

DOLOČITEV RAS IZOLATOV BAKTERIJE *Ralstonia solanacearum* POVZROČITELJICE RJAVE GNILOBE KROMPIRJA

Špela PRIJATELJ NOVAK¹, Tanja DREO², Tina DEMŠAR³, Maja RAVNIKAR⁴

^{1,2,3,4}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,
Ljubljana

IZVLEČEK

Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996 je karantenska bakterija, ki povzroča rjavo gnilobo krompirja in bakterijsko venenje številnih drugih rastlin. Uvrščena je na seznam IAll karantenskih organizmov. Seve bakterije *Ralstonia solanacearum* lahko razdelimo na pet ras glede na primarnega gostitelja ali pet biovarjev glede na uporabo določenih sladkorjev in sladkornih alkoholov. V Evropi povzročajo rjavo gnilobo krompirja predvsem sevi rase 3. Rasa 3 ustreza biovarju II. Ta rasa okužuje krompir, paradižnik, jajčevce in nekatere razširjene plevela in je prilagojena nižjim temperaturam. Predvsem v rastlinjakih so možni tudi sevi rase 1, ki imajo širši krog gostiteljev in so prilagojeni višjim temperaturam. Sevi rase 1 ustrezajo sevom biovarjev I, III ali IV. Rasa izolata lahko vpliva na fitosanitarne ukrepe in je zato pomemben del določitve bakterije *Ralstonia solanacearum*. Raso lahko določimo s testom hipersenzitivne reakcije na tobaku, določanjem uporabe nekaterih sladkorjev in sladkornih alkoholov (laktose, maltoze, celobioze, manitola, sorbitola in dulcitol) ali analizo profila maščobnih kislin. Za določanje rase izolatov bakterije *Ralstonia solanacearum*, izoliranih iz krompirja različnega izvora, smo uporabili test hipersenzitivne reakcije na tobaku in določanje uporabe nekaterih sladkorjev in sladkornih alkoholov. Vsi vzorci so bili vzorčeni v okviru posebnega nadzora slovenske službe za varstvo rastlin v letih 1997 do 2002. Vsi testirani izolati spadajo v raso 3, biovar II.

Ključne besede: bakterije, biovarji, krompir, *Ralstonia solanacearum*, rase

ABSTRACT

DETERMINATION OF *Ralstonia solanacearum* RASES CAUSING BROWN ROT IN POTATOES

Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996 is a quarantine bacterium causing brown rot of potatoes and bacterial wilt in many other hosts. It is listed on IA II quarantine list. Strains of *Ralstonia solanacearum* have been informally grouped into five races on the basis of the primarily affected host or five biovars on the basis of the catabolism of certain sugars and sugar alcohols. Most frequently isolated strains from potatoes in Europe correspond to race 3 which is equivalent to biovar II. This race infects potato, tomato, aubergine and some commonly present weeds and is adapted to lower temperatures. The presence of race 1 which has a wide host range and is adapted to higher temperatures is also possible especially in green house facilities. Race 1 corresponds to biovars I, III or IV. Determination of race may influence phytosanitary measures taken and is therefore an important part of testing on *Ralstonia solanacearum*.

Races of *Ralstonia solanacearum* can be determined using hypersensitivity reaction test in tobacco, utilisation of hexose alcohols and sugars (lactose, maltose, cellobiose, mannitol, sorbitol and dulcitol) or analysis of fatty acids profile. We have used hypersensitivity reaction test in tobacco and utilisation of hexose alcohols and sugars to determine races of *Ralstonia solanacearum* isolated from potatoes of different origine from 1997 to 2002. All tested isolates belonged to race 3, biovar II.

Key words: bacteria, biovars, potato, *Ralstonia solanacearum*, rases

¹ študentka agronomije, Večna pot 111, 1001 Ljubljana

² univ. dipl. mikrobiol., prav tam

³ univ. dipl. biol., prav tam

⁴ prof., dr. biol. znan., prav tam

1 UVOD

Ralstonia solanacearum (*Pseudomonas solanacearum*, Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996 je karantenska bakterija, ki povzroča rjavo gnilobo krompirja. Bolezen povzroča veliko škodo in je ena najpomembnejših bakterijskih boleznih rastlin. V Sloveniji jo uvrščamo na seznam IA II škodljivih organizmov.

Vrsta je na podlagi fitopatogenosti in gostiteljev razdeljena v pet ras (Schaad *et al.*, 2001) ter na podlagi biokemijskih lastnosti v pet biovarjev (Hayward, 1994). Rasa 1 okužuje večino predstavnikov družine *Solanaceae* in številne druge rastline. Za rast potrebuje temperaturo med 33 in 37°C, najbolj pogosta je v tropih, najde pa se tudi v rastlinjakih.

Rasa 2 okužuje triploidne banane (moko bolezen) in *Heliconia* ssp. Za rast potrebuje temperaturo med 33 in 37°C, najbolj pogosta je v tropih.

Rasa 3 okužuje večinoma krompir in paradižnik, lahko pa preživi tudi v drugih predstavnikih družine *Solanaceae*. Optimalna temperatura za njeno rast je 27-28°C. Najdemo jo po vsem svetu, zastopana je tudi v hladnejših podnebjih. Rasa 4 okužuje ingver, rasa 5 pa okužuje murve in jo najdemo le na Kitajskem. Večina sevov *Ralstonia solanacearum*, ki povzročajo rjavo gnilobo krompirja, sodi v raso 3, biovar II.

Ralstonia solanacearum (Rs) je razširjena v tropih in subtropih, pojavlja pa se tudi v hladnejših predelih. Razširjena je v Južni Ameriki, srednji in južni Afriki, Aziji, Avstraliji in v nekaterih predelih Evrope (Priou *et al.*, 1999). V Sloveniji bakterije še ni.

Bakterija preživi v zemlji, vodi in v koreninskem sistemu gostiteljskih rastlin. Najpogosteje se širi z okuženimi gomolji krompirja ter z okuženo vodo, ki jo uporabljajo za namakanje polj. Ker pa je večina sevov občutljiva na nižje temperature, je širjenje sevov na največja svetovna območja pridelave krompirja omejeno (Kelman, 1998).

Postopek laboratorijskega testiranja rjave gnilobe krompirja za raso 3 predpisuje direktiva EU 98/57/EC.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Test hipersenzitivne reakcije na tobaku HR

Za test hipersenzitivne reakcije (HR) smo uporabili rastline tobaka *Nicotiana tabacum* cv. White Burley s polno razvitimi listi. Rastline smo dva dni pred inokulacijo predstavili v komoro s temperaturo 25°C, fotoperiodo 16 ur svetlobe in 8 ur teme ter 70% zračno vlago.

Čez dva dni smo v 0.01M MgSO₄ pufru iz 24 ur starih bakterij, ki smo jih gojili na YPGA gojišču pripravili suspenzije različnih izolatov bakterije *Ralstonia solanacearum* (Rs) s koncentracijo 10⁸ CFU/ml po McFarlandovi lestvici. Suspenzije različnih izolatov bakterije Rs smo z iglo s premerom 0.5 mm vbrizgali v medcelične prostore na listu tobaka. Za negativno kontrolo smo uporabili 0.01M MgSO₄ pufer, za pozitivno kontrolo pa tipski izolat bakterije Rs rasa 3, biovar II. Na enem listu rastline tobaka lahko opravimo test z več različnimi izolati.

Rastline tobaka smo inkubirali v komori pri temperaturi 31°C, fotoperiodo 16 ur svetlobe in 8 ur teme ter 70% zračno vlago in jih opazovali pet dni.

2.2 Določanje porabe nekaterih sladkorjev in sladkornih alkoholov

Za test določanja porabe nekaterih sladkorjev in sladkornih alkoholov smo pripravili sterilne 10% raztopine sladkorjev in sladkornih alkoholov (maltoza, celobioza, dulcitol, manitol, laktoza in sorbitol) v bidestilirani vodi s pH 7,0 - 7,1. Raztopine smo dodali osnovnemu gojišču (Hayward, 1964, 1976) ter ga razdelili v sterilne mikrotitrne ploščice.

S 24 ur starimi bakterijskimi izolati, ki so rasli na TTC gojišču (Schaad *et al.*, 2001) smo z vbodom inokulirali gojišče. Inokulirali smo tudi z negativno in pozitivno kontrolo. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili s pokrovom in zavili v prozorno folijo, da smo preprečili izsušitev gojišča.

Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 72 ur pri 28° C in opazovali spremembo barve. Pozitiven rezultat temelji na spremembi pH in se kaže kot sprememba barve iz zelene na rumeno.

Preglednica 1: Določanje biovarjev z uporabo sladkorjev in sladkornih alkoholov
Table 1: Determination of biovars with utilisation of hexose alcohols and sugars

Biovar	Maltoza	Laktoza	Celobioza	Manitol	Sorbitol	Dulcitol
1	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+
5	+	+	+	+	-	-

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Test hipersenzitivne reakcije na tobaku

Rase bakterije *Ralstonia solanacearum* med seboj najenostavneje ločimo s testom hipersenzitivne reakcije na tobaku. Pri rasi 1 opazimo rumenenje in odmiranje listov v 7 do 8 dneh, pri rasi 2 opazimo hipersenzitivno reakcijo ter steklast videz listov po 12 do 24 urah, pri rasi 3 pa opazimo rumenenje oz. nekrotično reakcijo na okuženih listov v 2 do 8 dneh.

Pri vseh testiranih izolatih smo po dveh dneh na inokuliranih mestih opazili nekrotično reakcijo, značilno za raso 3.

3.2 Določanje porabe nekaterih sladkorjev in sladkornih alkoholov

Biovarje bakterije *Ralstonia solanacearum* med seboj ločimo na podlagi razlik v porabi treh heksoznih alkoholov in treh sladkorjev. Pozitiven rezultat temelji na spremembi pH in se kaže kot sprememba barve iz zelene na rumeno. Vzorec, ki smo ga dobili na mikrotiterskih ploščah, potrjuje, da vsi testirani izolati pripadajo rasi 3, biovarju II.

Preglednica 2: Rezultati določanja biovarjev
Table 2: Results of biovar determination

	pozitivna kontrola	negativna kontrola	IZOLAT 1	IZOLAT 2	IZOLAT 3	IZOLAT 4	IZOLAT 5
Maltoza	+	-	+	+	+	+	+
Laktoza	+	-	+	+	+	+	+
Celobioza	+	-	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-

4 SKLEPI

Obe metodi, tako test hipersenzitivne reakcije na tobaku kot tudi metoda določanja porabe sladkorjev in sladkornih alkoholov, sta se izkazali kot enostavni in sta ustrezni za uporabo v diagnostiki. Z uporabo ene od njih ali obeh lahko določimo raso/biovar.

Za vse izolirane bakterijske kulture iz vzorcev krompirja, ki so bili vzorčeni v okviru posebnega nadzora uradne službe za varstvo rastlin, smo z uporabo obeh metod potrdili, da pripadajo rasi 3, biovarju II.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Upravi RS za varstvo rastlin in semenarstvo, Ministrstvu RS za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in fitosanitarni inšpekciji Inšpektorata RS za kmetijstvo, gozdarstvo, lovstvo in ribištvo.

6 LITERATURA

- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27: 265-277
- Hayward, A.C. 1976. Some techniques of importance in the identification of *Pseudomonas solanacearum*. In: Planning conference and workshop on the ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina State University, Raleigh:137-142
- Hayward, A.C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. CAB International, Wallingford, UK. S.123-135
- Kelman, A.1998. One hundred and one years of research on bacterial wilt. V: Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects: reports of the Second International Wilt Symposium, Gosier, Guadeloupe, France, 22-27 June 1997. Prior, P. H., Allen, C., Elphinstone, J. (eds.).Berlin, Heidelberg, New York: 1-5
- Priou, S., Aley, P. 1999. Bacterial wilt of potato, online. International Potato Center (CIP), Lima, Peru
- Schaad *et al.* 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Aps Press, Minnesota:151-174.