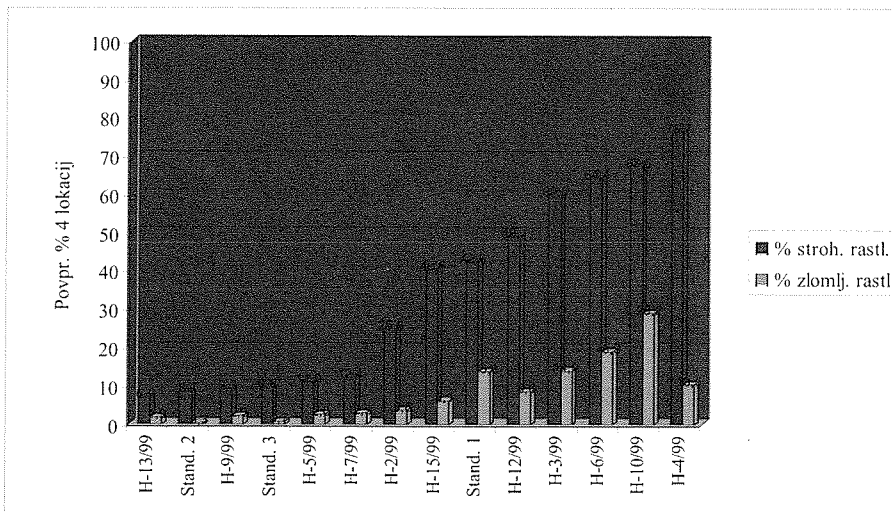
**Slika 2:** Tolerantnost kultivarjev koruze na trohnobo in lom stebela v razmerah naravne infekcije v l. 1999.

**Figure 2:** Tolerance of maize cultivars against stalk rot and lodging in field conditions with natural infection in 1999.



**Slika 3:** Tolerantnost kultivarjev koruze na koruzni ožig v razmerah umetne infekcije v primerjavi z % strohnelih rastlin v l. 1999 - Jable (r=0,83).

**Figure 3:** Tolerance of maize cultivars against stalk anthracnose in field conditions with artificial infection in relation with % stalk rot in 1999 – Jable (r=0,83).



**Preglednica 3:** Tolerantnost domačih kultivarjev koruze na koruzni ožig (*Colletotrichum graminicola*) v razmerah naravne in umetne okužbe v l. 2000.

**Table 3:** Tolerance of local maize cultivars against stalk anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) in field conditions with natural and artificial infections in 2000.

Kultivar	<i>Colletotrichum graminicola</i> (1-9)		
	Naravna okužba		Um. okužba
	Rugvica	Jable	Jable
H-2/00	4,9	1,46	2,98
H-3/00	5,1	1,51	4,25
H-5/00	4,8	1,40	3,29
H-6/00	4,3	1,68	4,57
H-9/00	4,8	1,36	4,32
H-11/00	3,8	1,33	3,90
H-12/00	2,7	1,41	4,36
H-15/00	2,5	1,42	4,93
Stand. 1	5,1	1,54	4,96
Stand. 2	2,0	1,71	3,03
H-13/00	5,0	1,24	3,17
H-10/00	5,0	1,44	4,41
H-7/00	4,1	1,57	4,88
H-4/00	4,8	1,28	3,69
Stand. 3	1,2	1,37	3,95

V Jablah je bila povprečna ocena okužbe z naravno okužbo 1,44, medtem ko se je ocena pri umetni okužbi dvignila na 4,39. Visoka povprečna ocena naravno okuženih rastlin 4,0 je bila v Rugvici, kar je posledica pridelave koruze v monokulturi. V naravnih razmerah v Rugvici je precej večji razpon med najodpornejšim in najboljčutljivejšim hibridom (3,5), medtem ko je v Jablah z umetno okužbo ta razpon bil le 1,98. Ti rezultati niso v prid ocenjevanja zunanjšega obolenja stebela in bi v razmerah umetne infekcije bil boljši pokazatelj odstotek strohnelih in zlomljenih rastlin.

Med hibridi ni bilo korelacije med odpornostjo glede lokacije in načinom okužbe. Pri umetni infekciji so bili najboljčutljivejši H-15/00, H-7/00, najodpornejši pa H-2/00 in H-13/00. V razmerah naravne infekcije so bili najboljčutljivejši H-6/00, H-7/00 (Jable), H-13/00 in H-10/00 (Rugvica), odporni pa so bili H-4/00 in H-13/00 (Jable), H-12/00 in H-15/00 (Rugvica).

#### 4. SKLEPI

V skupnih dvehletnih proučevanjih različnih kultivarjev koruze na stebelno trohnobo (*Fusarium* spp.) smo ugotovili na Hrvaškem večji pojav stebelne trohnobe kot v Sloveniji. V prvem letu preizkušanja so bile na vseh lokacijah ugotovljene signifikantne razlike v tolerantnosti kultivarjev na stebelno trohnobo (*Fusarium* spp.) v naravnih razmerah. V drugem letu so ugotovljene signifikantne razlike v tolerantnosti na koruzni ožig (*C. graminicola*) v Jablah samo v razmerah umetne okužbe. V Rugvici so ugotovljene signifikantne razlike tudi v razmerah z naravno okužbo, kjer je bila tudi mnogo močnejša okužba v primerjavi z naravno okužbo v Ljubljani. V letu 1999 je bil v Sloveniji prvič identificiran tudi pojav koruznega ožiga, ki ga povzroča gliva *Colletotrichum graminicola*, okuženih je bilo, odvisno od kultivarja, 2-35 % rastlin. Ugotovljena je bila tudi pozitivna korelacija med % strohnelih rastlin in rastlinami, okuženimi s koruznim ožigom (*C. graminicola*).

## 5. VIRI

- Christensen J. J., Wilcoxson R.D. 1966. Stalk Rot of Corn Monograph. The American Phytopathological Society at the Hefferman Press Inc., Worcester, Mass, 3, 1-59.
- Gomez K. A., Gomez A. A. 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research. An International Rice Research Institute Book. John Wiley and Sons.
- Krüger W., Weiler N. 1975. Über die Anfälligkeit der Maishybriden gegen Wurzelfäule. Z. Acker- und Pflanzenbau, 141: 205-210.
- Milatović J. 1969. Bolesti korijena i prizemnog dijela stabljike kukuruza na području SR Hrvatske. Zbornik radova. Savjetovanje o novijim dostignućima u zaštiti bilja. Zagreb.
- Milatović J., Palaveršić B. 1979. Ispitivanje otpornosti linija kukuruza prema *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils. u uslovima umjetne infekcije. Zaštita bilja, 30: 255-258.
- Milatović J., Palaveršić B., Vlahović V. 1983. Višegodišnja ispitivanja otpornosti kukuruza prema *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils. Zaštita bilja, 34: 15-26.
- Milevoj L. 1978. Prilog proučavanju bolesti stabla i klipa kukuruza u Sloveniji. Zaštita bilja 146: 343-347.
- Milevoj L. 1981. Prispevek k preučevanju boleznj koruze v Sloveniji. Zbornik Biotehniške fakultete Univ. E. K. v Ljubljani, 37: 215-222.
- Milevoj L. 1991. Varstvo koruze. V knjigi Koruza. Tajnšek T., ČZP Kmečki glas, 127-179.
- Vizvary M. A. Warren H. L. 1982. Survival of *Colletotrichum graminicola* in soil. Phytopathology 72: 522-525.

## PRIMERJAVA POJAVA LISTNIH BOLEZNI KORUZE V SLOVENIJI IN NA HRVAŠKEM

Branko PALAVERŠIĆ<sup>1</sup>, Ludvik ROZMAN<sup>2</sup>, Lea MILEVOJ<sup>3</sup>, Franci CELAR<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Institut za oplemenjvanje i proizvodnju bilja, d.d., Zagreb, Hrvaška

<sup>2,3,4</sup> Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, Slovenija

### IZVLEČEK

Z namenom spremljanja listnih bolezn koruze je bil v l. 1999 posejan poskus na dveh lokacijah na Hrvaškem (Rugvica, Ludbreg) in v Sloveniji (Ljubljana, Jable). Najbolj pogoste bolezni na vseh lokacijah v obeh državah sta bili koruzna progavost (*Exserohilum turcicum*, [Pass] K. J. Leonard in E. G. Suggs) in koruzna rja (*Puccinia sorghi* Schw.). Koruzni ožig (*Colletotrichum graminicola* [Ces.] G. W. Wils.) in očesna pegavost (*Kabatiella zaeae*, Narita in Hiratsuka) sta se pojavila samo v sledovih in še to samo na občutljivih linijah. S testiranjem različnega linijskega materiala v rastlinjaku je bila prvič v Sloveniji determinirana rasa 2 glive *Exserohilum turcicum*. Vseh 11 izolatov iz 7 lokacij na Hrvaškem je bilo prav tako iz rase 2. V dveh letih je bila preizkušena z umetno infekcijo tudi odpornost 4 slovenskih in 15 hrvaških hibridov koruze ter 2 populacij iz Slovenije in sicer v Ljubljani na listno progavost koruze rase 1, v Rugvici pa na raso 2. V prvem letu preizkušanja so bili odporni na obe rasi hibridi H-13/99, H-7/99; občutljivi pa H-2/99 in H-12/99, medtem ko so bila v drugem letu preizkušanja odporna na raso 2 H-5/00 in H-4/00, občutljivi pa H-2/00, H-4/00 in H-10/00. V razmerah umetne okužbe z raso 1 sta bila srednje občutljiva H-5/00 in H-12/00, najbolj občutljiva pa sta bila H-13/00 in H-2/00.

**Ključne besede:** koruza, hibridi, koruzna progavost, koruzni ožig, koruzna rja

### ABSTRACT

#### THE INVESTIGATION OF INCIDENCE OF SOME MAIZE LEAF DISEASES IN CROATIA AND IN SLOVENIA

In 1999, on the two locations in Croatia (Rugvica, Ludbreg) and on the two locations in Slovenia (Ljubljana, Jable) the incidence of maize leaf diseases was investigated. The most frequent disease in both countries were the northern corn leaf blight (*Exserohilum turcicum*, [Pass.] K. J. Leonard in E. G. Suggs) (NCLB) and the maize rust (*Puccinia sorghi* Schw.); whereas the stalk anthracnose (*Colletotrichum graminicola* [Ces.] G. W. Wils.) and maize eyespot (*Kabatiella zaeae*, Narita in Hiratsuka) were only slightly present. For the first time the test of different line materials in the glasshouse showed that the race 2 of the fungus *Exserohilum turcicum* is present also in Slovenia. This race was determined in all 11 isolates from 7 croatian locations. During the past two years we have been testing (with artificial inoculation) the tolerance/resistance of

<sup>1</sup> dr. agr. znan., HR-1000 Zagreb, Marulićev trg 5/1

<sup>2</sup> doc., dr. agr. znan., SI-1111 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, pp 2995

<sup>3</sup> red. prof., dr. agr. znan., prav tam

<sup>4</sup> dr. agr. znan., prav tam



4 slovenian and 15 croatian hybrids, and 2 slovenian populations. In the first year, H-13/99 and H-7/99 were found to be tolerant cultivars to the races 1 and 2 of *Exserohilum turcicum*, but H-2/99 and H-12/99 were susceptible. In the second year it was found that H-5/00 and H-4/00 were tolerant, and H-2/00, H-4/00 and H-10/00 susceptible to the race 2. In artificial conditions (when inoculated with the race 1) the most susceptible appeared to be H-13/00 and H-2/00.

**Key words:** maize, hybrids, *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola*, *Puccinia sorghi*

## 1. UVOD

Sprememba sortimenta in razmer v pridelavi koruze, kot je npr. gostota sklopa, različna obdelava ali namakanje lahko bistveno vplivajo na razširjenost določenih povzročiteljev bolezní oz. njihovih patotipov. Program spremljanja bolezní koruze se je na Hrvaškem začel l. 1985 po zgledu ameriškega programa (Smith, 1977). V petih letih spremljanja ni bila ugotovljena nobena nova bolezen (Brekalo in sod., 1991). V l. 1994 je bila ugotovljena rasa 2 glive *Exserohilum turcicum* (Pass.) K. J. Leonard in E. G. Suggs, ki je potem na Hrvaškem postala dominantna (Palaveršič in sod., 1996, 1997). V Sloveniji od listnih bolezní, še vedno največ škode povzroči rasa 1 glive *E. turcicum* (Rozman in sod., 1998). Cilj raziskav je skupno spremljanje pojava in jakosti okužbe listnih bolezní koruze kot tudi možen pojav novih povzročiteljev bolezní ali patotipov. Z umetnimi okužbami smo v ta namen preizkusili odpornost domačih hibridov in populacij koruze na obe rasi glive *E. turcicum*.

## 2. MATERIAL IN METODE

Z namenom spremljanja bolezní koruze je bil v l. 1999 na dveh lokacijah v Sloveniji (Ljubljana, Jable) in na dveh lokacijah na Hrvaškem (Rugvica, Ludbreg) posejan poskus z enim SC hibridom in 9 linijami koruze, ki so različno odporne proti povzročiteljem listnih bolezní. Šest do osem tednov po cvetenju smo ocenili jakost okužbe po skali (0,5-5, odporna-občutljiva) (Elliot, Jenkins, 1946).

Iz nabranih vzorcev okuženih listov je bilo v čisti kulturi na PDA agarju izoliranih 11 izolatov glive *E. turcicum* iz Hrvaške in dva iz Slovenije. Patotipi glive *E. turcicum* so bili identificirani v rastlinjaku v Botincu. V lončke premera 10 cm smo posejali po 10 zrn, ki smo jih kasneje prerediti na 3-4 rastline v enem loncu. V fazi razvoja 4-5 listov smo rastline okužili s suspenzijo spor v koncentraciji  $3-5 \times 10^4$  spor/ml, z vsakim izolatom po dve ponovitvi (dva lončka) različnih linij. Po infekciji smo rastline za 12 ur postavili v vlažno komoro. Jakost okužbe z glivo *E. turcicum* smo ocenjevali po 14 dneh. Za odporne kultivarje (R) so značilne rumene klorotične pege, za občutljive kultivarje (S) pa so značilne elipsaste sivo-olivne do rjave pege. V skupini, kjer so bile linije Lin-10/99, Lin-11/99, Lin-13/99 in Lin-14/99 bi pri rasi 1 moralo biti (S, R, R, R), pri rasi 2 pa (S, S, S, R).

Odpornost 14 oz. 15 kultivarjev koruze na glivo *E. turcicum* smo preizkusili v poljskih razmerah z umetno infekcijo po metodi Špehar in Palaveršič D. (1970) v letih 1999 in 2000 in sicer v Ljubljani na odpornost na raso 1, v Rugvici pa na raso 2 glive *E. turcicum*. Poleg tega smo spremljali tudi pojav drugih listnih bolezní koruze.

## 3. REZULTATI IN DISKUSIJA

Rezultati spremljanja listnih bolezní koruze so prikazani v preglednicah 1-3. Koruzna progavost (*E. turcicum*) in koruzna rja (*Puccinia sorghi*, Schwein.) sta bili najbolj pogosto zastopani listni bolezní koruze na preizkušanih lokacijah tako v Sloveniji kot

na Hrvaškem (pregl. 1 in 2). Močna okužba s koruzno progavostjo je bila v Rugvici in v Ljubljani, slabša okužba v Jablah, medtem ko se je v Ludbregu ta bolezen pojavila samo v sledovih. Močna okužba z rjo se je pojavila na dveh lokacijah v Sloveniji.

**Preglednica 1:** Pojav in jakost okužbe koruze s koruzno progavostjo (*Exserohilum turcicum*) na štirih lokacijah v Sloveniji in na Hrvaškem v l. 1999.

**Table 1:** Appearance and intensity of infections by northern corn leaf blight (NCLB) on 4 locations in Slovenia and in Croatia in 1999.

Kultivar	<i>Exserohilum turcicum</i> (0-5)			
	Ljubljana	Jable	Rugvica	Ludbreg
Lin-1/99	(-)	-	4	(+)
Lin-2/99	(-)	0,8	3	(+)
Lin-4/99	5	0,8	5	(+)
SC-5/99	4	0	2	(-)
Lin-7/99	2	2	1,5	-
Lin-8/99	1	-	-	-
Lin-10/99	1	1	3	+
Lin-11/99	1	1,3	3	-
Lin-13/99	0,5	0,5	1,5	+
Lin-14/99	0,5	0,5	0,5R	-

Opomba: (-) – suho listje, dryly leaves,

+ - pojav v sledovih, slightly appearance.

**Preglednica 2:** Pojav in jakost okužbe koruze s koruzno rjo (*Puccinia sorghi*) na štirih lokacijah v Sloveniji in na Hrvaškem v l. 1999.

**Table 2:** Appearance and intensity of infections by maize rust (*Puccinia sorghi*) on 4 locations in Slovenia and in Croatia in 1999.

Kultivar	<i>Puccinia sorghi</i> (0-5)			
	Ljubljana	Jable	Rugvica	Ludbreg
Lin-1/99	(-)	4	-	(-)
Lin-2/99	(-)	-	-	(-)
Lin-4/99	2	3	-	(-)
SC-5/99	4	4	0,5	(-)
Lin-7/99	2,5	5	-	3,5
Lin-8/99	1	3	-	-
Lin-10/99	3,5	3	1	3
Lin-11/99	3,5	5	1	3,5
Lin-13/99	1	5	-	-
Lin-14/99	1	-	-	-

Opomba: (-) – suho listje, dryly leaves,

+ - pojav v sledovih, slightly appearance.

Koruzni ožig (*Colletotrichum graminicola* [Ces.] G. W. Wilson.) ter koruzna pegavost (*Bipolaris zeicola* /G.L. Stout/ Shoemaker) sta se pojavili samo na Hrvaškem in še to samo na občutljivih linijah (pregl. 3). V preglednici 4 so prikazani rezultati determinacije patotipov *E. turcicum* v l. 2000. Prvič je bila v Sloveniji ugotovljena tudi rasa 2 glive *E. turcicum*. Po novi terminologiji se rasa 1 imenuje rasa 0, rasa 2 pa rasa 1 (Leonard in sod., 1989), ki pa se do sedaj uporablja predvsem samo še v ameriški literaturi.

**Preglednica 3:** Pojav in jakost okužbe koruze s koruzno pegavostjo (*Bipolaris zeicola*) ter koruznim ožigom na stebelu (*Colletotrichum graminicola*) na dveh lokacijah na Hrvaškem v l. 1999.

**Table 3:** Appearance and intensity of infections by maize eyespot (*Bipolaris zeicola*) and by stalk anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) on 2 locations in Croatia in 1999.

Kultivar	<i>Bipolaris zeicola</i>		<i>Coll. graminicola</i>	
	Rugvica	Ludbreg	Rugvica	Ludbreg
Lin-1/99	-	(-)	3	(+)
Lin-2/99	4,5	(+)	-	(-)
Lin-4/99	-	(-)	-	(-)
SC-5/99-	(-)	-	(-)	-
Lin-7/99	-	(-)	-	-
Lin-8/99	-	-	3	+
Lin-10/99	-	-	-	-
Lin-11/99	+	-	-	-
Lin-13/99	-	-	-	-
Lin-14/99	-	-	-	-

Opomba: ( ) – suho listje, dryly leaves,

+ - pojav v sledovih, slightly appearance.

**Preglednica 4:** Determinacija patotipov glive *Exserohilum turcicum* v rastlinjaku in na polju v l. 2000.

**Table 4:** Determinations of pathotypes of fungus *Exserohilum turcicum* in glasshouse and in the field in 2000.

Lokacija	Država	Število izolatov	
		rasa 1	rasa 2
Rakičan	SLO	0	2
Rugvica	HR	0	4
Oborovo	HR	0	1
Ludbreg	HR	0	1
Kraljevac	HR	0	1
Blato	HR	0	2
Matakovo	HR	0	1
N. Gradiška	HR	0	1
Skupaj		0	13

V prvem letu preizkušanja v razmerah umetne infekcije sta bila na obe rasi glive *E. turcicum* odporna hibrida H-13/99 in H-7/99, občutljiva pa H-2/99 in H-12/99 (pregl. 5). V drugem letu sta bila odporna na raso 2 hibrida H-5/00 in H-4/00, občutljivi pa H-2/00, H-7/00 in H-10/00. Na raso 1 sta bila srednje občutljiva hibrida H-5/00 in H-12/00, občutljiva pa H-13/00 in H-2/00 (pregl. 6). Pri izbiri hibridov za setev v Sloveniji, je potrebno upoštevati tudi tolerantnost hibridov na koruzno progavost.

**Preglednica 5:** Tolerantnost domačih hibridov in populacij koruze na koruzno progavost (*Exserohilum turcicum*) v razmerah naravne in umetne okužbe v l. 1999.

**Table 5:** Tolerance of local maize hybrids and populations to NCLB (*Exserohilum turcicum*) in conditions of natural and artificial infections in 1999.

<i>Exserohilum turcicum</i> (0-5)			
Kultivar	Umetna okužba		Naravna okužba
	Rugvica	Ljubljana	Jable
	rasa 2	rasa 1	rasa 1
Stand. 1	2,6	3,1	0,0
H-2/99	3,8	3,5	2,5
H-3/99	1,4	2,8	0,0
H-4/99	2,5	2,4	0,5
H-5/99	1,9	2,4	3,0
H-6/99	3,4	2,5	1,0
H-7/99	1,9	1,3	1,3
Stand. 3	2,9	3,1	2,3
H-9/99	1,6	2,6	2,5
H-10/99	3,5	2,4	0,5
Stand. 2	2,1	3,5	2,5
H-12/99	2,8	3,8	1,0
H-13/99	1,6	1,0	1,0
H-15/99	2,1	2,6	2,0
Povprečje	2,4	2,6	1,5
LSD <sub>p=0,05</sub>		1,03	1,27

**Preglednica 6:** Tolerantnost domačih hibridov koruze na koruzno progavost (*Exserohilum turcicum*) v razmerah naravne in umetne okužbe v l. 2000.

**Table 6:** Tolerance of local maize hybrids to NCLB (*Exserohilum turcicum*) in conditions of natural and artificial infections in 2000.

<i>Exserohilum turcicum</i> (0-5)		
Kultivar	Umetna okužba	
	Rugvica	Ljubljana
	rasa 2	rasa 1
H-2/00	3,5	4,40
H-3/00	2,0	3,51
H-5/00	1,4	2,55
H-6/00	2,4	3,52
H-9/00	2,4	3,43
H-11/00	2,8	3,62
H-12/00	2,1	2,73
H-15/00	2,3	3,11
Stand. 1	3,6	4,51
Stand. 2	2,8	3,43
H-13/00	2,5	3,60
H-10/00	3,3	3,47
H-7/00	3,4	3,07
H-4/00	1,5	3,06
Stand. 3	2,9	3,58
Povprečje		3,56
LSD <sub>p=0,05</sub>		0,97

#### 4. SKLEPI

Tako v Sloveniji kot na Hrvaškem sta koruzna progavost (*Exserohilum turcicum*) in koruzna rja (*Puccinia sorghi*) najpogostejši bolezn listov koruze, medtem, ko sta se koruzni ožig (*Colletotrichum graminicola*) ter koruzna pegavost (*Bipolaris zeicola*) pojavili samo na Hrvaškem. V l. 2000 je bila v Sloveniji prvič ugotovljena tudi rasa 2 glive glive *Exserohilum turcicum*. V obeh letih preizkušanja sta v razmerah umetne infekcije bila odporna na obe rasi omenjene glive po dva hibrida, po dva oz. trije pa občutljivi, kar je potrebno upoštevati pri izbiri hibridov za Slovenijo.

#### 5. VIRI

- Brekalo J., Palaveršič B., Rojc M. 1991. Monitoring the occurrence and severity of maize disease in Croatia from 1985-1989. *Zaštita bilja*, 42: 51-60.
- Elliot C., Jenkins M. T. 1946. Helminthosporium leaf blight of corn. *Phytopathology* 36: 660-666.
- Leonard K. J., Levy Y., Smith D. R. 1989. Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. *Plant Dis.* 73: 776-777.
- Palaveršič B., Lendler V. Novi patotip gljive *Exserohilum turcicum* Pass. u Hrvatskoj. *Fragmenta phytomedica et herbologica* 24: 29-34.
- Palaveršič B., Warren H. L., Brekalo J. 1997. Monitoring maize pathogens in Croatia. *Proceedings 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. Montpellier, France: 753-757.
- Rozman L., Milevoj L., Celar F., Valič N. 1998. Proučevanje odpornosti domačih linij in populacij koruze na glivične bolezni. *Zbornik simpozija "Novi izzivi v poljedelstvu ž98"*, Dobrna 1997, 219-224.
- Smith D. R. 1977. Monitoring corn pathogens. *Proc. Ann. Corn and Sorghum Res. Conf.* 32: 106-121.
- Špehar V., Palaveršič D. 1970. Corn resistance to leaf blight (*Helminthosporium turcicum* Pass.). *Savremena poljoprivreda* 17: 463-468.

## **BAKTERIJSKA UVELOST PELARGONIJ *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown 1923) Dye 1978**

Tina DEMŠAR<sup>1</sup>, Tanja DREO<sup>2</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Nacionalni inštitut za biologijo,  
Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,  
Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija

### **IZVLEČEK**

Bakterijsko uvelost pelargonij povzroča bakterija *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown 1923) Dye 1978, ki okužuje rastline iz rodu *Geranium* in *Pelargonium*.

Zastopanost in izraženost bolezenskih znamenj na rastlini sta odvisna od gostiteljske rastline (vrsta in kultivar), razmer okolja in seva patogene bakterije. Na okuženih rastlinah se sprva na spodnji površini listov pojavijo majhne, vdrte, vlažne pege, ki so kasneje opazne tudi na zgornji površini listov. Na listih se pojavijo tudi značilna klorotična in nekrotična območja. Bakterija se po žilnem sistemu širi po okuženi rastlini in povzroča venenje celotne rastline. Bakterija lahko preživi leto dni na odmrlem rastlinskem tkivu, na površju negostiteljskih rastlin in tudi epifitsko na gostiteljskih rastlinah ne da bi povzročala razvoj bolezenskih znamenj. Glavni vir okužb je vrtnarsko orodje, ki se uporablja za ločevanje potaknjencev od matične rastline. Okužba se širi tudi s škropljenjem vode po rastlinah, z odtekanjem vode iz visečih košar na spodaj postavljene občutljive rastline, s fizičnim kontaktom med rastlinami in tudi posredno z nekaterimi žuželkami. Preprečevanje bolezni temelji na uporabi pregledanih, neokuženih matičnih rastlin in strogih higienskih predpisov.

Za zanesljivo diagnozo je potrebno izolirano bakterijo določiti z različnimi testi kot so uporaba različnih gojišč, imunofluorescenca, biokemični testi in hipersenzitivna reakcija na listih tobaka.

**Ključne besede:** *Pelargonium* sp., rastlinske patogene bakterije, *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*

### **ABSTRACT**

## **BACTERIAL BLIGHT OF GERANIUM *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown 1923) Dye 1978**

Bacterial blight, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown 1923) Dye 1978, is the most destructive disease of *Pelargonium* and *Geranium* cultivars. Symptoms vary depending on the cultivar and species affected environmental conditions and the strain of the bacterium. Infected plants first develop small, sunken, water-soaked spots on the lower leaf surface. After several days spots become apparent on the upper surface of the leaves. The spots are then followed by wedge-shaped areas of chlorosis and necrosis. The bacterium moves into the vascular system and

<sup>1</sup> univ. dipl. biol., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

<sup>2</sup> študentka mikrobiol., prav tam

<sup>3</sup> prof., dr. biol. znan., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

eventually causes wilt of the entire plant. The bacterium can survive for at least a year in undecomposed plant tissues, on foliage of nonhost plants and epiphytically on pelargonium and geranium leaves without causing symptoms. The most common means of spreading the bacterium is by cutting tools during propagation, by splashing water, dripping of water from hanging baskets above a susceptible crop, plant to plant contact and by some insects which can transmit the bacterium from diseased to healthy plant. Control measures must be based upon establishing pathogen-free certified plants and following strict sanitary procedures.

The laboratory conformation of isolated bacteria is based on different media, immunofluorescence and biochemical tests and hypersensitivity reaction on tobacco leaves.

**Key words:** *Pelargonium* sp., plant pathogenic bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*

## 1. UVOD

Bakterija *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown 1923) Dye 1978 okužuje rastline iz rodu *Pelargonium* in *Geranium*. Povzročča bakterijsko uvelost ali črno gnilobo stebel in pegavost listov pelargonij. Bolezen je razširjena v večini držav, kjer gojijo pelargonije, tudi v Sloveniji. Najbolj občutljive na okužbo so gojene pelargonije: *Pelargonium hortorum*, *Pelargonium peltatum* in *Pelargonium domesticum*. Na geranijah se bolezen pojavlja redko.

## 2. OPIS BOLEZNI IN BOLEZENSKA ZNAMENJA

Bolezenska znamenja bakterijske uvelosti pelargonij se pojavljajo na listih, stebli in potaknjencih v obliki pegavosti listov, sistemskega venenja in nekroz stebel. Zastopanost in izraženost bolezenskih znamenj na rastlini sta odvisna od vrste in varietete gostiteljske rastline, seva patogene bakterije in razmer okolja.

Okužba listov se izvrši preko listnih rež, hidatod in ran. Najprej se na spodnji površini lista pojavijo majhne, okrogle, temnozeleno, vlažne pege, ki se kasneje povečajo, rahlo vdrejo in rdeče rjavo obarvajo, nikoli pa niso večje od 2-3 mm v premeru. Rob peg je zelenorumen in jasno viden. Pege lahko postanejo črne, trde in suhe. Pri nekaterih varietetah pelargonij se pege lahko pojavljajo tudi v zelo nepravilni obliki-kot nekroze. Iz listnih peg se bakterija lahko širi v žilni sistem rastline ter pri tem povzročča sistemske simptome venenja listov in suho gnitje stebela. Značilna so tudi klinasta (v obliki črke V) klorotična in nekrotična območja. Listi ostanejo na rastlini ali pa odpadejo. Primarno bolezensko znamenje okužbe rastline preko koreninskega sistema je venenje spodnjih listov.

Žilni sistem stebela približno 2-4 tedne po primarni okužbi potemni, lahko postane črn. Če tkivo stebela prerežemo na prehodu med zdravim in bolnim delom, opazimo izločanje bakterijskega izcedka. Okuženi poganjki pogosto izgubijo liste. Redko se pojavi gnitje korenin. Včasih si okužene rastline opomorejo in razvijejo na videz zdrave poganjke, ki kmalu zatem propadejo.

Okuženi potaknjenci ne tvorijo koreninskega sistema. Steblo počasi gnije od svoje baze navzgor. Najprej venejo spodnji listi, včasih se na njih pojavijo tudi nekrotična območja nepravilnih oblik. Steblo potaknjenca po približno 2-4 tednih v zemlji postane temno, suho (Smith *et al.*, 1988; Daughtrey *et al.*, 1995)

### 3. DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA RAZVOJ BOLEZNI

#### 3. 1. Gostiteljska rastlina

Med ključnimi dejavniki, ki vplivajo na razvoj bolezni so: starost rastlin in njihovo fiziološko stanje ter različna občutljivost posameznih varietet pelargonij. Najbolj občutljive pelargonije so *P. hortorum* (*P. zonale*) in *P. peltatum*. Slednje so pogosto latentno okužene. Delno rezistentne pelargonije so *P. domesticum* Martha Washington in *P. graveolens*. Rezistentne pelargonije so *P. cordifolium*, *P. cucullatum*, *P. tomentosum*, in *P. scarboriae* Sweet (Daughtrey et al., 1995).

#### 3. 2. Patogena bakterija

Različni sevi bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* so različno virulentni. Razlikujejo se v sposobnosti tvorbe lokalnih in sistemskih okužb (pegavosti listov in gnitja stebel).

#### 3. 3. Okolje

Optimalna temperatura za rast bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* je 24-26°C.

Visoka vlažnost zraka in visoka vlaga v zemlji, zaradi prekomernega zalivanja, ustvarjata idealne razmere za širjenje okužbe. Optimalne razmere za razvoj bakterij nastanejo tudi, ko so hranilne snovi v tleh pod optimumom za rast rastline. Pri prekomernem gnojenju rastlin z dušikom se bolezenska znamenja hitreje izrazijo. Tudi prekomerno gnojenje s fosforjem, ki zmanjša absorpcijo anorganskega dušika in povzroči hitrejšo staranje rastlin, poveča občutljivost rastline na okužbo. Razvoj bakterij lahko posredno povzroči tudi akumulacija amino kislin in amidov v rastlini, ki se dogodi zaradi pomanjkanja kalija.

Najbolj vitalne in najmanj občutljive na okužbo so navadno tiste rastline, ki jih gnojimo z zmanjšanimi koncentracijami dušika in fosforja in povečanimi koncentracijami kalija in kalcija (Kivilaan in Scheffer, 1958).

### 4. ŠIRJENJE BOLEZNI

Glavni vir okužb je vrtnarsko orodje, ki se uporablja za ločevanje potaknjencev od matične rastline. Okužba se širi tudi s škropljenjem vode po rastlinah ali pri povišani vlažnosti zraka, ko so listi na rastlinah vlažni in mokri. Bakterija lahko več mesecev preživi na listih rastlin (tudi negostiteljskih rastlin), ne da bi pozročila razvoj bolezenskih znamenj. Okužba se lahko širi tudi s fizičnim kontaktom med rastlinami. Vir okužbe so tudi okužena tla, v katerih bakterija preživi tudi 6 mesecev in več. Okužba se še posebno hitro širi tedaj, ko so rastline na gosto posajene in je vlaga v tleh, zaradi prekomernega zalivanja, povišana. Bakterija se prenaša tudi posredno z nekaterimi žuželkami (ščitkar *Trialeurodes vaporariorum*, resarji). Pomemben vir okužb so latentno okužene rastline; najpogosteje so to bršljanaste pelargonije *Pelargonium peltatum* ter *Pelargonium graveolens* (Munnecke, 1954).

### 5. ZATIRANJE BOLEZNI, UKREPI

Zatiranje bolezni temelji na vzgoji zdravih matičnih rastlin. Zelo enostaven test zastopanosti bakterij, ki se še vedno uporablja v proizvodnji, je metoda "culture index-



ing". Po tej metodi se izbrani rastlini odstrani zgornji del stebela in ga vkorenini v sterilnem substratu. Spodnji del stebela te rastline se segmentira in inkubira v hranilnem gojišču za bakterije. Če je test na bakterije negativen, se vkoreninjeni poganjek lahko uporabi kot matična rastlina za potaknjence. Danes se pri vzgoji zdravega, neokuženega rastlinskega materiala uporabljajo še druge diagnostične metode: različna gojišča, serološki testi, zlasti imunofluorescenca in v zadnjem času molekularne metode (PCR) (Nameth *et al.*, 1999).

Glavni ukrepi za preprečevanje okužbe in širjenja bolezni so: razkuževanje vrtnarskega orodja med ločevanjem potaknjencev od matičnih rastlin, gojenje potaknjencev v ločenih loncih in sterilnem substratu, ne prekomerno zalivanje in škropljenje rastlin z vodo, uravnoteženo gnojenje rastlin, zatiranje škodljivcev in izvajanje strogih higienskih predpisov.

## 6. LABORATORIJSKO DOLOČANJE

Boleznska znamenja bakterijske uvelosti pelargonij so podobna tistim, ki jih povzročajo nekateri drugi povzročitelji bolezni pelargonij: *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp., *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas cichorii*; zato je za postavitev diagnoze potrebna laboratorijska določitev.

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo določamo zastopanost bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* v rastlinah z izraženimi bolezenskimi znamenji in v latentno okuženih rastlinah.

Izbrane dele rastlin z izraženimi bolezenskimi znamenji najprej površinsko razkužimo v 70% etanolu in spiramo v sterilni bidestilirani vodi. Izrezane koščke tkiva na prehodu med zdravim in okuženim delom, inkubiramo v fosfatnem pufru ter ekstrakt naneseemo na YDCA gojišče (yeast dextrose chalk agar) in stekelca za izvedbo serološkega testa imunofluorescence. V primeru latentno okuženih rastlin naredimo izolacijo ločeno iz listov, stebel in korenin. Za preverjanje oziroma potrditev sumljivih bakterijskih izolatov uporabljamo še gojišča SPA, King B agar in SX agar, test indirektno imunofluorescence, hipersenzitivno reakcijo na listih tobaka in različne biokemične teste (Klement *et al.*, 1990; Schaad, 1988)

## 7. VIRI

- Daughtrey, M. L., Wick, R. L., Peterson, J. L. 1995. Compendium of Flowering Potted Plant Diseases, The American Phytopathological Society.
- Kivilaan, A., Scheffer, R. P. 1958. Factors affecting development of bacterial stem rot of pelargonium. *Phytopathology*, 48: 185-191.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Munnecke, D. E. 1954. Bacterial stem rot and leaf spot of *Pelargonium*. *Phytopathology*, 44: 627-632.
- Nameth, S. T., Daughtrey, M. L., Moorman, G. W., Sulzinski, M. A. 1999. Bacterial Blight of Geranium: A History of Diagnostic Challenges. *Plant Disease*, 83, 3: 204-212.
- Schaad, N. W. 1988. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*.
- Smith, I. M., Dunez, J., Lelliot, R. A., Phillios, D. H., Archer, S. A. 1988. *European Handbook of Plant Diseases*, Blackwell Scientific Publications.

## PRVI REZULTATI UPORABE NOVIH LABORATORIJSKIH METOD ZA UGOTAVLJANJE ZASTOPANOSTI VIRUSA, KI POVZROČA RAZBRAZDANJE LESA NA VINSKI TRTI V SLOVENIJI

Nataša PETROVIČ<sup>1</sup>, Petra ŠOSTER<sup>2</sup>, Zora KOROŠEC – KORUZA<sup>3</sup>,  
Maja RAVNIKAR<sup>4</sup>, Bao Zhong MENG<sup>5</sup> in Dennis GONSALVES<sup>6</sup>

<sup>1,2,4</sup> Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,  
Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo,  
Ljubljana, Slovenija

<sup>5,6</sup> Department of Plant Pathology, Cornell University,  
New York State Agricultural Experiment Station (NYSAES),  
Geneva, ZDA

### IZVLEČEK

Uvajamo laboratorijske metode za ugotavljanje zastopanosti povzročitelja boleznih razbrazdanja pri vinski trti (Rupestris stem pitting associated virus 1, RSPaV-1): serološke metode (imunski pivnik in ELISA) in RT-PCR. Preliminarne analize kažejo okuženost šestih od šestih analiziranih trsov indikatorske trte *Vitis rupestris* sorte St. George in okuženost štirih od petih analiziranih trsov *Vitis vinifera* sorte Refošk. Zanimivo je dejstvo, da nobeden od okuženih trsov *V. rupestris* in dva od štirih okuženih trsov Refoška ne kaže nikakršnih znamenj razbrazdanja.

**Ključne besede:** detekcijske metode, RSPaV-1, vinska trta, virus razbrazdanja lesa vinske trte, *Vitis vinifera*, *Vitis rupestris*

### ABSTRACT

#### FIRST RESULTS ON THE USE OF LABORATORY METHODS FOR DETECTION OF RUPESTRIS STEM PITTING ASSOCIATED VIRUS 1 IN GRAPEVINES IN SLOVENIA

We are introducing laboratory methods for a detection of the causal agent of rupestris stem pitting disease, a rupestris stem pitting associated virus 1 (RSPaV-1): serological methods (ELISA and Western blot) and RT-PCR. The techniques have generated some interesting preliminary results on the presence of the RSPaV-1 in indicator vines of *V. rupestris* cv. St. George, and in *V. vinifera* cv. Refošk. Analyses showed the infection of six (out of six analysed) St. George plants, and the infection of four (out of five

<sup>1</sup> dr. biol. znan., SI-1000 Večna pot 111

<sup>2</sup> študentka mikrobiol., prav tam

<sup>3</sup> doc. dr. znan., SI-1111 Jamnikarjeva 101

<sup>4</sup> prof. dr. znan., SI-1000 Večna pot 111

<sup>5</sup> dr. bio. znan., Geneva, NY 14456, ZDA

<sup>6</sup> prof. dr. znan., prav tam

analysed) Refošk vines. Interestingly, all infected St. George vines and two of the positively analysed Refošk vines show no symptoms of rugose wood.

**Key words:** detection methods, grapevine, rugose wood, Rupestris stem pitting associated virus, RSPaV-1, *Vitis vinifera*, *Vitis rupestris*

## 1. UVOD

Rupestris stem pitting (RSP) je leta 1976 odkril A. C. Goheen v Kaliforniji (Goheen, 1998). Novejše objave kažejo, da je RSP ena zelo razširjenih boleznih, ki jo povzroča virus, povezan z razbrazdanjem lesa vinske trte *Vitis rupestris* cv. St. George (angl. Rupestris stem pitting associated virus 1, RSPaV-1) (Meng s sod., 1998; Zhang s sod. 1998; Meng s sod. 1999b).

Klasičen način ugotavljanja okuženosti vinske trte z virusom RSPaV-1, ki je eden od povzročiteljev boleznih razbrazdanja lesa, je indeksiranje na lesni indikator *V. rupestris* cv. Saint George, kjer se po cepljenju v obdobju 2-3 let opazuje pojav značilnih simptomov (Goheen, 1998). Ker je RSP ena zelo razširjenih in gospodarsko pomembnih virusnih boleznih vinske trte, je razvoj hitrejših diagnostičnih metod zelo pomemben za zdravstveno selekcijo klonov vinske trte ter za nadzor pri mednarodnem prometu s sadilnim materialom. Na osnovi določitve sekvence genoma RSPaV-1 je bilo razvitih več metod: serološke metode na osnovi pridobitve protitelesa, kjer so uporabili virusni plaščni protein izražen v bakterijah *Escherichia coli* kot antigen za imunizacijo kuncev (ELISA, imunski pivnik, Meng 1999a) in RT-PCR (Meng s sod. 1998).

## 2. MATERIAL IN METODE

Analizirali smo šest trsov *Vitis rupestris* sorte St. George (A, B, C, D, E, F, Ampelografski vrt Biotehniške fakultete v Kromberku pri Novi Gorici) in pet trsov *Vitis vinifera* sorte Refošk iz nasada zbirke klonov Refoška v Komnu na Krasu.

Za analizo smo uporabili sveže nastrgan floem prevodnega dela enoletnih olesenelih poganjkov (rožg) ali pa floem sveže zmrznjen pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### ELISA

Uporabili smo indirektni postopek ELISA (Clark in Bar-Joseph, 1984) ter poliklonska primarna protitelesa (As 7-276, Cornell University, Meng 1999a), pridobljena z rekombinantnimi tehnikami, v razmerju 1:1000 in sekundarna protitelesa, konjugirana z alkalno fosfatazo (Sigma, A-8025), v razmerju 1:5000. Ostale razmere: Substrat para nitrofenil fosfat (Sigma, 104-105) v koncentraciji 1mg/ml, mikrotiterske ploščice Nunc Maxi sorp, čitalec Dynatech MR 5000 pri 405 nm.

### Imunski pivnik

Metodo smo priredili po postopkih opisanih v Dunbar, 1994. Uporabili smo primarna specifična protitelesa za RSPaV-1 (As 7-276, Cornell University), v razmerju 1:2000, in sekundarna protitelesa z vezano alkalno fosfatazo (Biorad, 170-6518), v razmerju 1:6000. Uporabili smo kemiluminiscenten substrat (Biorad, 170-5018) ter markerske proteine za določanje molekulskih mas pa so bili Prestained SDS-PAGE Standards, Low range (Biorad, 161-0305). PAGE elektroforeza in prenos proteinov iz gela na membrano sta potekala v aparatu za elektroforezo Trans Blot Mini Cell (Biorad). Proteine smo iz gela prenesli na najlonsko membrano (Sigma), ki smo jo izpostavili delovanju sekundarnih protiteles in substrata ter končni produkt zasledili po izpostavljanju filmu (Kodak x-omat, Sigma 19H1287).

**Ekstrakcija virusne ds RNK (dvojnovijačne RNK) in RT-PCR (reverzna transkripcija in verižna reakcija polimeraze)**

Ekstrakcija dsRNK RSPaV-1 je potekala po postopku prirejenem po Hu s sod., 1990. Za RT-PCR po postopku opisanem v Meng s sod. (1999b) smo uporabili reverzno transkriptazo (N808-0018, Perkin Elmer) in Taq polimerazo (N801-0060) ter par začetnih sintetskih nukleotidov, ki določa pomnoževanje 498 bp dolgega fragmenta virusne cDNK (začetnika 9 in 10, Meng s sod. 1999b): RSP 9: 5-GGCCAAGGTTTCAGTTTG-3; RSP 10: 5-ACACCTGCTGTGAAAGC-3. RT in PCR reakciji sta potekali v GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer).

**3. REZULTATI IN DISKUSIJA**

V Preglednici 1 so zbrani podatki o okuženosti šestih trsov *V. rupestris* St. George z virusom RSPaV-1, ki so bili testirani po treh metodah. Rezultati vseh treh metod so pozitivni pri floemu rozg trsov *V. rupestris* B, C in E. Za te trse tako lahko z gotovostjo trdimo, da se v floemu njihovih rozg nahajajo virusi RSPaV-1. Eksperimentalno je bilo dokazano, da je od obeh seroloških testov (ELISA in imunski pivnik) bolj občutljiv imunski pivnik. S to metodo torej lahko zaznamo manjše koncentracije virusa. Tako lahko za *V. rupestris* D in *V. rupestris* F, pri katerih so bili rezultati ELISA negativni, rezultati imunskega pivnika pa pozitivni, predvidevamo, da je do negativnega ELISA rezultata prišlo zaradi manjše občutljivosti tega testa, ki ne zazna dovolj majhnih koncentracij virusa v rastlinskem tkivu. Dodatno potrdilo za okuženost floema rozg trsa *V. rupestris* D nam daje pozitiven rezultat testa RT-PCR. V primeru, ko pri RT-PCR nismo dobili pozitivnega rezultata, moramo upoštevati naslednje pomanjkljivosti te metode: 1) virusno dsRNA pri ekstrakciji lahko izgubimo in 2) začetniki 9 in 10 ne zajamejo vsega spektra sekvenčnih različic genoma RSPaV-1 (Meng, 1999a).

**Preglednica 1:** Primerjava rezultatov treh različnih diagnostičnih metod za analizo virusa RSPaV-1 (ELISA, imunski pivnik in RT-PCR), po katerih so bili testirani trsi *V. rupestris* St. George (trsi A-F) in prikaz zastopanosti znamenj obolelosti razbrazdanja lesa na testiranih trsih.

**Table 1:** Comparison of the results of three different methods of analyses of RSPaV-1 virus (ELISA, Western blot and RT-PCR), on *Vitis rupestris* cv. St. George (vines A-F), and description of the presence of rugose wood symptoms on each of the tested vines.

<i>Vitis rupestris</i> St. George	ELIS	Imunski pivnik	RT-PCR	Bolezenska znamenja razbrazdanja lesa
A	+	+	-	Jih ni
B	+	+	+	Jih ni
C	+	+	+	Jih ni
D	-	+	+	Jih ni
E	+	+	+	Jih ni
F	-	+	-	Jih ni

Preglednica 2 zajema skupen prikaz rezultatov treh diagnostičnih metod za trse *V. vinifera* sorte Refošk. Z njeno pomočjo si lahko, kakor pri trsih *V. rupestris* razložimo, kateri trsi so okuženi z RSPaV-1, oziroma ki s tem virusom niso okuženi. Pri Ref. 38VIII/44 in Ref. 24V/61 negotovosti ni, saj smo z vsemi uporabljenimi metodami dokazali, da sta okužena z virusom RSPaV-1. Ref. 6II/18 je pozitiven po obeh seroloških metodah in negativen po RT-PCR, kar lahko razložimo podobno kot v primeru

*V. rupestris* A (pomanjkljivosti RT-PCR metode). Ref. 20V/4 je z virusom RSPaV-1 okužen, čeprav ELISA tega ni pokazala, kajti, kot je bilo že omenjeno, je imunski pivnik občutljivejša metoda od metode ELISA. Gotovost, s katero lahko trdimo ali je trs okužen ali ne, pa je močno zmanjšana pri Ref. 23V/60, pri katerem je bil virus dokazan le z RT-PCR.

Analiza zastopanosti RSPaV-1 pri vseh analiziranih trsah je pokazala, da so uporabljene laboratorijske metode izredno pomembne, saj lahko ugotovimo virus v rastlini preden (če sploh) se pokažejo kakršnakoli bolezenska znamenja. Tako smo za tri trse Refoška, ki ne kažejo znamenj obolezlosti razbrazdanja lesa, dokazali virus RSPaV-1 z eno (Ref 23V/60), z dvema (Ref 6II/18) ali z vsemi tremi (Ref 24V/61) metodami. Tudi tu (kot pri *V. rupestris* St. George) lahko sklepamo na latentno okužbo z RSPaV-1 in na možno toleranco. Možno pa je tudi razmišljati, da razbrazdanje povzroča nek tretji, neznan, nedoločen, neizoliran patogen, saj etiologija boleznih razbrazdanja lesa še ni popolnoma znana (Goheen, 1998; Meng s sod., 1999b). Za dokončno potrditev zanesljivosti hitrih diagnostičnih metod bi bilo potrebno vzporedno z njimi izvajati klasičen način preverjanja okuženosti vinskih trsov z RSPaV-1 – s cepljenjem na zdrav indikator *V. rupestris* St. George in na večjem številu rastlin.

**Preglednica 2:** Primerjava rezultatov treh različnih diagnostičnih metod za analizo RSPaV-1 (ELISA, imunski pivnik in RT-PCR), po katerih je bilo testiranih pet trsov *Vitis vinifera* sorte Refošk ter prikaz znamenj obolezlosti razbrazdanja lesa na testiranih trsah.

**Table 2:** Comparison of the results of three different methods of analyses of RSPaV-1 virus (ELISA, Western blot and RT-PCR) on five vines of *Vitis vinifera* cv. Refošk, and description of the presence of rugose wood symptoms on each of the tested vines.

<i>Vitis vinifera</i> Refošk (oznaka trsa)	ELISA	Imunski pivnik	RT-PCR	Bolezenski znamenja razbrazdanja lesa
Ref. 20 V / 4	-	+	+	Razbrazdanje na podlagi
Ref. 6 II / 18	+	+	-	Bolezenskih znamenj ni
Ref. 38 VIII / 44	+	+	+	Razbrazdanje na zgornjem delu
Ref. 23 V / 60	-	-	+	Bolezenskih znamenj ni
Ref. 24 V / 61	+	+	+	Bolezenskih znamenj ni

#### 4. SKLEPI

Naše analize opravljene z vsemi tremi tehnikami kažejo okuženost šestih trsov (od šestih testiranih) *V. rupestris* Saint George in okuženost štirih trsov (od petih testiranih) *V. vinifera* sorte Refošk. Zanimivo je, da nobeden od šestih trsov St. George ne kaže bolezenskih znamenj razbrazdanja lesa. Dva od pozitivno testiranih trsov Refoška ne kažeta nobenih znamenj razbrazdanja lesa, eden kaže izrazito razbrazdanje na podlagi (SO 4), eden pa na zgornjem delu. Ti preliminarni rezultati nakazujejo, da so laboratorijske metode lahko izredno pomembne za odkrivanje virusa RSPaV-1 ter za odkrivanje povezanosti tega virusa z boleznijo razbrazdanja lesa.

Prednosti hitrih diagnostičnih metod so relativno visoka občutljivost, hitra izvedba, sposobnost odkrivanja latentnih okužb in možnost njihove priredbe za rutinsko uporabo (RT-PCR in ELISA).

## 5. VIRI

- Clark, M. F., Bar-Joseph, M. 1984. Enzyme Immunosorbent assays in plant virology. Academic Press, Inc., 51-85.
- Dunbar, B. S. 1994. Protein blotting, A practical approach. Oxford University Press, 11-52
- Goheen, A. C. 1989. Virus Diseases and Grapevine Selection. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40, 1: 67-72
- Hu, J. S., Gonsalves, D., Teliz, D. 1990. Characterization of Closterovirus-like Particles Associated with Grapevine Leafroll Disease. *J. Phytopathology* 128: 1-14
- Meng, B. 1999a. Rupestris stem pitting of grapevines: Insights on etiology, and development of reverse transcription-polymerase chain reaction and immunoassays for diagnosis. Doktorska disertacija, Cornell University. 130 s.
- Meng, B., Johnson, R., Peressini, S., Forsline, P.L., Gonsalves, D. 1999b. Rupestris stem pitting associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 191-199
- Meng, B., Sheng-zhi Pang, Forsline, P.L., McFerson, J.R., Gonsalves, D. 1998. Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting virus. *Journal of General Virology*. 79: 2059-2069
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., Golino, D. A., Rowhani, A. 1998. Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem-pitting disease. *Phytopathology* 88: 1231-1237

## IZKUŠNJE S ČRNO PEGAVOSTJO JAGOD IN NJENA RAZŠIRJENOST V JAGODNIH NASADIH V SLOVENIJI

Alenka MUNDA<sup>1</sup>, Metka ŽERJAV<sup>2</sup>, Martina JAKLIČ<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup> Kmetijski inštitut Slovenije

<sup>3</sup> Inšpektorat R Slovenije za kmetijstvo, gozdarstvo, lovstvo in ribištvo

### IZVLEČEK

Leta 1998 smo v jagodnih nasadih v Sloveniji prvič ugotovili črno pegavost jagod. Povzročja jo gliva *Colletotrichum acutatum* Simmonds, ki jo uvrščamo med karantenske škodljive organizme. V vlažnih in toplih obdobjih gliva povzroči precejšnjo izgubo pridelka. V letih 1999 in 2000 smo vpeljali metode za njeno odkrivanje in identifikacijo ter v okviru sistematičnega nadzora raziskali njeno razširjenost in pomen v območjih pridelovanja jagod v Sloveniji.

**Ključne besede:** *Colletotrichum acutatum*, črna pegavost jagod, Slovenija, razširjenost

### ABSTRACT

#### EXPERIENCE WITH STRAWBERRY BLACK SPOT AND ITS DISTRIBUTION IN STRAWBERRY FIELDS IN SLOVENIA

In 1988, Strawberry black spot, caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds, was first confirmed in strawberry fields in Slovenia. The fungus is a quarantine organism and causes significant loss particularly during warm and wet weather. In the years 1999 and 2000 we introduced laboratory techniques for detection and diagnosis of *Colletotrichum acutatum* and investigated its distribution in strawberry growing areas in Slovenia.

**Key words:** *Colletotrichum acutatum*, diagnostics, distribution, Slovenia, strawberry black spot

#### 1. UVOD

Črna pegavost jagod povzročja gliva *Colletotrichum acutatum* Simmonds. Razširjena je v vseh večjih pridelovalnih območjih jagod v Evropi in v letih, ko so vremenske razmere za njen razvoj ugodne, povzročja velike izgube pridelka. V Evropski zvezi in tudi pri nas glivo uvrščamo med karantenske škodljive organizme. V Sloveniji smo jo prvič ugotovili leta 1998 (Munda, 1999) in jo leta 2000 uvrstili na listo A 2 seznama karantenskih škodljivih organizmov (Pravilnik o spremembi pravilnika o zdravstveni kontroli pošiljk rastlin pri trgovanju čez državno mejo in na notranjem tržišču, 2000). V okviru sistematičnega nadzora smo v letih 1999 in 2000 raziskovali njeno razširjenost, pomen in možnosti za omejevanje njenega širjenja.

<sup>1</sup> dr., mag. agr. znan., univ. dipl. inž. kmet., SI-1000 Ljubljana, Hacquetova 17

<sup>2</sup> univ. dipl. inž. kmet., prav tam

<sup>3</sup> univ. dipl. inž. kmet., SI-1000 Ljubljana, Parmova ulica 33

## 2. MATERIAL IN METODE DELA

### 2. 1. Vzorčenje

Vzorčenje smo opravili v sodelovanju s fitosanitarnimi inšpektorji. Pregledovali smo uvožene sadike jagodnjaka *Fragaria x ananassa* Duch. na meji, ob razkladanju, pri dodelovalcih sadik ter v pridelovalnih nasadih (t. i. pregled pri končnem uporabniku). Nabrali smo 157 vzorcev iz 67 nasadov in objektov za dodelavo sadik ter 26 primerkov uvoženega sadilnega materiala (frigo sadike). Za laboratorijsko analizo smo nabrali najstarejše še zelene liste jagodnjaka skupaj s peclji, po en list s posamezne rastline. Vzorec za laboratorijsko analizo je praviloma obsegal 300 listov iz posamezne sorte, nasada ali pošiljke. S tako velikim številom primerkov lahko teoretično odkrijemo že zelo nizke stopnje okužbe (1 % okuženih rastlin v 95 % primerov).

### 2. 2. Odkrivanje okužbe

Čeprav okuži gliva vse dele rastline, so znamenja bolezni - temne uleknjene pege, ki jih prekriva rožnata gmota trosov - izrazita in prepoznavna le na dozorevajočih plodovih. Tedaj lahko odkrijemo okužbo že z vizualnim pregledom in jo kasneje potrdimo v laboratoriju. Med vegetativno rastjo in v letih, ko se zaradi vremenskih razmer bolezenska znamenja na plodovih ne pojavijo, pa je za odkritje okužbe (t. i. skrita ali latentna okužba) potrebna laboratorijska analiza listnih pecljev. Okužbo najbolj zanesljivo ugotovimo na dnišču listnih pecljev in na prilistih. Glivo moramo najprej spodbuditi, da na okuženih delih rastline oblikuje trosišča. V ta namen uporabimo herbicid parakvat, s katerim obdelamo listne peclje in jih nato šest dni inkubiramo na vlažnem filtrirnem papirju, pri temperaturi 250 C in na svetlobi (Cook, 1993). Na okuženih pecljih se razvijejo nespolna trosišča - acervuli, ki so velika do 0,5 mm in prekrita z gmoto rožnatih trosov.

### 2. 3. Mikroskopski pregled

Vrsto *C. acutatum* prepoznamo po naslednjih morfoloških značilnostih:

- velikost trosov: 8,5 – 16,5 x 2,5 – 4 µm
- oblika trosov: vretenasta do koničasta
- velikost set: 12,5 – 22,5 x 3 – 5 µm, se redko razvijejo
- velikost apresorijev: 6,5 – 11 x 4,5 – 7,5 µm
- oblika apresorijev: kijasta ali jajčasta.

Micelij je svetlo siv z belim robom, na spodnji strani rožnat, na gojišču iz krompirjevega agarja (PDA) priraste 9 mm / dan pri temperaturi 270 C.

Identifikacija glive je težavna zaradi pogoste zamenjave z vrsto *C. gloeosporioides* (anamorf *Glomerella cingulata* /Stoneman/ Spauld. et Schrenk.), ki povzroča podobna bolezenska znamenja. Razlikujemo jo po nekoliko večjih in valjastih trosih (9 - 24 x 3 – 4,5 µm) ter daljših setah (45 – 162 x 2,5 – 5 µm) in hitrejši rasti micelija (13 – 14 mm / dan pri temperaturi 270 C, PDA).

### 2. 4. Seroško testiranje

Uporabili smo ga tako za identifikacijo čiste kulture glive kot za odkrivanje okužbe v rastlinskem materialu. Pri slednjem smo listne peclje najprej obdelali s herbicidom parakvat in inkubirali štiri dni pri T 250 C in stalni svetlobi. S spiranjem in ponovno inkubacijo za štiri dni smo dosegli, da se je biomasa glive povečala in povišala kon-



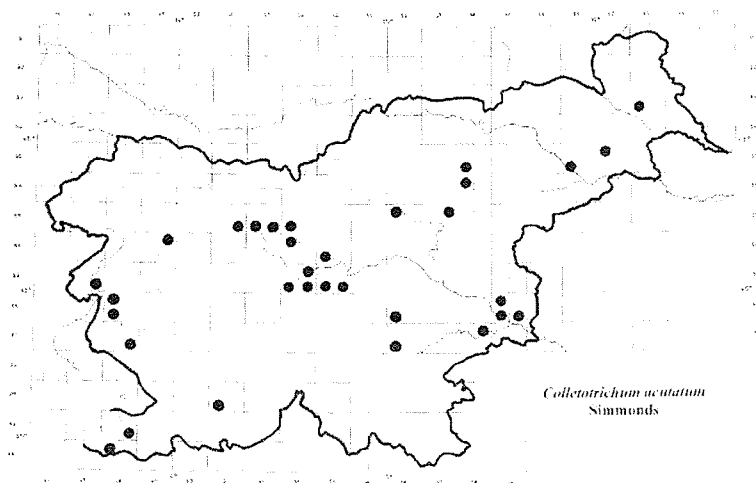
centracija trosov v suspenziji, ki smo jo analizirali (t. i. bioamplifikacija). Pri analizi čiste kulture glive smo zlahka dobili suspenzijo z zadostno količino trosov in postopek bioamplifikacije ni bil potreben. Za identifikacijo glive smo uporabili monoklonska protitelesa MAFF 26 (Adgen), ki so specifična za glivo *C. acutatum* in pta (plate trapped antigen) ELISA test, pri katerem se vzorec veže neposredno na ploščico (Hughes, Lane, Cook, 1997).

### 3. REZULTATI IN UGOTOVITVE

Okužbo smo ugotovili v 65 % pregledanih nasadov v vseh predelovalnih območjih jagod v Sloveniji: Posavje, Dolenjska, Primorska, Gorenjska, okolica Ljubljane, Štajerska, Pomurje. Okuženih je bilo 43 % analiziranih vzorcev jagod. Poleg vrste *C. acutatum* smo v okuženem rastlinskem materialu ugotovili tudi vrsto *C. gloeosporioides* (en primerek), drugih povzročiteljev antraknoze na jagodah (*C. dematium* in *C. fragariae*) nismo ugotovili. Med različnimi sortami jagod ni bilo večjih razlik v stopnji okuženosti, v nekoliko večjem obsegu so bile okužene 'Elsanta', 'Evita', 'Miss' in 'Selva'. Med pregledanimi primerki uvoženega sadilnega materiala so bili okuženi trije: dve pošiljki iz Nizozemske in ena iz Italije. Fitosanitarna inšpekcija je v nasadih, kjer je bila ugotovljena okužba, odredila uporabo fitofarmaceutskih sredstev in kolobarjenje ter prepovedala maloprodajo okuženih sadik.

**Slika 1:** Razširjenost glive *Colletotrichum acutatum* Simmonds v Sloveniji

**Figure 1:** Distribution of *Colletotrichum acutatum* Simmonds in Slovenia



Opazili smo precejšnje razlike v stopnji okuženosti med posameznimi leti: leta 1999 je bilo okuženih 55 % vzorcev, leta 2000 pa le 26 % (izguba pridelka to leto nikjer ni bila večja kot 5 %). Manjši pojav bolezni v letu 2000 lahko pripišemo topli in sušni pomladi, ki je zavirala razvoj bolezni vse do konca obiranja, ko je izbruhnila po nekajdnevem dežju in ponovno v vlažni in deževni jeseni. Ugotovimo lahko, da je bolezen sicer zastopana v vseh pridelovalnih območjih jagod v Sloveniji, njen pojav in intenzivnost pa sta izrazito odvisna od vremenskih razmer.

Primerjava diagnostičnih metod, ki smo jih uporabili za odkrivanje okužbe in identifikacijo glive *C. acutatum* pokaže, da je pri odkrivanju nizkih stopenj okužbe mikroskopski pregled listnih pecljev natančnejši in zanesljivejši kot serološki test. V takih primerih je koncentracija trosov v suspenziji prenizka, da bi jo s serološkimi metodami zaznali, hkrati pa vsebnost rastlinskega soka reakcijo inhibira. Prednost serološkega testiranja je predvsem v nedvoumni identifikaciji vrste *C. acutatum*, ki jo zaradi velike variabilnosti težko z gotovostjo prepoznamo po morfoloških značilnostih. Pri izbiri diagnostične metode je odločilna tudi njena hitrost, kar je še zlasti pomembno pri preverjanju okuženosti sadilnega materiala ob uvozu. Mikroskopski pregled zahteva sicer krajši čas inkubacije (6 dni), vendar je pri velikem številu vzorcev zelo zamuden, s serološkim testom pa dobimo rezultat v devetih dnevih.

#### 4. VIRI

- Cook, R. T. A. 1993: Strawberry black spot caused by *Colletotrichum acutatum*. V: British crop protection council monograph. no. 1993, 54: 303 - 304.
- Gunnell, P. S., Gubler, W. D. 1992: Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, 84, 2: 157 - 165.
- Hughes, K. J. D., Lane, C. R., Cook, R. T. A. 1997: Development of a rapid method for the detection and identification of *Colletotrichum acutatum*. V: *Diagnosis and identification of plant pathogens*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 113 - 116.
- Munda A. 1999: *Colletotrichum acutatum* Simmonds – povzročitelj antraknoze na jagodah v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov 4. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin v Portorožu od 3. do 4. marca 1999, Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin, 209 – 214.
- Pravilnik o spremembi pravilnika o zdravstveni kontroli pošilk rastlin pri trgovanju čez državno mejo in na notranjem tržišču, 2000. Ur. l. RS, št. 57 / 00.

## PROSTO ŽIVEČE ENTOMOFAGNE VRSTE V ZELENJAVI V SEVEROVZHODNI SLOVENIJI

Draga ZADRAVEC<sup>1</sup> in Martina BAVEC<sup>2</sup>

Kmetijska svetovalna služba Slovenije, Kmetijski zavod Maribor

### IZVLEČEK

Z vnosom uvoženih entomofagnih vrst v zaščitene prostore v Sloveniji se je povečalo tudi poznavanje prosto živečih entomofagnih vrst. V zaščiteneh prostorih v Podravju, vključenih v sistem integrirane pridelane zelenjave, je poleg pikapolonic (*Coccinella septempunctata* in *Coccinella bipunctata*) zabeležena še zastopanost navadne tančičarice (*Crysoperla carnea*) - naravnega sovražnika listnih uši in tripsov; plenilske stenice (*Orius majusculus*) - naravnega sovražnika tripsov, listnih uši in navadne pršice; plenilske hrčice (*Aphidoletes aphidimyza*) - naravnega sovražnika breskove listne uši in parazitske osice (*Aphidius matricariae*) - naravnega sovražnika listnih uši, med drugim tudi črne fižolove uši (*Aphis fabae*). Navedene entomofagne vrste so razširjene v zaščiteneh prostorih tudi na 30-50 km oddaljenih lokacijah od najbližjih vnosov. Vse omenjene vrste smo v letu 2000 zasledili tudi pri pridelavi zelenjave na prostem. Pojav sedempikčaste pikapolonice je v zaščiteneh prostorih v Podravju pogostejši od dvopikčaste. Populacija le-teh je številčnejša pri močnejšem napadu sive breskove uši (*Myzus persicae*) in črne fižolove uši. Navadna tančičarica (*Crysoperla carnea*), ki jo v Slovenijo tako kot pikapolonic še nismo uvažali in vnašali v zaščitene prostore v Podravju, je bila v letu 2000 zastopana v nasadih paprike, jajčevca in solatnih kumar v večini zaščiteneh prostorov, pogosto pa tudi pri pridelavi vrtnin na prostem. V letu 1999 pa smo jo zasledili na dveh lokacijah. Roparska stenica (*Orius majusculus*) je bila zastopana v letu 1999 na lokaciji Murska Sobota, kjer še sploh ni bilo nobenega vnosa te predatorske vrste. Ta vrsta je bila zastopana tudi na lokaciji Trgovišče, kjer v prejšnjem letu ni bilo vnosa. V letu 2000 smo jo zasledili v vseh zaščiteneh prostorih v Podravju in Pomurju ter tudi pri pridelovanju paprike in kumar na prostem na 9 lokacijah v Podravju in 3 v Pomurju – zlasti v nasadih paprike in kumar močnejše napadenih s tobakovim resarjem (*Thrips tabaci*). Na lokaciji v Stojncih je bila večja populacija plenilske stenice zastopana v nasadu paprike od 3. 7. do 16. 10. 2000, medtem ko je na sosednji parceli čebule, močno napadene s tobakovim resarjem nismo zasledili. Opaženo je, da se ta plenilska vrsta nerada zadržuje na paradižniku, ki je močno napaden z navadno pršico. Prosto živeča plenilska hrčica (*Aphidoletes aphidimyza*) je bila v letu 2000 zastopana v zaščiteneh prostorih v Pekrah in na prostem v Miklavžu v nasadu jedilnih bučk in kumar pri zelo močnem pojavu listnih uši. Parazitska osica (*Aphidius matricariae*) je bila v letu 2000 zastopana pri pridelavi zelenjave na prostem na 11 lokacijah v Podravju in 2 v Pomurju. Julija smo jo zasledili tudi na klasih pšenice ter parazitirane listne uši s klasi prenesli v zaščitene prostore. Ta vrsta parazitira tudi na ličinke in odrasle osebkke pikapolonic.

**Ključne besede:** entomofagne vrste, zelenjava, škodljivci

<sup>1</sup> univ. dipl. inž. kmet., Kmetijska svetovalna služba Slovenije, Kmetijski zavod Maribor, Vinarska 14

<sup>2</sup> dr., univ. dipl. inž. kmet., prav tam.

## ABSTRACT

### NATURAL ENEMIES AGAINST VEGETABLE PESTS IN THE NORTHEAST OF SLOVENIA

By introducing imported natural enemies against pests in protected vegetable production in Slovenia, knowledge about domestic natural enemies rose up, too. In protected area in the northeast of Slovenia were noticed beside *Coccinella septempunctata* and *Coccinella bipunctata* also *Crysoperla carnea*, *Orius majusculus*, *Aphidoletes aphidimyza* and *Aphidius matricariae*. They were found in locations 30 to 50 km apart from inputs and in the year 2000 also on the open field vegetable production.

**Key words:** natural enemies, vegetable production

#### 1. UVOD

Kot pozitivno posledico vnosa uvoženih entomofagnih vrst v zaščitene prostore v Sloveniji ugotavljamo tudi boljše poznavanje in ugotavljanje zastopanosti domačih entomofagnih vrst na posameznih lokacijah v Podravju. V zadnjih treh letih ugotavljamo v vseh zaščitelih prostorih v Podravju, ki so bili vključeni v sistem pridelave in nadzora integrirano pridelane zelenjave večje število entomofagnih organizmov. Razen pikapolonic (*Coccinella septempunctata* in *Coccinella bipunctata*) v zaščitelih prostorih in pri pridelavi zelenjave na prostem ugotavljamo še navadno tančičarico (*Crysoperla carnea*), naravne sovražnike listnih uši in resarjev, plenilske stenice (*Orius majusculus*), naravne sovražnike resarjev, listnih uši in navadne pršice, plenilske hrčice (*Aphidoletes aphidimyza*), naravne sovražnike breskove listne uši in parazitske osice (*Aphidius matricariae*), naravnega sovražnika listnih uši, med drugim tudi fižolove listne uši (*Aphis fabae*). Navedenih entomofagne vrste ugotavljamo tudi v krajih, oddaljenih 30-50 km od lokacije, kjer smo opravili najbližji vnos v rastlinjake, pa tudi vrste, ki jih še nismo vnašali v rastlinjake. Zato sklepamo, da so posamezne koristne vrste tako kot so nam zagotovili strokovnjaki iz sosednje Avstrije, razširjene tudi v našem prostoru. Vse omenjene vrste smo letos ugotavljali tudi pri pridelavi zelenjave na prostem (Guyer, Stüssi, Zuber, 1996).

#### 2. MATERIAL IN METODE

Analizo razširjenosti prostoživečih entomofagnih vrst v zelenjavi v severovzhodni Sloveniji smo ugotavljali pri rednih dvotedenskih ogledih pri pridelavi zelenjave v zaščitelih prostorih in pri pridelavi na prostem pri pridelovalcih, ki so bili v letu 1999 in v letu 2000 vključeni v projekt poskusne integrirane pridelave zelenjave v Podravju. Pri delu smo evidentirali datum zastopanosti prvih osebkov posameznih prostoživečih entomofagnih vrst, vrtnino na kateri smo jo evidentirali, škodljivca na katerem je prostoživeča entomofagna vrsta bila evidentirana, številčnost entomofagne vrste in škodljivcev, datum zadnjega evidentiranja zastopanosti entomofagne vrste in oceno učinkovitosti entomofagnih organizmov pri zatiranju škodljivcev.

#### 3. REZULTATI IN DISKUSIJA

V rastlinjakih v Podravju pogosto srečamo sedempikčasto pikapolonico, ki je pogostejša od dvopikčaste. Ti vrsti smo ugotavljali pri močnejšem napadu breskove listne uši (*Myzus persicae*), zelo pogosto pa tudi na rastlinah, ki so močnejše napadene s fižolovo listno ušjo.

Navadno tančičarico (*Cryosperla carnea*), ki je v Slovenijo še nismo uvažali in posebej vnašali v zaščitene prostore v Podravju, smo letos ugotavljali pri pridelavi paprike, jajčevca in solatnih kumar v večjem številu rastlinjakov v Podravju. To vrsto smo v letu 2000 opazili zelo pogosto tudi pri pridelavi vrtnin na prostem. V letu 1999 smo jo opazili v Spodnji Polskavi in Brunšviku.

Roparska stenica (*Orius majusculus*) je bila v letu 1999 ugotovljena v Murski Soboti, kjer še sploh ni bilo nobenega vnosa te plenilske vrste. Ugotavljali smo jo tudi v Trgovišču, kjer v lanskem letu ni bilo opravljenega vnosa. Strokovnjaki za zelenjadarstvo iz Kmetijsko-gozdarske zbornice Gradec, kot tudi strokovnjaki iz podjetja Biohelp iz Dunaja, ki se ukvarjajo z razmnoževanjem, distribucijo in svetovanjem uporabe koristnih vrst v zaščitelih prostorih, so nam zagotovili, da je ta vrsta normalno razširjena v jugovzhodnem delu Avstrije in da je zastopana tudi pri pridelavi na prostem. V letu 2000 smo je zasledili v vseh rastlinjakih v Podravju in v Pomurju, kot tudi pri pridelovanju paprike in kumar na prostem v večjem obsegu na lokacijah Formin, Gorišnica, Stojnci, Trgovišče, Velika Nedelja, Cerkevnik, Miklavž, Spodnja Polskava in Pekre v Podravju kot tudi na lokaciji Noršinci, Murska Sobota in Branoslavci v Pomurju. To plenilsko stenico smo ugotavljali na posevkih paprike in kumar močneje napadenih s tobakovim resarjem (*Thrips tabaci*). V Stojncih smo ugotavljali plenilsko stenico *Orius majusculus* na posevku paprike od 3. julija do 16. oktobra. Kljub velikemu številu osebkov plenilske stenice na parceli paprike pa na parceli močno napadeni od istega škodljivca na sosednji parceli pod čebulo, omenjene plenilske vrste nismo opazili. Enako smo ugotavljali, da se ta plenilska vrsta nerada zadržuje na paradižniku, ki je bil močno napaden z navadno pršico, kljub zagotovitvi, da je ta vrsta tudi njen naravni sovražnik.

Plenilsko hrčico *Aphidoletes aphidimyza*, naravnega sovražnika listnih uši smo ugotavljali v letu 2000 v Pekrah in v Miklavžu na Dravskem polju, pri pridelavi jedilnih bučk in kumar na prostem. Ta plenilska vrsta je v naravi razširjena le pri zelo močnem pojavu listnih uši.

Parazitsko osico *Aphidius matricariae* smo v letu 2000 ugotavljali pri pridelavi zelenjave na prostem v Forminu, Pobrežju pri Ptuj, Trgovišču, Veliki Nedelji, Miklavžu, Pekrah, Lokavcu, Kidričevem, Branoslavcih, Noršincih, Cerkevniku, Brunšviku in Spodnji Polskavi. To koristno vrsto smo v letu 2000 registrirali tudi na posevkih pšenice na klasih v juliju. V nekatere rastlinjake smo zato odnesli listne uši, ki so bile parazitirane od parazitske osice kar na pšeničnih klasovih. Žal pa pri tej vrsti ugotavljamo, da parazitira tudi na odraslih osebkih in ličinkah pikapolonic.

#### 4. SKLEPI

Prostoživeče entomofagne vrste vplivajo na vzpostavitev ravnovesja med škodljivimi in koristnimi vrstami pri pridelavi zelenjave v Podravju. Njihova učinkovitost pri zatiranju škodljivih vrst je zelo odvisna od rastline-gostiteljice.

Pri pridelavi zelenjave vplivajo na zmanjšanje populacije škodljivih organizmov, zelo redko pa so ti organizmi dovolj za zagotavljanje števila škodljivih organizmov pod pragom škodljivosti.

Potrebno je opraviti dodatno izobraževanje pridelovalcev zelenjave za spoznavanje prostoživečih entomofagnih organizmov, saj je od njihove zastopanosti zelo odvisna izbira fitofarmaceutskih pripravkov.

Nekatere prostoživeče entomofagne vrste bi se ob manjših vlaganjih in dodatnem izobraževanju, dalo dodatno razmnoževati v Sloveniji ter na ta način prispevati k širjenju biotičnega varstva zelenjave pred škodljivci.

## 5. VIRI

- Albert R., Hassan A.S., Rost M. 1993. Pflanzenschutz mit Nützlingen: im Freiland und unter Glas. Stuttgart:Ulmer : 12-30, 93-166
- Crüger G., 1991. Pflanzenschutz im Gemüsebau. Stuttgart : 5-308
- Guyer U., Stüssi S., Zuber M., 1996. Handbuch zum Nützlingseinsatz in Gewächshäusern und Innenbegrünungen, Grossdietwil : A.1.1.- C.T.2
- Harmut P. 1995. Dokaz o preizkusu znanja iz varstva rastlin : poljedelstvo, zelenjadarstvo, sadjarstvo, vinogradništvo, pridelovanje okrasnih rastlin (prevedel Jože Maček; s predpisi R Slovenije uskladila Marta Ciraj, izdalo MKGP : 115-128
- Lamparter B., 1992. Nützlingseinsatz im Gemüsebau unter Glas, Braunschweig : 6-106
- Macelj M., 1997. Zaštita povrća od štetočinja, Znanje Zagreb : 5-352

## **EQUATION PRO – KORAK NAPREJ PRI ZATIRANJU PERONOSPORE VINSKE TRTE IN KROMPIRJEVE PLESNI**

Ljiljana KREZIĆ

Aropi d.o.o., SI-2327 Rače, Slovenija

### **IZVLEČEK**

Equation Pro je nov fungicid za zatiranje peronospore vinske trte in kromirjeve plesni, ki temelji na novi aktivni snovi famoksadon, odkriti v podjetju Du Pont.

Equation Pro vsebuje 22,5% famoksadona, ki deluje večinoma preventivno. Zoosporam, izpostavljenim famoksadonu, je onemogočen dotok kisika, izgubijo gibljivost in se v nekaj minutah razkrojijo. Druga aktivna snov v proizvodu je cimoksanil, ki deluje kurativno. Rast micelija ustavi pri do en dan stari okužbi pri krompirju in pri dva do tri dni stari okužbi pri vinski trti. Zaradi izredne oprijemljivosti z voščenimi snovmi listov se Equation Pro trdno prilepi na povrhnjico, zaradi česar po dežju ostane približno do 80% pripravka na rastlini. Equation Pro je najbolj učinkovit pri preventivni uporabi ali v začetnih fazah razvoja okužbe.

V pripravi je tudi razširitev registracije za uporabo v paradižniku, kumarah in čebuli. Equation Pro se povsem vključuje v integrirano varstvo rastlin.

### **ABSTRACT**

## **EQUATION PRO – A STEP FORWARD IN THE CONTROL OF GRAPE DOWNY MILDEW AND POTATO LATE BLIGHT**

Equation Pro is the new fungicide in the control of grape downy mildew and of potato late blight, which base on famoxate, the novel fungicide discovered by Du Pont.

Equation Pro contains 22,5% of famoxate, which acts mainly as a protectant compound. Zoospores exposed to famoxate exhibit cessation of oxygen consumption within seconds, lose mobility and lyse within minutes. The second active ingredient in the product is cymoxanil, which has curative properties. It is able to stop mycelial growth of one day old infections of potato and two to three days old infections of grapes. Thanks to its strong affinity for lipids, Equation Pro adheres very firmly to the cuticle and to the waxy substances of the bunches and leaves. For this reason about 80% of the product is unaffected by rainfall after treatment. Equation Pro is most effective when applied preventively or at very early stages of infection. In arrangement is also extension of registration for use in tomato, cucumber and onion. Equation Pro is suitable for integrated crop-protection programmes.

*Do konca redakcije integralnega besedila nismo prejeli.*

## **RELDAN 40 EC – VEČLETNE IZKUŠNJE ZATIRANJA ŠKODLJIVCEV V SADJARSTVU IN VINOGRADNIŠTVU**

Ljiljana KREZIĆ<sup>1</sup>, Andrea MACELJSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Aropi d.o.o., SI 2327 Rače,

<sup>2</sup> Dow AgroScience M.B.H, HR-10000 Zagreb

### **IZVLEČEK**

Reldan 40 EC je dotikalni insekticid na osnovi klorpirifos-metila. Ima širok spekter delovanja na različne škodljivce pri različnih kmetijskih rastlinah.

Uveljavil se je v integriranem varstvu rastlin – predvsem v sadjarstvu za zatiranje jabolčnega zavijača (*Cydia pomonella*) in zavijačev lupine sadja (*Adoxophyes orana*) ter v vinogradništvu za zatiranje grozdnih sukačev (*Eupoecilia ambiguella* in *Lobesia botrana*).

Na posterju prikazujemo večletne učinkovitosti tega standardnega pripravka.

### **ABSTRACT**

#### **RELDAN 40 EC – YEARS OF EXPERIENCES IN THE CONTROL OF PESTS IN FRUIT-GROWING AND IN GRAPEVINE**

Reldan 40 EC is contact insecticide on the base of chlorpirifos-methyl. It has a wide spectrum of acting to many different pests in various agricultural crops.

Very suitable for integrated crop-protection programmes – above all in fruit-growing for control of *Cydia pomonella* and *Adoxophyes orana* and in grapevine for control of *Eupoecilia ambiguella* and *Lobesia botrana*.

On the poster we are showing experiences in last-years of efficiency of Reldan 40 EC. Do konca redakcije integralnega besedila nismo prejeli.



## DOLOČANJE RASTLINSKIH PATOGENOV Z UPORABO METOD NA OSNOVI POLIMERAZNE VERIŽNE REAKCIJE

Jelka ŠUŠTAR-VOZLIČ<sup>1</sup>, Marta ŠABEC-PARADIŽ<sup>2</sup>,  
Mojca VIRŠČEK-MARN<sup>3</sup>, Gregor UREK<sup>4</sup>,  
Vladimir MEGLIČ<sup>5</sup>, Mojca ŠKOF<sup>6</sup>  
Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

### IZVLEČEK

Za detekcijo posameznih fitopatogenih in fitofagnih organizmov ter njihovih bioloških ras, sojev ali različkov uvajamo na Kmetijskem inštitutu Slovenije različne molekularne tehnike, osnovane na polimerazni verižni reakciji (PCR). Tako smo uvedli metodiko, ki je kombinacija tehnik immunocapture in RT-PCR, s katero lahko hitro in zanesljivo določimo zastopanost PVY<sup>NTN</sup> različka krompirjevega virusa Y. IC-PCR metodo vpeljujemo tudi za razlikovanje dveh virulentnih sevov češpljeve šarke (PPV), seva D in M, ki se razlikujeta tudi po svoji epidemiologiji. Z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov določamo bakterijo *Agrobacterium vitis*, ki povzroča bakterijski rak koreninskega vratu na vinski trti, hkrati pa razlikujemo tudi njene biovarje. Za detekcijo krompirjevih ogorčic, *Globodera rostochiensis* in *Globodera pallida* smo uvedli multipleks PCR metodo.

**Ključne besede:** *Agrobacterium vitis*, *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, immunocapture, polimerazna verižna reakcija, PPV, PVY<sup>NTN</sup>, RT-PCR

### ABSTRACT

#### THE USE OF PCR-BASED METHODS FOR DETECTION OF PLANT PATHOGENS

For detection of certain phytopathogenous and phytophagous organisms, their strains, pathotypes or races different molecular methods, based on the polymerase chain reaction (PCR) are being introduced at the Agricultural Institute of Slovenia. Immunocapture RT-PCR method was applied as a quick and reliable method for detection of NTN strain of potato virus Y. IC-PCR is tested for distinguishing two virulent strains of plum pox virus (PPV), strains M and D. With the use of specific primers the causal agent of crown gall disease of grape, *Agrobacterium vitis* and its biovars can be identified. For detection of potato nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* multiplex PCR method was introduced.

**Key words:** *Agrobacterium vitis*, *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, immunocapture, polymerase chain reaction, PPV, PVY<sup>NTN</sup>, RT-PCR

<sup>1</sup> dr., mag., univ. dipl. inž. agr., SI-1001 Ljubljana, Hacquetova 17

<sup>2</sup> univ. dipl. inž. agr., prav tam

<sup>3</sup> dr., mag., univ. dipl. inž. agr., prav tam

<sup>4</sup> dr., mag., univ. dipl. inž. agr., prav tam

<sup>5</sup> dr., mag., univ. dipl. inž. agr., prav tam

<sup>6</sup> univ. dipl. inž. agr., prav tam

## 1. UVOD

Molekularne tehnike, osnovane na polimerazni verižni reakciji (PCR), se v zadnjem času veliko uporabljajo tudi za diagnostiko rastlinskih patogenov. Prednosti teh metod pred tradicionalnimi metodami diagnostike so predvsem v njihovi hitrosti in občutljivosti detekcije. Z njimi lahko določimo tudi različke, katerih sploh ni mogoče določati z drugimi metodami, oz. je določanje s tradicionalnimi metodami (različne morfometrijske in biološke metode) ali s serološkimi metodami dolgotrajnejše in/ali manj zanesljivo.

## 2. KROMPIRJEV VIRUS PVY<sup>NTN</sup>

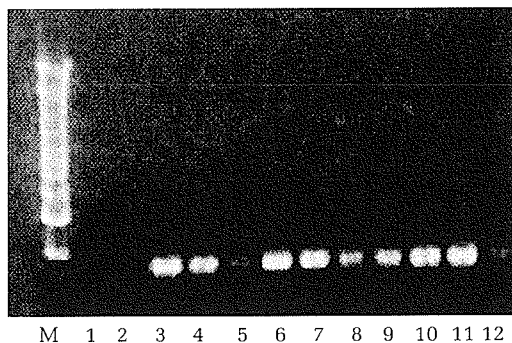
Leta 1987 se je v Sloveniji pojavil nov različek krompirjevega virusa Y (PVY), označen kot PVY<sup>NTN</sup> in se je razlikoval od do tedaj znanega različka PVY<sup>N</sup>. PVY<sup>NTN</sup>, ki je od vseh različkov Y virusa najbolj virulenten, povzroča nekrotične pege na gomoljih (slika 1). Po letu 1988 je skoraj onemogočil semensko pridelavo krompirja v Sloveniji ter povzročil spremembo sortne sestave (Dolničar, 1998). Eden od najpomembnejših ciljev sedanjega programa žlahtnjenja krompirja na inštitutu je vzgoja sort, odpornih proti PVY<sup>NTN</sup>.

Razlikovanje PVY<sup>N</sup> od PVY<sup>NTN</sup> ni možno z vpeljanimi serološkimi metodami. Za detekcijo virusa pri odbiri odpornih klonov v procesu žlahtnjenja ter pri pregledu uvoženega in domačega sadilnega materiala pa je potrebna zanesljiva in hitra metoda. Zato smo uvedli metodiko, ki združuje tehniki immunocapture in RT-PCR (Dedič in Ptaček, 1998). Virus izoliramo s specifičnimi protitelesi (IgG, Bioreba) na elisa ploščici ali v mikrocentrifugirki, kjer izvedemo tudi postopek reverzne transkripcije. V polimerazni verižni reakciji uporabimo specifična začetna oligonukleotida S3 in S4 (Weilguny in Singh, 1998). Najboljše rezultate dobimo, če izoliramo RNA iz svežih ali zamrznjenih listov oz. rastlinic iz tkivne kulture. Intenzivnost črt na gelu je slabša (slika 2), če kot izhodiščni material uporabimo gomolje z nekrozami, zato je potrebno postopek v tem primeru optimizirati.

**Slika 1:** Nekrotični obročki na gomolju krompirja, ki jih povzroča virus Y<sup>NTN</sup>.



**Slika 2:** Elektroforetski prikaz rezultata RT-PCR reakcije 11 analiziranih vzorcev krompirja (M - lestvica, 1 - negativna kontrola, 2, 5, 12 – gomolji z nekrozami sorte 'Igor', 3, 4, 6-11 – listi pozitivnih rastlin različnih sort iz postkontrolne).

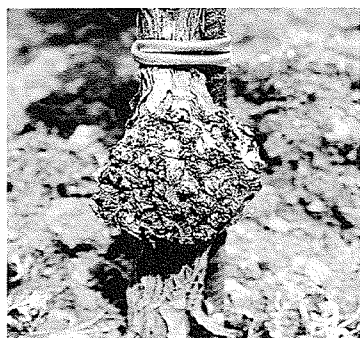


### 3. BAKTERIJSKI RAK KORENINSKEGA VRATU NA VINSKI TRTI (*AGROBACTERIUM VITIS*)

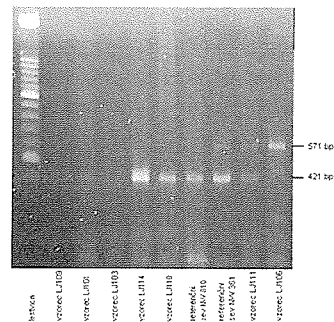
Razvoj tumorskih izrastkov (slika 3) lahko inducirajo le agrobakterije, ki imajo Ti plazmid. Del dedne informacije s Ti plazmida (T-DNA) agrobakterije se prenese v kromosom rastlinske celice. Tako spremenjena rastlinska celica tvori rastlinske rastne hormone, ki pospešujejo rast in razmnoževanje spremenjenih in okoliških celic in s tem tvorbo tumorjev. Hkrati spremenjene rastlinske celice tvorijo tudi specifične snovi, opine, ki olajšajo razmnoževanje agrobakterij v tumorjih. Različni sevi agrobakterij lahko inducirajo sintezo različnih opinov: oktopina, nopalina ali vitopina (Burr *et al.*, 1998).

Z verižno reakcijo s polimerazo lahko z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov določimo zastopanost značilnih sekvenc na T-DNA (slika 4). Začetni oligonukleotid Ia omogoča namnožitev dela *acs* gena nopalinskih in oktopinskih sevov v dolžini 421 bp, začetni oligonukleotid V/Ib pa dela *vis/6b* regije vitopinskih sevov *A. vitis* v dolžini 571 bp. Z uporabo molekularne metode po protokolu, ki so ga opisali Schultz *et al.* (1993), tako lahko identificiramo izolirane bakterije kot *A. vitis* in dokažemo, da imajo Ti plazmid in del potrebnih genov za indukcijo tvorbe tumorjev ter hkrati razlikujemo oktopinske/nopalinske seve od vitopinskih. Dobljene rezultate potrjujemo s testiranjem patogenosti na testnih rastlinah in določanjem vrste opina, ki ga vsebujejo tumorski izrastki s papirno elektroforezo (Otten in Schilperoot, 1978).

**Slika 3:** Tipična bolezenska znamenja so tumorski izrastki, ki se najprej pojavijo okoli cepljenega mesta.



**Slika 4:** S PCR namnoženi značilni fragmenti dokazujejo zastopanost genov na T-DNA delu Ti plazmida izoliranih bakterij: fragment dolžine 421 bp zastopanost gena *acs* pri izoliranih oktopinskih in nopalinskih sevih, 571 bp pa zastopanost regije *vis/6b* pri vitopinskih sevih *A. vitis*)



#### 4. ŠARKA - PPV (PLUM POX VIRUS)

V Evropi prevladujeta dva seva šarke, sev M in sev D. Sev M se z ušmi prenaša hitreje od seva D in povzroča resnejše simptome na breskvah. Sev D okužuje predvsem slive in marelice in se s teh gostiteljev redko prenaša na breskve (López-Moya *et al.*, 2000). Razlikovanje med tema dvema sevoma je pomembno zaradi razlik v njuni epidemiologiji.

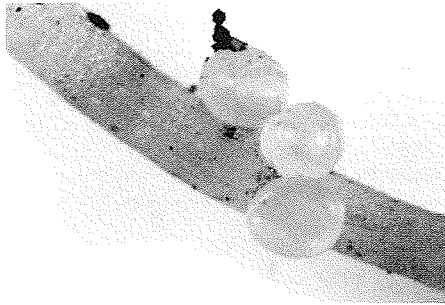
Za potrebe raziskovalnega dela in kot dopolnilno metodo za potrjevanje in preverjanje rezultatov serološkega testiranja (ELISA) uvajamo metodo IC-PCR (immunocapture PCR) po Corvo in Sousa Santos (1995). V primerjavi z ELISA testi so metode na podlagi PCR občutljivejše. Pri metodi IC-PCR v postopku ekstrakcije za vezavo virusa uporabljamo za PPV specifična protitelesa. Po reverzni transkripciji uporabljamo za namnoževanje specifičnih fragmentov začetne oligonukleotide PPV 1 in PPV 2 po Wetzel *et al.* (1991). Z restrikcijsko analizo namnoženih fragmentov z endonukleazo *Rsa I* lahko razlikujemo sev M od seva D. Pri sevu M dobimo po restrikciji 2 črti (okrog 60 bp in okrog 180 bp), pri sevu D pa ostane ena črta s 243 bp.

#### 5. KROMPIRJEVE OGORČICE, *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* IN *GLOBODERA PALLIDA*

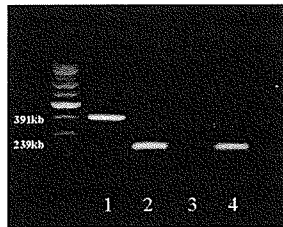
Krompirjevi ogorčici, *Globodera rostochiensis* (GRO) (slika 5) in *Globodera pallida* (GPA) sta karantenska škodljivca, ki lahko povzročita veliko škodo v krompirjevih nasadih (Urek, 1998). Režim uporabe kontaminiranih zemljišč za nadaljnjo pridelavo krompirja je odvisen od vrste krompirjeve ogorčice, ki povzroča škodo.

Poleg klasičnih morfometričnih metod je za detekcijo in diferenciacijo na voljo vrsta imunokemičnih, biokemičnih ter molekularnih metod. Večina le-teh je kompleksnih ali dolgotrajnih. Uvedli smo multipleks PCR metodo, ki je primerna za naše razmere ter je relativno hitra in natančna (Mullholland *et al.*, 1996; Zouhar *et al.*, 2000). Zadošča že DNA, ekstrahirana iz ene ciste. GRO in GPA razlikujemo s pomočjo specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki se vežejo na regijo med ITS1 in 5.8S rRNA genom. Amplifikacija GPA da fragment dolžine 391 bp, GRO pa fragment dolžine 238 bp (slika 6).

**Slika 5:** Rumena krompirjeva ogorčica, ciste na korenini.



**Slika 6:** Determinacija s pomočjo PCR: vzorec 1 in 2 sta kontrolni GPA in GRO, vzorec 3 GPA in vzorec 4 GRO iz cist ekstrahiranih iz okuženega vzorca prsti.



## 6. SKLEP

Predstavljene metode na osnovi polimerazne verižne reakcije, ki smo jih uvedli oz. jih uvajamo na Kmetijskem inštitutu Slovenije, nam omogočajo hitro in zanesljivo detekcijo nekaterih rastlinskih virusov (krompirjev virus YNTN, češpljeva šarka: sev M in sev D), bakterij (*Agrobacterium vitis*) in ogorčic (*Globodera rostochiensis* in *Globodera pallida*) ter njihovih različkov ali sevov, ki jih z drugimi metodami ni mogoče ločiti, oz. je določanje z njimi dolgotrajnejše ali manj zanesljivo. Uporabljamo jih tako za raziskovalne kot za diagnostične namene.

## 7. VIRI

- Burr T.J., Bazzi C., Süle S., Otten L. 1998. Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant disease*, 82: 1288-1297
- Corvo L.M., Sousa Santos M. 1995. Detection of plum pox virus using a simplified polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae*, 386: 383-390
- Dedič P., Ptaček J. 1998. Possibilities to differentiate the potato virus Y (PVY) strains by means of polymerase chain reaction (RT-PCR). *Rostlinna Vyroba*, 44, 12: 545-551
- Dolničar P. 1998. Methods of assessment of susceptibility to PVY in Slovenia. V: Peter K. (Ur.) *Breeding research on potatoes: proceedings*. Quedlinburg, June 23-26, 1998. Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Quedlinburg, 39-40
- López-Moya J.J., Fernández-Fernández M.R., Cambra M., García J.A. 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology*, 76:121-136
- Mullholland V., Carde L., O'Donnell K.J., Fleming C.C., Powers T.O. 1996. Use of the polymerase chain reaction to discriminate potato cyst nematode at the species level. *Proc. BCPC Symposium No. 65: Diagnosis in crop production*: 247-252
- Otten L., Schilperoot R.A. 1978. A rapid microscale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities. *Biochimica Biophysica Acta*, 527: 497-500

- Schultz T.F., Lorenz D., Eichhorn K.W., Otten L. 1993. Amplification of different marker sequences for identification of *A. vitis* strains. *Vitis*, 22: 179-182
- Urek, G. in A. Hržič. 1998. Ogorčice - nevidni zajedavci rastlin : fitonematologija. Ljubljana: samozal. G. Urek, 240 str., ilustr.
- Weilguny H., Singh R.P. 1998. Separation of Slovenian isolates of PVYNTN from the North American isolates of PVYN by a 3-primer PCR. *Journal of Virological Methods*, 71: 57-68
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Dunez J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox virus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355-365
- Zouhar M., Rysanek P., Kočova M. 2000. Detection and differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. *Plant Protect. Sci.*, 36: 81-84

## UPORABA TKIVNIH KULTUR ZA IZBOLJŠANJE DETEKCIJE FITOPLAZEM V VINSKI TRTI

Nataša PETROVIČ<sup>1</sup>, Nataša JERAJ<sup>2</sup> in Maja RAVNIKAR<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Nacionalni inštitut za biologijo,

Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,

Večna pot 111, Ljubljana 1000, Slovenija, e-mail: natasa.petrovic@uni-lj.si

### IZVLEČEK

Neenakomerna razporejenost, nizka vsebnost in sezonska nihanja vsebnosti fitoplazem v trsih predstavljajo glavne ovire pri uvajanju in standardizaciji protokolov za rutinsko uporabo molekularno-bioloških laboratorijskih detekcijskih metod za potrebe potrjevanja in karantenskega nadzora. Rezultati so pokazali višjo vsebnost in enakomernejšo porazdelitev fitoplazem v okuženih rastlinah *Vitis vinifera* in *Catharanthus roseus* gojenih v tkivni kulturi v primerjavi z rastlinami, ki so rasle v zemlji, kar nakazuje možnost uporabe tkivnih kultur kot alternativne metode za izboljšanje razmer za ugotavljanje fitoplazem v vinski trti, posebej, kadar gre za njihovo izredno nizko vsebnost v specifičnih vzorcih ter pri odkrivanju morebitnih latentnih okužb.

**Ključne besede:** *Catharanthus roseus*, detekcijske metode, fitoplazme, tkivna kultura, trsne rumenice, vinska trta, *Vitis vinifera*

### ABSTRACT

#### THE USE OF TISSUE CULTURE FOR IMPROVED DETECTION OF PHYTOPLASMA IN GRAPEVINES

Heterogenous distribution, low concentration and seasonal variations of grapevine yellows phytoplasma in grapevines remain as main problems which prevent the introduction and standardization of molecular biology-based quick laboratory detection protocols for their routine use in certification and quarantine. The results showed increased phytoplasma concentration and homogenous distribution in infected *Vitis vinifera* and *Catharanthus roseus* grown in tissue culture in comparison to plants grown in soil. Present results indicate the potential use of tissue culture as an alternative tool in improving laboratory methods of phytoplasma detection in grapevines, especially in detecting extremely low concentrations of phytoplasma in specific samples of grapevine, and in discovering latent infections.

**Key words:** *Catharanthus roseus*, detection methods, grapevine yellows, grapevine, phytoplasma, tissue culture, *Vitis vinifera*

<sup>1</sup> dr. biol. znan., SI-1000 Večna pot 111

<sup>2</sup> študentka mikrobiol., prav tam

<sup>3</sup> prof. dr. znan., prav tam

## 1. UVOD

Na vinski trti se pojavlja več gospodarsko pomembnih boleznih, ki jih povzročajo različni tipi fitoplazem. Te lahko nastopajo posamič ali v obliki mešanih okužb, v vsakem primeru pa povzročajo enaka bolezenska znamenja (Boudon-Padieu in Maixner, 1998).

Za ugotavljanje zastopanosti fitoplazem, ki povzročajo bolezni trsnih rumenic na vinski trti je opisanih že kar nekaj občutljivih, specifičnih in zanesljivih laboratorijskih metod (Lee 1993; Daire s sod., 1997). Posamezne tipe fitoplazem je mogoče določati z analizami DNK in vzorčenjem primernega izhodnega tkiva. Zaradi nehomogene razporeditve in nizke koncentracije fitoplazem ter vpliva inhibitorjev je ekstrakcija fitoplazemske DNK močno odvisna od izhodnega materiala (specifičnega tkiva, njegove priprave, letnega časa...).

Še vedno pa so pri vseh metodah težave: neenakomerna razporejenost, nizka vsebnost in sezonska nihanja v vsebnosti fitoplazem v trsih. Le-ti so glavne ovire pri uvažanju in standardizaciji protokolov za rutinsko uporabo molekularno-bioloških in seroloških hitrih laboratorijskih detekcijskih metod za potrebe potrjevanja in karantenskega nadzora.

Prejšnje izkušnje kažejo na povečanje koncentracije in na homogeno razporeditev virusov v vseh organih v rastlinah krompirja (Petrovič s sod., 1995) in vinske trte (Tanne, 1997), ki jih gojimo v tkivni kulturi. Predvidevali smo, da se bo zaradi specifičnih razmer rasti v tkivni kulturi podobno pokazalo pri rastlinah vinske trte in *Catharanthus roseus*, ki so okužene s fitoplazmami. Sklepali smo, da bi lahko z uporabo metodike tkivnih kultur poskušali rešiti težave, ki nastopajo pri analizi fitoplazem na vinski trti.

## 2. MATERIAL IN METODE

Za izvoren rastlinski material smo uporabili trse *Vitis vinifera* iz Ampelografskega vrta Biotehniške fakultete v Kromberku in sicer pet trsov sorte Chardonnay, dva sorte Rebula in en sorte Modri pinot, ki kažejo bolezenska znamenja okužbe s fitoplazmami že več let. Analizirali smo jih kot rastline iz vinograda (nabrano septembra 1999) in kot rastline iz tkivne kulture.

Poleg tega smo analizirali tudi rastline *Catharanthus roseus* okužene z izolati rumenic skupin: Aster (AY), X-disease (X-D) in Stolbur (STOL), ki smo jih dobili na Univerzi v Udinah, Italija in *C. roseus* okužene z izolati rumenic Flavescence doree (FD70) in Bois noir (STOL C), ki smo jih dobili iz INRA v Dijonu, Francija. Te rastline so nam služile za izolacijo fitoplazemske kontrolne DNK. Testirali smo jih v obliki rastlin vzgojenih v lončkih v rastlinjaku in v obliki *in vitro* vzgojenih rastlin.

Negativne kontrole so predstavljale zdrave rastline *C. roseus* in *V. vinifera* sorte Zelen, ki je bil vzgojen iz kulture meristema. Tudi te smo analizirali kot rastline vzgojene v zemlji in kot rastline iz tkivne kulture.

Pri rastlinah, ki so rasle v zemlji, smo za testiranje uporabili listne žile iz več različnih poganjkov, pri *in vitro* rastlinah pa smo ločeno testirali celotne poganjke in korenine.

### **Sterilizacija rastlinskega materiala in vzpostavitev tkivne kulture stebelnih nodijev**

Iz mladih, še zelenih, neolesenelih poganjkov (mladic) smo odstranili liste in nadaljnje delo opravljali v laminariju. Mladice smo razrezali na 3 - 4 nodije in jih sterilizirali v 1% natrijevem hipokloritu, čemur je sledilo spiranje v avtoklavirani bidestilirani vodi, ki ga ponovimo trikrat po 5 minut. Na vsake 3 - 4 tedne smo rastline prestavljali na sveže gojišče.



### **Razmere rasti v tkivni kulturi**

Kot osnovno gojišče za nodijsko kulturo vinske trte in *C. roseus* smo uporabili 1/2 MS gojišče (Murashige in Skoog) po 10 ml v epruvetah 20x150 mm. Osvetljevali smo z žarnicami OSRAM L36 W/36, Fluora, Nemčija. Fotoperioda v rastnih komorah je bila 16 ur svetlobe (temperatura 21°C) in 8 ur teme (temperatura 19°C).

Ob prenosu rastlinic iz epruвет kot tudi ob prenosu v vodi ukoreninjenih poganjkov vinske trte iz vinograda v lončke smo uporabili sterilno zemljo pomešano s šoto (Huminsubstrat N3, Neuhaus).

### **Detekcijske metode za analizo fitoplazem**

Za analizo fitoplazem v vinski trti in *C. roseus* smo uporabili metodi ekstrakcije DNA in PCR z uporabo univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov P1/P7 in U3/U5 (nested PCR) opisani v Daire s sod., 1997. Pozitivne kontrole so predstavljali vzorci *C. roseus* okuženi z referenčnimi sevi fitoplazem tipov AY, X-D, and STOL, ki nam jih je prijazno podaril prof. Ruggero Osler (Univerza Udine, Italija) ter različkov fitoplazem trsnih rumenic STOL C in FD70, ki nam jih je prijazno podarila gospa Elisabeth Boudon-Padieu (INRA, Dijon, Francija). Za negativne kontrole smo uporabili zdrave rastline *C. roseus* in *V. vinifera* sorte Zelen gojene v tkivni kulturi stebelnih nodijev.

### **3. REZULTATI IN DISKUSIJA**

Rezultati, prikazani v preglednici 1, jasno kažejo, da je vsebnost fitoplazem v vinski trti precej manjša kot v rastlinah *C. roseus*. Razvidno je tudi, da je zaradi izredno nizke vsebnosti fitoplazem v vinski trti uporaba žnested' PCR tehnike za povečanje občutljivosti analize še vedno neizogibna. Rezultati kažejo povečano vsebnost fitoplazem v rastlinah vinske trte in *C. roseus*, ki rasejo v tkivni kulturi, v primerjavi z rastlinami, ki rasejo v tleh. Pri tem je potrebno opozoriti, da je teža izhodnega tkiva za izolacijo DNK pri vinski trti v tkivni kulturi enkrat nižja kot pri rastlinah raslih v zemlji. Zanimivo je dejstvo, da so fitoplazme v rastlinah, raslih v tkivni kulturi, zastopane tako v poganjku kot tudi v koreninah in da je v slednjih koncentracija fitoplazem celo višja kot v poganjkih.

**Preglednica 1:** Rezultati PCR analize vinske trte (*Vitis vinifera*) (z izraženimi znamenji okuženosti s fitoplazmami trsnih rumenic, sort Chardonnay, Rebula in Modri pinot ter sorte Zelen kot negativna kontrola) ter *Catharanthus roseus* (okužen s fitoplazmami tipov AY, X-D in STOL), z uporabo parov univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov P1 in P7 ter U3 in U5 za žnestež PCR.

**Table 1:** Results of PCR analysis of grapevine (*V. vinifera*) (with expressed symptoms of infection with grapevine yellows phytoplasma, cvs. Chardonnay, Rebula and Pinot Noir, and cv. Zelen as negative control) and *C. roseus* (infected by AY, X-D, and STOL), using universal primers P1/P7, and by nested PCR using primers U3/U5.

VZORCI	RASTLINE V TLEH				TKIVNA KULTURA			
	Vinograd		Rastlinjak		POGANJKI		KORENINE	
	PCR P1/P7	'nested' PCR U3/U5	PCR P1/P7	'nested' PCR U3/U5	PCR P1/P7	'nested' PCR U3/U5	PCR P1/P7	'nested' PCR U3/U5
Chardonnay	-	-	-	-	-	+	-	++
Rebula	-	-	-	-	-	+	-	++
Modri pinot	-	-	-	-	-	++	-	+
Zelen	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. roseus</i>								
AY okužen	NT	NT	-	+	+++	+++	NT	NT
X-D okužen	NT	NT	++	+++	++	+++	+	++
STOL okužen	NT	NT	++	+++	+++	+++	NT	NT

NT: ni bil testiran; - : ni bilo vidnega PCR produkta, +, ++ in +++ : tri stopnje intenzivnosti PCR pasu oziroma produkta.

Potrebno je poudariti, da je koncentracija fitoplazem v rastlinah ocenjena le glede na količino PCR produktov, ki jih dobimo pri postopku PCR v enakih razmerah. Razlike v tako ocenjeni vsebnosti fitoplazem v različnih rastlinah, tkivih ali v različnih razmerah rasti niso nujna posledica dejanskih razlik v vsebnosti fitoplazem, temveč so lahko tudi posledica različno močnih inhibitornih učinkov (na primer različne vsebnosti inhibitorjev PCR reakcije, kot so ogljikovi hidrati in fenoli). Pri nadaljnjem delu bomo priredili tudi alternativne metode za izolacijo fitoplazemske DNK po obogatitvenih postopkih.

#### 4. SKLEPI

Uporaba tkivnih kultur predstavlja alternativo za izboljšanje razmer za ugotavljanje zastopanosti fitoplazem v vinski trti, posebej, kadar gre za izredno nizko vsebnost fitoplazem v specifičnih vzorcih ter pri odkrivanju morebitnih latentnih okužb. Tkivna kultura s fitoplazmami okuženih rastlin kaže tudi na nove možnosti pri študiju interakcij med rastlinami in fitoplazmami, gibanja fitoplazem po rastlini, čiščenja fitoplazem za pripravo protiteles in za ohranjanje določenih fitoplazemskih sevov in mutant.

#### 5. VIRI

- Boudon-Padieu E. in Maixner M. 1998. Jaunisses de la vigne: etat des connaissances et des methodes de lutte. Bulletin O.I.V., 71, 809-810: 573-607  
 Daire X., Clair D., Boudon-Padieu E. 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the Elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. European Journal of Phytopathology 103: 507-514