

***Pseudomonas* ssp. NA VZORCIH Z BOLEZENSKIMI ZNAMENJI OŽIGA**

Manca PIRC<sup>1</sup>, Tanja DREO<sup>2</sup>, Maja RUPNIK<sup>3</sup>, Peggy P.M.A. GORKINK SMITS<sup>4</sup>, Jaap D. JANSE<sup>5</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>6</sup>

<sup>1,2,6</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo, SI-1000 Ljubljana

<sup>3</sup>Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Univerza v Ljubljani, SI-1000 Ljubljana

<sup>4,5</sup>Department of Bacteriology, Plant Protection Service, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, The Netherlands

**IZVLEČEK**

Patogene bakterije rodu *Pseudomonas* so v Sloveniji precej razširjene. Pri okuženih drevesih so sadeži slabše kvalitete, pridelek je manjši, hkrati so rastline bolj občutljive na druge povzročitelje bolezni. V letu 2003 smo bakterije iz rodu *Pseudomonas* izolirali tudi iz rastlin s posebej hudimi znamenji ožiga. Bolezenska znamenja povzročena z bakterijami iz rodu *Pseudomonas* in tista, ki jih povzroča okužba z bakterijo *Erwinia amylovora* je zelo težko razlikovati. Tako smo v letu 2003, v sklopu sistematičnega nadzora bakterijskega hruševega ožiga, ki ga koordinira Fitosanitarna uprava RS, testirali 441 vzorcev z bolj ali manj tipičnimi bolezenskimi znamenji hruševega ožiga. Med izolacijo bakterije *Erwinia amylovora* na gojiščih SNA in King B, smo pri 34 vzorcih (8%) opazili in izolirali kolonije morfološko podobne bakterijam iz rodu *Pseudomonas*. V letu 2004 smo patogene bakterije rodu *Pseudomonas* izolirali iz 26 od skupno 129 vzorcev (20,2%). Okužene gostiteljske rastline pri katerih smo potrdili patogene bakterije iz rodu *Pseudomonas* so bile jablana, hruška, kutina, ognjeni trn, panešplja, japonska kutina, vrtnica in photinia. Za vse izolate smo izvedli LOPAT teste. Na podlagi preliminarnih testov smo z namenom zajeti čim večjo raznolikost gostiteljev in izolatov izvedli še dodatne teste, kot so profil maščobnih kislin, profil celotnih celičnih proteinov, test patogenosti na različnih gostiteljih ter biotest tvorbe toksinov. Od biološko - molekularnih tehnik smo izvedli 16S rDNA RFLP in tipizacijo z rep-PCR. Opazili smo veliko raznolikost HR pozitivnih izolatov (najverjetneje patovarjev *Pseudomonas syringae* ali *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) na testih patogenosti na različnih gostiteljih in tudi po molekularnem profilu, pridobljenem z rep-PCR. Bakterije rodu *Pseudomonas* so znani inhibitorji drugih bakterij, zato smo preverili njihovo sposobnost inhibicije rasti *Erwinia amylovora* na gojišču King B, ker bi to lahko oviralo določanje te bakterije. Sposobnost inhibicije smo potrdili pri 4 od 46 testiranih sevov.

Ključne besede: 16S rDNA RFLP, *Erwinia amylovora*, ožig, *Pseudomonas* ssp., rep – PCR

**ABSTRACT*****Pseudomonas* ssp. FROM SAMPLES WITH BLIGHT SYMPTOMS**

Plant pathogenic bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* are common on fruit trees in Slovenia. They reduce fruit quality and may lower yield. Trees infected by pathogenic *Pseudomonas* species are also more susceptible to other pathogens. In 2003 some *Pseudomonas* isolates were obtained that were from samples with more severe blight symptoms of apple shoots than are usually observed. *Pseudomonas* and *Erwinia amylovora* infections are difficult to distinguish. In the frame of systematic survey of fire blight

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

<sup>2</sup>univ. dipl. mikrobiol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

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

<sup>4</sup>PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, The Netherlands

<sup>5</sup>PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, The Netherlands

<sup>6</sup>prof. dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

coordinated by the Phytosanitary Administration of the Republic of Slovenia in 2003, 441 samples showing more or less typical fire blight symptoms were tested. During *Erwinia amylovora* isolation on sucrose nutrient agar and King's B media *Pseudomonas*-like colonies were observed and isolated from 34 samples (8 %). In 2004 pathogenic bacteria from genus *Pseudomonas* were isolated from 26 (20,2%) out of 129 samples tested on *Erwinia amylovora*. Infected samples included apple and pear trees, quince, *Pyracantha*, *Cotoneaster*, Japanese Quince, rose and *Photinia*. Biochemical (LOPAT) tests were performed for all isolates. On the basis of preliminary tests isolates from different host plants were selected and further tested using fatty acids profile analysis, whole cell protein profiles, toxin production bioassay, pathogenicity tests on various hosts and molecular methods such as 16S rDNA RFLP and rep-PCR. High diversity of the HR-positive strains (most likely pathovars of *Pseudomonas syringae* or *P. syringae* pv. *syringae*) was observed in pathogenicity tests and rep-PCR profiles. Because bacteria from genus *Pseudomonas* often show inhibitory effects on growth of other bacteria their possible influence on efficacy of *Erwinia amylovora* detection was checked. Marked inhibitory effects on *Erwinia amylovora* on King's B media were observed in 4 out of 46 tested isolates.

Key words: 16S rDNA RFLP, blight, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* ssp., rep – PCR

## 1. UVOD

Patogene bakterije rodu *Pseudomonas* so v Sloveniji precej razširjene. Najpomembnejša vrsta iz tega rodu, ki povzroča bolezn na rastlinah, je *Pseudomonas syringae*. Vrsta je na podlagi različnih gostiteljskih rastlin razdeljena v več kot 50 patovarjev, ki pa jih je s standardnimi bakterijskimi taksonomskimi testi težko razlikovati. Dodatno se patovarji med seboj razlikujejo še po etiologiji bolezni, virulenci in sposobnosti tvoriti kemično različne fitotoksine (Scholz *et al.*, 1994). Bolezenska znamenja, ki jih povzroča ta bakterija so podobna znakom hruševega ožiga povzročenim z bakterijo *Erwinia amylovora*, ki povzroča bolezn pri rastlinah iz družine *Rosaceae* in je ena najnevarnejših bolezni sadnega drevja ter je razširjena praktično po vsej Evropi.

Med izbruhom hruševega ožiga v Sloveniji v letih 2003 in 2004 smo iz vzorcev, ki smo jih testirali na bakterijo *Erwinia amylovora*, pogosto izolirali tudi kolonije morfološko podobne bakterijam rodu *Pseudomonas*. Da bi ugotovili raznolikost izoliranih patogenih bakterij iz rodu *Pseudomonas* smo seve karakterizirali z različnimi metodami kot so profil maščobnih kislin, test patogenosti na različnih gostiteljih, biotest tvorbe toksinov, 16S rDNA RFLP in tipizacija z rep-PCR. Ker so bakterije iz rodu *Pseudomonas* znani inhibitorji drugih bakterij, smo preverili tudi njihovo sposobnost inhibicije rasti *Erwinia amylovora* na gojišču King B, ker bi to lahko oviralo določanje te bakterije.

## 2. MATERIAL IN METODE

### 2.1. Rastlinski vzorci in izolacija bakterij

V letu 2003 in 2004 smo pregledali skupno 570 vzorcev z bolj ali manj tipičnimi znamenji hruševega ožiga iz območja celotne Slovenije. Vzorčenje je potekalo vsako leto od aprila do oktobra, ko se pojavijo bolezenska znamenja hruševega ožiga. Izolacija iz rastlinskega materiala je potekala kot je opisano v EPPO standardu za določanje bakterije *Erwinia amylovora* (OEPP/EPPO Phytosanitary procedures PM 3/40 (1). *Erwinia amylovora*. Sampling and test methods). Uporabljali smo gojišči SNA (sucrose nutrient agar) in King B ter jih inkubirali 2-3 dni pri 28°C.

V raziskavo smo vključili tudi 6 izolatov iz rodu *Pseudomonas* iz leta 2001 in 2002 in sicer iz kutine, slive, breskve in stročjega fižola. Vključili smo tudi 4 referenčne seve in sicer: NCPPB 281 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*), NCPPB 2684 (*Pseudomonas syringae* pv.

*syringae*), GSPB 2204 (*Pseudomonas syringae* pv. *phasolicola*) in GSPB 1836 (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*).

## 2.2. Karakterizacija izoliranih sevov

Morfologijo kolonij smo opazovali na gojiščih King B in SNA. Pri vseh sevih smo naredili LOPAT teste (L-tvorba levana, O-oksidaza, P-pektinolitičnost, A-arginin dihidrolazni test, T-hipersenzitivna reakcija na tobaku), test razgradnje želatine ter test fluorescence na gojišču King B.

Za določene izolate smo izvedli tudi profil maščobnih kislin, kot je opisano v Janse (1991).

**Tipizacija z molekularnimi metodami.** Seve smo tipizirali glede na polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA (16S rDNA RFLP) z encimoma *RsaI* in *MnII*. Izolacijo grobe DNA s Chelexom in pomnoževanje 16S rDNA z verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli kot so opisali Cankar *et al.* (2005). Tipizacijo smo izvedli tudi z rep-PCR (Rademaker *et al.*, 2000). Pri tej metodi z oligonukleotidni začetniki, ki so komplementarni ohranjenim ponavljajočim se delom DNA v bakterijskem genomu, pomnožujemo med njimi ležeče dele DNA. Ti deli so različno veliki in ko jih ločimo po velikosti z agarozno elektroforezo, dobimo značilen profil. V naši analizi smo uporabili BOX oligonukleotidni začetnik.

**Inhibicija rasti bakterije *Erwinia amylovora* s pseudomonadami.** Na gojišče King B smo v črti nacepili testirani sev *Pseudomonas* ssp. in nato po 24 urni inkubaciji na celotno gojišče nanесли še suspenzijo bakterije *Erwinia amylovora*. Cono inhibicije smo odčitali po 72 urni inkubaciji na 28°C.

**Produkcija toksinov.** Pri izbranih 57 izolatih smo preverili tvorbo toksinov, predvsem siringomicina, ki je bolj toksičen za indikatorsko glivo *Rhodotorula pilimanae* od ostalih toksinov, ki jih lahko tvori *Pseudomonas syringae*. Toksini, ki pronicajo iz bakterij zavirajo rast indikatorske glive *Rhodotorula pilimanae*, kar je vidno v čisti coni okoli bakterijskih kolonij (Bultreys *et al.*, 1999, Bender *et al.*, 1999)

**Test patogenosti.** S 26 izolati smo izvedli test patogenosti na listih hruške Conference in na plodovih jabolane sorte Braeburn (Yessad *et al.*, 1992) ter pri 30 izolatih test patogenosti na stročjem fižolu. Opazovali smo razlike v izraženih bolezenskih znamenjih pri različnih gostiteljih in med posameznimi izolati.

## 3. REZULTATI IN RAZPRAVA

V letih 2003 in 2004 smo iz vzorcev z bolj ali manj tipičnimi bolezenskimi znamenji hruševega ožiga izolirali kolonije morfološko podobne bakterijam rodu *Pseudomonas*. Da bi ugotovili, ali gre za določen tip bakterij znotraj tega rodu, ki lahko povzroča simptome podobne hruševemu ožigu oziroma za tip, ki se pogosto pojavlja na materialu okuženem z *E. amylovora*, smo preverjali njihovo virulenco, sposobnost zaviranja rasti *E. amylovora* in genetsko raznolikost z molekularnimi tipizacijskimi metodami.

Od 441 vzorcev v letu 2003 smo opazili in izolirali kolonije morfološko podobne bakterijam rodu *Pseudomonas* pri 34 vzorcih. Izolirani sevi so bili tako patogeni kakor tudi nepatogeni. V letu 2004 smo od vseh izoliranih bakterij iz rodu *Pseudomonas* v nadaljevanju testirali samo tiste, ki so imeli pozitivno hipersenzitivno reakcijo na tobaku. Od 129 vzorcev iz sistematičnega nadzora bakterijskega hruševega ožiga in 11 lastnih vzorcev smo patogene seve izolirali iz 35 vzorcev.

V preglednici 1 je prikazano število vzorcev z izoliranimi bakterijami iz rodu *Pseudomonas* po gostiteljih v letu 2003 in 2004. Pri določenih vzorcih smo izolirali po dva ali več različnih izolatov, tako da je skupno število izolatov 180.

Preglednica 1: Število vzorcev in izolatov iz rodu *Pseudomonas* po gostiteljih v letu 2003 in 2004.

Gostitelj	Število vzorcev	Število izolatov
glog	2	2
hruška	6	8
jablana	42	144
japonska kutina	2	3
jerebika	3	5
kutina	7	9
ognjeni trn	1	1
panešplja	4	5
photinia	1	1
vrtnica	1	2
<b>SKUPAJ</b>	<b>69</b>	<b>180</b>

V rod *Pseudomonas* smo bakterije uvrstili na podlagi morfologije na gojiščih SNA in King B ter fluorescence na gojišču King B. Patogenost teh bakterij smo potrdili s hipersenzitivno reakcijo na tobaku. V vrsto *Pseudomonas syringae* smo seve uvrstili na podlagi LOPAT testa.

Pri analizi izolatov z molekularnimi metodami naši preliminarni rezultati kažejo, da imajo izolati s pozitivno hipersenzitivno reakcijo (HR) na tobaku drugačen 16S rDNA *RsaI* restrikcijski profil od izolatov z negativno hipersenzitivno reakcijo. Za dokončno potrditev te hipoteze je potrebno poskus izvesti še na večjem številu vzorcev. Dobljeni BOX-PCR profili so bili veliko bolj raznoliki kot 16S restrikcijski profili. Tako smo lahko od 164 testiranih izolatov 151 izolatov razvrstili v 13 BOX-PCR tipov, ostalih 13 izolatov pa kaže edinstven BOX-PCR tip. Določen profil se je pojavljal pri bakterijah iz različnih gostiteljskih rastlin in iz različnih lokacij. Dobljeni rezultati se ujemajo z ugotovitvami drugih avtorjev (Stead *et al.*, 2003; Weingart *et al.*, 1997), ki opisujejo, da so profili pri določenih patovarjih zelo podobni in je težko razlikovati tudi med zelo sorodnimi patovarji, medtem ko so določni patovarji po profilih zelo različni in ima veliko sevov svoj profil. Med zelo heterogene patovarje sodi tudi patovar *syringae*. Ena od možnih razlag je, da so te bakterije epifitske bakterije, ki imajo zelo velik krog gostiteljskih rastlin. S prilagoditvijo na različne okoljske razmere je tudi genska heterogenost večja (Weingart *et al.*, 1997).

Pri določenih izolatih rodu *Pseudomonas* smo testirali sposobnost tvorbe toksinov, predvsem siringomicina, bakterijskega toksina, ki povzroča nekroze rastlinskega tkiva. Od testiranih 57 izolatov jih je 30 (52,6%) na gojišču tvorilo toksin. Delež toksičnih sevov pri jablanah in hruškah je bil 45% in 33%, pri večini drugih rastlin pri katerih smo testirali manjše število sevov, pa so toksine proizvajali vsi testirani sevi (sevi iz breskev, kutin, panešplje, slive, španskega bezga in vrtnice).

Test patogenosti na stročjem fižolu, listih hruške sorte Conference in na plodovih jabolane sorte Braeburn smo delali samo z izolati s pozitivno hipersenzitivno reakcijo na tobaku. Ugotovili smo, da se izolati med seboj močno razlikujejo po virulenci na določenem gostitelju. Tako nekateri izolati povzročijo razvoj bolezenskih znamenj hitreje in v večjem obsegu samo na enem ali dveh izmed testiranih gostiteljskih rastlin. Pege, ki so se razvile na stročjem fižolu, so bile različno velike. Večina je bila rjavih in udrtih, kakršni so značilni za *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, vidne pa so bile tudi vodene pege z izcedkom, ki so značilne za *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Povezave med velikostjo in tipom peg in sposobnostjo tvorbe siringomicina na gojiščih nismo opazili. Pri listih hruške sorte Conference so se pri bolj virulentnih izolatih pojavile nekroze že po 24 urah in tudi obseg

nekroz na listih pri teh izolatih je bil večji kakor pri ostalih. Pri plodovih jabolane sorte Braeburn so se prva bolezenska znamenja, v obliki majhnih mastnih peg ob mestu vboda, pojavila po 4 dneh. Izrazitejše nekroze ob mestu vboda pa so se razvile po 14 dneh.

V letu 2003 smo poleg patogenih bakterij iz rodu *Pseudomonas*, izolirali in karakterizirali tudi nekaj nepatogenih izolatov. Pri vseh izolatih iz tega leta smo testirali sposobnost inhibicije rasti bakterije *Erwinia amylovora* na gojišču King B. Pri 4 izolatih, ki so se vsi izkazali za nepatogene, smo ugotovili, da so sposobni močno inhibirati rast bakterije *Erwinia amylovora*. Čeprav te bakterije ne povzročajo bolezenskih znamenj, so lahko pomembne pri diagnostiki bakterije *Erwinia amylovora*, povzročiteljice bakterijskega hruševega ožiga, saj lahko ovirajo izolacijo te bakterije na gojišču. Nekateri nepatogeni sevi iz rodu *Pseudomonas* se uporabljajo tudi za omejevanje širjenja hruševega ožiga kot biotični antagonisti. Da bi preverili možnost delovanja naših izolatov kot biotičnih agensov bi bilo potrebno opraviti nadaljnje teste v naravnih razmerah, saj je znano, da je stopnja inhibicije v kulturi in naravi lahko zelo različna (Vanneste, J, 2000).

#### 4. SKLEPI

Na podlagi izvedenih testov lahko sklenemo, da je v Sloveniji na sadnem drevju in okrasnih rastlinah veliko različnih bakterij iz rodu *Pseudomonas* (predvsem *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*). Bakterije se razlikujejo med seboj tako po molekularnih lastnostih, kakor tudi po patogenosti in tvorbi toksinov.

#### 5. ZAHVALA

Zahvaljujemo se Fitosanitarni upravi RS, fitosanitarnim inšpektorjem Fitosanitarnе inšpekcije Inšpektorata RS za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano, ter drugim strokovnjakom s področja varstva rastlin za nabrane vzorce, Ministrstvu za šolstvo znanost in šport za sofinanciranje ter Špeli Prijatelj Novak, Lidiji Matičič in Alešu Blatniku za pomoč pri izvedbi laboratorijskih testov.

#### 6. LITERATURA

- Bender C.L., Alarcon-Chaidez F., Gross D.C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Jun; 63 (2), 266-92
- Bultreys, A., Gheysen, I. 1999. Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Applied and environmental microbiology*, 65, 1904 – 1909
- Cankar, K., Kraigher, H., Ravnikar, M., Rupnik, M., 2005. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS microbiol. lett.* [Print ed.], vol. 244, no. 2., 341-345.
- Janse JD (1991) Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335-345.
- Rademaker, J.L.W., De Bruijn, F.J. 2000. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University
- Scholz, B. K., Jakobek, J.L., Lindgren, P.B. 1994. Restriction fragment length polymorphism evidence for genetic homology within a pathovar of *Pseudomonas syringae*. *Applied and environmental microbiology*, 60 (4), 1093- 1100
- Stead, D.E., Simpkins, S.A., Weller S.A., Hennessy J., Aspin A., Stanford, H., Smith, N.C., Elphinstone, J.G. 2003. Classification and identification of plant pathogenic *Pseudomonas* species by REP PCR derived genetic fingerprints. V: *Pseudomonas syringae* and related pathogens. *Biology and Genetic*. Iacobellis, N.S., Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J.W., Morris C.E., Murillo C.E., Schaad, N.W., Stead, D.E., Surico, G. Kluwer academic publishers. The Netherlands, 411 - 420
- Vanneste, J. 2000. FIRE BLIGHT : the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, Oxon; New York.
- Weingart, H., Völksch, B. 1997. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC - , REP-, in ISSO PCR. *Journal of Phytopathology*, 145, 339 345
- Yessad, S., Manceau, C., Luisetti, J. 1992. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant disease*, 76, 370 373