

**PROBLEMATIKA OLJČNEGA RAKA *Pseudomonas syringae* ssp. *Savastanoi*
Janse (1982)**Igor ZIDARIČ¹¹Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin**IZVLEČEK**

Oljčni rak je bakterijska bolezen, ki napada nekatere predstavnike iz družine Oleaceae. Gospodarsko škodo povzroča predvsem na oljkah (*Olea europea*) in na drugih gostiteljskih rastlinah v drevesnicah. V Sloveniji je približno 800 ha oljčnih nasadov, kar predstavlja potencialno nevarnost za širjenje bolezni. Z vizualnimi pregledi in laboratorijskimi analizami smo želeli ugotoviti razširjenost oljčnega raka v oljčnikih Slovenske Istre. V letih 2004 in 2005, smo v Koprskem okolišu vzorčili 25 oljk in oleander z bolezenskimi znamenji. Z laboratorijskimi analizami, smo potrdili bakterijo *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* v 10 vzorcih oljke in v vzorcu oleandra. Velika nevarnost za širjenje bolezni predstavljajo nizke zimske temperature, ki so v Slovenski Istri zelo pogoste. Varstveni ukrepi pred oljčnim rakom so zelo omejeni, zato je pomembno pravočasno odkrivanje bolezenskih znamenj in predvsem sanacija ter zdrav sadilni material.

Ključne besede: oljka, *Olea europaea*, gostiteljske rastline, oljčni rak, *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*

ABSTRACT**STUDY OF THE OLIVE TREE KNOT DISEASE *Pseudomonas syringae* ssp.
Savastanoi Janse (1982)**

Olive tree knot disease is a bacterial disease harmful to some plants of the *Oleaceae* family. It causes an economically important damage, particularly on olive tree (*Olea europea*) and other host plants growing in nurseries. In Slovenia there are approximately 800 ha olive tree orchards which represent a spreading potential of the bacterial disease. We wanted to discover the dissemination of this disease in olive tree orchards of the Slovene Istria using visual survey and laboratory analyses. In 2004 and 2005, 25 samples in olive tree orchards and one sample of oleander with symptoms were taken in the Koper district. In 10 olive tree samples and in the oleander sample the presence of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* was confirmed by laboratory analyses. Low winter temperatures, which are very often in the Slovene Istria, represent a great danger of spreading of the disease. Due to a limited control of olive tree knot disease, detection of symptoms, sanitation and healthy plant material are of major importance.

Key words: olive tree, *Olea europaea*, host plants, olive tree knot disease,

1. UVOD

Oljčni rak (Sancin, 1990) je bolezen oljke, ki jo povzroča bakterija *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*. V slovenskih oljčnikih se bolezenska znamenja pojavljajo že več kot 25 let (Vrhovnik Irena, ustna informacija). Bakterija je razširjena po vsem Sredozemlju, Kaliforniji, Novi Zelandiji in v Avstraliji, kjer so našli okužbe kljub strogim karantenskim ukrepom (Ridnell in Smith, 2003). Dejstvo, da se boleznim v preteklosti ni posvečalo velike pozornosti, je bila majhna intenzivnost pridelovanja. V zadnjih 12-ih letih smo površino intenzivnih

¹univ. dipl. inž. agr., Hacquetova 17, SI-1001 Ljubljana

oljčnih nasadov, iz 107 ha v letu 1993, povečali na 781 ha bruto površin v letu 2002 (Statistični urad RS, 1998, 2002).

Oljka izvira iz Sredozemlja, kjer je tudi najbolj razširjena. V Sloveniji jo uvrščamo med gospodarsko pomembne rastline, saj je po površini, takoj za jablano, druga sadna vrsta. V Sloveniji je oljka razširjena predvsem v Istri, nekaj oljčnikov pa je tudi v Goriških Brdih in Vipavski dolini. Slovenija predstavlja skrajni severni del geografskega območja, kjer oljka še uspeva in je zato zelo izpostavljena nizkim zimskim temperaturam in pozebi (Ogrin, 2002). Nizke temperature so največja abiotična nevarnost za oljke, predstavljajo pa tudi posredno biotsko nevarnost, saj so prizadeti rastlinski deli za bakterijo vstopna mesta in s tem omogočijo širjenje bolezni.

Razvoj bolezenskih znamenj bakterije povzročijo z induciranjem hormonskega neravnovesja. Bakterije sintetizirajo indol-3-ocetno kislino (IAA) in snovi, ki delujejo podobno kot citokinini (Janse, 1982), zato se v rastlini začne nenormalna rast celic in nastanejo tumorji. Bolezen okužuje rastlinske dele, predvsem deblo in mladike, manj pa korenine, brste, liste in cvetove (Sancin, 1990). Bakterije se širijo z vetrom, vodo in rezjo. Vstopna mesta so različne abiotične in biotske poškodbe na listih in poganjkih. Najnevarnejši vir okužb in širjenja bolezni so okužen sadilni material in okužene gostiteljske rastline.

Bakterija *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* je patogen družine oljkovk (*Oleaceae*), saj okužuje skoraj vse glavne predstavnik te družine. Njene gostiteljske rastline so oljka (*Olea europaea*), oleander (*Nerium oleander*), mali jesen (*Fraxinus ornus*), veliki jesen (*Fraxinus excelsior*), jasmin (*Jasminum* sp.), kalina (*Ligustrum* sp.), zelenika (*Phillyrea* sp.), forsitija (*Forsythia* sp.) (Surico in Lavermicocca, 1989).

2. MATERIALI IN METODE

2.1 Vizualni pregledi oljčnikov in vzorčenje

Vizualno smo pregledali nekatere oljčnike na območju Ankarana, Strunjana, Seče (Sečovelj) in manjše oljčnike ob poti iz Dragonje proti Šmarjam. Preglede in vzorčenja smo opravili v mesecih juliju, oktobru in novembru 2004 ter v mesecu februarju 2005. Skupno smo odvzeli 26 vzorcev od tega 25 na oljki in enega na oleandru, 19 vzorcev je bilo odvzetih na podlagi sumljivih bolezenskih znamenj, 6 pa smo jih odvzeli v oljčnikih kjer nismo opazili bolezenskih znamenj. Vzorčili smo sorte 'Leccino', 'Leccione', 'Istrska belica', 'Maurino' in 'Frantoio'. Na vzorčenem oleandru smo opazili značilna bolezenska znamenja.

2.2 Izolacija bakterij iz vzorcev

Po površinski sterilizaciji in odstranitvi poškodovanega površinskega tkiva smo vzorec inkubirali v PBS pufru. Po inkubaciji smo ekstrakt nanесли na splošni gojišči NA in KB, s katerih smo po 3-5 dneh tipične kolonije precepljali in vzgajili čiste bakterijske kulture.

2.3 Sistem BIOLOG in test aglutinacije

Sistem BIOLOG (Biolog Inc., ZDA) nam na podlagi njihovih metaboličnih značilnosti omogoča identifikacijo bakterij. Ker podatkovna zbirka, s katero sistem primerja dobljeni najbližji rezultat verjetno ni popolna, nam v primeru nejasne identifikacije običajno določi le rod in vrsto bakterije.

V testu aglutinacije s protitelesi smo uporabili protitelesa (Plant Research International), ki omogočajo določevanje bakterij *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*.

2.4 Molekulske biološke metode

Identiteto izoliranih čistih bakterijskih kultur smo potrdili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), v kateri smo uporabili začetna oligonukleotida IAALF in IAALR (Penyalver *et al.*, 2000). Pomnožene produkte smo opazovali na 1,5 % agaroznem gelu z etidijevim bromidom. Za potrditev izolirane bakterijske kulture iz prvega vzorčenja smo ugotovljeno nukleotidno zaporedje pomnoženih PCR produktov primerjali z dostopnimi zaporedji v bazi podatkov GenBank. Ta primerjava je potrdila identifikacijo izolirane bakterije kot *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*.

3. REZULTATI

V času od julija 2004 do februarja 2005 smo pregledali 16 različnih oljčnikov in en vrt z uvoženimi sadikami oleandra. Bolezenska znamenja smo našli v 6 oljčnikih in na vrtu z oleandri. Z laboratorijskimi analizami smo potrdili bakterijo *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* v vseh 6 omenjenih oljčnikih in na vrtu.

V laboratoriju smo analizirali 26 vzorcev, od tega 25 vzorcev oljke in en vzorec oleandra. Pri prvem vizualnem pregledu smo odvzeli po en vzorec s treh dreves sorte 'Frantoio'. Na gojiščih smo izolirali tri morfološko podobne kolonije in identifikacijo najprej opravili s sistemom BIOLOG (Biolog Inc., ZDA). V podatkovni zbirki sistema BIOLOG sicer ni podatkov za določanje bakterije *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*, zato sistem kot rezultat pokaže rod in vrsto, kateri bakterija najverjetneje pripada. Sistem BIOLOG nam je, za eno od analiziranih kolonij, kot rezultat nakazal veliko verjetnost, da kolonija pripada vrsti *Pseudomonas syringae*. Na vseh treh morfološko podobnih izoliranih kolonijah smo opravili tudi test aglutinacije, ki je bil za eno kolonijo pozitiven, kar pomeni, da smo iz oljke izolirali bakterijsko kolonijo *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*. Kot potrditveni test smo uporabili PCR, ki je specifičen za določevanje bakterije *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* (Penyalver *et al.*, 2000) in katerega rezultati so potrdili rezultate testa aglutinacije. S primerjavo nukleotidnega zaporedja tega produkta smo potrdili identiteto bakterije kot *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*.

Pri vseh ostalih vzorcih smo opravili izolacijo čistih bakterijskih kultur in kot potrditveni test PCR. Pri drugem vizualnem pregledu smo odvzeli po en vzorec iz treh dreves v oljčniku, kjer nismo našli vidnih bolezenskih znamenj. Pri tretjem vizualnem pregledu nismo opravili vzorčenja, pri četrtem vizualnem pregledu pa smo odvzeli 19 vzorcev oljke in en vzorec oleandra.

Od skupno 25 vzorcev oljke je bilo 6 vzorcev brez bolezenskih znamenj. Pri vseh vzorcih smo opravili enak postopek izolacije. Iz nobenega vzorca brez bolezenskih znamenj nismo uspeli izolirati sumljivih bakterijskih kolonij. Od 19 vzorcev oljke z bolezenskimi znamenji smo sumljive bakterijske kulture izolirali iz 14 vzorcev. S PCR testom smo bakterijo *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* potrdili v 10 vzorcih. V vzorcu oleandra, ki je bil odvzet na podlagi bolezenskih znamenj, analiziran in identificiran z enakimi metodami kot vzorci oljke, smo potrdili bakterijo. Ugotovili smo, da izolacija bakterij iz starih olesenelih tumorjev ni vedno mogoča, ker je v njih zelo majhno število živih bakterij (Penyalver *et al.*, 2000). Kljub izolaciji sumljivih bakterijskih kolonij iz štirih vzorcev z bolezenskimi znamenji, nam s PCR ni uspelo potrditi bakterije *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*.

Bakterije smo dokazali na sortah 'Maurino', 'Leccino' in 'Frantoio'. V sortah 'Istrska belica' in 'Leccione', ki sta bili vzorčeni brez bolezenskih znamenj, bakterije nismo dokazali. Po Sancinu (1990), sta sorti 'Istrska belica' in 'Leccino' odporni na oljčni rak. V okviru naših raziskav smo uspeli dokazati bakterijo na enem vzorcu sorte 'Leccino', zato bi bilo v nadaljevanju potrebno ugotoviti, o kakšni stopnji odpornosti pri tej sorti lahko govorimo. Dejstva, da je sorta 'Istrska belica' odporna na bakterijski rak, na podlagi opravljenih pregledov in enega analiziranega vzorca, ne moramo zanesljivo potrditi. Za potrditev bi bilo potrebno opraviti več pregledov in dodatnih analiz. Močno občutljivost sorte 'Frantoio' (Sancin, 1990) smo potrdili tako pri vizualnih pregledih, kot tudi z laboratorijskimi analizami.

4. SKLEPI

Po nam znanih podatkih smo prvi v Sloveniji potrdili okužbo oljke in oleandra z bakterijo *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*. Z vizualnimi pregledi in vzorčenjem, smo želeli ugotoviti razširjenost oljčnega raka v oljčnikih Slovenske Istre. Z laboratorijskimi analizami smo dokazali bakterijo v 10 analiziranih vzorcih oljke in enem vzorcu oleandra.

Skupna lastnost bakterijskih bolezni, potem ko je bakterija enkrat že na rastlini, je težka oz. nemogoča eradikacija. Zato izvajamo predvsem preventivno varstvo in nadzor nad širjenjem bolezni. Pomembno je ohranjanje vitalnih in zdravih dreves in uravnotežena prehrana, pri čemer imamo v mislih predvsem smotno uporabo dušika. Med varstvenimi ukrepi so najpomembnejši preventivni ukrepi, kot so, uporaba zdravega sadilnega materiala, saditev manj občutljivih sort in sprotno odstranjevanje in sežiganje okuženih rastlinskih delov. V bližini oljčnikov se moramo izogibati saditvi gostiteljskih rastlin oljčnega raka (South Australian Research & Development Institute, 2003).

V zadnjih letih, ko se je površina oljčnikov v Sloveniji močno povečala, smo veliko oljčnikov posadili na neustrezna mesta. Zato se bojimo da bo oljčni rak postal vse večji problem slovenskih pridelovalcev.

5. ZAHVALA

Raziskava je bila narejena v okviru strokovnih nalog s področja varstva rastlin. Za financiranje se zahvaljujem Fitosanitarni upravi Republike Slovenije in Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Zahvala gre tudi gospe Ireni Vrhovnik in gospodu Matjažu Jančarju za strokovno pomoč na terenu, ter sodelavcem na Kmetijskem inštitutu Slovenije, še posebej Urši Pečar Fonovič.

6. LITERATURA

Gardan, L., Bollet, C., Ghorrah M., A., Grimont, F., Grimont, P., A., D. 1992. DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. International journal of systematic bacteriology, 42: 606-612

Janse, D., J. 1982. *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on *Oleaceae* and *Nerium oleander* L. International journal of systematic bacteriology, 32: 166-169

Ridnell, J. in Smith T.,A. 2003. A knotty problem for olive growers.

<http://www.abc.net.au/centralvic/stories/s967350.htm>

Ogrin D. 2002. Pozebe v Primorju z vidika uspevanja mediteranskih kultur. Dela 18: 157-170

Penyalver, R., Garcia, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Lopez, M., M. 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Applied and environmental microbiology, 66: 2673-2677

Sancin, V. 1990. Velika knjiga o oljki. Založništvo tržaškega tiska. 319 str.

South Australian Research & Development Institute. 2003. Olive knot information.

<http://www.australianolives.com.au/archives/olive%20knot.htm>

Statistični urad Republike Slovenije. 1998. Statistični letopis Republike Slovenije 1998,

Površina, sadna drevesa in pridelki v intenzivnih nasadih

Statistični urad Republike Slovenije. 2002. Popis intenzivnih sadovnjakov in oljčnikov. 807: 30 str.

Surico. G. in Lavermicocca P. 1989. A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Phytopathology 79: 185-190