

**VPLIV BAKTERIJE *Agrobacterium tumefaciens* NA VSTOP LI INK OGOR ICE  
*Meloidogyne ethiopica* V KORENINE GOSTITELJSKE RASTLINE *in vitro***

Janja LAMOVŠEK<sup>1</sup>, Barbara GERI STARE<sup>2</sup>, Gregor UREK<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

**IZVLE EK**

V rizosferi prihaja do številnih medsebojnih vplivov med različnimi organizmi. Zanimal nas je odnos med bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*, povzročiteljico raka koreninskega vratu, in rastlinsko parazitsko ogorico *Meloidogyne ethiopica*. Vpliv *A. tumefaciens* na vstop drugostopenjskih li ink (J2) *M. ethiopica* v korenino je bil ovrednoten *in vitro* na gostiteljski rastlini *Arabidopsis thaliana* s tehniko ločenih korenin. Zastopanost *A. tumefaciens* na eni strani korenine ni vplivala na vstop li ink *M. ethiopica* na nasprotni strani korenine. Vstop li ink J2 je bil slabši ob zastopanosti *A. tumefaciens* na isti strani korenine, vendar le pri inokulumu 100 li ink na korenino. Predvidevamo, da zastopanost *A. tumefaciens* otežuje vstop li inkam *M. ethiopica* v gostiteljsko rastlino zaradi nastanka biofilma okoli korenine. Zmanjšano razmnoževanje ogorice ob zastopanosti *A. tumefaciens* je pokazal tudi lonni poskus na paradižniku. Izbrana *in vitro* metoda se je izkazala kot dober sistem za hitre študije medsebojnih vplivov med omenjenimi organizmi, saj so nam rezultati takšnih hitrih študij lahko v pomoč pri zasnovi dolgotrajnejših lonnih poskusov.

373

**Ključne besede:** *Agrobacterium tumefaciens*, *in vitro*, medsebojni vpliv, *Meloidogyne ethiopica*

**ABSTRACT**

**PENETRATION OF *Meloidogyne ethiopica* JUVENILES INTO HOST PLANT ROOTS  
AFFECTED BY *Agrobacterium tumefaciens in vitro***

Rhizosphere presents a place of numerous interactions between various organisms. We studied interaction between the crown gall bacterium *Agrobacterium tumefaciens* and root knot nematode *Meloidogyne ethiopica*. The effect of *A. tumefaciens* on penetration of *M. ethiopica* second-stage juveniles (J2) into plant host roots was assessed on the host plant *Arabidopsis thaliana* with *in vitro* split root technique. The presence of *A. tumefaciens* on one side of the split root had no effect on J2 penetration on the opposite split root. A significant decrease in J2 penetration was observed when *A. tumefaciens* was present on the same side of the roots, but only in treatment with 100 larvae per root. Penetration of J2 larvae may be hindered due to biofilm formation on the plant roots by *A. tumefaciens*. Reduced reproduction of *M. ethiopica* was shown also on tomato co-infected with *A. tumefaciens* in a pot trial. The applied *in vitro* method proved as an excellent choice for short-term interaction studies between the studied organisms, as it provides additional information useful in designing long-term pot trials.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*, interaction, *in vitro*, *Meloidogyne ethiopica*

<sup>1</sup> univ. dipl. mikrobiol., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana, e-mail: janja.lamovsek@kis.si

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

<sup>3</sup> doc. dr., prav tam

## 1 UVOD

Rizosfera je okolje, kjer prihajajo v stik različni organizmi. Kakšen medsebojni odnos bodo ti razvili, je odvisno od ekološke niše ter vira prehrane. Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* in ogorica *Meloidogyne ethiopica* spadata v skupino ekonomsko najpomembnejših škodljivih organizmov v kmetijstvu. Oba rodova povzročita hipertrofijo rastlinskega tkiva, a preko različnih mehanizmov. Patogenost bakterije *A. tumefaciens* je pogojena z zastopanostjo plazmida Ti (ang. tumor-inducing) z zapisom za tumorigenost, kateri se prenese in vgradi v genom rastlinske celice. Izražanje genov patogenosti povzroči nenadzorovano delitev rastlinske celice, kar opazimo kot tumor. Navadno tumor nastane ob koreninskem vratu, lahko pa nastane tudi na koreninah. Agrobakterije vstopijo in vgradijo patogene gene po prepoznavi signala, ki ga oddaja poškodovano rastlinsko tkivo. Znano je, da lahko agrobakterije vstopajo skozi rane nastale ob prehranjevanju fitoparazitskih ogoric (Karimi in sod., 2000). Ogorice koreninskih šišek (*Meloidogyne* sp.) so obligatni paraziti, ki na koreninah številnih rastlinskih vrst povzročajo značilne odebeltve imenovane šiške. Šiška nastane, ko lička inka druge razvojne stopnje (J2) po vstopu v korenino s svojimi žleznimi izločki vzpodbudi nastanek prehranjevalnega mesta v obliki večjega jedrne rastlinske celice. Tako agrobakterije kot ogorice koreninskih šišek vplivajo na transport vode in hranil od korenin do poganjkov (Veselov in sod., 2003; Strajnar in sod., 2012), kar lahko privede do propada rastline.

Razširjenost *A. tumefaciens* smo v Sloveniji dokazali na različnih kmetijskih zemljiščih (Lamovšek in sod., 2011), zastopanost vrste *M. ethiopica* pa smo v Evropi prvi zabeležili prav na slovenskih tleh (Širca in sod., 2004). *M. ethiopica* je tropska ogorica, ki je sposobna preživeti tudi v zmernih podnebnih razmerah (Strajnar in sod., 2011). Njeno zastopanost so v Evropi pred kratkim potrdili tudi v Grčiji in Turčiji (Conceição in sod., 2012; Aydinli in sod., 2013).

Za nastanek bolezni morajo bakterije oz. ogorice vstopiti v korenino. Z *in vitro* poskusom smo želeli oceniti vpliv patogene bakterije *A. tumefaciens* na vstop ličinke *M. ethiopica* v korenine navadnega repnjakovca *Arabidopsis thaliana*.

## 2 MATERIALI IN METODE

Za izvedbo *in vitro* poskusa smo uporabili tehniko ločitve korenin. Zasnova poskusa je razvidna iz preglednice 1. Vsako obravnavanje smo naredili v šestih ponovitvah.

Semena *A. thaliana* smo sterilizirali v 1 % NaOCl in nakalili na modificiranem gojišču KNOP (Sijmons in sod., 1991) v temi. Rast stranskih korenin smo stimulirali tretji dan po kalitvi tako, da smo s skalpelom odrezali vrh glavne korenine. Ploščice smo inkubirali na svetlobi (14 h) v rastni komori pri povprečni dnevni temperaturi 23 °C. Deveti dan smo rastline predstavili na KNOP gojišču in v ploščicah s tremi predelki tako, da smo fizično ločili zeleni del in oba lateralno razvita dela korenine. Ploščice smo zaščitili z ovojnim trakom in inkubirali v rastni komori v že omenjenih razmerah. Po sedmih dneh smo rastlinam dodali ličinke J2 ogorice *M. ethiopica* in / ali bakterije *A. tumefaciens*.

Jajčeca ogorice *M. ethiopica* smo pridobili s korenin okuženega paradižnika po Hussey in Barker-jevi metodi (Hussey in Barker, 1973). Ličinke J2 smo po izleganju v sterilni vodi površinsko sterilizirali s tri-minutnim namakanjem v 0,5 % HgCl<sub>2</sub>. Nato smo ličinke trikrat sprali v sterilni deionizirani vodi na 20 µm situ. Inokulum z ličinkami J2 smo pripravili v sterilni raztopini Gelrite®. Želatinasta struktura pripravka Gelrite preprečuje prehitro usedanje ličink in omogoča pripravo enakomerne suspenzije ličink.

Patogeni sev *A. tumefaciens* (slovenski izolat 06-424-7) smo namnožili na ploščicah z gojiščem King's B. Suspenzijo z 80 % prosojnostjo določeno z tubidimetrom (Biolog, ZDA) (okoli 10<sup>8</sup> CFU/ml) smo pripravili iz 24 h starih kolonij v sterilni deionizirani vodi in inokulum pripravili v raztopini Gelrite®.

Tri tedne po inokulaciji obeh organizmov smo korenine obarvali s fuksinom (Byrd in sod., 1983) in pod le o prešteli li inke, ki so vstopile v korenino. Podatke o številu li ink v korenini smo statisti no ovrednotili s statisti nim programom R (v.3.0.0.) (R Development, 2008) s paketoma Rcmdr (v. 1.9-6) in agricolae (v. 1.1-4). Razlike med obravnavanji smo ovrednotili z analizo variance (ANOVA) in preizkusom mnogoterih primerjav (LSD) pri P 0,05.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultati *in vitro* študije nakazujejo na antagonisti en vpliv bakterij *A. tumefaciens* na vstop li ink ogor ic koreninskih šišk *M. ethiopica*. Vstop li ink *M. ethiopica* v korenine je bil slabši, kadar so bile na površju hkrati tudi bakterije (preglednica 1: obravnavanji III in VI). Predvidevamo, da biofilm oz. sluz (zunajceli ni polisaharidi), ki jo bakterija tvori na površini korenine, otežuje premikanje li ink, kar se kaže v izrazito zmanjšanem vstopu. Rezultati našega lon nega poskusa na koreninah paradižnika so pokazali 2,5-krat manjše razmnoževanje ogor ic ob zastopanosti agrobakterij po 45-ih dneh inkubacije (rezultati niso prikazani).

Preglednica 1. Vpliv zastopanosti bakterij *A. tumefaciens* na vstop li ink J2 *M. ethiopica* v korenine *A. thaliana* *in vitro*.

Obravnavanje	Inokulum		Št. <i>M. ethiopica</i> v korenini	Delež <i>M. ethiopica</i> v korenini (%)
	1. predelek	2. predelek		
I	100 J2 <i>M. ethiopica</i>	/	3,0 ± 0,8 <b>b</b>	3,0 ± 0,8 <b>bc</b>
II	100 J2 <i>M. ethiopica</i>	100 CFU <i>A. tumefaciens</i>	2,8 ± 0,8 <b>b</b>	2,8 ± 0,8 <b>bc</b>
III	100 J2 <i>M. ethiopica</i> + 10 CFU <i>A. tumefaciens</i>	/	0,0 ± 0,0 <b>a</b>	0,0 ± 0,0 <b>c</b>
IV	20 J2 <i>M. ethiopica</i>	/	2,8 ± 0,7 <b>b</b>	13,8 ± 3,5 <b>a</b>
V	20 J2 <i>M. ethiopica</i>	100 CFU <i>A. tumefaciens</i>	2,8 ± 1,3 <b>b</b>	14,2 ± 6,6 <b>a</b>
VI	20 J2 <i>M. ethiopica</i> + 10 CFU <i>A. tumefaciens</i>	/	1,6 ± 0,6 <b>b</b>	8,0 ± 2,7 <b>ab</b>

rke za številom in deležem li ink (a-c) v stolpcih prikazujejo statisti no zna ilne razlike med obravnavanji (LSD test, p 0,05). Enake rke pripadajo obravnavanjem, med katerimi ni statisti no zna ilnih razlik.

Za uspešen vstop li ink J2 je pomembna za etna velikost populacije, ki ne sme prese i kriti ne gostote v *in vitro* sistemu. Izkazalo se je, da je 100 li ink nanosenih na polovico korenin preve , kar se kaže v zmanjšanem deležu li ink, ki vstopijo v korenino pri visokem inokulumu li ink. Ob ve jem inokulumu li ink smo opazili tudi ve raztrganih koreninskih vrši kov, najverjetneje kot posledico tekmovanja med li inkami.

Zastopanost bakterij na koreninah ni vplivala na vstop li ink *M. ethiopica*, e organizma nista prišla v neposreden stik (preglednica 1: obravnavanji II in V). Sklepamo, da zastopanost bakterije na eni strani korenine ne izzove v rastlini systemskega odziva, ki bi omejeval vstop li ink *M. ethiopica* na nasprotni strani.

Korenine *A. thaliana* so tanke in prosojne, in kot take ustrezne za opazovanje vstopa li ink ogor ic. Vstop li inke v korenino je viden že tretji dan po inokulaciji kot zadebelitev na mestu, kjer si ogor ica ustvari prehranjevalno mesto (ve jedrna celica). Po enem tednu li inka ni ve vidna zaradi hipertrofije tkiva. Število ogor ic v korenini po tretjem dnevu in po treh

tednih se ni razlikovalo (podatki niso prikazani). Z barvanjem smo se prepričali, da je v vsaki šiški le ena lička *M. ethiopica*, etudi so se šiške po velikosti razlikovale.

Bakterijski sev *A. tumefaciens* 06-424-7 povzroča tumorje na gostiteljskih rastlinah, vendar tumorjev v našem *in vitro* poskusu nismo opazili. Znano je, da je nastanek tumorja odvisen od gostote bakterij, ki mora doseči kritično maso, da bakterije prenesejo in vgradijo T-DNA s plazmida Ti v rastlinski genom. Prava je bila dodana koncentracija bakterij sprva nizka (preglednica 1), se je gostota hitro dvignila zaradi rasti bakterij na gojišču. Po enem tednu so bakterije v celoti poselile korenino. Sev po treh tednih na koreninah ni izgubil patogenosti, saj je po izolaciji s korenin in inokulaciji na testne rastline (paradižnik, sončnica in kalanhoja) zopet povzročil nastanek tumorjev. Prava sta bila gostota bakterij in čas zastopanosti ugodna za nastanek tumorjev, pa so morda drugi pogoji v *in vitro* sistemu onemogočili nastanek tumorjev.

#### 4 SKLEPI

Antagonisti ni vpliv bakterij *A. tumefaciens* na vstop ogorčice *M. ethiopica* v rastlinsko korenino v našem *in vitro* sistemu temelji na fizični prepreki, ki jo ustvari bakterijski biofilm. Menimo, da je izbrana *in vitro* metoda bolj primerna za študije medsebojnih odnosov med glivami in ogorčicami kot bakterijami in ogorčicami. Zaradi narave večinoma bakterijskih sevov, kot sta hitra rast na gojišču in proizvodnja zunajceli nih polisaharidov, izbrana metoda ne more nadomestiti lon nih poskusov. Struktura biofilma bakterij na koreninah v naravnem okolju ter v *in vitro* pogojih se razlikuje. Agrobakterije v naravi redko tvorijo tolikšne količine sluzi kot na gojiščih, saj je vir sladkorjev v naravi običajno omejen, v gojišču pa prosto dostopen v večjih količinah. Kljub temu se je izbrana *in vitro* metoda izkazala kot dober sistem za hitre študije odnosov med omenjenimi organizmi, saj so nam rezultati takšnih hitrih študij lahko v pomoč pri zasnovi dolgotrajnejših lon nih poskusov.

#### 5 ZAHVALA

Za finančno pomoč se zahvaljujemo ARRS (P4-0133).

#### 6 LITERATURA

- Aydinli, G., Mennan, S., Devran, Z., Širca, S., Urek, G. 2013. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato and cucumber in Turkey. *Plant Disease* (sprejeto v objavo, doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0019-PDN>).
- Byrd, D.W. Jr, Kirkpatrick, T., Barker, K.R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142-143.
- Conceição, I.L., Tzortzakakis, E.A., Gomes, P., Abrantes, I., da Cunha, M.J. 2012. Detection of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 3: 451-457.
- Hussey, R.S., Barker, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- Karimi, M., Van Montagu, M., Gheysen, G. 2000. Nematodes as vectors to introduce *Agrobacterium* into plant roots. *Molecular Plant Pathology*, 1,6: 383-387.
- Lamovšek, J., Geri Stare, B., Urek, G. 2011. Occurrence of the bacteria *Agrobacterium tumefaciens* in Slovenian soil samples. V: Janežič, S., Benčina, M., Rupnik, M., Gradišar, H. (ur.) 9<sup>th</sup> Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5<sup>th</sup> Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation, Maribor, 12<sup>th</sup> – 15<sup>th</sup> October 2011. *Abstract book*. Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo: 235.
- Sijmons, P.C., Grundler, F.M.W., von Mende, S., Burrows, P.R., Wyss, U. 1991. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant parasitic nematodes. *Plant Journal*, 1: 245–254.
- Strajnar, P., Širca, S., Knapič, M., Urek, G. 2011. Effect of Slovenian climatic conditions on the development and survival of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica*. *European Journal of Plant Pathology*, 129 (1): 81-88.

- Strajnar, P., Širca, S., Urek, G., Šircelj, H., Železnik, P., Vodnik, D. 2012. Effect of *Meloidogyne ethiopica* parasitism on water management and physiological stress in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 49-57.
- Širca, S., Urek, G., Karssen, G. 2004. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato in Slovenia. *Plant Disease*, 88: 680.
- Veselov, D., Langhans, M., Hartung, W., Aloni, R., Feussner, I., Götz, C., Veselova, S., Schlomski, S., Dickler C., Bächmann, K., Ullrich, C.I. 2003. Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene, and abscisic acid. *Planta*, 216: 512-522.
- Wyss, U., Grundler, F.M.V., Münch, A. 1992. The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica*, 38: 98-111.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.