

OCENJEVANJE OBČUTLJIVOSTI PLODOV OREHA NA OREHOV OŽIG Z UMETNO INOKULACIJO

Matej ŠUŠTARŠIČ¹, Anita SOLAR², Maja RAVNIKAR³, Lidija MATIČIČ⁴, Gregor LIPOVŠEK⁵, Franci ŠTAMPAR⁶, Tanja DREO⁷

^{1, 3, 4, 7}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Ljubljana

²Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Raziskovalno polje za lupinarje, Maribor

^{5, 6}Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana

IZVLEČEK

Orehov ožig povzroča bakterija *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Pierce 1901) Vauterin, Hoste, Kersters in Swings 1995 (*X. a.* pv. *juglandis*). Bolezen se pojavlja na vseh območjih pridelave orehov pri čemer se sorte orehov razlikujejo po občutljivosti, na sam razvoj bolezni pa pomembno vplivajo klimatske razmere. Za določanje občutljivosti posamezne sorte za zdaj ni hitrih metod, zato smo v okviru naše raziskave preverili možnost ocenjevanja občutljivosti plodov z umetnim okuževanjem. Orehe, nabrane v fenofazi GF + 30, smo površinsko dezinficirali in na treh točkah vbodli z iglo, impregirano s *X. a.* pv. *juglandis*. Po inkubaciji smo orehe prečno in vzdolžno prerezali ter odtisnili na gojišča. Opazovali smo izražanje bolezenskih znamenj in razširjenost bakterij v plodovih ter ta parametra primerjali med sortami.

Ključne besede: občutljivost orehov, orehov ožig, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

ABSTRACT

ASSESSING SUSCEPTIBILITY OF WALNUT FRUIT TO WALNUT BLIGHT USING ARTIFICIAL INOCULATIONS

Walnut blight is caused by bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Pierce 1901) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings 1995 (*X. a.* pv. *juglandis*). The disease is present in most walnut production areas. Although walnut cultivars are differently susceptible, climatic conditions can play a major role in disease development. There are no fast methods for detection of walnut cultivar susceptibility that is why in our research we tried to examine the response of different walnut cultivars to artificial inoculations as a possible method of detection. Walnut fruits were collected at GF + 30 phenophase and surface disinfected. Each fruit was inoculated at three points with a needle impregnated with *X. a.* pv. *juglandis*. Fruits were incubated to allow development of symptoms then sliced vertically and horizontally and printed on growth media. Development of symptoms and bacterial spread were observed and compared among varieties.

Key words: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, susceptibility of walnut, walnut blight

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

² dr. agron. znanosti., Vinarska 14, SI-2000 Maribor

³ prof. dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

⁴ projektni sodelavec, prav tam

⁵ diplomant, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

⁶ prof. dr., prav tam

⁷ dr. biol. znan., prav tam

1 UVOD

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* povzročča bakterijsko pegavost oreha, imenovano tudi orehov ožig (Vauterin s sod., 1995). Bakterijo uvrščamo v skupino gospodarsko pomembnih bakterij, saj lahko njen pojav povzročča velike gospodarske izgube. Bolezen orehovega ožiga je zastopana v vseh pridelovalnih območjih oreha (Loreti s sod., 2001). Bakterija napada vse zelene dele rastline, tudi plodove, kar posledično zmanjša pridelek (Belisario s sod., 1999). V splošnem velja, da je mlajše tkivo bolj občutljivo od starejšega, kar kaže na vlogo sekundarnih metabolitov, tudi fenolov (Solar s sod., 2006).

V raziskavi smo preizkusili metodo ocenjevanja razvoja bolezenskih znamenj inokuliranih plodov oreha, različno občutljivih sort, razvito v okviru projekta COST873, ki smo jo nadgradili z analizo slik odtisov prečno in vzdolžno prerezanih orehov na hranilnem gojišču. Občutljivost posameznih sort orehov smo ocenili z oceno izraženih bolezenskih znamenj.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Plodovi so bili nabrani v kolekcijskem nasadu Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v Mariboru. Vključili smo šest sort (Seifersdorfski, Šampion, Cisco, Erjavec, Fernette in Zdole), ki se med seboj razlikujejo po občutljivosti plodov za orehov ožig. Med drugimi smo testirali zelo občutljivo sorto Šampion in manj občutljivo sorto Fernette (Solar, 1995-2006). Plodove smo nabrali v fenofazi GF + 30, jih površinsko dezinficirali v 4 % NaOCl, sprali v sterilni deionizirani vodi in posušili na sterilnem filter papirju.

2.2 Inokulacija plodov

Plodove smo inokulirali s španskim izolatom *X. a.* pv. *juglandis*, ki smo ga namnožili na hranilnem agarju (starost kolonij 3-4 dni, rast pri 25 °C). Inokulacijo smo izvedli z vbodom igle, s katero smo prej postrgali bakterije z agarja, v treh točkah. Vbodli smo do mezokarpa, pri čemer smo si pomagali z distančnikom. Oblikovali smo ga tako, da smo pri povprečnem orehu iz posamezne serije izmerili oddaljenost vrhnje plasti do mezokarpa in s sterilnim skalpelom odrezali odgovarjajoč del pokrovčka igle. V primeru negativne kontrole (slepa inokulacija), smo orehe vbodli s sterilno iglo.

2.3 Inkubacija in ocena razvitih znamenj bolezni

Inokulirane in slepo inokulirane orehe smo inkubirali pri temperaturi 25 °C, 16 urni fotoperiodi in v razmerah visoke zračne vlage (90 % relativna zračna vlaga). V posamezni seriji, ki je predstavljala plodove orehov ene sorte, je bilo med 36 in 40 plodov, od tega 5 slepo inokuliranih (negativna kontrola). Po inkubaciji (22 dni) smo plodove orehov prerezali. Simptome smo ocenili na prečno prerezanih plodovih z lestvico od 1- 4, pri čemer 1 predstavlja poškodbo tkiva ob umetni inokulaciji in 4 predstavlja nekroze v samem jedrcu.

2.4 Analiza razširjenosti bakterij v inokuliranih plodovih

Tako prečno kot tudi vzdolžno prerezane orehe vsake serije smo odtisnili na gojišča hranilnega agarja. Gojišča smo inkubirali do rasti kolonij in jih fotografirali. Za analizo fotografij smo uporabili program ImageJ, različico 1.41g. Določili smo površino odtisa oreha in površino istega odtisa, ki je bilo na hranilnem agarju prekrito z bakterijsko rastjo.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Oreh je pomembna rastlina v evropskem prostoru. Pridelavo lahko omejuje bolezen orehov ožig, pri čemer se sorte orehov razlikujejo po občutljivosti, na sam razvoj boleznici pa pomembno vplivajo klimatske razmere. Za določanje občutljivosti posamezne sorte za zdaj ni hitrih metod, zato smo v okviru naše raziskave preverili možnost ocenjevanja občutljivosti plodov z umetnim okuževanjem.

Za okuževanje plodov smo uporabili španski izolat bakterije *X. a. pv. juglandis* in metodo, oblikovano v okviru projekta COST873, ki smo jo nadgradili z odtisovanjem okuženih orehov na gojišča. Metoda predvideva vbodno inokulacijo bakterije do mezokarpa plodov orehov v fenofazi Gf + 30. V poskusih, v katerih smo plodove inokulirali z globljimi vbodi, je bil razvoj bolezenskih znamenj v celotnem jedrcu izredno hiter (podatki niso prikazani). Sklepamo, da je ob globlji inokulaciji obramba rastline premagana in razvita bolezenska znamenja niso sortno specifična. Za inokulacijo smo zato oblikovali distančnik, ki nam je omogočil natančno inokulacijo celotne serije plodov do enake globine - mezokarpa.

Plodovi, sort orehov, uporabljenih v poskusu, so fenofazo Gf + 30 dosegli v različnem času in so se razlikovali po zrelosti, velikosti in obliki. Pri vseh šestih sortah je bila povprečna vzdolžna površina prerezanega ploda med 13,71 in 16,47 cm², povprečna prečna površina oreha pa med 13,03 in 16,21 cm². Razen dveh sort (podolgovata oblika), so imeli plodovi ostalih sort kroglasto obliko.

Po umetni inokulaciji plodov z bakterijo *X. a. pv. juglandis* so se znamenja boleznici, značilna za orehov ožig, razvila pri vseh šestih testiranih sortah. Znamenja boleznici so se izražala predvsem v notranjosti oreha, mezokarpu in jedrcu, izredno redko pa na površini zelene lupine.

Pri ocenjevanju bolezenskih znamenj smo opazili tako nihanje bolezenskih znamenj ob treh točkah inokulacije znotraj posameznega plodu, kot znotraj sorte. Posamezen plod smo inokulirali trikrat, pri čemer smo iglo impregnirali s *X. a. pv. juglandis* samo enkrat. Razpon ocene bolezenskih znamenj znotraj plodu, med 1 in 3, ki smo ga posamično opazili, je najverjetneje posledica tega, da smo iglo ob inokulaciji plodu z bakterijo impregnirali le enkrat in se zato lahko vnesena količina bakterije med posameznimi vbodi rahlo razlikuje. Ravno tako je mogoče, da se debelina lupine ob točkah vboda pri nekaterih orehih razlikuje in da smo ob vbodu bakterije vnesli do različne globine. Z dovolj velikim številom plodov smo kljub temu zagotovili zanesljivost rezultatov. Razpon bolezenskih znamenj posamezne sorte je značilno različen, pri nekaterih sortah skoraj ne niha, pri drugih pa se giblje med 1 in 4, kar potrjuje našo hipotezo, da lahko z metodo umetne inokulacije ugotovimo razlike v občutljivosti sort.

Korelacija med časom vstopa sorte v fenofazo Gf + 30 in občutljivostjo sort ob umetni inokulaciji je bila šibka. V nasprotju z razširjeno predpostavko, da so zgodnejše sorte bolj občutljive, sta bili ob umetni inokulaciji dve od treh zgodnjih sort zelo občutljivi, najbolj zgodnja pa je bila bolj odporna. Rezultat ni presenetljiv, saj je znano, da so za razvoj orehovega ožiga pomembni tudi klimatski dejavniki, ki se lahko med enim mesecem (časovni razpon v katerem so opazovane sorte dosegle fenofazo Gf + 30) precej spremenijo.

Nadgradnja metode z odtisom prečno in vzdolžno prerezanih orehov na plošče gojišča hranilnega agarja, daje dodatne informacije o razširjanju bakterije v notranjosti oreha ter morebitni zastopanosti drugih bakterij. Analiza odtisa oreha na gojišče prikaže razporeditev bakterij ob koncu inkubacije.

Pri odtisih plodov, okuženih s *X. a. pv. juglandis*, smo v veliki večini primerov na gojiščih opazili rast bakterij z morfologijo, značilno za rod *Xanthomonas*.

Pri pregledu odtisov prečno prerezanih plodov na gojiščih je bila rast bakterij v nekaterih primerih lokalizirana na mesto inokulacije, večinoma pa je prišlo do preraščanja bakterij po

večjem delu ali celotni površini odtisa. Z analizo slike prečnih odtisov s programom ImageJ smo ugotovili površino namnožene bakterije na površino prereza. Opazili smo korelacijo med izraženimi bolezenskimi znamenji in površino bakterij. Sorti z najbolj izraženimi simptomi sta imeli tudi največji delež bakterij na površino prečnega prereza.

Velika težava pri določanju občutljivosti orehov je zaradi splošne razširjenosti bakterije *X. a. pv. juglandis* zagotavljanje zdravega izhodiščnega materiala. Nadgradnja metode odtisovanja okuženih orehov omogoča naknadno izolacijo bakterij in njihovo analizo. Z uporabo španskega izolata bakterije smo lahko le-tega naknadno razlikovali od drugih prisotnih bakterij z uporabo metode BOX-PCR (rezultati niso prikazani). Večina bakterij izoliranih iz umetno okuženih plodov sorte Seifersdorfski, je imela profil enak španskemu izolatu, kar kaže na to, da so bila razvita znamenja boleznih posledica umetne okužbe. Iz nekaterih orehov smo, včasih tudi ob španskem izolatu, iz notranjosti nekaterih orehov izolirali bakterijo *X. a. pv. juglandis*, ki smo jo lahko razlikovali od španskega izolata, s katerim smo umetno okuževali orehe. Sklepamo, da so bili plodovi okuženi že ob nabiranju, saj je kljub sterilni notranjosti ploda na nekaterih ploščah negativne kontrole bila opazna rast bakterij. Predhodna okužba seveda lahko vpliva na odziv rastline ob ponovni okužbi, zato nadgradnja metode, ki omogoča analizo bakterij ob koncu inkubacije okuženih plodov, pomembno prispeva k zanesljivosti metode in pravilni interpretaciji rezultatov.

Pri nekaterih sortah smo poleg bakterij rodu *Xanthomonas* na gojiščih opazili tudi posamične druge bakterije ali večje količine fluorescentnih bakterij rodu *Pseudomonas*. Te bakterije so bile prisotne predvsem ob odpadli brazdi pestičnega cveta, včasih pa tudi v notranjosti jedrca. Glede na rezultate testa hipersenzitivne reakcije na tobaku gre za patogene bakterije, ki bi lahko sodelovale bodisi pri vstopu bakterij *Xanthomonas*, bodisi same povzročale razvoj bolezenskih znamenj. Bakterije rodu *Pseudomonas* so pogosto povezane s poškodbami ob zmrzali, kar olajša vstop tudi drugim škodljivim organizmom. Poleg prisotnih bakterij *X. a. pv. juglandis*, imajo lahko ostali zastopani organizmi, pomembno vlogo pri razvoju bolezenskih znamenj orehovega ožiga in povezani škodi zaradi izgube pridelka.

4 SKLEPI

Glede na rezultate sklepamo, da metoda umetne inokulacije plodov orehov v fenofazi Gf + 30 pokaže razlike v odzivih plodov in razvitimi bolezenskimi znamenji med različnimi sortami. Metoda je enostavna in ustrezna za hkratno ocenjevanje občutljivosti večjega števila sort. Nadgradnja z odtisovanjem prerezanih orehov na gojišča nam daje dodatne informacije o pojavu in širjenju bakterij, tako tistih, s katerimi smo okuževali, kot tudi drugih bakterij, ki so lahko povezane z razvojem boleznih. V nadaljevanju bomo rezultate umetnega okuževanja primerjali z izraženimi bolezenskimi znamenji v naravi in s spremembo metabolizma fenolnih substanc v plodovih, okuženih s v s *X. a. pv. juglandis*.

5 ZAHVALA

Za financiranje se zahvaljujemo CRP bakterije (V4-0523). Hvala sodelavcem v projektu COST 873 (Bacterial diseases of stone fruits and nuts) za koristno izmenjavo informacij in dr. Marii M. Lopez (IVIA, Španija) za posredovanje španskega izolata bakterije *X. a. pv. juglandis*.

6 LITERATURA

- Belisario, A., Zoina, A., Pezza L., Luongo, L. 1999. Susceptibility of species of *Juglans* to pathogens of *Xanthomonas campestris*. *European Journal of Plant Pathology*, 29: 75-80.
- Loreti, S., Gallelli, A., Belisario, A., Wajnberg, E., Corazza, L. 2001. Investigation of genomic variability of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* by AFLP analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 583-591.

- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008.
- Sharma, A. 1999. *Xanthomonas*. V: Robinson, R. K.. Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier, Oxford, 1999: str. 2323-2329.
- Solar, A. 1995-2006. Lupinarji. V: Introdukcija in selekcija sadnih rastlin. Ambrožič-Turk, B. (Ur.). Kmetijski inštitut Slovenije, 177 str.
- Solar, A., Colarič, M., Usenik, V., Štampar, F. 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). Plant science 170: 453-461.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology, 45: 472-489.