

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Igor ZIDARIČ

RAZŠIRJENOST OLJKOVEGA RAKA (*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse) V SLOVENSKI ISTRI

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Igor ZIDARIČ

**RAZŠIRJENOST OLJKOVEGA RAKA (*Pseudomonas syringae* subsp.
savastanoi Janse) V SLOVENSKI ISTRI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**OLIVE KNOT DISEASE (*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*
Janse) DISTRIBUTION IN SLOVENIAN ISTRIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Pregledi in vzorčenja oljčnikov so bila opravljena v slovenski Istri. Vse laboratorijske analize so bile opravljene v laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Francija Aca CELARJA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Zlata LUTHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Franci Aco CELAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Igor ZIDARIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 634.63:632.35(497.4)(043.2)
KG	oljka/ <i>Olea europaea</i> /rastlinske bolezni/oljkov rak/ <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i> /razširjenost bolezni/Slovenija
AV	ZIDARIČ, Igor
SA	CELAR, Franci Aco (mentor)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2016
IN	RAZŠIRJENOST OLJKOVEGA RAKA (<i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i> Janse) V SLOVENSKI ISTRI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 54 str., 13 pregl., 19 sl., 67 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AL	Najstarejša opisana bolezen na oljkah (<i>Olea europaea</i> L.) je oljkov rak, ki ga povzroča bakterija <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i>. Škodo gospodarskega pomena povzroča predvsem na gostiteljskih rastlinah v drevesnicah in mladih oljkah občutljivih na zimsko pozebo. Bolezen prepoznamo po tumorskih izrastkih, zaradi katerih sta ovirana rast in razvoj dreves, ki povzročajo izgubo pridelka. Diplomaska naloga je bila usmerjena v ugotavljanje razširjenosti bolezenskih znamenj oljkovega raka v slovenski Istri na italijanskih sortah 'Leccino', 'Frantoio', 'Pendolino', 'Maurino', 'Ascolana tenera' in slovenski sorti 'Istrska belica'. Pregledali smo 125 različnih oljčnikov na 24 lokacijah, opravili 20 vzorčenj na podlagi bolezenskih znamenj ter 64 vzorčenj na podlagi latentne prisotnosti bakterije. V laboratoriju smo nato na odvzetih vzorcih ugotavljali prisotnost bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i> z barvanjem po Gramu, s serološko metodo indirektne imunofluorescence, verižno reakcijo s polimerazo, ter vgnezditevno verižno reakcijo s polimerazo. Bakterijo <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i> smo potrdili v vseh vzorcih z bolezenskimi znaki in v enem latentnem vzorcu. Vse proučevane italijanske sorte so se izkazale kot zelo občutljive, saj smo pri vseh potrdili prisotnost bakterije. Na sorti 'Istrska belica' bolezenskih znakov nismo našli, zato ugotavljamo, da je ta sorta tolerantna za okužbe z bakterijo <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i>, kar se je izkazalo kot prednost pred italijanskimi sortami.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 634.63:632.35(497.4)(043.2)
CX olive/*Olea europaea*/plant disease/olive kont/ *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*/disease distribution/Slovenia
AU ZIDARIČ, Igor
AA CELAR, Franci Aco (supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2016
TI OLIVE KNOT DISEASE (*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse)
DISTRIBUTION IN SLOVENIAN ISTRIA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 54 p., 13 tab., 19 fig., 67 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Olive knot disease is the oldest described disease on olive trees (*Olea europaea* L.). The causative agent of the disease is bacterium *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. Economically important losses occur mainly in the nurseries where host plant are grown, and on young olive trees susceptible to winter frosts. The disease manifests in tumour-like outgrowths that weaken the growth and development of olive trees and leads to lower yields. The research was focused on occurrence of symptoms in olive orchards in Slovenian Istria. The field survey was conducted on Italian varieties 'Leccino', 'Frantoio', 'Pendolino', 'Maurino', 'Ascolana tenera' and one Slovenian 'Istrska belica'. In total 125 different olive orchards at 24 locations was inspected, where 20 symptomatic samples and 64 samples without symptoms were collected. Samples were taken to laboratory where Gram staining, serological method of indirect immunofluorescence, polymerase chain reaction, and nested polymerase chain reaction were used for identification of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. The presence of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* in all symptomatic samples and in one latent sample was confirmed. Italian varieties exhibited very high susceptibility, considering that all samples were positive to bacteria presence. In contrary Slovenian variety 'Istrska belica' seems to be tolerant to infection with bacterium *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* since no visible symptoms of disease were found.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 POVZROČITELJ BOLEZNI	2
2.1.1 Odkritje povzročitelja	2
2.1.2 Oljkov rak v Sloveniji	2
2.1.3 Razširjenost bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i> v svetu	2
2.2 LASTNOSTI BAKTERIJE	3
2.2.1 Taksonomska uvrstitev in opis bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i>	3
2.2.1.1 Taksonomska uvrstitev bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i>	3
2.2.1.2 Opis bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i>	3
2.2.2 Preživetje in širjene	3
2.2.3 Sorodstvene povezave znotraj vrste	4
2.3 POTEK OKUŽBE IN BOLEZENSKA ZNAMENJA	6
2.4 GOSTITELJSKE RASTLINE	10
2.4.1 Oljka	10
2.4.1.1 Taksonomska uvrstitev oljke (Martinčič in sod., 1999)	10
2.4.1.2 Izvor in razširjenost oljke pri nas in v svetu	10
2.4.1.3 Razprostranjenost oljčnikov v Sloveniji	12
2.4.1.4 Sorte oljk	13
2.4.2 Ostale gostiteljske rastline	14
2.5 OLJČNA MUHA	15
2.6 POZEBA IN NJEN VPLIV NA ŠIRJENJE OLJČNIH NASADOV TER TVEGANJE ZA NASTANEK OLJČNEGA RAKA	17
2.7 METODE ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJE Pssa	18
2.8 VARSTVO PRED OLJKOVIM RAKOM	18
2.8.1 Testiranje odpornosti sort na bakterijo Pssa	18
2.8.2 Uporaba pripravkov na podlagi bakra in odpornost	19

2.8.3	Varstvo	20
3	MATERIALI IN METODE DELA	22
3.1	PREGLEDI OLJČNIKOV IN VZORČENJE	22
3.1.1	Vzorčenje na podlagi bolezenskih znamenj	22
3.1.2	Vzorčenje na podlagi latentne prisotnosti	24
3.2	KRATKI OPISI TESTIRANIH SORT	24
3.2.1	'Istrska belica'	24
3.2.2	'Leccino'	25
3.2.3	'Maurino'	25
3.2.4	'Frantoio'	26
3.2.5	'Pendolino'	27
3.2.6	'Ascolana tenera'	27
3.3	IZOLACIJA POVZROČITELJEV BOLEZENI	28
3.3.1	Izolacija bakterij iz rastlinskih tkiv z bolezenskimi znamenji	28
3.3.2	Izolacija bakterij iz rastlinskih tkiv brez bolezenskih znamenj	30
3.4	BARVANJE PO GRAMU	30
3.5	IMUNOFLUORESCENCA	31
3.6	ANALIZA IZOLATOV S POLIMERAZNO VERIŽNO REAKCIJO	32
3.6.1	Izolacija DNA	32
3.6.1.1	Izolacija DNA iz čistih bakterijskih kolonij z alkalno lizo NaOH	32
3.6.1.2	Izolacija DNK s kuhanjem	33
3.6.2	Namnoževanje DNK zaporedja s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	33
3.6.3	Dokazovanje namnoženih odsekov z agarozno gelsko elektroforezo	34
3.7	ANALIZA IZOLATOV Z VGNEZDITVENO PCR	35
4	REZULTATI	37
4.1	PREGLEDI OLJČNIKOV IN VZORČENJE	37
4.2	REZULTATI IZOLACIJ POVZROČITELJEV BOLEZENSKIH ZNAMENJ IN BARVANJE PO GRAMU	37
4.3	REZULTATI IMUNOFLUORESCENCE	40
4.4	ANALIZA IZOLATOV S PCR IN VGNEZDITVENO PCR	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.2	SKLEPI	45
6	POVZETEK	47
7	VIRI	49
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Površine intenzivnih nasadov oljk in število dreves v ekstenzivnih nasadih od leta 1991 do 2012 (SURS, 2015a, 2015b)	11
Preglednica 2:	Pridelava oljčnega olja v svetu leta 2007 v 1.000 tonah (World ..., 2012)	12
Preglednica 3:	Pozebe oljk v preteklosti (Ogrin, 2002: 163)	17
Preglednica 4:	Značilnosti pozeb oljk v slovenski Istri v 20. Stoletju (Ogrin, 2002: 164)	17
Preglednica 9:	Kraji pregledov, število pregledanih oljčnikov in število odvzetih vzorcev	23
Preglednica 5:	Sestava PCR mešanice z začetnim oligonukleotidnim parom IAALF/IAALR	34
Preglednica 6:	Pogoji pomnoževanja z začetnim oligonukleotidnim parom IAALF/IAALR	34
Preglednica 7:	Sestava mešanice vgnezditevne PCR z notranjim začetnim oligonukleotidnim parom IAALN1/IAALN2	36
Preglednica 8:	Pogoji pomnoževanja z notranjim začetnim oligonukleotidnim parom IAALN1/IAALN2	36
Preglednica 10:	Rezultati izolacij bakterij iz simptomatičnih vzorcev in barvanje izolatov po Gramu	38
Preglednica 11:	Rezultati izolacij bakterij iz latentnih vzorcev in barvanje izolatov po Gramu	39
Preglednica 12:	Rezultati analiziranja izolatov z IF	40
Preglednica 13:	Rezultati PCR, vgnezditevne PCR, barvanja po gramu in IF	41

KAZALO SLIK

Slika 1:	Rakaste tvorbe vozličaste oblike na rodnih vejah oljke (foto: I. Zidarič)	7
Slika 2:	Bolezenska znamenja oljkovega raka na stranskih vejah (foto: I. Zidarič)	7
Slika 3:	Zelo močna okužba ogrodne veje z oljkovim rakom (foto: I. Zidarič)	8
Slika 4:	Bolezenska znamenja oljkovega raka na ogrodnih vejah (foto: I. Zidarič)	8
Slika 5:	Bolezenska znamenja oljkovega raka na deblu mlade oljke (foto: I. Zidarič)	9
Slika 6:	Poškodbe od insektov na veji oljke (foto: I. Zidarič)	9
Slika 7:	Oljka v času zorenja (foto: I. Zidarič)	12
Slika 8:	Primerna območja za rast oljk v slovenski Istri (Brlec, 2011: 26)	13
Slika 9:	Bolezenska znamenja bakterije Pssa na listih oleandra (foto: I. Zidarič)	14
Slika 10:	Oljčna muha pred pikom in izleganjem jajčeca (foto: M. Jančar)	16
Slika 11:	Žerka oljčne muhe v plodu oljke (foto: M. Jančar)	16
Slika 12:	Oljčna veja s plodovi sorte 'Istrska belica' (foto: I. Zidarič)	24
Slika 13:	Oljčna veja s plodovi sorte 'Leccino' (foto: I. Zidarič)	25
Slika 14:	Oljčna veja s plodovi sorte 'Maurino' (foto: I. Zidarič)	26
Slika 15:	Oljčna veja s plodovi sorte 'Frantoio' (Regans Ridge, 2005)	26
Slika 16:	Močno okuženo deblo, občutljive sorte 'Pendolino' (foto: I. Zidarič)	27
Slika 17:	Oljčna veja s plodovi sorte 'Ascolana tenera' (foto: I. Zidarič)	28
Slika 18:	Elektroforegram namnoženih specifičnih odsekov genomske DNK dolžine 454 bp z začetnim oligonukleotidnim parom IAALF/IAALR značilno za bakterijo Pssa	42
Slika 19:	Elektroforegram namnoževanja specifičnih odsekov genomske DNK dolžine 338 bp z začetnim oligonukleotidnim parom IAALN1/IAALN2 značilno za bakterijo Pssa	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Agar	sredstvo za strjevanje gojišč pridobljeno z ekstrakcijo in sušenjem nekaterih morskih alg
Agaroz	polisaharid pridobljen iz agarja
Avtoklav	naprava za avtoklaviranje
Avtoklaviranje	15 minutna sterilizacija pri 121 °C in povišanem tlaku 1,1 bar
Cfu	kolonije formirajočih enot (ang. colony forming unit)
dH ₂ O	destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
IAA	indol - 3 - očetna kislina
IF	imunofluorescenca
IVIA	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
K ₂ HPO ₄	dikalijev hidrogen fosfat
Kazamino kisline	amino kisline in majhni peptidi pridobljeni s hidrolizo kazeina
KCl	kalijev klorid
KH ₂ PO ₄	kalijev hidrogen fosfat
KingB	pol selektivno gojišče za izolacijo bakterij
KS	krajevna skupnost
LB	litijev boratni pufer
MgSO ₄	magnezijev sulfat
MKGP	ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
ml	mililiter
NaCl	natrijev klorid (morska sol)
Na ₂ HPO ₄	dinatrijev hidrogen fosfat
NaOH	natrijev hidroksid
NCPPB	National collection of plant pathogenic bacteria
ng	nanogram
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PBS	phosphate buffered saline (fosfatni pufer s soljo)
Pepton	vir proteinov, peptidov in aminokislin za rast mikroorganizmov
Pssa	<i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i>
PVF-1	selektivno gojišče za izolacijo bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>savastanoi</i>
safranin	žafnanasto barvilo
SDS	sodium dodecyl sulfate (natrijev dodecil sulfat)
SGŠ	severna geografska širina

spatula po Drigalskem

laboratorijsko orodje za enakomerno razmazovanje bakterijske
suspenzije po trdih površinah (agarnih gojiščih)

supernatant bistra tekočina nad usedlino

SURS statistični urad Republike Slovenije

TAE tris acetatni pufer

Taq DNA polimeraza

polimeraza iz organizma *Thermophilus aquaticus*

TBE tris boratni pufer

torkla stiskalnica s celotnim prostorom, oljarna

UV ultravijolična svetloba

vorteksiranje stresanje s posebnim centrifugalnim stresalnikom

µm mikrometer

1 UVOD

Bakterija *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (v nadaljevanju Pssa) je povzročiteljica oljkovega raka na oljki in na nekaterih drugih gostiteljskih rastlinah. Gospodarsko škodo povzroča v oljčnikih in v drevesnicah, kjer gojijo sadike gostiteljskih rastlin. V letih, ko so razmere za razvoj bakterije in bolezni dobri, lahko pričakujemo zelo močan pojav bolezenskih znamenj. Bolezen nima velikega neposrednega vpliva na kakovost in na količino pridelka pri odraslih drevesih. Največjo nevarnost predstavljajo močne okužbe dreves v mladostnem obdobju rasti, na rastlinah občutljivih za zimske pozebe. Posledica bolezni je slabša rast in razvoj dreves. Šolski primer takšne močne okužbe, smo opazili ob enem izmed pregledov, ko smo naleteli na močne okužbe mladih dreves in močno zaostalost v rasti. O oljčnem raku v Sloveniji ni bilo veliko napisanega, saj je omenjen le v knjigi Velika knjiga o oljki (Sancin, 1990). O oljčnem raku je bilo več napisanega na področju bivše Jugoslavije, kjer je oljka rastla na 45000 ha, Slovenija pa v tem času ni bila poznana kot pridelovalka oljke.

Namen raziskovalne naloge je bil pregledati nekatere oljčnike in ugotoviti razširjenost bolezenskih znamenj oljkovega raka v slovenski Istri in odvzeti vzorce z najbolj razširjenih sort oljke pri nas ('Istrska belica', 'Leccino', 'Frantoio', 'Pendolino', 'Maurino' in 'Ascolana tenera', ki se uporablja za vlaganje). Tako je prvi del diplomske naloge obsegal terensko delo in iskanje ter vzorčenje iz obolelih rastlin. Ker so bolezenska znamenja, ki jih povzroča bakterija zelo značilna, smo predvidevali, da z iskanjem ne bomo imeli težav. Predvidevali smo tudi, da se bolezenska znamenja v okolju, kjer je bakterija prisotna, pojavljajo intenzivneje, kar je značilno za vse bakterijske bolezni. Prav tako smo predvidevali, da se bolezenska znamenja pojavljajo tam, kjer prihaja do zimskih pozeb in kjer je prisotna oljčna muha, ki je prenašalec (vektor) pri širjenju te bakterije. Sporadičnih najdb pred izvedbo pregledov nismo pričakovali. Prav tako smo želeli dokazati prisotnost bakterije v latentnih vzorcih. Obsežnejši del diplomske naloge je bilo laboratorijsko diagnosticiranje povzročitelja. Imeli smo namen vpeljati metode, za izolacijo in potrditev bakterije z vsaj dvema metodama. Z raziskavo bi ugotovili potencialno nevarnost te bakterijske bolezni v slovenskih oljčnikih. Bakterijske bolezni so namreč zelo nevarne v ustreznih okoliščinah, saj zoper njih ne poznamo učinkovitih fitofarmaceutskih sredstev, kot jih poznamo za zatiranje glivičnih bolezni. Ugotovili bomo tudi razširjenost bakterije in s tem možnost pojava bolezenskih znamenj na teh lokacijah. Prav tako smo želeli ugotoviti razlike v občutljivosti najbolj razširjenih sort na oljčnega raka. Pri natančnih pregledih oljčnikov smo bili pozorni tudi na ostale bolezni in škodljivce, ki so poleg oljčnega raka lahko omejujoč dejavnik pri ekonomični pridelavi oljk.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POVZROČITELJ BOLEZNI

2.1.1 Odkritje povzročitelja

Oljkov rak je verjetno prva opisana rastlinska bolezen, ki jo je pred več kot 2300 leti v antičnih časih opisal Teofrast v svojem delu *De historia et de causis plantarum*. Takrat seveda še niso vedeli, da bolezenska znamenja na oljki povzroča bakterija. Prvi, ki je proučeval bakterijo (l. 1886), jo izoliral in opisal, pa je bil prof. dr. Luigi Salvatore Savastano (1853-1937). Svoje odkritje je leta 1889 opisal v članku *Il bacillo della tubercolosi dell olivo*, bakterijo pa poimenoval *Bacillus olea tuberculosis* (Pierce, 1891). Smith je leta 1908 bakterijo preimenoval po njenem odkritelju v *Bacterium savastanoi*. Zadnje poimenovanje bakterije je *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (Gardan in sod., 1992; Scortichini in sod., 2004).

2.1.2 Oljkov rak v Sloveniji

Oljkov rak je v slovenskih oljčnikih verjetno prisoten že dalj časa, vendar mu nismo posvečali nobene pozornosti. Dejstvo, da se bolezni v preteklosti ni posvečalo velike pozornosti, je bila tudi majhna intenzivnost pridelave oljk in mnogo bolj nevarne in pogoste zimske pozebe. Prav tako ni nihče na strokovni ravni pisal o pojavu bolezni. Vrhovnik (2004) in Jančar (2007) se sicer s pojavom oljčnega raka pri nas srečujeta že več kot 30 let. V zadnjih letih se na nekaterih lokacijah v večjem obsegu pojavljajo bolezenska znamenja, čemur so lahko vzrok različni dejavniki. V tem obdobju ni bilo pripravljene tudi nobene strategije o preventivnih in kurativnih ukrepih zoper to bolezen. Zaradi intenzivnega in obsežnega povečevanja intenzivnih površin oljčnikov v zadnjih 20 letih, lahko pričakujemo večji pomen oljčnega raka in prav tako večjo pozornost usmerjeno v varstvene ukrepe.

2.1.3 Razširjenost bakterije *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* v svetu

Razširjenost bakterije po kontinentih (Young, 2004):

Evropa:	Španija, Italija, Portugalska, Grčija, Ciper, Francija, Nemčija, Avstrija, Nizozemska, Norveška, Švica, Velika Britanija, Češka, Albanija, Švedska, Rusija. Avtor omenja tudi bivšo Jugoslavijo, vendar ne specificira v katerih novo nastalih državah.
Azija:	Gruzija, Iran, Irak, Izrael, Libanon in Turčija.

Afrika: Alžirija, Libija, Maroko, Južna Afrika, Tanzanija in Tunizija.
Severna Amerika: ZDA (Arizona, Arkansas, Teksas in Kalifornija), Mehika.
Južna Amerika: Argentina, Brazilija, Kolumbija, Peru, Urugvaj.
Avstralazija: Avstralija in Nova Zelandija

Na podlagi naštetih držav lahko ugotovimo, da je bakterija zastopana v skoraj vseh državah, kjer gojijo oljke. Prisotna pa je tudi v nekaterih državah, kjer je bila izolirana iz ostalih gostiteljskih rastlin, saj oljke zaradi klimatskih razmer tam ne gojijo.

2.2 LASTNOSTI BAKTERIJE

2.2.1 Taksonomska uvrstitev in opis bakterije *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*

2.2.1.1 Taksonomska uvrstitev bakterije *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*

Kraljestvo: Prokariota
Deblo: Proteobacteria
Razred: Gammaproteobacteria
Red: Pseudomonadales
Družina: Pseudomonadaceae
Rod: *Pseudomonas*

2.2.1.2 Opis bakterije *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*

Bakterija Pssa je gram negativna paličasta bakterija velika od 0,4 do 0,8 x od 1 do 3 µm, je gibljiva in ima enega do štiri polarne bičke. Bakteriji je bila določena determinacijska shema z LOPAT tehniko (L – produkcija levana, O - produkcija oksidaze, P – pektolitična aktivnost, A – proizvodnja arginin dihidrolaze in T – hipersenzitivnostna reakcija na listih tobaka) (Lelliott, 1966). Bakterija Pssa na listih tobaka povzroči hipersenzitivnostno reakcijo. Ne tvori oksidaze. Argininski test je negativen, sevi izolirani iz oljke in oleandra ne tvorijo levana. Pektolitična aktivnost se po Hildebrandovi metodi (Hildebrand, 1971) prične pri pH 4 (Garrity in sod., 2005).

2.2.2 Preživetje in širjene

Dolgotrajno preživetje patogenim bakterijam Pssa omogočajo le gostiteljske rastline. Bakterije preživijo v sami rastlini, na površju kot so listi, pa preživijo le krajši čas. Krajše

obdobje bakterije lahko preživijo tudi na prenašalcih (vektorjih), predvsem na oljčni muhi. V tleh bakterije propadejo. Bakterije so prisotne v živih tumorjih, torej razvijajočih se tumorjih. V starih posušenih razbrazdanih tumorjih, čeprav so videti kot veliko žarišče patogenov, živih bakterij ni prisotnih, saj se njihovo število s starostjo tumorja hitro zmanjšuje in izolacija živih bakterij ni več mogoča. Poleg tega lahko stare posušene tumorje z drevesa kar odlučimo. Ravno preživetje bakterije v sami rastlini omogoča širjenje le te na večje razdalje s sadilnim materialom še posebej tam, kjer rastline razmnožujejo s cepljenjem.

Na krajše razdalje, predvsem znotraj nasada se bakterije širijo z rezjo, aerosolom, ki ga raznaša veter in dežjem, še posebej pri močnejših nevihtah in toči, ki poškoduje rastline in naredi vstopne rane. Prav tako lahko bakterije prenašamo s kmetijsko mehanizacijo, ki pride v stik z okuženimi drevesi, saj na ta način prenesemo bakterije iz okuženih na zdrava drevesa. Tak način prenosa je še posebej opazen na prvem drevesu v vrsti, ki ga zaradi traktorskega obračanja, kjer smo omejeni z manipulativnim prostorom, traktorist močnejše poškoduje, kar so bila tudi naša opažanja ob priložnosti študijskega obiska na inštitutu IVIA v Valenciji (Španija). Ko je bakterija enkrat prisotna v nasadu, tam tudi ostane, trajna eradikacija je namreč nemogoča (Young, 2004).

Bolezenska znamenja se ne pojavijo vsako leto z enako intenzivnostjo. Bolezen lahko več let miruje, nato pa v letu, ko so idealne razmere za njen razvoj, pride do močnejšega izbruha. Bakterije v rastlino vstopajo skozi rane na poganjkih in listih, ki jih povzročamo z rezjo in skozi rane, ki jih povzročajo močnejše nevihte in toča. Ravno tako lahko vstopna mesta predstavljajo poškodbe, ki so nastale zaradi zmrzali. Številna vstopna mesta povzročamo tudi s tradicionalnim obiranjem oljk, ko odpadanje plodov povzročamo s palico, s katero močno udarjamo po vejah ali pri uporabi mehanskega načina obiranja oljk. Bakterije lahko v rastlino vstopijo tudi skozi naravne rane, ki nastanejo na mestu odpadlega listja. Zmotno je namreč mišljenje, da vednozelenne rastline ne menjajo listja. Oljka svoj liste menja na od 3 do 4 leta. Prek ran, ki nastajajo ob obiranju, lahko pride do okužbe v obdobju od 7 do 10 dni. Do največjih okužb prihaja v spomladanskem in ne jesensko zimskem času, ko odpadajo listi. Razvoj bakterij in posledično bolezenskih znamenj je namreč povezan z deževnim obdobjem in vegetacijo, saj so rastline v zimskem času v mirovanju in bakterijam ne nudijo najboljših pogojev za njihov razvoj (Teviotdale in Krueger 1998; Krueger, 2003; Young, 2004).

2.2.3 Sorodstvene povezave znotraj vrste

Ime bakterije, povzročiteljice oljčnega raka, se je od odkritja do danes kar nekaj krat spremenilo. Vendar fitobakteriologi in taksonomi niso spreminjali le imena, temveč so z

novimi odkritji bakteriji večkrat spremenili tudi vrsto. V vrsto *Pseudomonas savastanoi* je bakterijo uvrstil leta 1913 Stevens. To ime je veljalo do leta 1980, ko so bakterijo uvrstili znotraj vrste *Pseudomonas syringae* in so jo tako poimenovali *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Janse je leta 1981 odkril, da je patovar *savastanoi* v bistvu nova podvrsta, ki ji je pripisal tri virulentne patovarje, ki inducirajo nastajanje tumorjev in predlagal spremembo imena, pri kateri je na podlagi ugovora dr. Younga tudi ostalo, in sicer *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *oleae*, *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini* in *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *nerii* (Gardan in sod., 1992). Razlika znotraj predlaganih patovarjev je v določenih specifičnih lastnostih posameznih patovarjev, da preferirajo okuževanje določenih gostiteljskih rastlin, tako najpogosteje na oljki srečujemo bakterijo *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *oleae* na oleandru bakterijo *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *nerii* in na jesenu bakterijo *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini* (Janse, 1981). Vsekakor pa so možne izolacije različnih patovarjev na različnih gostiteljskih rastlinah (Janse, 2008). Janse (1982) je sicer objavil rezultate v katerih je opisal glavne značilnosti in razlike med sevi izoliranimi iz jesena in ostalimi sevi. Poglavitne razlike so, da ti izolati ne povzročajo parenhimskih tumorjev zaradi zmanjšane tvorbe IAA in pomanjkanja tvorbe citokininom podobnih snovi. Prav tako izolati iz jesena niso patogeni za ostale gostiteljske rastline, ki jih sicer bakterija Pssa okužuje. Na podlagi novih raziskav na področju fenotipskih analiz in DNK – DNK hibridizacije so odkrili nove lastnosti bakterij znotraj vrste *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* in bakterijo uvrstili v novo vrsto *Pseudomonas savastanoi*, ki so jo razdelili na tri patovarje. Prvi patovar znotraj vrste je *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, ki vključuje vse tri patovarje, ki jih je leta 1981 predlagal dr. Jaap Janse. Ostale dva patovarja pa sta *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycine* in *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Palleroni, 2005). Z dr. Jaap Jansem smo se pogovarjali glede novega poimenovanja, ki mu ni razumljiv, saj so razlike med temi tremi patovarji znotraj vrste z vidika fitobakteriologa in fitopatolga zelo velike (Janse, 2008).

Danes se za bakterijo pogovorno najpogosteje uporablja poimenovanje *Pseudomonas savastanoi*, pri čemer se izraz patovar, ki določa sev bakterije zanemari. V pisni obliki pa je potrebno zaradi nedvoumnosti ta izraz tudi uporabljati. Kadar imamo opravka z dotičnim izolatom pa je najbolje, da navedemo tudi iz katere rastline je bil izoliran. Do tako natančnega poimenovanja sevov prihaja, ker niso bili sprejeti taksonomski predlogi Janse Jaapa. Takšno razlikovanje je pomembno tudi zato, ker je nek sev bakterije v nekaterih državah lahko na karantenski listi škodljivih organizmov ali pa je vsaj na listi ekonomsko pomembnih patogenov. Še pomembnejše pa je takrat, ko je nek sev, ki sicer ni karantenski organizem prisoten v državi, drug sev, ki je karantenski patogen, pa ni prisoten.

2.3 POTEK OKUŽBE IN BOLEZENSKA ZNAMENJA

Po okužbi gostiteljske rastline in primernih razmerah za potek bolezni se razvoj bolezenskih znamenj začne z induciranjem hormonskega neravnovesja. Bakterije sintetizirajo indol-3-octno kislino (IAA) in snovi, ki delujejo podobno kot citokinini (Janse, 1982), zato v rastlini pride do nekontrolirane rasti celic in nastanka tumorjev. IAA se sintetizira iz L-triptofana preko intermediata indolacetamida. Za sintezo omenjenega hormona sta pomembna gena *iaaM* z zapisom za triptofan monooksigenazo in gen *iaaH* z zapisom za indolacetamid hidrolazo. Oba gena tvorita operon, ki se lahko nahaja na plazmidu ali na kromosomu, odvisno od posameznega seva. Gen *ipt* pa nosi zapis za biosintezo citokininov in se nahaja na bakterijskem plazmidu (Caponero, 1995). Obstaja še gen *iaaL* z zapisom za lizin sintetazo, ki pretvarja IAA v IAA-lizin, pri čemer je bakterija Pssa edina opisana bakterija, ki je sposobna takšne pretvorbe. IAA-L ima med drugim tudi funkcijo shranjevanja IAA v simptomatičnem tkivu in se kadar se poveča potreba po IAA lahko zopet pretvori v to aktivnejšo obliko. Prednost IAA-L pa je tudi v tem, da je bistveno bolj obstojna in odporna pred nevarnostjo razgradnje s pomočjo encimov peroksidaze in IAA oksidaze. Sicer pa je IAA-L tudi manj aktivna oblika hormona od svojega konjugata IAA (Glass in Kosuge, 1986).

Bolezenska znamenja, ki jih povzroča bakterija Pssa, so na vseh gostiteljskih rastlinah enaka. Prav tako se lahko pojavijo na vseh rastlinskih delih, saj je bila bakterija izolirana tudi iz listov, plodov in korenin. Najpogostejša in izrazita bolezenska znamenja opazimo le na mladikah (slika 1 in slika 2), ogrodnih vejah (slika 3 in slika 4) in deblu (slika 5). Prisotnost bakterije v vseh rastlinskih delih nakazuje, da se bakterija lahko širi sistemsko po celotnem organizmu. Težave sistemsko okuženih rastlin so v tem, da odstranitev okuženih rastlinskih delov ne izključuje ponovnega pojava bolezenskih znamenj. Bolezenska znamenja se izražajo v obliki vozličastih (ang. olive knot disease) novotvorb (slika 1) oz. tumorjev velikosti lešnika do oreha (Sancin, 1990). Pri zelo močnih okužbah lahko opazimo tudi tumorje do velikosti moške pesti. Janse (1981) opisuje bolezenska znamenja v obliki bradavičastih izrastkov in parenhimskih tumorjev.

Okužbe z bakterijo lahko povzročijo sušenje in propadanje rodni vej. V mladostnem obdobju rasti drevo močno zastane v rasti in s tem ne dosega zelenega rodnega volumna. Kadar so razmere za okužbo zelo dobre in pride do močnih okužb lahko ostanemo brez pridelka. V najslabšem primeru lahko bakterije, ki so se namnožile v zelo velikem številu in okoli debla oblikujejo obroč, povzročijo popoln propad drevesa. Bakterija Pssa lahko tudi zmanjša cvetenje dreves, ter vpliva na razvoj plodov in njihov okus (Young, 2004).



Slika 1: Rakaste tvorbe vozličaste oblike na rodnih vejah oljke (foto: I. Zidarič)

Na oljki lahko podobna bolezenska znamenja povzroča tudi bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, povzročiteljica raka koreninskega vratu na številnih gostiteljskih rastlinah iz različnih rodov in družin (De Cleene in De Ley, 1976). Okužbe z agrobakterijami so sicer zelo redke, poleg tega so si ti tumorji podobni le v začetni fazi, ko so še majhni. Kasneje pa izkušen fitopatolog zlahka loči med temi tumorji in tumorji, ki jih povzroča bakterija Pssa, saj so slednji značilno vozličaste oblike.



Slika 2: Bolezenska znamenja oljkovega raka na stranskih vejah (foto: I. Zidarič)



Slika 3: Zelo močna okužba ogrodne veje z oljkovim rakom (foto: I. Zidarič)



Slika 4: Bolezenska znamenja oljkovega raka na ogrodnih vejah (foto: I. Zidarič)



Slika 5: Bolezenska znamenja oljkovega raka na deblu mlade oljke (foto: I. Zidarič)

Razvoj tumorjev na vejah lahko v začetni fazi zamenjamo z raznimi abiotскими dejavniki, ki izzovejo kalusiranje tkiva. Izbokline na vejah pa lahko povzročajo tudi vbodi insektov, ki se tam hranijo ali pa delajo vbodne luknje, kamor ležejo jajčeca (slika 6).



Slika 6: Poškodbe od insektov na veji oljke (foto: I. Zidarič)

2.4 GOSTITELJSKE RASTLINE

2.4.1 Oljka

2.4.1.1 Taksonomska uvrstitev oljke (Martinčič in sod., 1999)

Kraljestvo:	Rastline – Plantae
Deblo:	Semenke – Spermatophyta
Poddeblo:	Kritosemenke – Magnoliophytina (Angiospermae)
Razred:	Dvokaličnice – Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Podrazred:	Lamiidae
Nadred:	Gentiananae
Red:	Oljkovci – Oleales
Družina:	Oleaceae Hoffmanns. & Link 1809
Rod:	<i>Olea</i>

2.4.1.2 Izvor in razširjenost oljke pri nas in v svetu

»*Olea prima omnium arborum est*« oz. oljka je kraljica vseh dreves, je zapisal rimski pisec Lucius Junius Moderatus Columella (4-70 n. št.) (Efe in sod., 2012). Botanični rod *Olea* obsega okoli 40 različnih vrst in podvrst. Prvi je oljki določil znanstveno ime Švedski botanik Carl Linne (*Olea europaea* L.). Kasneje so razni botaniki pri klasifikaciji vrsto *europaea* razdelili še na podvrste od katerih je najpomembnejša oljka *Olea europaea* L. ssp. *europaea* Wagner et al. 1999. Imenujemo jo tudi navadna oljka, domača oljka, evropska oljka ali kultivirana oljka, saj le ta podvrsta oblikuje užitne plodove in užitno olje.

Sinonimi navadne oljke: *Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *europaea*, *Olea europaea* L. ssp. *sativa* Arcang., *Olea europaea* L. var. *europaea*, *Olea europaea* L. var. *sativa* Loud., *Olea gallica* Mill., *Olea hispanica* Mill., *Olea lancifolia* Moench, *Olea sativa* Hoffmans. & Link.

Pri nas je v naravi razširjena na kamnitih pobočjih obmorskih predelov, tudi divja oljka (Martinčič in sod., 1999) *Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr. Divja oljka je nižje rasti in ima manjše plodove od navadne oljke.

Sinonimi divje oljke: *Olea europaea* L. ssp. *oleaster* (Hoffm. & Link) Negodi, *Olea europaea* L. ssp. *sylvestris* (Mill.) Rouy, *Olea europea* L. var. *oleaster* (Hoffm. &

Link.) DC., *Olea europaea* L. var. *sylvestris* Brot., *Olea oleaster* Hoffmegg. & Link, *Olea sylvestris* Mill.

Po podatkih, ki v Statističnem letopisu (preglednica 1) niso zajeti, naj bi v Sloveniji oljke rasle že na 1796 ha intenzivnih površin (Brlec in sod., 2011). Po podatkih MKGP (2013) naj bi GERK imelo 960 ha oljčnikov, dejanskih površin pa naj bi bilo 1968 ha. Prav tako po podatkih MKGP (2013) naj bi bilo pri nas potencialnih površin za gojenje oljk 2600 ha. Te številke so še vedno majhne, če vemo da je bilo v preteklosti v Sloveniji okoli 300.000 dreves oljke. Po proizvodnji olja pa smo med vsemi pridelovalci verjetno najmanjši, saj smo v letu 2011 pridelali le 1704 tone oljčnega olja. Največja pridelovalka oljk in olja v Evropi in v Svetu je Španija, saj pridelala skoraj 500 tisoč ton olja (preglednica 2).

Preglednica 1: Površine intenzivnih nasadov oljk in število dreves v ekstenzivnih nasadih od leta 1991 do 2012 (SURs, 2015a, 2015b)

Leto	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Intenzivni nasadi (ha)	64	92	107	254	445	496	540	540	540	586	586
Ekstenzivni nasadi (št. dreves)	55381	49744	44107	38470	32834	27197	21560	21560	21560	11289	11289
Leto	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Intenzivni nasadi (ha)	781	781	781	781	781	837	837	837	892	892	892
Ekstenzivni nasadi (št. dreves)	11289	11165	11165	18974	18974	17353	17353	17353	17353	17353	17353

Slovenski oljkarji začnejo zgodnje sorte oljke obirati sredi oktobra. Glavnino obiranja pa opravijo konec oktobra in novembra. V letih, ko oljke zorijo pozno in še posebej pri poznih sortah, pa obiranje opravijo v decembru. Večino obiranja opravijo ročno ali s posebnimi mehanskimi zgrabljalniki. Na sliki 7 je prikazana oljka sorte 'Istrska belica' v času zorenja. Oljkarji pred obiranjem okoli drevesa položijo pregrinjalo. S tem ukrepom lažje zbirajo plodove in pri tem tudi preprečijo stik plodov s tlemi. Plodove oljk oljkarji takoj po obiranju odpeljejo v torklo (Hočevar, 2011), kjer iz njih iztisnejo olje.

Oljčniki so v zasebni lasti in manjših površin (od 0,2 do 3 ha). Največji kompleks na Beneši (občina Ankaran – Ancarano), kjer je združeno več lastnikov, je velik 14 ha. V novih nasadih prevladuje avtohtona sorta 'Istrska belica' (od 50 do 70 %), ki je dobro rodna in oljevita ter dobro prenaša pozebo. Ker je za boljšo harmoničnost olivnega olja potrebnih več sort, imajo posajene še 'Leccino' (od 20 do 30 %), v starejših nasadih pa še nekatere druge sorte: 'Pendolino', 'Frantoio', 'Moraiolo', 'Štorta', 'Buga', 'Črnica', 'Drobnica', 'Mata' idr.

Preglednica 2: Pridelava oljčnega olja v svetu leta 2007 v 1.000 tonah (World ..., 2012)

Država	Slovenija	Španija	Turčija	Egipt	Maroko	Sirija	Grčija
Količina	1,489	492,3	270	220	85	100	95
Država	Argentina	ZDA	Italija	Alžirija	Iran	Jordanija	Peru
Količina	90	85	80	65	35	29,5	29



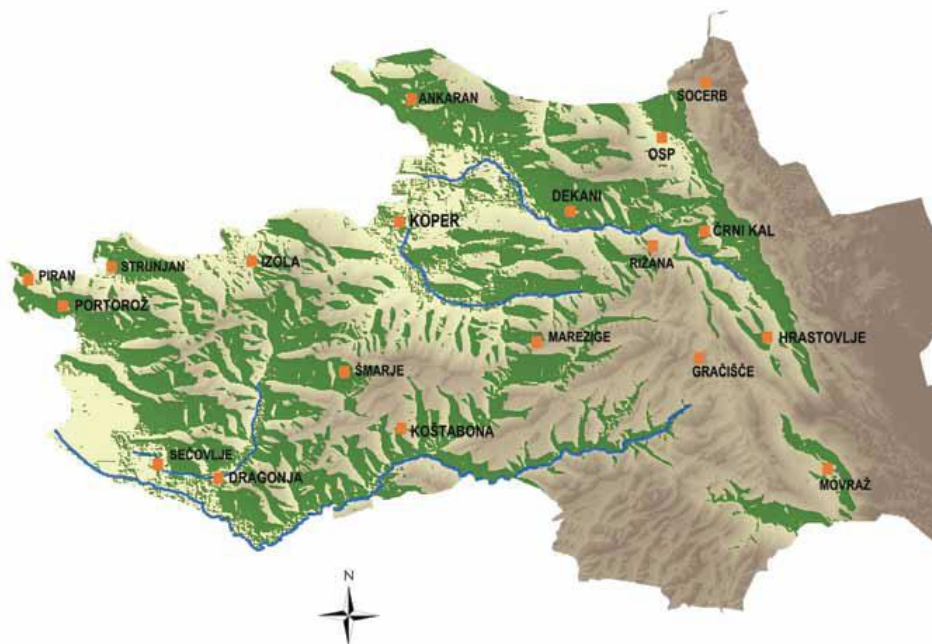
Slika 7: Oljka v času zorenja (foto: I. Zidarič)

2.4.1.3 Razprostranjenost oljčnikov v Sloveniji

Oljka je za klimatske in edafske razmere tipična in nezahtevna sredozemska rastlina. Kadar pa jo, tako kot v Sloveniji, gojimo v mejnih razmerah, z blagim mediteranskim vplivom, postane zahtevnejša. Omejujoč dejavnik za gojenje so predvsem nizke zimske temperature. Večino oljčnih nasadov pa je v slovenski Istri (slika 8) v priobalnem pasu in gričevju do 250 m nadmorske višine in redkeje do 300 m (Ogrin, 2002). Najstarejše oljke v slovenski Istri pa verjetno rastejo v Padni. Tam najdemo oljke, ki so preživele najhujšo pozebo leta 1929. Razlog za preživetje oljk na tem območju je verjetno v posebni mikroklimi, ki omogoča oljki idealne rastne razmere.

Zaradi temperaturnih inverzij in slabših talnih razmer ne uspeva na naplavinah vodotokov. V notranjost sega le po prisojnih pobočjih Rižane, Osapske reke, Badaševce, Drnice, Dragonje in Rokave. Raziskava v Rižanski dolini je pokazala, da ima 70 % oljčnikov južno ali zahodno ekspozicijo in 18 % vzhodno ter da je 82 % rastišč v višinskem pasu do 250 m. Največ nasadov je v zahodnem, nekoliko nižjem delu slovenske Istre, zahodno od črte Škofije-Marezige-Koštabona. Po podatkih popisa prebivalstva in gospodinjstev iz leta 1991 je v krajevnih skupnostih (KS) v tem delu, če ne upoštevamo mestnih KS, raslo skoraj 75 % vseh oljk, od tega več kot 20 % v KS Lucija in Šmarje (Ogrin, 2002).

Oljka je razširjena tudi v Goriških Brdih, kamor se vrača po uničujoči pozebi leta 1929 (Ogrin, 2002). V Brdih so oljko gojili že v srednjem veku, saj so imeli torklo (stiskalnico) že v 16. stoletju. Danes so oljko seveda zamenjale druge sadne vrste in predvsem vinska trta. Danes v Brdih oljko pridelujejo na približno 120 ha (Kandus, 2011). Nekaj oljčnikov je posajenih tudi v Vipavski dolini in v nižjih predelih Krasa. Kandus (2011) navaja po Uršiču in Prinčiču, da je na območju Vipavske doline in Goriških Brd zasajenih približno 200 ha oljk.



Slika 8: Primerna območja za rast oljk v slovenski Istri (Brlec, 2011: 26)

2.4.1.4 Sorte oljk

Gospodarsko bolj ali manj pomembnih je preko 100 različnih sort oljke. V Sloveniji je tržno zanimivih približno 15 sort oljke. Po zadnjem sadnem izboru za leto 2014, so sorte oljk razdeljene v seznam A (nekdaj glavne sorte) in seznam B (nekdaj postranske sorte), poleg tega so razdeljene še na oljke za olje, za vlaganje in kombinirane sorte (Godec in sod., 2015).

Sorte oljk za predelavo v olje:

Seznam A: 'Istrska belica' in 'Leccino'

Seznam B: 'Arbequina', 'Buga', 'Cipressino', 'Coratina', 'Črnica', 'Frantoio', 'Grignan', 'Leccio del corno', 'Leccione', 'Maurino', 'Moraiolo', 'Oblica', 'Pendolino'

Sorte oljk za predelavo v olje in za vlaganje (kombinirane sorte):

Seznam B: 'Itrana', 'Picholine'

Sorte oljk za vlaganje:

Seznam B: 'Ascolana tenera', 'Mata', 'Santa Caterina', 'Štorta'

2.4.2 Ostale gostiteljske rastline

Bakterija Pssa je patogena za vrste iz družine oljkovk (Oleaceae), saj okužuje skoraj vse glavne predstavnike te družine. Družina oljkovk obsega 27 rodov (GRIN, 2003) in preko 600 različnih rastlinskih vrst. Predstavnice iz družine oljkovk so lahko potencialne gostiteljske rastline te patogene bakterije.

Rodovi gostiteljskih rastlin znotraj družine oljkovk s katerih je bila do sedaj že izolirana bakterija Pssa so *Jasminum* L., *Fraxinus* L., *Ligustrum* L. in *Olea* L. (Surico in Lavermicocca, 1989). Bakterija Pssa je bila izolirana tudi iz oleandra (*Nerium oleander* L.) (Azad in Cooksey, 1995; Zidarič, 2005) in brazilskega jasmína (*Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson) (Pirc in sod., 2015), ki pa ne spadata v družino oljkovk, temveč sta uvrščena v botanično družino pasjestrupovk (Apocynaceae). Bolezenska znamenja na oleandru pogosto najdemo na listih (slika 9). Bakterijski izolati izolirani iz omenjenih rastlin so shranjeni tudi v bakterijski kolekciji NCPPB (2015).



Slika 9: Bolezenska znamenja bakterije Pssa na listih oleandra (foto: I Zidarič)

V Mali flori Slovenije so Martinčič in sod. (1999) opisali 7 rodov iz družine oljkovk, ki so lahko možne gostiteljske rastline bakterije Pssa in se pojavljajo pri nas. To so že prej omenjeni rodovi: *Jasminum* L., *Fraxinus* L., *Ligustrum* L. in *Olea* L. Poleg njih pa so opisane še *Phillyrea* L., *Forsythia* Vahl in rod *Syringa* L., katere predstavnik je španski bezeg oz. lipovka (*Syringa vulgaris* L.). Španski bezeg je bolj kot potencialni gostitelj

bakterije Pssa pomemben zato, ker je bil iz njega prvotno izolirana bakterija *Pseudomonas syringae* Van Hall 1902 (Hirano in Upper, 2000) oz. bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902, (*Phytomonas syringae* Van Hall 1902) (Palleroni, 2005). V Mali flori Slovenije ni opisane okrasne rastline oleander (*Nerium oleander*), ki je prav tako gostiteljska rastlina bakterije *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (Azad in Cooksey, 1995) in brazilskega jasmína.

2.5 OLJČNA MUHA

Oljčna muha (*Bactocera olea* Rossi, 1790) je najbolj znan in v ekonomskem merilu najpomembnejši škodljivec oljke, ki se pojavlja povsod, kjer ta rastlina uspeva (Sancin, 1990; Rice, 2000). V letih, ko so razmere za razvoj muhe ugodne, lahko ta uniči plodove in zmanjša pridelek za od 70 do 90 %. Poškodovani plodovi namiznih sort niso primerni za vlaganje. Olje pridelano iz poškodovanih plodov je slabše kakovosti in zaradi povečane kisline večkrat tudi neužitno. Povečana vsebnost kisline je posledica iztrebkov ličink in naknadne okužbe s številnimi plesnimi (Sancin, 1990).

Odrasla oljčna muha (slika 10) je velika do 6 mm in je rjavo rumene barve. Prezimi kot buba v tleh ali kot ličinka v plodovih, ki so ostali na drevesu. Razvoj muhe je močno odvisen od temperature in lahko v primernih razmerah vzleti že marca in se na začetku hrani z medeno roso, ki jo izločajo raznovrstne uši. V nekaterih podnebnih razmerah ima lahko do 7 generacij letno, v naših razmerah ima le dve do tri (Sancin, 1990). Navadno poškodbe na plodovih opazimo julija in avgusta, vendar škodo lahko povzroča vse do oktobra. Napadom oljčne muhe so bolj podvržene sorte z večjimi plodovi in večjo vsebnostjo vode, prav tako pa tudi sorte, ki imajo nežnejšo povrhnjico, ki jo samica lažje predre z leglico, ko v plod leže jajčece. Samica v vsak plod izleže le po eno jajčece iz katerega se razvije žerka (slika 11). V integriranem varstvu zatiramo oljčno muho s preventivno metodo z zastrupljenimi vabami in kurativno metodo pri kateri z insekticidi zatiramo žerke (Tehnološka ..., 2015). Poleg omenjenih dveh metod oljčno muho lahko zatiramo še na biotični način s predatorji, z rumenimi ploščami in mehanično (Sancin, 1990).

Oljčna muha in bakterija Pssa živita v simbiozi. Hagen (1966) odnos med oljčno muho in Pssa omenja kot mutualistično simbiozo, namreč od njunega odnosa imata korist oba organizma. Oljčna muha ima veliko vlogo pri prenosu bakterije Pssa iz okuženih dreves na zdrava. Poškodbe na plodovih, ki jih povzroča, predstavljajo tudi vstopna mesta za patogena (Arsenijević, 1988). S tem pripomore k širjenju in ohranjanju bakterijske populacije. Oljčna muha sama pa ima zelo omejene prehranske zahteve in s tem tudi ozek

krog gostiteljskih rastlin. Bakterija Pssa predstavlja muhi, v stadiju larve in odraslega osebk, pomemben dejavnik pri presnovi kemijskih spojin v plodu, saj ji pomaga pri razgradnji le teh v esencialne aminokisline in proteine, ki so pomembne za njeno rast in reprodukcijo (Rice, 2000).

S pojavom globalnih klimatskih sprememb in segrevanjem ozračja se srečujemo tudi v Sloveniji. Dvig temperatur ponuja ugodne razmere za razvoj oljčne muhe, ki se lahko na ta način razširi po celotnem pridelovalnem območju. Poleg razširitve območja napada, pa bomo deležni tudi povečanega števila generacij letno, kar ima lahko za posledico večje gospodarske škode ali pa več škropljenj in s tem večje obremenjevanje okolja. Močnejši napad oljčne muhe v slovenski Istri, smo zabeležili leta 2014. V nekaterih oljčnikih je bilo poškodovanih več kot 40 % plodov (Dravinec, 2014). Za bakterijo Pssa pomeni širjenje oljčne muhe tudi njeno širjenje in pojav bolezenskih znamenj v oljčnikih, kjer se do sedaj s to boleznijo še niso srečali.



Slika 10: Oljčna muha pred pikom in izleganjem jajčeca (foto: M. Jančar)



Slika 11: Žerka oljčne muhe v plodu oljke (foto: M. Jančar)

2.6 POZEBA IN NJEN VPLIV NA ŠIRJENJE OLJČNIH NASADOV TER TVEGANJE ZA NASTANEK OLJČNEGA RAKA

Občasne ekstremne zimske temperature in posledično pozeba, je močno zaznamovala razvoj oljkarstva v Sloveniji. Pozebo v povezavi z oljkovim rakom omenjamo zato, ker je poglavitni abiotični dejavnik, ki vpliva na razvoj bakterije Pssa in s tem na pojav bolezenskih znamenj v zelo velikem in gospodarsko pomembnem obsegu.

V Evropi so nasadi oljk na obrobju Sredozemskega morja z robnimi morji in se večinoma raztezajo med 30° in 35° SGŠ (Ogrin, 2002). Slovenija je zaradi severne lege 45° SGŠ in milega sredozemskega vpliva poleg severne Italije (pokrajina Treviso) na robu, kjer klimatske razmere še dovoljujejo gospodarno pridelavo oljk. Omejevalni dejavnik so torej nizke zimske temperature, ki se v pri nas pojavijo vsakih od 15 do 30 let (preglednica 3).

Preglednica 3: Pozebe oljk v preteklosti (Ogrin, 2002: 163)

Stoletje	Število pozeb	Leto pozebe	Pogostost (leta)
15.	1	1441	
16.	0		
17.	2	1684, 1685	
18.	7	1704, 1709, 1738, 1763, 1782, 1789, 1795	15
19.	4	1820, 1829, 1847, 1885	25
20.	5	1901, 1929, 1956, 1985, 1996	20
15. - 20.	19		30

Po Sancinu (1990) prenese oljka med zimskim mirovanjem od -13 do -15 °C, odvisno od zračne vlage, sorte, prehranjenosti rastline in njene starosti. Do pozebe pride hitreje, če je zračna vlaga visoka in so temperature skozi daljše obdobje od -5 do -8 °C, kot če so temperature v krajšem obdobju in suhem vremenu spustijo do -15 °C. Kadar vegetacija še traja oziroma se je že začela je nevarnost zaradi mraza še večja. Tedaj so lahko usodne že temperature od -2 do -3 °C.

Preglednica 4: Značilnosti pozeb oljk v slovenski Istri v 20. stoletju (Ogrin, 2002: 164)

Leto pozebe	Absolutne minimalne temp.	Škoda
1929	Trst (11.2): -14,3 °C	Uničenih 90 % dreves.
1956	Koper (10.2): -12,8 °C, Kubed (8.1.): -14,6 °C	Do tal pozeblo 30 % oljk, pozeba zaustavila obnovo.
1985	Portorož (8.1.): -9,3 °C, Kubed (8.1.): -16 °C	Poškodovanih 60 % dreves. Pridelek manjši za 80 %.
1996	Portorož (29.12.): -8,5 °C, Korte (29.12.): -10 °C	Skoraj v celoti prizadeti enoletni nasadi.

Za pozebo so nevarne zlasti zgodnje spomladanske otoplitve in poznejše hitre in močne ohlavitve, ko se v rastlini že začnejo asimilacijski procesi. Okvirno se prve poškodbe listov in vejic pojavijo pri $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, večjih vej in debla pa od -10 do $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Če mraz traja dalj časa, deblo pozebe od -14 do $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Toda tudi pri takih temperaturah koreninski vrat ni nikoli poškodovan, zato oljke spomladi poženejo iz njega (Sancin, 1990). Značilnosti pozeb prikazuje preglednica 4.

2.7 METODE ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJE Pssa

Za identifikacijo patogenih bakterij se uporablja različne klasične in novejšje molekulske metode, ki temeljijo na zaporedju DNK. Scortichini (2008) in Janse (2008) sta mnenja, da je osnova pri določanju patogenih bakterij, poznavanje gostiteljskih rastlin, vseh fizioloških stanj in bolezni, ki lahko prizadenejo rastlino, poznavanje zamenljivih znamenj in poznavanje bolezenskih znamenj, ki jih povzroča bakterija. Na koncu pa je potrebno še veliko izkušenj in logičnega razmišljanja. Šele, ko vsa ta znanja osvojimo, se lotimo naslednjega koraka, to je laboratorijskega dela.

Ko se odločimo za vzorčenje, sledimo navodilom za pravilen odvzem. Pri bakterijskih boleznih je pomembno tudi poznavanje preživetvenih sposobnosti bakterij, ki jih želimo identificirati. Odvzeti vzorec moramo shraniti v vrečko, ga zapreti in hraniti na hladnem mestu, saj so za večino rastlinskih patogenih bakterij temperature med 50 in $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ lahko že usodne. Hranjenje v hladilniku ali celo zamrzovalniku pa jim preživetje celo podaljša. Pri identifikaciji bakterije Pssa v laboratoriju uporabljamo naslednje metode: izolacija bakterije, inkubacija, barvanje po Gramu, imunofluorescenca (IF), verižna reakcija s polimerazo (PCR) in vgnezditevna PCR.

2.8 VARSTVO PRED OLJKOVIM RAKOM

2.8.1 Testiranje odpornosti sort na bakterijo Pssa

Proti oljčnemu raku za enkrat ni ekonomsko upravičenega baktericidnega sredstva (Young, 2004). Sisto in Iacobelis (2001, cit. po Young, 2004) pišeta, da je potrebno identificirati tolerantne sorte oljke za zmanjšanje škode, ki jo povzroča oljkov rak. Iacobelis (2001, cit. po Young, 2004) pa navaja, da za enkrat ni uporabne tolerantne sorte. Prav tako so Young in sod. (2004) v rastlinjaku z referenčnim sevom bakterije umetno okužili 9 sort z namenom ugotoviti toleranco na to bakterijo. Za določanje tolerance so uporabili dva kvantitativna kriterija. Prvi je bil velikost tumorjev po dveh mesecih, drugi pa je bil velikost tumorjev na podlagi koncentracije inokulirane bakterijske suspenzije. Po njihovih

rezultatih so sorte 'Carolea', 'Koroneiki', 'Leccino' in 'Pendolino' najbolj tolerantne. Sorte 'Barnea', 'Manzanillo', 'Pikoline', 'Piqua' in 'Verdale' so manj tolerantne. Prav tako so Marcelo in sod. (1999) testirali 6 sort oljke. Poskus, ki so ga opravili, je bil podoben poskusu, ki so ga opravili Young in sod. (2004), razen da so za merilo uporabili podatke o pojavljanju tumorjev na posamezni inokulirani sadiki oljke. Na podlagi njihovih rezultatov je sorta 'Cordovil de Serpa' najobčutljivejša, nekoliko manj občutljiva od nje sta 'Galega Vulgar' in 'Branquita', sorte 'Santulhana', 'Redondil' in 'Cobrancosa' pa so najmanj občutljive. Varvaro in Surico (1978) sta prav tako preizkušala 6 sort na tolerantnost na okužbo z bakterijo Pssa. Poskus sta izvedla tako, da sta z bakterijsko suspenzijo inokulirala oljčno sadiko in v intervalnih pregledih ocenjevala pojavljanje in velikost tumorjev. Njuni rezultati so prikazali veliko občutljivost sort 'Nocelara del Belice', 'S. Agostino' in 'Olivastro'. Sorti 'Leccino' in 'Frantoio' sta bili nekoliko manj občutljivi od predhodnih, najmanj občutljiva sorta med preskušanimi pa je bila sorta 'Coratina'. Godena in sod. (2012) so v hrvaški Istri ugotavljali pojavljanje bolezenskih znamenj na sorti 'Pikoline' in 'Leccino' in ugotovili znatno manjšo občutljivost slednje. Na sorti 'Pikoline' so pri izvajanju monitoringa našli veliko več rakastih tvorbo. Nekateri avtorji navajajo, da naj bi sorta 'Leccino' veljala za odporno proti oljkovemu raku (Sancin, 1990; Hall in sod., 2004; Vesel in sod., 2009). Po Sancinu (1990), naj bi bila odporna tudi sorta 'Istrska belica', sorta 'Frantoio' pa zelo občutljiva.

2.8.2 Uporaba pripravkov na podlagi bakra in odpornost

Bakrovi pripravki se uporabljajo predvsem za zatiranje glivičnih obolenj in delujejo kot kontaktni fungicid, saj se ne prenašajo po rastlinskem tkivu. Poleg kontaktnega delovanja pa delujejo tudi lokalno sistemsko oz. delujejo plitko pod površjem. Bakrove pripravke se uporablja pri zimskem oz. zgodnje spomladanskem in jesenskem škropljenju pri vseh sadnih vrstah in vinski trti. S tem skušamo čim bolj zmanjšati število trosov, ki bi takoj ko razmere to dovoljujejo, začeli kaliti in povzročili primarne okužbe. Medtem, ko bakrovi pripravki delujejo fungicidno, pa proti bakterijam delujejo le bakteristatično. Bakterij ne ubijejo ampak le zmanjšujejo njihovo populacijo s tem, da negativno vplivajo na njihov razvoj in preprečijo razvoj bolezenskih znamenj. Zato je zmotno mišljenje, da če se bolezenska znamenja po aplikaciji bakrenih pripravkov ne pojavijo, da bakterij ni več prisotnih. Bakterije so še vedno prisotne, vendar je za razvoj bolezni in bolezenskih znamenj potrebna njihova zelo velika koncentracija.

Bakrovi pripravki se pri zatiranju bakterijskih bolezni uporabljajo tako preventivno kot kurativno. Pri preventivnih aplikacijah se uporablja manjše koncentracije in manj aplikacij. Z njimi škropimo le v spomladanskem in jesenskem času, ko odpade polovica listja. Pri vednozelenih rastlinah, kot je oljka, pa se v jesenskem času škropi po obiranju, to je v

naših klimatskih razmerah novembra, decembra, kar je odvisno od tehnologije pridelave, sorte in vremenskih razmer. Bakrovi pripravki imajo vsaj dve slabi lastnosti. Prva je fitotoksičnost na vse zelene rastlinske dele. Kot drugo je baker še težka kovina, ki se lahko kopiči v tleh ali pa se izpira v podtalje in tekoče vode. Fitotoksičnost pa nam tudi omejuje uporabo v rastni dobi, saj zaradi nje izgubljammo listno maso, kvaliteto plodov, v času cvetenja pa prihaja do poškodb cvetov. V rastni dobi se tako uporabljajo le bistveno zmanjšane koncentracije. Pri zatiranju hruševega ožiga (*Erwinia amylovora*) se npr. v rastni dobi v jablanovih nasadih uporablja 0,06 % koncentracija ali 600 gramov pri porabi vode 1000 l/ha. Bakrovi pripravki se uporabljajo tudi pri zatiranju bakterijskih bolezni na vrtninah in jagodičevju, vendar so tu koncentracije zelo majhne, saj so te rastline zelo občutljive na fitotoksičnost. Na vrtninah se najpogosteje z bakrovimi pripravki zatira črna žilavka kapusnic (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), bakterijske pegavosti (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*), mehke gnilobe (*Erwinia carotovora*), navadna bakterijska pegavost fižola (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) in na jagodah jagodna oglata listna pegavost (*Xanthomonas fragaria*). Koncentracije bakrovih pripravkov za zatiranje oljčnega raka so zaradi genetske lastnosti oljke, da je olistana celo leto, enake čez vse leto.

Bakrovi pripravki so edina dovoljena sredstva za zatiranje bakterijskih bolezni, zato ga pridelovalci uporabljajo tudi v času vegetacije in sicer v manjših koncentracijah, kar pa lahko privede do razvoja odpornih bakterijskih sevov. Večkratna aplikacija z majhnimi koncentracijami bakrovih pripravkov namreč omogoča preživetje odpornim sevom bakterij, ki se nato namnožijo in povzročijo nastanek novih bolezenskih znamenj.

2.8.3 Varstvo

Najpomembnejši varstveni ukrepi so preventivni ukrepi. Najpomembnejši med njimi je preprečevanje vnosa patogenih bakterij v nasad. To je glavni preventivni ukrep pri postavitvi novega nasada, zato si morajo oljkarji priskrbeti zdrave sadike. Pri izbiri sort izberemo tiste sorte, ki so manj občutljive za oljkov rak in se izogibamo zelo občutljivim. Med občutljivejše pri nas zastopane sorte uvrščamo: 'Pendolino', 'Frantoio' in 'Maurino', nekoliko manj občutljiva je sorta 'Leccino'. Najmanj občutljiva sorta, ki je za oljkarje zelo pomembna pa je 'Istrska belica'. V Tehnoloških navodilih za integrirano pridelavo sadja (2015), pa kot agrotehnični ukrep MKGP priporoča sajenje odpornih sort kot sta 'Leccino' in 'Istrska belica'. Med najobčutljivejše sorte v svetovnem merilu sodijo sorte 'Manzanillo', 'Pikolino' in 'S. A. Verdale'. Portugalska sorta 'Galega Vulgar' pa naj bi bila odporna (Barag da Cruz in Tavares 2002). Pri omenjeni sorti preiskujejo mehanizem odpornosti in interakcijo med rastlino in patogenom. Namen raziskave je vzgojiti odporne klone in s križanjem to odpornost prenesti na občutljive sorte. Kot preventivni ukrep priporočajo tudi

odstranitev ostalih gostiteljskih rastlin, še posebej oleandrov, na razdalji 500 m od nasada. V nekaterih drevesnicah preventivno uporabljajo bakrove pripravke. Prav tako med preventivne ukrepe sodijo razkuževanje orodja in strojev, ki lahko pridejo v stik z obolelimi rastlinami. Še posebej to velja za sadjarske škarje in palice, s katerimi si pomagamo pri obiranju. Rez dreves opravimo v suhem vremenu. Najprej obrežemo drevesa brez vidnih bolezenskih znamenj, obolela drevesa pa režemo na koncu. S tem zmanjšamo možnost prenosa bakterij. Z okuženih dreves odstranimo vse simptomatične poganjke in jih zažgemo. Drevesa, ki imajo vidna znamenja okužb na koreninskem vratu odstranimo le v primeru, kadar bi takšne okužbe močno vplivale na razvoj drevesa ali celo povzročile njegov propad. Prav tako režemo tako, da čim bolj preprečimo stike med sosednjimi drevesi. Od fitofarmacevtskih sredstev, ki se uporabljajo za varstvo pred oljkovim rakom so na voljo le bakrovi pripravki, kot so bakrov oksid, bakrov hidroksid in bakrov sulfat. Med posameznimi bakrovimi pripravki ni razlik v učinkovitosti. Pomembno je le, da škropivo pravilno pripravimo in apliciramo v čim bolj primernem času. Učinkovitost teh pripravkov večkrat ekonomsko vprašljiva in poleg tega lahko z njimi na listih povzročimo ožige. Kadar oljke škropimo z bakrovimi pripravki to storimo po rezi, po toči in spomladi pred začetkom vegetacije (Young, 2004).

Danes, ko je družba vedno bolj ozaveščena, potrebe po ohranjanju narave in varovanju okolja pa so vedno večje, je pomembno tudi biotično varstvo pred nevarnimi boleznimi. Proti bakteriji Pssa so v *in vitro* razmerah testirali baktericid (protimikrobno sredstvo), ki ga tvori bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* NCPPB2355 in je dalo odlične rezultate (Lavermicocca in sod., 1999). Kljub uspešnemu poskusu pa sredstvo za enkrat še ni tržno razvito in dostopno tudi uporabnikom.

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 PREGLEDI OLJČNIKOV IN VZORČENJE

Preglede oljčnikov smo prvič opravili že v okviru prvih pregledov prisotnosti bolezenskih znamenj leta 2004 in 2005. Pri seznanjanju z bolezenskimi znamenji in težavami, ki jih bakterije povzročajo oljkarjem sta nam bila v pomoč Irena Vrhovnik in Matjaž Jančar. V okviru diplomske naloge smo oljčnike pregledali v jesenskem času 2007. Oljčnike smo pregledali tako, da smo zajeli čim več oljčnih nasadov v različnih krajih, kjer pridelujejo oljke. Oljčnike smo pregledovali z obhodom med vrstami, tako da smo prehodili čim večji del nasada. Med pregledi oljčnikov smo izkoristili priložnost in bili poleg oljčnega raka pozorni tudi na ostale bolezni in škodljivce ter na abiotske dejavnike rasti, kot so zimska pozeba, vpliv namakanja in gnojenja.

Preglede smo opravili v 24 različnih krajih in 125 oljčnikih v slovenski Istri (preglednica 9). Pregledali smo preko 12000 dreves. Pregledani oljčnik je imel v povprečju posajenih 100 oljk. Največji oljčnik je imel posajenih preko 600 dreves, najmanjši pa le 20. V povprečju so bile pregledane oljke stare med 20 in 25 let. Pregledali smo tudi 15 oljčnikov mlajših od 10 let. Starost najstarejših pregledanih oljk smo težko ocenili zaradi pogostih pozeb, pri katerih je večino nadzemnih delov dreves uničenih. Predvidevamo, da oljk bistveno starejših od 30 let nismo pregledali. Smo pa našli nekaj posameznih oljk v notranjosti slovenske Istre, ki so bile zagotovo stare med 50 in 60 let, morda celo več. Teh dreves v raziskavi nismo upoštevali oz. na njih nismo opravili vzorčenj, ker niso bile gojene v sklopu intenzivnih oljčnikov. Na njih bolezenskih znamenj tudi nismo našli.

Vzorčenje smo opravili na podlagi sumljivih in tipičnih bolezenskih znamenj ter na podlagi latentne prisotnosti patogenih bakterij. Vzorce je bilo potrebno do laboratorijske analize pravilno hraniti. Ker smo vzorčili v takšnem času, da ni bilo vročine, s hranjenjem vzorcev v avtomobilu nismo imeli težav. Kadar pa se temperature v sončnem vremenu povzpnejo nad 30 °C so temperature v stoječem avtomobilu še veliko večje. V takšnem primeru je potrebno vzorce hraniti v hladilni torbi. V laboratoriju smo vzorce do pričetka analiz za določanje prisotnosti bakterije Pssa hranili v hladilniku na 8 °C.

3.1.1 Vzorčenje na podlagi bolezenskih znamenj

Bolezenska znamenja oljčnega raka so zelo značilna. Pri prepoznavanju bolezenskih znamenj in vzorčenju zato nismo imeli nobenih težav. Prav tako za laboratorijsko diagnosticiranje bakterij iz rastlinskega tkiva s sumljivimi bolezenskim znamenji ne potrebujemo veliko rastlinskega materiala. Kadar so tumorji, tvorba katero izzovejo

bakterije, sveži, je dovolj, da jih samo odluščimo. Zaradi enostavnejšega vzorčenja in lažje ponovljivosti laboratorijskega dela, kadar bi to bilo potrebno, smo vzorec odvzeli tako, da smo odrezali približno 30 cm dolg poganjek, na katerem so bili tumorji. Če je bilo na drevesu več okuženih poganjkov, smo odrezali dva poganjka.

Preglednica 5: Kraji pregledov, število pregledanih oljčnikov in število odvzetih vzorcev

Kraj	Št. pregledanih oljčnikov	Št. vzorcev z bolezenskimi znamenji	Vzorčena sorta	Št. latentnih vzorcev	Vzorčena sorta
Ankaran	8	3	'Pendolino', 'Leccino'	4	'Istrska belica', 'Leccino', 'Pendolino'
Baredi	3			2	'Istrska belica', 'Leccino'
Beneša	5			4	'Leccino', 'Istrska belica', 'Frantoio', 'Pendolino'
Bošamarin	2			1	'Istrska belica'
Debeli rtič	5	5	'Pendolino', 'Leccino', 'Frantoio'	3	'Istrska belica', 'Leccino', 'Pendolino'
Dekani	10			4	'Leccino', 'Istrska belica', 'Frantoio'
Dobrava	16	6	'Leccino', 'Maurino', 'Ascolana tenera'	5	'Istrska belica', 'Leccino', 'Ascolana tenera', 'Maurino', 'Frantoio'
Dragonja	10			4	'Istrska belica', 'Leccino', 'Frantoio'
Elerji	2			1	'Istrska belica'
Gabrovica	5			3	'Istrska belica', 'Leccino'
Gažon	5			2	'Istrska belica', 'Leccino'
Grinjan	4			1	'Istrska belica'
Jagodje	3			2	'Istrska belica', 'Leccino'
Korte	6			2	'Istrska belica'
Krkavče	5			2	'Istrska belica'
Livade	2			2	'Istrska belica', 'Leccino'
Osp	9			6	'Istrska belica', 'Leccino'
Padna	3			2	'Istrska belica', 'Leccino'
Rižana	2			1	'Istrska belica'
Seča	3	1	'Maurino'	1	'Istrska belica'
Sermin	2			2	'Istrska belica', 'Leccino'
Strunjan	9	5	'Leccino', 'Maurino'	4	'Istrska belica', 'Leccino', 'Ascolana tenera'
Šared	4			4	'Istrska belica', 'Leccino', 'Frantoio', 'Maurino'
Škofije	2			2	'Istrska belica', 'Leccino'
Skupno	125	20	0	64	

3.1.2 Vzorčenje na podlagi latentne prisotnosti

Odločitev za vzorčenje na podlagi latentne prisotnosti bakterij in nato laboratorijsko delo pa je bolj zahtevno. Latentna prisotnost namreč pomeni dokazovanje patogenih organizmov v vzorcih brez vidnih bolezenskih znamenj. Vzorčili smo tako, da smo iz drevesa porezali približno 20 eno do dvoletnih poganjkov, iz katerih smo skušali izolirati bakterije.

3.2 KRATKI OPISI TESTIRANIH SORT

3.2.1 'Istrska belica'

Je naša najbolj razširjena sorta, saj je z njo posajenih skoraj 70 % vseh površin. Po Sancinu (1990) 'Istrska belica' izvira iz Doline pri Trstu, številni avtorji navajajo, da je avtohtona vrsta (Ogrin, 2002), tudi Hrvati jo imajo za svojo, po Blasquezu (1996) pa naj bi bila to italijanska sorta. Je srednje bujna sorta s pokončno in metlasto rastjo. Listi so srednje veliki in široki, nekoliko spiralni in temno zelene barve (slika 12). Je samooplodna, vendar bolje rodi, če ima poleg opraševalno sorto. Je občutljiva na oljkovo kozavost (*Fusicladium oleagineum*; sin. *Cycloconium oleagineum*) in oljčno muho, ter po Sancinu (1990) odporna na oljkov rak.



Slika 12: Oljčna veja s plodovi sorte 'Istrska belica' (foto: I. Zidarič)

3.2.2 'Leccino'

Je italijanska sorta, najbolj razširjena v srednji Italiji, sicer pa jo gojijo povsod, kjer so oljke gospodarsko pomembna sadna vrsta, saj velja za eno izmed najboljših in najrodovitnejših sort. Drevo je srednje bujno z rahlo povešavimi vejami. Medčlenki (internodiji) so kratki. Listi so podolgovati, široki in srednje dolgi. Sorta je avtosterilna. Za opraševanje sadjarji pogosto uporabljajo sorti 'Pendolino' in 'Frantoio'. Plodovi so črne barve (slika 13) srednje debeli, težki od 2 do 4 grame z od 20 do 24 % oljevitostjo. Sorta je odporna na nizke temperature. Sorta je odporna na oljčnega raka (Sancin, 1990; Tehnološka ..., 2015). Konjedic (2010) pa je opisal močne poškodbe zaradi oljčnega raka na poganjkih te sorte v oljčnikih v Goriških Brdih.



Slika 13: Oljčna veja s plodovi sorte 'Leccino' (foto: I. Zidarič)

3.2.3 'Maurino'

Je italijanska sorta, najbolj razširjena v srednji Italiji. Drevo je manj bujno, s pokončnimi strnjanimi vejami in povešavimi rodnimi vejicami. Listi so suličasti, ozki in dolgi (slika 14), intenzivno zelene barve na zgornji in sivo srebrne barve na spodnji strani. Plodovi so črne barve, drobni težki samo en gram in z od 20 do 22 % oljevitostjo. Sorta je avtosterilna in potrebuje drugo sorto za opraševanje. Je srednje odporna na mraz in občutljiva na oljkov rak in oljkovo kozavostjo (*Fusicladium oleagineum*; sin. *Cycloconium oleagineum*) (Sancin, 1990).



Slika 14: Oljčna veja s plodovi sorte 'Maurino' (foto: I. Zidarič)

3.2.4 'Frantoio'

Je srednje bujna italijanska sorta, razširjena predvsem v Toskani. Krošnja je gosta s tankimi povešenimi rodnimi vejicami in kratkimi medčlenki (slika 15). Listi so suličasti, srednje veliki, bleščeče zelene na zgornji in zeleno sive barve na spodnji strani. Je samooplodna. Plodovi so težki 2 grama in vsebujejo od 20 do 23 % olja. Je srednje odporna na nizke zimske temperature. Močno je občutljiva na oljkov rak in oljkovo kozavost (Sancin, 1990).



Slika 15: Oljčna veja s plodovi sorte 'Frantoio' (Regans Ridge, 2005)

3.2.5 'Pendolino'

Je Italijanska sorta, prav tako značilna za Toskano. Drevo je slabe bujnosti s šibko krošnjo. Veje so dolge in pri osnovi pokončne na koncu pa se povešajo. Rodne vejice so tanke, dolge in se povešajo. Listi so suličasti, ozki in dolgi. Je avtosterilna, vendar odličen opraševalec, zato jo pogosto sadijo kot opraševalno sorto. Plodovi so razmeroma drobni težki do 3 grame z od 20 do 23 % oljevitostjo. Pridelek je majhen. Po Sancinu (1990) dobro prenaša zimski mraz, toda Grozdanič (2007) navaja, da je sorta občutljiva na mraz in posledično na oljkovega raka, kar vidimo na sliki 16, ki prikazuje močno okuženo deblo s posejanimi rakastimi tvorbami.



Slika 16: Močno okuženo deblo, občutljive sorte 'Pendolino' (foto: I. Zidarič)

3.2.6 'Ascolana tenera'

Je bujna, italijanska namizna sorta s pokončno rastjo, rodne veje pa se povešajo in imajo srednje dolge medčlenke. Listi so podolgovati in intenzivno zeleno obarvani na zgornji in sivo srebrno na spodnji strani. Ker je avtosterilna, potrebuje opraševalno sorto. Dobro prenaša zimski mraz. Plodovi so debeli (slika 17) in težki od 8 do 10 in več gramov. Oljevitost pa je nizka saj je le med 12 in 15 %. Občutljiva je na oljčni rak, oljkovo kozavost in oljčno muho (Sancin, 1990).



Slika 17: Oljčna veja s plodovi sorte 'Ascolana tenera' (foto: I. Zidarič)

3.3 IZOLACIJA POVZROČITELJEV BOLEZENI

Izolacijo bakterij smo opravili naslednji dan po nabiranju vzorcev oziroma takoj, ko je bilo to mogoče. Do izolacije smo vzorce hranili v hladilniku na 8 °C.

3.3.1 Izolacija bakterij iz rastlinskih tkiv z bolezenskimi znamenji

Rastlinsko tkivo z bolezenskimi znamenji smo najprej sprali pod tekočo vodo in ga osušili s papirnato brisačo. Tkivo smo nato površinsko razkužili s 70 % etanolom, nato popivnali s papirnato brisačo in počakali, da se do konca posuši. Površinsko tkivo smo s sterilnim skalpelom odstranili, ostalo tkivo približno od 0,2 do 1 cm³ smo prenesli v sterilno plastično petrijevko. S sterilnim skalpelom smo nato tkivo narezali na čim manjše koščke in ga prenesli v sterilno epruveto in ga prelili s 5 ml PBS pufra. Vsebino epruvete smo inkubirali na sobni temperaturi približno eno uro, vmes smo jo večkrat pretresli. Po preteku inkubacije smo po 30 µl dobljenega ekstrakta prenesli s 100 µl eppendorf pipeto (v nadaljevanju samo pipeto) na dve agarni plošči pol-selektivnega gojišča KingB in dve agarni plošči selektivnega gojišča PVF-1 (Surico in Lavermicoca, 1989). Ekstrakt smo po plošči razmazali s spatulo po Drigalskem. Pri prvih izolacijah bakterije Pssa, smo uporabili po dve plošči splošnega NA gojišča in dve plošči pol selektivnega KingB gojišča. V nadaljevanju smo NA gojišče opustili, zaradi prevelikega preraščanja neciljnih organizmov. Nacepljene plošče smo inkubirali od 3 do 5 dni na 27 °C. Vsa gojišča in pufer smo pred uporabo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Sestava gojišč in PBS pufra:

Sestava gojišča KingB

Bacto pepton (Difco)	20 g
Glicerol (Kemika)	15 ml
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,5 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
Agar	15 g
dH ₂ O	dopolnimo do 1000 ml
pH	umerimo na 7,2

Sestava gojišča NA (nutrient agar)

Mesni ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
dH ₂ O	dopolnimo do 1000 ml

Sestava gojišča PVF-1

Saharoza	30 g
Glicerol	10 ml
Kazamino kisline	2,5 g
SDS	0,4 g
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	1,96 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,4 g
Agar	20 g
dH ₂ O	dopolnimo do 1000 ml

Sestava PBS fosfatnega pufra

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
dH ₂ O	dopolnimo do 1000 ml
pH	umerimo na 7,4

Kadar so bakterije (čista kultura) zrasle tako na gojišču KingB kot na PVF-1 smo bakterijsko kolonijo vedno vzeli iz gojišča PVF-1, ki je bolj selektivno in jih precepili na gojišče KingB, ki je manj selektivno, vendar je bolj primerno za preverjanje čistosti bakterijskih kultur. Prav tako smo bakterije precepili na gojišče KingB, kadar so zrasle

samo na enem ali drugem gojišču. Če je zraslo več sumljivih kolonij, smo precepili vse na KingB gojišče, ne glede na to na katerem gojišču so zrasle. Po preteku inkubacijske dobe smo pregledali gojišča in sumljive bakterijske kolonije ponovno precepili na gojišče KingB. S tem smo pridobili čiste kolonije, s katerimi smo se lahko lotili ostalih identifikacijskih metod. Po 48 urah oz. takoj, ko so se bakterije dovolj namnožile, smo najprej naredili barvanje po Gramu. Iz bakterijskih kolonij, ki so se pri barvanju po Gramu obarvale rdečo (gram negativne bakterije) in neznačilno (za gram negativne bakterije) rdeče barve smo na gojišče prelili 2 - 3 ml gojišča za trajne kulture in s pomočjo sterilne cepilne zanke naredili bakterijsko suspenzijo. Približno 1 ml te suspenzije smo odpipetirali v sterilno mikrocentrifugirko volumna 1,5 ml in jo shranili v zamrzovalni skrinji na -80 °C.

Sestava gojišča za trajne kulture

Mesni ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
Glicerol	300 g
dH ₂ O	dopolnimo do 1000 ml

3.3.2 Izolacija bakterij iz rastlinskih tkiv brez bolezenskih znamenj

Izolacija bakterij iz tkiv brez bolezenskih znamenj oz. izolacija za preverjanje latentne prisotnosti bakterij je nekoliko zahtevnejša od zgoraj opisane. Za izolacijo smo potrebovali nekaj oljčnih poganjkov iz katerih smo odrezali po približno en centimeter lesa. Odrezane koščke smo najprej sprali pod tekočo vodo in jih osušili s papirnato brisačo. Tkivo smo nato površinsko razkužili s 70 % etanolom, nato popivnali s papirnato brisačo in počakali, da se do konca posušijo. Površinsko tkivo smo s sterilnim skalpelom odstranili, ostalo tkivo pa smo prenesli v sterilno plastično petrijevko. S sterilnim skalpelom smo nato tkivo narezali na čim manjše koščke in ga prenesli v epruveto in tkivo prelili s 5 ml PBS pufra. Epruveto smo inkubirali na sobni temperaturi približno eno uro, vmes smo jo večkrat pretresli. Po Penyalveru in sod. (2000) smo po preteku inkubacije 0,5 ml dobljenega ekstrakta prenesli v sterilno epruveto in ji dodali 4,5 ml tekočega gojišča PVF-1 in tri dni inkubirali pri 27 °C. Po preteku inkubacije smo s pipeto 30 µl dobljenega obogatnega ekstrakta prenesli na trdno selektivno gojišče PVF-1 in naredili razmaz. Od tu naprej je bil postopek enak zgoraj opisanemu.

3.4 BARVANJE PO GRAMU

Barvanje po Gramu nam je v pomoč pri razvrščanju bakterij v dve glavni skupini, to je gram pozitivne (+) in gram negativne bakterije (-). Vsako bakterijo je mogoče uvrstiti v eno izmed teh dveh skupin. Princip barvanja je uporaba barvila, ki ga pri gram (+)

bakterijah ne moremo izprati z raztopino iz 90 % etanola in 10 % acetona, saj imajo debelejšo membrano in celično steno (peptidoglikan), zato se obarvajo vijolično. Gram (-) bakterije pa imajo tanko membrano in celično steno, ki jo obdaja lipopolisaharidni sloj in bičke iz flagelina in se zato pri barvanju obarvajo rdeče. Barvanje smo opravili z že pripravljenimi reagenti proizvajalca Merck.

Postopek barvanja:

- bakterije smo s cepilno zanko prenesli na objektno stekelce ga osušili in fiksirali nad plamenom
- preparat smo prelili s kristal vijoličnim in ga po 1 minuti sprali pod tekočo vodo
- preparat smo prelili z lugolom in ga po 1 minuti sprali pod tekočo vodo
- preparat smo nato prelili z raztopino za izpiranje in ga po 30 sekundah sprali pod tekočo vodo
- preparat smo na koncu prelili še z raztopino safranina, ki smo jo po 1 minut sprali pod tekočo vodo
- preparat smo posušili v brezprašni komori
- na objektno stekelce smo položili krovno stekelce in ga fiksirali z lakom
- tako pripravljen preparat smo pregledali pod mikroskopom z imerzijskim objektivom na 1000 kratni povečavi

3.5 IMUNOFLUORESCENCA

Indirektna IF je serološka metoda, ki jo s pomočjo specifičnih protiteles uporabljamo za določanje prisotnosti patogena v vzorcu. Pri IF se primarna protitelesa specifično vežejo na določene proteine na površju bakterije. Primarna protitelesa prepoznajo sekundarna na katere je vezano fluorescentno barvilo, ki ga vidimo pod fluorescentnim mikroskopom (Zidarič, 2007).

Za IF smo uporabili izolate shranjene na -80 °C. Izolate smo nacepili iz trajnih kultur na gojišče KingB jih dva dni inkubirali pri 27 °C in pripravili bakterijsko suspenzijo katere koncentracija je bila približno 10^6 bakterij na ml. V okenca stekla za IF smo nato nanesti 20 µl tako pripravljene suspenzije in posušili na zraku in nato bakterijske celice fiksirali s trikratnim rahlim potegom nad plamenom. V okenca smo nato prenesli 20 µl primarnih protiteles in inkubirali 30 minut na vlažni papirnati brisači pokriti z aluminijasto folijo. Sledilo je spiranje s PBS pufrom, ki je vseboval 0,1 % Tweena. Spirali smo približno 7 minut, nato smo sprali z vodo. V okenca smo nanesti 20 µl sekundarnih protiteles oz. konjugata z barvilom FITC in inkubirali enako kot prej. Po 30 minutah smo ponovno približno 7 minut spirali v PBS pufu in nato sprali še z vodo. Preparat smo nato pustili, da se posuši in nato v vsako okence dodali 2 µl PBS pufra z dodatkom glicerola. Preparat smo

previdno pokrili s krovnim stekelcem in ga fiksirali z lakom. Tako pripravljen preparat smo nato pregledali pod fluorescentnim mikroskopom z imerzijskim objektivom na 1000-kratni povečavi (Pečar in Zidarič, 2004). S to metodo smo analizirali vse izolate, ki so se pri barvanju po gramu obarvali negativno in tiste, ki so se pri barvanju obarvali neznatno. Za negativno kontrolo smo pri IF uporabili bakterijo povzročiteljico črne žilavke kapusnic (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili slovenski izolat s sekvenčno reakcijo potrjen kot bakterija *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *oleae* (Zidarič, 2005).

3.6 ANALIZA IZOLATOV S POLIMERAZNO VERIŽNO REAKCIJO

Metodo, s katero smo določili bakterijske izolate, smo povzeli po Penyalveru in sod. (2000). S to metodo smo ugotavljali prisotnost specifičnega zaporedja gena *iaaL* nahajajočega na genomski DNA. Specifičnost omenjenega zaporedja in določitev specifičnih začetnih oligonukleotidov je bila določena na podlagi 70 izolatov bakterije Pssa. Za negativno kontrolo oz. v potrditev specifičnosti so poskus izvedli tudi na 93 izolatih preostalih znanih bakterij pri katerih se specifično zaporedje ni namnožilo (Penyalver in sod., 2000).

3.6.1 Izolacija DNA

Za izolacijo DNA smo uporabili 2 dni stare bakterijske kolonije nacepljenih iz trajnih kultur na gojišče KingB. Izolacijo DNA smo pri prvih izolatih izvedli na dva načina. Rezultate smo primerjali med seboj in se pri nadaljnjem delu odločili za boljšo metodo.

3.6.1.1 Izolacija DNA iz čistih bakterijskih kolonij z alkalno lizo NaOH

Metodo izolacije DNA z alkalno lizo smo z manjšimi spremembami povzeli po Sambrooku (1989). Za izolacijo smo potrebovali trdno gojišče s čisto kulturo bakterije. S cepilno zanko smo prenesli nekaj bakterijskih kolonij v mikrocentrifugirko in prelili s 100 µl ledeno hladne raztopine I. Bakterije smo nato resuspendirali z grobim vorteksiranjem in dodali 200 µl sveže pripravljene raztopine II. Mikrocentrifugirke smo nato z roko pretresli s 5-kratnim obračanjem in jih shranili na ledu dokler nismo dodali 150 µl ledeno hladne raztopine III. Mikrocentrifugirko s tako pripravljeno suspenzijo smo premešali, inkubirali na ledu 5 minut in nato še centrifugirali 5 minut pri 12000 rpm in 4 °C v centrifugi. Po centrifugiranju smo supernatant s pipeto prenesli v novo mikrocentrifugirko in ga prelili z dvakratnim volumnom 96 % etanola sobne temperature. Vse skupaj smo vorteksirali, pustili stati 2 minuti pri sobni temperaturi in nato 5 minut centrifugirali pri 12000 rpm in 4

°C. Supernatant smo odstranili in pustili, da se usedlina v mikrocentrifugirki posuši na sobni temperaturi. Posušeno usedlino smo nato prelili z 1 ml ohlajenega 70 % etanola in centrifugirali enako kot prej. Supernatant smo ponovno odstranili in vsebino posušili na sobni temperaturi. Tako izolirano DNA smo razredčili s 50 µl dH₂O in shranili pri -20 °C.

Sestava raztopine I

50 mM glukoza	0,901 g
25 mM Tris-Cl (pH 8.0)	0,394 g
10 mM EDTA (pH 8.0)	0,292 g
dH ₂ O	100 ml
avtoklaviranje	15 minut na 121°C, nato shraniti pri 4°C

Sestava raztopine II

10 M NaOH	0,2 ml
SDS	0,1 g
dH ₂ O	9,8 ml

Sestava raztopine III

Natrijev acetat	24,6 g
Ocetna kislina	11,5 ml
dH ₂ O	88,5 ml

3.6.1.2 Izolacija DNK s kuhanjem

V 1,5 ml mikrocentrifugirko smo odpipetirali 500 µl destilirane vode. S konico cepilne zanke smo nato v mikrocentrifugirko prenesli bakterijsko kolonijo in jo resuspendirali. Mikrocentrifugirko smo v termomikserju inkubirali 10 minut pri 95 °C. Skuhano DNA smo do analize hranili na - 20 °C.

3.6.2 Namnoževanje DNK zaporedja s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi

Najprej smo v 1,5 ml mikrocentrifugirki pripravili PCR mešanico po priporočilih proizvajalca Promega (ZDA), za želeno število vzorcev, pri čemer smo upoštevali pozitivno in negativno kontrolo (preglednica 5). Po 24 µl PCR mešanice smo nato s pipeto prenesli v PCR mikrocentrifugirke volumna 0,2 ml in jim nato sterilno dodali izolirano DNA, ki smo jo pred tem odtajali in pretresli.

Za namnoževanje specifičnih odsekov iz genomske DNK smo uporabili začetni oligonukleotidni par IAALF (5'-GGCACCAGCGGCAACATCAA-3') in IALLR (5'-CGCCCTCGGAACTGCCATAC-3'), ki pomnožuje zaporedje DNK velikosti 454 baznih parov. PCR reakcija je potekala v 25 µl končnem volumnu v cikličnem termostatu (GenAmp AB PCR System 9700) pri pogojih v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestava PCR mešanice z začetnim oligonukleotidnim parom IAALF/IAALR

Snov	Koncentracija	Količina za 1 vzorec
PCR pufer (Promega)	10 X	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	2 µl
dNTPs	10 mM	2 µl
IAALF	10 µM	0.5 µl
IAALR	10 µM	0.5 µl
dH ₂ O		16.2 µl
Taq DNA polimeraza (Promega)	5 U/µl	0.25 µl
DNA		1 µl
skupaj		25 µl

Preglednica 7: Pogoji pomnoževanja z začetnim oligonukleotidnim parom IAALF/IAALR

Število ciklov	Temperatura (°C)	Čas
1	94	5 min
35	94	30 sec
	62	30 sec
	72	30 sec
	72	5 min
1	4	∞*

* Dokler vzorčkov ne vzamemo iz cikličnega termostata in jih do nadaljnje analize shranimo na -20 °C.

3.6.3 Dokazovanje namnoženih odsekov z agarozno gelsko elektroforezo

Velikost namnoženih odsekov smo dokazali z gelsko elektroforezo na 1,5 % agaroznem gelu z dodatkom etidijevega bromida. Velikost namnoženih odsekov smo odčitali pod ultravijolično svetlobo (UV). Agarozna gelska elektroforeza je metoda v biokemiji in molekularni biologiji in se uporablja za ločevanje molekul DNK ali RNK glede na njihovo velikost. Ločevanje dosežemo s premikanjem negativno nabitih molekul nukleinskih kislin skozi agarozni gel v električnem polju. Krajše molekule se premikajo hitreje. Na hitrost potovanja DNK ali RNK vpliva še velikost in oblika molekule, koncentracija agaroznega gela in napetost električnega polja. Najpogosteje uporabljeno barvilo pri agarozni gelski elektroforezi je etidijev bromid, ki fluorescira pod UV, ko se vgradi v DNK ali RNK molekulo. Ko potujejo molekule DNK skozi gel, ki vsebuje etidijev bromid in gel izpostavimo UV svetlobi, postane vsak pas, ki vsebuje več kot 20 ng DNK, jasno viden.

Pri agarozni gelski elektroforezi lahko uporabimo naslednje pufre: tris acetatni pufer ali TAE (tris/acetat/EDTA), tris boratni pufer ali TBE (tris/borat/EDTA) ter litijev boratni pufer ali LB. TAE ima najnižjo pufersko kapaciteto in omogoča najboljšo resolucijo za večje molekule DNK (Serwer, 1983; Sambrook in sod., 1989).

3.7 ANALIZA IZOLATOV Z VGNEZDITVENO PCR

Za vgnezditevno PCR smo se odločili zaradi njene večje občutljivosti. Z omenjeno metodo lahko zaznamo že eno samo živo celico (cfu) na ml ekstrakta oz. pripravljene suspenzije. Zaradi tako visoke občutljivosti je ta metoda primerna za zgodnje odkrivanje majhne bakterijske populacije že v času razmnoževanja v drevesnicah (Bertolini in sod., 2003).

Razlika med PCR in vgnezditevno PCR je v tem, da pri slednji uporabljamo notranje začetne oligonukleotide, ki nalegajo na odsek oz. zaporedje, ki se je pomnoževalo pri PCR, kjer smo uporabili zunanje začetne oligonukleotide. Metoda se lahko izvede na dva različna načina. Pri prvem načinu najprej izvedemo PCR z zunanjimi začetnimi oligonukleotidi. Po končani reakciji 1 µl dobljenega produkta prenesemo kot vir DNK v naslednjo vgnezditevno PCR, kjer uporabimo notranje začetne oligonukleotide. Drugi način je tak, da prvo in drugo reakcijo izvedemo v isti mikrocentrifugirki s tem, da najprej na cikličnem termostatu nastavimo razmere za zunanje začetne oligonukleotide, po preteku programa pa reakcijo nadaljujemo z razmerami za notranje začetne oligonukleotide. Zaradi enostavnejše optimizacije programov na cikličnem termostatu smo pri naši raziskavi uporabili prvi zgoraj opisani način. Za namnoževanje specifičnih odsekov iz genomske DNK smo uporabili notranji začetni oligonukleotidni par IAALN1 (5'-CTCCCTCTCCAACGTCTTC-3') in IAALN2 (5'-GCCTGATGATTTTCTTCTG-3'), ki pomnožuje zaporedje DNK velikosti 338 baznih parov (Bertolini in sod., 2002; Bertolini in sod., 2003). Sestava vgnezditvene PCR mešanice je predstvaljena v preglednici 7, pogoji pomnoževanja v cikličnem termostatu pa v preglednici 8.

Preglednica 8: Sestava mešanice vgnezditvene PCR z notranjim začetnim oligonukleotidnim parom IAALN1/IAALN2

Snov	Koncentracija	Količina za 1 vzorec
PCR pufer (Promega)	10X	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	2 µl
dNTPs	10 mM	2 µl
Primer IAALN1	10 µM	0.5 µl
Primer IAALN2	10 µM	0.5 µl
H ₂ O		16.2 µl
Taq DNA polimeraza (Promega)	5U/µl	0.25 µl
PCR produkt		1 µl
skupaj		25 µl

Vgnezditvena PCR je potekala v 25 µl končnem volumnu v cikličnem termostatu. Pogoji pomnoževanja so predstavljeni v preglednici 8.

Preglednica 9: Pogoji pomnoževanja z notranjim začetnim oligonukleotidnim parom IAALN1/IAALN2

Število ciklov	Temperatura (°C)	Čas
1	94	5 min
40	94	30 sec
	50	30 sec
	72	30 sec
	72	10 min
1	4	∞*

* Dokler vzorčkov ne vzamemo iz cikličnega termostata in jih do nadaljnje analize shranimo na - 20 °C.

4 REZULTATI

4.1 PREGLEDI OLJČNIKOV IN VZORČENJE

Pregledali smo 125 olčnikov v 24 različnih krajih, kjer smo opravili tudi vzorčenje. Bolezenska znamenja smo našli in opravili vzorčenje na sortah 'Leccino' (6 vzorcev), 'Frantoio' (2 vzorca), 'Pendolino' (4 vzorci), 'Maurino' (7 vzorcev) in 'Ascolana tenera' (1 vzorec). Vzorec, ki smo ga odrezali s sadjarskimi škarjami, je vseboval poganjek z rakastimi tvorbami. Vzorčenje na podlagi bolezenskih znamenj smo opravili v 20 oljčnikih v krajih Ankaran (3 vzorci), Debeli rtič (5 vzorcev), Dobrava (6 vzorcev), Seča (1 vzorec) in Strunjan (5 vzorcev). Vsak vzorec smo ločeno shranili v zaprti polivinilasti vrečki označeni z etiketo. Škarje smo po vsakem rezu razkužili z večkratnim pomakanjem v 70 % etanol in ožiganjem, s čimer smo preprečili prenos bakterij iz okuženega vzorca na neokužene.

Pri sorti 'Istrska belica' nismo našli sumljivih bolezenskih znamenj, zato smo pri tej sorti opravili le vzorčenje na podlagi latentne prisotnosti bakterije Pssa. Latentni vzorec je vseboval 20 eno in dvoletnih poganjkov. Na podlagi latentne prisotnosti smo opravili 64 vzorčenj v vseh 24 krajih. Vzorčili smo sorte 'Istrska belica' (32 vzorcev), 'Leccino' (20 vzorcev), 'Frantoio' (5 vzorcev), 'Pendolino' (3 vzorci), 'Maurino' (2 vzorca) in 'Ascolana tenera' (2 vzorca). V preglednici 9 je razvidno v katerem kraju in s kakšnim razlogom je bil odvzet vzorec, ter v s katere sorte.

4.2 REZULTATI IZOLACIJ POVZROČITELJEV BOLEZENSKIH ZNAMENJ IN BARVANJE PO GRAMU

Prva metoda za določanje iskane bakterije je bilo barvanje po Gramu. Izvedli smo jo takoj, ko so nam bakterije zrasle po drugem precepljanju na gojišču KingB. Iz bakterijskih izolatov, ki so se pri barvanju obarvali rdeče smo naredili trajne kulture. Bakterije iz rodu *Pseudomonas* so namreč gram negativne in se pri barvanju obarvajo rdeče. Izolate, ki so se obarvali vijolično smo avtoklavirali in zavrgli.

Iz vseh 20 vzorcev (100 % učinkovitost) smo na selektivnem gojišču PVF-1 uspeli izolirati sumljive oz. morfološko tipične kolonije za bakterijsko vrsto Pssa, medtem ko nam je na gojišču KingB to uspelo le iz 11 vzorcev (45 % učinkovitost). Pri štirih vzorcih so se na gojišču KingB pojavile plesni, pri petih pa je bilo gojišče preraščeno z netipičnimi in sluzastimi bakterijskimi kulturami. Vseh 20 bakterijskih izolatov se je pri barvanju po Gramu obarvalo rdeče (100 % učinkovitost), kar je pomenilo, da smo izolirali gram negativne kulture, kamor uvrščamo tudi bakterije Pssa. Pri izolaciji smo tudi ugotovili in

potrdili večjo selektivnost gojišča PVF-1 v primerjavi s pol selektivnim gojiščem KingB. Učinkovitost izolacije je bila pri prvem večja (preglednica 10).

Preglednica 10: Rezultati izolacij bakterij iz simptomatičnih vzorcev in barvanje izolatov po Gramu

Oznaka vzorca	Rast na KingB	Rast na PVF-1	Barvanje po Gramu	Oznaka izolata
V1	+ ¹	+	gram (-) ⁴	V1-1P
V2	plesen ²	+	gram (-)	V2-1P
V3	plesen	+	gram (-)	V3-1P
V4	plesen	+	gram (-)	V4-1P
V5	+	+	gram (-)	V5-1P
V6	preraščenost ³	+	gram (-)	V6-1P
V7	+	+	gram (-)	V7-1P
V8	preraščenost	+	gram (-)	V8-1P
V9	+	+	gram (-)	V9-1P
V10	+	+	gram (-)	V10-1P
V11	plesen	+	gram (-)	V11-1P
V12	+	+	gram (-)	V12-1P
V13	+	+	gram (-)	V13-1P
V14	preraščenost	+	gram (-)	V14-1P
V15	preraščenost	+	gram (-)	V15-1P
V16	+	+	gram (-)	V16-1P
V17	+	+	gram (-)	V17-1P
V18	+	+	gram (-)	V18-1P
V19	preraščenost	+	gram (-)	V19-1P
V20	+	+	gram (-)	V20-1P

1-Rast bakterijskih kolonij značilnih za Pssa; 2-gojišče so prerasle plesni; 3-gojišče so prerasle različne bakterijske kolonije neznačilne za Pssa; 4-prisotnost gram negativnih bakterij.

Pri izolaciji iz latentnih vzorcev nam je na gojišču KingB uspelo pri 10 vzorcih izolirati sumljive bakterijske kolonije (15,6 % učinkovitost). Na gojišču PVF-1 pa nam je sumljive kolonije uspelo izolirati le iz dveh vzorcev (3,1 % učinkovitost). Vse sumljive kolonije smo barvali po gramu. Pri petih sumljivih kolonijah smo ugotovili vijolično obarvanje, kar je pomenilo, da so bile bakterijske kulture gram pozitivne in s tem niso pripadale rodu *Pseudomonas*. Te izolate smo uničili. Pri treh sumljivih kolonijah smo ugotovili obarvanje, ki je bilo za gram negativne bakterije sicer neznačilno, a smo se vseeno odločili, da jih shranimo in opravimo nadaljnje diagnostične metode (oznaka izolatov: VL11-1KB, VL47-1KB, VL48-1KB). Samo na podlagi barvanja po gramu namreč ne moramo potrditi oz. ovreči prisotnosti bakterije Pssa v vzorcu. Sumljive kolonije iz dveh vzorcev izolirane na obeh gojiščih pa so se po gramu obarvale rdečo, kar je pomenilo, da nam je iz dveh latentnih vzorcev uspelo izolirati bakterijske kulture, ki bi lahko bile povzročiteljice oljkovega raka (oznaka izolatov: VL46-1P, VL49-1P) (preglednica 11).

Preglednica 11: Rezultati izolacij bakterij iz latentnih vzorcev in barvanje izolatov po Gramu

Oznaka vzorca	Rast na KingB	Rast na PVF-1	Barvanje izolatov po Gramu	Oznaka vzorca	Rast na KingB	Rast na PVF-1	Barvanje izolatov po Gramu
VL1	- ¹	-	n.o. ³	VL33	-	-	n.o.
VL2	-	-	n.o.	VL34	-	-	n.o.
VL3	-	-	n.o.	VL35	-	-	n.o.
VL4	+ ²	-	gram (+) ⁴	VL36	-	-	n.o.
VL5	-	-	n.o.	VL37	-	-	n.o.
VL6	-	-	n.o.	VL38	+	-	gram (+)
VL7	+	-	gram (+)	VL39	+	-	gram (+)
VL8	+	-	gram (+)	VL40	-	-	n.o.
VL9	-	-	n.o.	VL41	-	-	n.o.
VL10	-	-	n.o.	VL42	-	-	n.o.
VL11	+	-	neznačilno obar. ⁵	VL43	-	-	n.o.
VL12	-	-	n.o.	VL44	-	-	n.o.
VL13	-	-	n.o.	VL45	-	-	n.o.
VL14	-	-	n.o.	VL46	+	+	gram (-) ⁶
VL15	-	-	n.o.	VL47	+	-	neznačilno obar.
VL16	-	-	n.o.	VL48	+	-	neznačilno obar.
VL17	-	-	n.o.	VL49	+	+	gram (-)
VL18	-	-	n.o.	VL50	-	-	n.o.
VL19	-	-	n.o.	VL51	-	-	n.o.
VL20	-	-	n.o.	VL52	-	-	n.o.
VL21	-	-	n.o.	VL53	-	-	n.o.
VL22	-	-	n.o.	VL54	-	-	n.o.
VL23	-	-	n.o.	VL55	-	-	n.o.
VL24	-	-	n.o.	VL56	-	-	n.o.
VL25	-	-	n.o.	VL57	-	-	n.o.
VL26	-	-	n.o.	VL58	-	-	n.o.
VL27	-	-	n.o.	VL59	-	-	n.o.
VL28	-	-	n.o.	VL60	-	-	n.o.
VL29	-	-	n.o.	VL61	-	-	n.o.
VL30	-	-	n.o.	VL62	-	-	n.o.
VL31	-	-	n.o.	VL63	-	-	n.o.
VL32	-	-	n.o.	VL64	-	-	n.o.

1-Na gojišču ni bilo prisotnih za Pssa značilnih bakterijskih kolonij; 2-rast bakterijskih kolonij značilnih za Pssa; 3-barvanje ni bilo opravljeno (na gojiščih nismo izolirali za Pssa značilnih bakterij); 4-prisotnost gram pozitivnih bakterij; 5-neznačilno obarvanje za gram negativne bakterije; 6-prisotnost gram negativnih bakterij.

Prav tako kot pri izolaciji na podlagi bolezenskih znamenj smo pri izolaciji na podlagi latentne prisotnosti bakterije ugotovili večjo selektivnost gojišča PVF-1. Pri obeh izolatih se je pri barvanju po Gramu izkazalo, da smo izolirali gram negativne bakterije. Pri pol selektivnim gojišču KingB pa se je pri barvanju po gramu le pri petih od desetih vzorcev (50 %) pokazalo, da smo izolirali gram negativne bakterije oz. bakterije z neznačilnim obarvanjem (preglednica 10 in 11).

4.3 REZULTATI IMUNOFLUORESCENCE

Vsi izolati izolirani iz vzorcev z bolezenskimi znamenji so pri IF bili pozitivni (100 % učinkovitost). Pri izolatih latentnega vzorčenja je bil pozitiven le en vzorec od petih (20 % učinkovitost) in sicer izolat VL46-1P (preglednica 12).

Preglednica 12: Rezultati analiziranja izolatov z IF

Oznaka izolata	V1-1P	V2-1P	V3-1P	V4-1P	V5-1P	V6-1P	V7-1P	V8-1P	V9-1P
IF	+ ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
Oznaka izolata	V10-1P	V11-1P	V12-1P	V13-1P	V14-1P	V15-1P	V16-1P	V17-1P	V18-1P
IF	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oznaka izolata	V19-1P	V20-1P	VL11-1KB	VL46-1P	VL47-1KB	VL48-1KB	VL49-1P	KON-neg.	KON-poz.
IF	+	+	- ²	+	-	-	-	-	+

1-Rezultat IF je pozitiven (prisotnost bakterije Pssa); 2-rezultat IF je negativen (bakterija Pssa ni prisotna).

4.4 ANALIZA IZOLATOV S PCR IN VGNEZDITVENO PCR

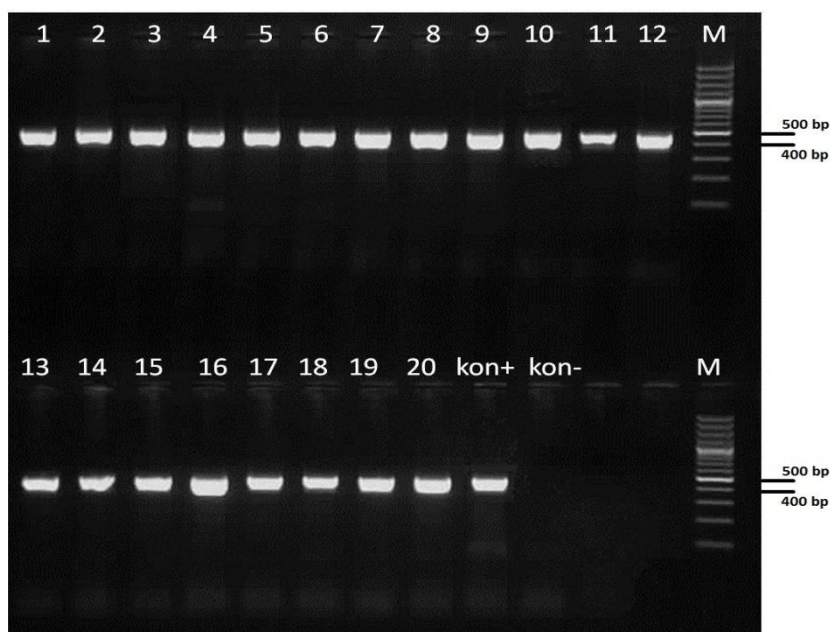
Za izvedbo verižne reakcije s polimerazo smo potrebovali izolirano DNK, ki smo jo dobili s kuhanjem. Preliminarni testi so namreč pokazali, da so rezultati pri uporabi izolirane DNK s kuhanjem ali izolirane z alkalno lizo enaki. Analizirali smo vse izolate, ki smo jih analizirali že z IF. Potrebovali smo še specifične začetne oligonukleotide in vse ostale potrebne sestavine za reakcijsko mešanico in v cikličnem termostatu. Velikost namnoženih odsekov smo dokazali z gelsko elektroforezo na 1,5 % agaroznem gelu z dodatkom etidijevega bromida. Velikost namnoženih odsekov 454 baznih parov smo odčitali pod UV svetlobo (slika 18). Preostanek produkta, ki ga nismo dali na gel smo shranili na -20 °C in kasneje 1 ml preostanka uporabili še za izvedbo vgnezditvene PCR (338 baznih parov) (slika 19). V obeh primerih smo za negativno in pozitivno kontrolo uporabili ista izolata kot pri IF.

Vsi izolati izolirani iz vzorcev z bolezenskimi znamenji so pri verižni reakciji s polimerazo bili pozitivni, kar pomeni, da smo potrdili prisotnost bakterije Pssa. Pri izolatih latentnega vzorčenja pa je bil zopet pozitiven le izolat VL46-1P. Vsi rezultati vgnezditvene polimerazne verižne reakcije so bili enaki polimerazni verižni reakciji (preglednica 13).

Preglednica 13: Rezultati PCR, vgnezditvene PCR, barvanja po gramu in IF

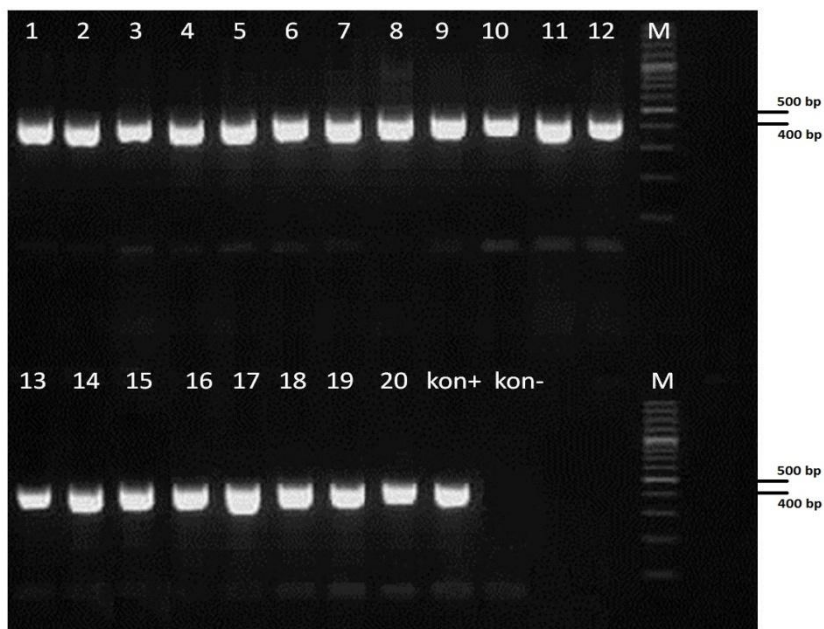
Oznaka izolata	Barvanje po gramu	PCR	Vgnezditvena PCR	IF
V1-1P	gram (-) ¹	+ ⁴	+	+
V2-1P	gram (-)	+	+	+
V3-1P	gram (-)	+	+	+
V4-1P	gram (-)	+	+	+
V5-1P	gram (-)	+	+	+
V6-1P	gram (-)	+	+	+
V7-1P	gram (-)	+	+	+
V8-1P	gram (-)	+	+	+
V9-1P	gram (-)	+	+	+
V10-1P	gram (-)	+	+	+
V11-1P	gram (-)	+	+	+
V12-1P	gram (-)	+	+	+
V13-1P	gram (-)	+	+	+
V14-1P	gram (-)	+	+	+
V15-1P	gram (-)	+	+	+
V16-1P	gram (-)	+	+	+
V17-1P	gram (-)	+	+	+
V18-1P	gram (-)	+	+	+
V19-1P	gram (-)	+	+	+
V20-1P	gram (-)	+	+	+
VL11-1KB	neznačilno obar. ²	- ⁵	-	-
VL46-1P	gram (-)	+	+	+
VL47-1KB	neznačilno obar.	-	-	-
VL48-1KB	neznačilno obar.	-	-	-
VL49-1P	gram (-)	-	-	-
KON-neg.	n.o. ³	-	-	-
KON-poz.	n.o.	+	+	+

1-Prisotnost gram negativnih bakterij; 2-neznačilno obarvanje za gram negativne bakterije, 3-ni opravljeno; 4-pozitiven rezultat na prisotnost bakterije Pssa; 5-negativen rezultat na prisotnost bakterije Pssa.



Oznake 1 do 20 predstavljajo bakterijske izolate z ozanko V1-1P do V20-1P; kon+ in kon- predstavljata pozitivno in negativno kontrolo; M – DNK standard marker (100 baznih parov).

Slika 18: Elektroforegram namnoženih specifičnih odsekov genomske DNK dolžine 454 bp z začetnim oligonukleotidnim parom IAALF/IAALR značilno za bakterijo Pssa



Oznake 1 do 20 predstavljajo bakterijske izolate z ozanko V1-1P do V20-1P; kon+ in kon- predstavljata pozitivno in negativno kontrolo; M – DNK standard marker (100 baznih parov).

Slika 19: Elektroforegram namnoževanja specifičnih odsekov genomske DNK dolžine 338 bp z začetnim oligonukleotidnim parom IAALN1/IAALN2 značilno za bakterijo Pssa

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Bakterija Pssa je patogena za družino oljkovk (Oleaceae), saj okužuje skoraj vse glavne predstavnike te družine. Lastnost, da bakterija okužuje predstavnike le ene družine je pogosta. V Sloveniji se od leta 2001 srečujemo še z enim takšnim patogenom, to je bakterija *E. amylovora* (Burrill, 1882; Winslow et al., 1920), za katero pravimo, da je patogena za družino rožnic (Rosaceae) (Zidarič in Škerlavaj, 2004). Toda bakterija Pssa za razliko od bakterije *E. amylovora* ni tako virulentna, saj slednja v večini primerov v nekaj letih povzroči propad gostiteljske rastline, med tem ko bakterija Pssa propad rastline povzroči le izjemoma. Močno prizadete oljke od oljkovega raka smo našli le v dveh oljčnikih, kjer so bila mlada drevesa sorte 'Maurino'. Drevesa so bila zaradi okužbe občutno manjša, manj obraščena in predvsem z izrazito manjšim rodnim volumenom, v primerjavi z enako starimi drevesi sorte 'Istrska belica' v istem oljčniku, ki bolezenskih znamenj niso imela.

Vse rastline iz katerih je bila do sedaj izolirana bakterija Pssa najdemo tudi pri nas. Oljkarjem bi zato dali priporočilo, da v bližini oljčnikov ne sadijo gostiteljskih rastlin oz. če te rastline tam že rastejo, da so na njih pozorni in ob pojavu bolezenskih znamenj ustrezno ukrepajo. Okužene gostiteljske rastline, na katere nismo pozorni, namreč predstavljajo velik potencial za širjenje bolezni. V primeru bakterije *E. amylovora*, je Fitosanitarna uprava na ogroženih območjih okoli intenzivnih nasadov jablan in hrušk v letu 2004, celo prepovedala sajenje gostiteljskih rastlin (Pravilnik ..., 2004). Pri terenskem pregledu lahko za potencialno nevarno gostiteljsko rastlino potrdimo le oleander. Številni oleandri posajeni na Primorskem so nepreverjenega oz. sumljivega izvora. Na njih smo odkrili številna bolezenska znamenja (slika 9).

Učinkovitega kurativnega sredstva za varstvo pred oljkovim rakom ne poznamo. Najučinkovitejše je preventivno varstvo. Kot fitofarmacevtska sredstva pa se uporabljajo bakrovi pripravki. Baker je sicer težka kovina, ki se lahko kopiči v tleh ali pa se izpira. Pri previsoki koncentraciji lahko povzroča fitotoksične spremembe na rastlini, zato je pri njegovi uporabi potrebno upoštevati navodila.

Preglede in vzorčenja smo opravili le na oljkah, ker je oljka gospodarsko pomembna gostiteljska rastlina in po zasajenih površinah druga sadna vrsta, takoj za jablano v Sloveniji. Vzorčenje na podlagi bolezenskih znamenj smo opravili tako, da smo v vsakem okuženem oljčniku odvzeli le po en vzorec. Vzorčenje na podlagi latentne prisotnosti bakterije pa smo opravili v naključnih oljčnikih in v vsakem kraju, kjer smo opravili

preglede odvzeli po vsaj en vzorec. Zastopanost vzorčenih sort je bila smiselno razporejena glede na njivo pomembnost. Pri namizni sorti smo odvzeli le en vzorec, kjer smo našli bolezenska znamenja in dva brez znamenj. Večje število vzorcev namiznih sort nismo odvzeli, ker so te sorte pri nas manj pomembne in jih gojijo le na posameznih vrtovih. Dravinec (2013) navaja Valenčiča, da je obseg pridelave namiznih sort pri nas le okrog 1 %, medtem ko se v svetu v zadnjem desetletju njihova pridelava povečuje za približno 4 % letno.

Na podlagi terenskih ogledov in vzorčenja ugotavljamo, da smo bolezenska znamenja odkrili v 20 od 125 pregledanih oljčnikih oz. v 16 %. Bakterijo Pssa smo identificirali v vseh 20 vzorcih z bolezenskimi znamenji, kar predstavlja 100 % učinkovitost oz. zanesljivost pri prepoznavanju oz. vizualni identifikaciji bolezni. Za primerjavo navajamo Potočnika in sod. (2003), da so leta 2001 in 2002 na Nacionalnem inštitutu za biologijo iz 71 odvzetih vzorcev s sumljivimi bolezenskimi znamenji hruševega ožiga, bakterijo *E. amylovora* uspeli izolirati le iz 5 vzorcev, kar je le 7 % učinkovitost. Oljkov rak ima za razliko od nekaterih drugih bakterijskih patogenov zelo značilna bolezenska znamenja, ki jih izkušen fitopatolog le stežka zamenja, kar je zagotovo vplivalo na 100 % učinkovitosti v laboratoriju. Nizek odstotek pozitivnih vzorcev pri hruševem ožigu pa je posledica možnih zamenjav pri prepoznavanju bolezenskih znamenj (Zidarič in Škerlavaj, 2004; Celar in Valič, 2004).

Bolezenska znamenja smo našli in potrdili na sorti 'Leccino', pri čemer so naši rezultati v nasprotju z nekaterimi avtorji, ki navajajo tolerantnost in odpornost te sorte (Sancin, 1990; Hall in sod., 2004; Young in sod., 2004; Vesel in sod., 2009; Tehnološka ..., 2015). Glede na obseg posajenih površin sorte 'Leccino' v slovenski Istri in število okuženih dreves, pa bi se lahko soglašali z nekaterimi avtorji, ki navajajo, da je ta sorta nekoliko manj občutljiva od najobčutljivejših sort (Varvaro in Surico, 1978; Godena in sod., 2012). Bolezenska znamenja smo našli in potrdili še na sortah 'Maurino', 'Pendolino', 'Frantoio' in 'Ascolana tenera' s čimer lahko pritrdimo avtorjem, ki navajajo občutljivost teh sort (Varvaro in Surico, 1978; Sancin, 1990; Grozdanič, 2007). Pri sorti 'Istrska belica' nismo našli bolezenskih znamenj, prav tako iz latentno odvzetih vzorcev pri tej sorti nismo izolirali bakterije Pssa. Na podlagi naših rezultatov in navedbam nekaterih avtorjev je ta sorta vsaj tolerantna, če ne odporna na okužbe z bakterijo Pssa (Sancin, 1990; Tehnološka ..., 2015).

Okužene oljčnike smo našli v krajih Ankaran, Debeli rtič, Dobrava, Seča in Strunjan, kjer smo ugotovili tudi večji pojav oljčne muhe. Na podlagi naših ugotovitev soglašamo s Hagenom (1966), ki je opisal mutualistično simbiozo med oljčno muho in bakterijo Pssa in

z Arsenijevičem (1988), ki je omenjal, da poškodbe, ki jih povzročajo oljčne muhe, predstavljajo vstopne rane za bakterijo Pssa.

Pri terenskih pregledih smo v 64 oljčnikih odvzeli vzorec brez bolezenskih znamenj. V diagnostičnem laboratoriju nam je pri 10 vzorcih uspelo izolirati sumljive bakterijske kolonije. Z nadaljnjimi diagnostičnimi metodami smo bakterijo Pssa potrditi le v enem vzorcu. Latentno okužena je bila sorta 'Maurino'.

5.2 SKLEPI

Pri terenskem pregledu oljčnikov smo bolezenska znamenja našli le v oljčnikih, ki ležijo v priobalnem pasu, v notranjosti Slovenske Istre pa jih nismo našli. V priobalnem pasu smo ugotovili tudi večji pojav oljčne muhe in poškodbe zaradi nizkih zimskih temperatur.

Ugotovili smo, da so bolezenska znamenja oljkovega raka zelo specifična in značilna za to bolezen. Z laboratorijsko diagnostiko smo namreč v vseh 20 odvzetih vzorcih z vidnimi bolezenskimi znamenji potrdili prisotnost bakterije Pssa.

Pri vzorcih na podlagi latentne oz. speče prisotnosti povzročitelja, ki ne kažejo bolezenskih znamenj, smo prisotnost bakterije Pssa potrdili le v enem vzorcu. Vzorec je bil prav tako odvzet v priobalnem pasu.

Pri izolaciji bakterij iz vzorcev, smo ugotovili večjo specifičnost selektivnega gojišča PVF-1 v primerjavi s pol selektivnim gojiščem KingB. Pri nadaljnjih identifikacijskih metodah smo ugotovili, da smo pri barvanju po Gramu dobili nekaj lažno pozitivnih rezultatov, saj se je pri PCR izkazalo, da v teh vzorcih bakterija Pssa ni bila prisotna. Vgnezditevna PCR je pokazala enak rezultat kot PCR, zato lahko zaključimo, da s slednjo nismo dobili nobenega lažno pozitivnega rezultata.

Na podlagi naše raziskave lahko za hitro in zanesljivo diagnosticiranje bakterije Pssa priporočamo izolacijo na selektivnem gojišču PVF-1 in PCR, saj pri teh metodah nismo dobili nobenega lažno negativnega oz. lažno pozitivnega rezultata.

Za 'Istrsko belico', najbolj razširjeno sorto oljk pri nas lahko na podlagi naše raziskave potrdimo, da je odporna oziroma tolerantna na okužbo z bakterijo Pssa, saj v nobenem oljčniku nismo našli okuženega drevesa te sorte.

Za občutljive so se izkazale sorte 'Pendolino', 'Maurino', 'Frantoio' in 'Leccino', torej vse 4 najbolj razširjene italijanske sorte pri nas. Le na enem drevesu sorte 'Ascolana tenera' pa smo našli eno rakasto tvorbo, za katero se je izkazalo, da je njen povzročitelj oljkov rak.

6 POVZETEK

Bakterija *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* povzročiteljica oljkovega raka na oljki in nekaterih drugih gostiteljskih rastlinah iz družine oljkovk (Oleaceae) in na oleandru (*Nerium oleander*), vrsti iz družine pasjestrupovk (Apocynaceae). Gospodarsko škodo povzroča v mladih oljčnikih in v drevesnicah, kjer vzgajajo sadike gostiteljskih rastlin. Oljkov rak je pred več kot 2300 leti v antičnih časih opisal Teofrast v svojem delu *De historia et de causis plantarum* in ga zato imamo za prvo opisano rastlinsko bolezen. V tistih časih še niso vedeli, da gre pri rakastih tvorbah za bakterijsko bolezen. Povzročitelja bolezni je prvi izoliral in proučeval Luigi Savastano (l. 1886), po katerem bakterija tudi nosi vrstno ime.

Bolezenska znamenja oljkovega raka se v slovenskih oljčnikih pojavljajo že dlje časa. Kljub temu pa ni še nihče poročal o obsežnejši škodi, ki bi jo ta bolezen povzročila. Za oljke pri nas velja, da je njihov največji sovražnik zimska pozeba, ki se je v zadnjih 200 letih v povprečju pojavila vsakih 25 let. Torej so klimatske razmere največji omejevalni dejavnik za pridelovalce oljk, saj Slovenija leži na 45° SGŠ, kjer so omiljeni vplivi sredozemskega podnebja, to pa predstavlja geografsko mejo, kjer je pridelovanje oljk še gospodarno (Ogrin, 2002). Prav zaradi zimskih pozeb in intenzivnega sajenja oljk v zadnjih 25 letih predvidevamo, da bo oljkov rak pridobil na pomenu in povečani potrebi po varstvenih ukrepih. Kljub temu pa do sedaj še ni bilo pripravljene nobene strategije o preventivnih in kurativnih ukrepih za njegovo zatiranje.

Prvi cilj diplomske naloge je bil pregledati nekatere oljčnike v slovenski Istri in ugotoviti razširjenost bolezni. Pri pregledih smo želeli ugotoviti občutljivost najbolj razširjenih sort oljke pri nas ('Leccino', 'Frantoio', 'Pendolino' in 'Maurino'), za katere nekateri avtorji navajajo, da so občutljive za oljkov rak, ter 'Istrsko belico', ki naj bi bila tolerantna. Sortam za vlaganje zaradi majhne razširjenosti nismo posvečali večje pozornosti. Pregledali smo le nekaj dreves sorte 'Ascolana tenera'.

Drugi cilj diplomske naloge je bil vpeljava laboratorijskih metod za izolacijo in potrditev bakterije, s katerimi bi v prihodnosti lahko opravili laboratorijsko diagnosticiranje povzročitelja oljkovega raka. Metode s katerimi smo določili bakterijo Pssa so bile izolacija na pol selektivnem (KingB) in selektivnem gojišču (PVF-1), barvanje po Gramu, IF, PCR in vgnezditevna PCR.

Na terenu smo pregledali 125 oljčnikov v 24 krajih Slovenske Istre. Odvzeli smo 20 vzorcev z bolezenskimi znamenji in 64 vzorcev na podlagi latentne oz. speče prisotnosti bakterije Pssa. Z laboratorijskimi analizami smo dokazali prisotnost bakterije Pssa v vseh

20 vzorcih z bolezenskimi znamenji in v enem latentnem vzorcu. Kot učinkoviti in zanesljivi metodi za diagnosticiranje povzročitelja oljkovega raka sta se izkazali izolacija na selektivnem gojišču PVF-1 in PCR, saj pri slednji metodi nismo dobili nobenega lažno negativnega oz. lažno pozitivnega rezultata. Rezultate smo namreč preverili tudi z vgnezditveno PCR, kjer so bili enaki. Za občutljive so se izkazale vse proučevane italijanske sorte. Za sorto 'Istrska belica' lahko trdimo, da je tolerantna oziroma odporna za oljkov rak, saj na njej nismo našli nobenih sumljivih bolezenskih znamenj.

7 VIRI

- Arsenijević M. 1988. Bakterioze biljaka. Naučna knjiga Beograd. Beogradski izdavačko-grafički zavod: 463 str.
- Azad H. R., Cooksey D. A. 1995. A semiselective medium for detecting epiphytic and systemic populations of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. *Phytopathology*, 85: 740-745
- Barag da Cruz A., Tavares R. M. 2002. Development of tools for studying *Olea europaea*: *Pseudomonas savastanoi* interaction. V: Poster apresentado no 13th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Hersonissos, Grčija, 2.-6. september 2002
<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/3365> (20. dec. 2015)
- Bertolini E., Olmos A., Lopez M. M., Cambra M. 2002. Multiplex nested reverse transcription – polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology*, 93, 3: 286-292
- Bertolini E., Penyalver R., Garcia A., Olmos A., Quesada J. M., Cambra M., Lopez M. M. 2003. Highly sensitive detection of *pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested – PCR in a single closed tube. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 2: 261-266
- Blasquez J. M. 1996. The world olive encyclopedia. Madrid, International olive council: 479 str.
- Brlec T., Cerar G., Justin M., Kavčič S. 2011. Geografski obzornik: Časopis za geografsko vzgojo in izobraževanje, 58, 2: 23-30
- Caponero A., Contesini A., M., Iacobellis N., S. 1995. Population diversity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive and oleander. *Plant Pathology*, 44: 848-855
- Celar A. F., Valič N. 2004. Diagnoza hruševega ožiga na podlagi bolezenskih znamenj – možne zamenjave. V: Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 24.-26. marec 2004. Hudina M. (ur.). Ljubljana, Strokovno sadjarsko društvo Slovenije: 387-394
- De Cleene M. in De Ley J. 1976. The host range of crown gall. *The Botanical Review*, 42: 389-466
- Dravinec S. 2013. V svetu in pri nas je vse več namiznih oljk. *Primorske novice – spletni dnevnik*, 10, 23.

- <http://www.primorske.si/2013/10/23/V-svetu-in-pri-nas-je-vse-vec-namiznih-oljk> (20. dec. 2015)
- Dravinec S. 2014. Oljčna muha letos prehiteva. Primorske novice – spletni dnevnik, 7, 9. <http://www.primorske.si/Novice/Istra/Oljcna-muha-letos-prehiteva> (30. dec. 2015)
- Efe R., Soykan A., Cürebal I., Sönmez S. 2012. Olive and olive oil culture in the mediterranean basin. V: Environment and ecology in the mediterranean region. Efe R., Ozturk M., Ghazanfar S. (ed). Cambridge scholars publishing: 51-62
- 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
- Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T. 2005. Order IX. Pseudomonadales Orla - Jensen 1921. V: Bergey's manual of Systematic bacteriology, second edition, volume two, The Proteobacteria, part B, The Gammaproteobacteria. Garrity G. M. (ed). Springer: 323-379
- Glass N. L., in Kosuge T. 1986. Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. Journal of Bacteriology, 166: 598–603
- Godec B., Hudina M., Usenik V., Koron D., Solar A., Vesel V., Stopar M. 2015. Sadni izbor za Slovenijo 2014. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 73 str.
- Godena S., Dminič I., Đermić E. 2012. Differential susceptibility of olive varieties to olive knot disease in Istria. Journal of Central European Agriculture, 13, 1: 85-94
- GRIN. 2003. Oleaceae Hoffmanns. & Link, nom. cons. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?787> (20. nov. 2007)
- Grozđanič B. 2007. "Občutljivost sorte 'Pendolino' na pozebo in oljkovega raka". Ankaran (osebni vir, oktober 2007)
- Hagen K. S. 1966. Dependence of the olive fly, *Dacus oleae*, larvae on Symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. Nature, 209: 423-424
- Hall B. H., Cother E. J., Whattam M., Noble D., Luck J., Cartwright D. 2004. First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on olives (*Olea europea*) in Australia. Australian Plant Pathology, 33: 433-436
- Hildebrand D. C. 1971. Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens. Phytopathology, 61: 1430-1436
- Hirano S. S., Upper C. D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64, 3: 624-653

- Hočevar J. 2011. Narečna torkla proti pravopisni torklji. Primorske novice – spletni dnevnik, 7, 16.
<http://primorske.si/Razno/Minuta-za-jezik/Narecna-torkla-proti-pravopisni-torklji.aspx> (20. dec. 2015)
- Jančar M. 2007. "Oljkov rak v Sloveniji". Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica, Koper (osebni vir, oktober 2007)
- Janse D. J. 1981. The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. II. Etiology and taxonomic consideration. European Journal of Forest Pathology, 11: 425-438
- Janse D. J. 1982. *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on Oleaceae and Nerium oleander L. Journal of Systematic Bacteriology, 32, 2: 166-169
- Janse D. J. 2008. "Možnosti izolacije Pssa iz različnih gostiteljskih rastlin". Wageningen, Department of bacteriology, Plant protection service (osebni vir, marec 2008)
- Kandus T. 2011. Geografska problematika oljarstva v Vipavski dolini. Diplomsko delo: 99 str.
- Konjedic D. 2010. Opažanje oljkovega raka na sorti leccino.
<http://www.wineandweather.net/?p=216> (20. dec. 2015)
- Krueger B. 2003. Olive knot disease – two sprays are better than one. Olive News, 5, 2: 2
- Lavermicocca P., Lonigro S. L., Evidente A., Andolfi A. 1999. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* NCPPB2355 isolation and partial characterization of the antimicrobial compound. Journal of Applied Microbiology, 86: 257-265
- Lelliott R. A., Billing E., Hayward A. C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. Journal of applied bacteriology, 29: 470-489
- Marcelo A., Fernandes M., Fatima Potes M. Serrano J. F. 1999. Reaction of some cultivars of *Olea europaea* L. to experimental inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Acta horticulturae, 474: 581-584
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 1999. Mala flora Slovenije, Ključ za določanje praprotnic in semenk. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 845 str.
- MKGP. 2013. Oljčno olje.
http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/oljno_olje/ (8. jan. 2016)

- NCPPB. 2015. National collection of plant pathogenic bacteria.
<http://ncppb.fera.defra.gov.uk/ncppbresult.cfm> (30. dec. 2015)
- Ogrin D. 2002. Pozebe v Primorju z vidika uspevanja mediteranskih kultur. Dela/ Filozofska fakulteta, Oddelek za geografijo, 18: 157-170
- Palleroni N. J. 2005. *Pseudomonas* Migula 1894. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2: The *Proteobacteria*, part B: The *Gammaproteobacteria*. Springer: 323-379
- Pečar U., Zidarič I. 2004. Metoda IF (indirektna imunofluorescenca) za detekcijo in identifikacijo bakterij: Protokol za diagnostiko. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 7 str.
- 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, 6: 2673-2677
- Pierce N. B., 1891. Tuberculosis of the olive. The Journal of Mycology, 6, 4: 148-153
- Pirc M., Ravnkar M., Dreo T. 2015. First report of *Pseudomonas savastanoi* causing bacterial leaf spot of *Mandevilla sanderi* in Slovenia. Plant disease, 99, 3: 415
- Potočnik A., Cvelbar J. J., Brecl A. 2003. Inšpekcijski ukrepi in nadzor ob ugotovitvi bakterijskega hruševega ožiga (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) v Naklem. V: Zbornik predavanj in referatov. 6. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin, 4.-6. marec 2003, Zreče, Slovenija. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 112-117
- Pravilnik o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje hruševega ožiga. 2004. Ur. l. RS št. 18/04
- Regans Ridge. 2005. Olive tree varieties.
http://www.regansridge.com.au/gallery_view.php?image_id=13 (30. dec. 2015)
- Rice R. E. 2000. Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. KAC Plant Protection Quarterly, 10, 3: 1-5
- Sambrook J., Fritsch E. F., Manitis T. 1989. Molecular Cloning, A laboratory Manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sancin V. 1990. Velika knjiga o oljki. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 319 str.
- Scortichini M., Rossi M. P., Salerno M. 2004. Relationshis of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity. Plant Pathology, 53: 491-497

- Scortichini M. 2008. Bacterial diseases of nuts and stone fruits. V: COST 873 Stone FruitNut Health. Short term Scientific Training Mission – Plant Bacteriology, York, Velika Britanija 3 - 6. marec 2008 (neobjavljeno)
- Surico G. in Lavermicocca P. 1989. A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Phytopathology, 79: 185-190
- Serwer P. 1983. Agarose gels: Properties and use in electrophoresis. Electrophoresis, 4: 375-382
- SURS. 2015a. Pridelava sadja v intenzivnih sadovnjakih in oljk v intenzivnih oljčnikih http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1502404S&ti=&path=../Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/04_rastlinska_pridelava/01_15024_pridelki_povrsina/&lang=2 (20. dec. 2015)
- SURS. 2015b. Pridelava sadja v ekstenzivnih sadovnjakih in oljk v ekstenzivnih oljčnikih http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1502405S&ti=&path=../Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/04_rastlinska_pridelava/01_15024_pridelki_povrsina/&lang=2 (20. dec. 2015)
- Tehnološka navodila za integrirano pridelavo sadja. 2015. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 63 str.
- Teviotdale B. L., Krueger B. 1998. Olive knot control and assessment of copper resistance in *Pseudomonas savastanoi*. Plant Protection Quarterly, 8, 3 in 4: 1-3
- Varvaro L., Surico G. 1978. Comportamento di diverse cultivars di Olivo (*Olea Eurpaea* L.) alla inoculazione artificiale con *Pseudomonas savastanoi* (E. F. Smith) Stevens. Phytopathologia Mediterranea, 17: 174-178
- Vesel V., Valenčič V., Jančar M., Čalija D., Butinar B., Bučar – Miklavčič M. 2009. OLJKA – živilo, zdravilo, lepotilo. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 134 str.
- Vrhovnik I. 2004. "Oljkov rak v Sloveniji". Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica, Koper (osebni vir, oktober 2004)
- Zidarič I. 2005. Problematika oljčnega raka *Pseudomonas syringae* ssp. *Savastanoi* Janse (1982). V: Zbornik predavanj in referatov. 7. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin, 8.-10. marec 2005, Zreče, Slovenija. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 232-235
- Zidarič I. 2007. Detekcija in/ali identifikacija bakterij iz rodu *Pseudomonas* z imunofluorescenco: Metoda bakteriološkega laboratorija (interno gradivo). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 5 str.
- Zidarič I., Škerlavaj V. 2004. Znamenja okužbe z bakterijo *Erwinia amylovora* Burrill, 1882; Winslow et al., 1920. V: Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa

z mednarodno udeležbo, Krško, 24.-26. marec 2004. Hudina M. (ur.). Ljubljana, Strokovno sadjarsko društvo Slovenije: 377-385

World olive oil figures. 2012. Madrid, International olive council
<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures> (5. nov. 2012)

Young J. M. 2004. Olive knot and its pathogens. Australian Plant Pathology, 33: 33-39

Young J. M., Wilkiw J. P., Fletcher M. J., Park DC., Pennycook S. R., Triggs C. M., Watson D. R. W. 2004. Relative tolerance of nine olive cultivars to *Pseudomonas savastanoi* causing bacterial knot disease. Phytopathologia Mediterranea, 43: 395-402

ZAHVALA

Ob zaključku diplomskega dela se zahvaljujem mentorju prof. dr. Franciju Aca Celarju za pomoč, spodbudo in predvsem, da je verjel v moj uspešen zaključek študija.

Zahvaljujem se članu komisije prof. dr. Gregorju Ostercu in predsednici komisije prof. dr. Zlati Luthar za nasvete pri končnem vsebinskem oblikovanju diplomske naloge.

Zahvalil bi se tudi nekdanji sodelavki dr. Urši Pečar Fonović, za nesebično spoznavanje in učenje molekularnih tehnik in sodelvacu Kmetijskega inštituta Slovenije Vojku Škerlavaju za vse znanje na področju rastlinske fitopatologije in agrotehničnih ukrepov.

Upravi Kmetijskega inštituta Slovenije se zahvaljujem za uporabo genetskega laboratorija, kjer smo opravili vse laboratorijske analize in za kritje vseh materialnih stroškov.

Posebna zahvala pa gre Karmen, Juliji in staršem, ker me prenašajo že toliko let.