

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mateja MESARIČ

**ODZIV RAZLIČNIH SORT PARADIŽNIKA IN KROMPIRJA NA  
OKUŽBO Z BAKTERIJO *Ralstonia solanacearum* V  
LABORATORIJSKIH RAZMERAH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE RESPONSE OF DIFFERENT VARIETIES OF TOMATOES AND  
POTATOES TO THE INFECTION WITH A BACTERIUM *Ralstonia  
solanacearum* UNDER THE LABORATORY CONDITIONS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije z dne 29. 5. 2009 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Marina Dermastia in za recenzentko prof. Maja Ravnikar.

Mentorica: prof. dr. Marina Dermastia

Recenzentka: prof. dr. Maja Ravnikar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:      prof. dr. David Stopar  
                        Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica:      prof. dr. Marina Dermastia  
                        Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko  
                        biologijo in Univerza v Ljubljani in Biotehniška fakulteta, Oddelek za  
                        biologijo

Članica:      prof. dr. Maja Ravnikar  
                        Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko  
                        biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Mateja Mesarič se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mateja Mesarič

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Dn
DK	UDK 632.35:579.22+579.24(043)=163.3
KG	bolezni rastlin/ paradižnik/ krompir/ rjava gniloba krompirja/ bakterijsko venenje paradižnika/ patogene bakterije/ <i>Ralstonia solanacearum</i> / test patogenosti/ bolezenska znamenja/ odtis rastline
AV	MESARIČ, Mateja
SA	DERMASTIA, Marina (mentorica)/ RAVNIKAR, Maja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2010
IN	ODZIV RAZLIČNIH SORT PARADIŽNIKA IN KROMPIRJA NA OKUŽBO Z BAKTERIJO <i>Ralstonia solanacearum</i> V LABORATORIJSKIH RAZMERAH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 71 str., 5 pregl., 40 sl., 10 pril., 35 vir.
IJ	sl
JI	sl/ en
AI	Patogena bakterija <i>Ralstonia solanacearum</i> povzroča rjavo gnilobo krompirja in bakterijsko venenje paradižnika ter številnih drugih rastlinskih vrst. S testom patogenosti na rastlinah paradižnika in krompirja, gojenih v rastlinskih komorah, smo preučevali vpliv bakterije na izražanje bolezenskih znamenj. Preverjali smo odziv različnih sort paradižnika (Moneymaker in Roma) in krompirja (Desireé, Igor in Sante) na okužbo z bakterijo ter preizkušali različne načine okuževanja testnih rastlin z <i>R. solanacearum</i> . Rezultati kažejo, da je metoda vbrizganja bakterijske suspenzije v koncentraciji $10^5$ cfu/mL v steblo testne rastline najprimernejša za ponovljivo spremljanje pojava bolezenskih znamenj tako pri paradižniku kot pri krompirju, saj višje koncentracije povzročijo hitro odmiranje rastlin, kar otežuje spremljanje razvoja bolezenskih znamenj. Metoda vboda čiste kulture bakterij, ki jih postrgamo z gojišča, zaradi visoke koncentracije bakterij povzroči hiter razvoj bolezenskih znamenj ter hiter propad testnih rastlin. Različne sorte paradižnika in krompirja so na okužbo s patogeno bakterijo različno občutljive, vendar smo zaznali le manjše razlike v odgovoru na okužbo. Ugotovili smo tudi, da starost rastlin ob okužbi nima vpliva na poznejše izražanje bolezenskih znamenj. S testom odtisa posameznih delov paradižnika na SMSA gojišču smo ugotovili, da se bakterija ob vstopu v steblo gostiteljske rastline razširja najprej navzgor po rastlini in šele nato navzdol proti koreninam.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

ND Dn  
DC UDC 632.35:579.22+579.24(043)=163.3  
CX plant diseases/ tomato/ potato/ potato brown rot/ bacterial wilt of tomato/  
pathogenic bacteria/ *Ralstonia solanacearum*/ pathogenicity test/ symptoms/  
printing test  
AU MESARIČ, Mateja  
AA DERMASTIA, Marina (supervisor)/ RAVNIKAR, Maja (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology  
PY 2010  
TI THE RESPONSE OF DIFFERENT VARIETIES OF TOMATOES AND  
POTATOES TO THE INFECTION WITH A BACTERIUM *Ralstonia*  
*solanacearum* UNDER THE LABORATORY CONDITIONS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XIV, 71 p., 5 tab., 40 fig., 10 add., 35 ref.  
LA sl  
AL sl/ en  
AB A pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* causes potato brown rot and  
bacterial wilt disease in tomato and many other plant species. We studied the  
impact of *R. solanacearum* on the expression of symptoms by the  
pathogenicity test performed in a greenhouse using the tomato varieties  
Moneymaker and Roma and potato varieties Desireé, Igor and Sante.. We  
examined different ways of inoculation of test plants with the bacterium. The  
results showed that the best method for monitoring the symptoms is the  
injection of the bacterial suspension at the concentration of  $10^5$  cfu/mL into  
the plant stem. Higher concentrations caused rapid death of plants, which  
complicated the monitoring of symptoms development. For the same reason  
the injection method of a pure culture of bacteria, scraped from the culture  
medium, was also inappropriate. Varieties of tomato and potato were  
differentially sensitive to the infection with *R. solanacearum*.. In addition, the  
age of plant at the inoculation time had no effect on the subsequent expression  
of symptoms. The test with printing different parts of the tomato plant on the  
SMSA medium showed that the bacterium by entering the host plant stem first  
extends through the plant upward and then down toward the roots.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
1.2 HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 PATOGENEZA .....	3
2.2 BOLEZENSKA ZNAMENJA .....	5
2.3 SEVI.....	6
2.4 ODGOVOR RASTLINE .....	10
2.5 ZAZNAVANJE OKUŽBE IN NADZOR BOLEZNI .....	11
2.6 ZATIRANJE BOLEZNI .....	15
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>18</b>
3.1 MIKROORGANIZMI .....	18
3.2 GOJIŠČA IN PUFRI .....	18
<b>3.2.1 Sestava gojišč .....</b>	<b>18</b>
3.3 PRIPRAVLJANJE BAKTERIJSKE SUSPENZIJE .....	21
<b>3.3.1 Določanje koncentracije bakterij po McFarlandu .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.2 Merjenje absorbance.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.3 Določanje števila kolonij (cfu/mL) .....</b>	<b>23</b>

3.4 GOJENJE NA GOSTITELJSKIH RASTLINAH – TEST PATOGENOSTI .....	24
<b>3.4.1 Paradižnik .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4.2 Krompir .....</b>	<b>27</b>
3.5 NAČIN OCENJEVANJA BOLEZENSKIH ZNAMENJ.....	28
3.6 ODTIS PARADIŽNIKA NA SMSA GOJIŠČU .....	30
3.7 OBDELAVA PODATKOV .....	32
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
4.1 REZULTATI GOJENJA NA GOSTITELJSKIH RASTLINAH – TEST PATOGENOSTI.....	33
<b>4.1.1 Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1.2 Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na krompirju.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.3 Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> pri krompirju sorte Desireé – primerjava odziva testnih rastlin glede na različno koncentracijo bakterij .....</b>	<b>52</b>
4.2 ODTIS PARADIŽNIKA NA SMSA GOJIŠČU .....	55
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>56</b>
5.1 RAZPRAVA .....	56
<b>5.1.1 Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku .....</b>	<b>56</b>
5.1.1.1 Odziv različnih sort testnih rastlin paradižnika (Moneymaker in Roma) na različne načine inokulacije .....	56
5.1.1.2 Spremljanje števila listov.....	57
5.1.1.3 Višina rastlin .....	58
5.1.1.4 Splošne ugotovitve testa patogenosti na paradižniku .....	59
<b>5.1.2 Test patogenosti na krompirju .....</b>	<b>60</b>
5.1.2.1 Odziv različnih sort testnih rastlin krompirja (Desiré, Igor in Sante) na inokulacijo z vbodom čiste bakterijske kulture ter vbrizgavanjem bakterijske suspenzije.....	60
5.1.2.2 Odziv testnih rastlin sorte Desireé glede na različno starost ob inokulaciji	61
5.1.2.3 Odziv testnih rastlin sorte Desireé glede na različno bakterijsko koncentracijo.....	62
5.1.2.4 Splošne ugotovitve testa patogenosti na krompirju .....	62
<b>5.1.3 Odtis paradižnika na gojišču SMSA.....</b>	<b>63</b>

5.2 SKLEPI .....	64
------------------	----

<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>65</b>
------------------------	-----------

<b>7 VIRI .....</b>	<b>67</b>
---------------------	-----------

## **ZAHVALA**

## **PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Razdelitev <i>R. solanacearum</i> na rase in biovarje (Roberts in sod., 2004; EPPO, 2004) .....	7
<b>Preglednica 2:</b> Virulentne in aviruletne kolonije na osnovnih in selektivnih gojiščih pri procesu izolacije <i>Ralstonie solanacearum</i> (Council Directive 98/57/EC..., 1998)....	13
<b>Preglednica 3:</b> Priprava raztopin za določanje koncentracije bakterij po McFarlandu.....	22
<b>Preglednica 4:</b> Lestvica za ocenjevanje bolezenskih znamenj pri paradižniku in krompirju (Winstead in Kelman, 1952).....	26
<b>Preglednica 5:</b> Prikaz rezultatov testa z odtisom. +, kolonija na gojišču SMSA; dpi, dnevi po okužbi. ....	55

**KAZALO SLIK**

<b>Slika 1:</b> Območje razširjenosti <i>R. solanacearum</i> (rasa 3) po svetu. (EPPO, 2006).....	4
<b>Slika 2:</b> Izcedek <i>R. solanacearum</i> iz prerezanega steba rastline. (Clemson University, 2010).....	5
<b>Slika 3:</b> Prečni prerez rastlinskega steba. (McKenzie, 2007) .....	9
<b>Slika 4:</b> Primer nanašanja vzorca bakterijske suspenzije za določanje števila kolonij.....	23
<b>Slika 5:</b> Vbrizgavanje bakterijske suspenzije v steblo paradižnika med klična lista.....	25
<b>Slika 6:</b> Inkubacija okuženega paradižnika v rastlinjaku.....	26
<b>Slika 7:</b> Prikaz mesta vboda na krompirju.....	27
<b>Slika 8:</b> Inkubacija okuženega krompirja v rastlinjaku.....	28
<b>Slika 9:</b> Prikaz bolezenskih znamenj pri paradižniku .....	29
<b>Slika 10:</b> Primer bolezenskih znamenj pri krompirju v primerjavi z negativno kontrolo. .	29
<b>Slika 11:</b> Primerjava bolezenskih znamenj pri krompirju. ....	30
<b>Slika 12:</b> Prikaz mest na paradižniku, kjer smo delali odtise na ploščo z gojiščem.....	31
<b>Slika 13:</b> Primerjava različnih metod inokulacije rastlin pri dveh različnih sortah paradižnika. ....	34
<b>Slika 14:</b> Število listov pri testu patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker in Roma, po okužbi rastlin z vbodom čiste kulture (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec). .....	35
<b>Slika 15:</b> Število listov pri testu patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker in Roma po okužbi rastlin z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije $10^5$ cfu/mL (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec).....	36
<b>Slika 16:</b> Število listov pri testu patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker in Roma po okužbi rastlin z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo koncentracije $10^5$ cfu/mL (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec). ....	37
<b>Slika 17:</b> Višina rastlin pri testu patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker in Roma, po okužbi rastlin z vbodom čiste kulture (desni stolpec) in pri negativni kontroli (levi stolpec).....	38

<b>Slika 18:</b> Višina rastlin pri testu patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker in Roma po okužbi rastlin z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije $10^5$ cfu/mL (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec). ....	39
<b>Slika 19:</b> Višina rastlin pri testu patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker in Roma po okužbi rastlin z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo koncentracije $10^5$ cfu/mL (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec). ....	40
<b>Slika 20:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker , 5. dan po inokulaciji.....	41
<b>Slika 21:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Roma, 5. dan po inokulaciji.....	41
<b>Slika 22:</b> Bolezenski znaki pri paradižniku sorte Moneymaker, okuženim z vbodom čiste kulture.....	42
<b>Slika 23:</b> Bolezenski znaki pri paradižniku sorte Moneymaker in Roma, okuženim z vbodom čiste kulture. ....	42
<b>Slika 24:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker , 11. dan po inokulaciji.....	43
<b>Slika 25:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Roma, 11. dan po inokulaciji.....	43
<b>Slika 26:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker, 11. dan po inokulaciji.....	44
<b>Slika 27:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Roma, 11. dan po inokulaciji.....	44
<b>Slika 28:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Moneymaker , 11. dan po inokulaciji.....	45
<b>Slika 29:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na paradižniku sorte Roma, 11. dan po inokulaciji.....	45
<b>Slika 30:</b> Primerjava bolezenskih znamenj pri sortah krompirja, ki so bile okužene z vbodom čiste kulture dva tedna po presaditvi. ....	47
<b>Slika 31:</b> Primerjava bolezenskih znamenj pri sortah krompirja, ki so bile okužene z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije $10^5$ cfu/mL dva tedna po presaditvi. ....	48

<b>Slika 32:</b> Primerjava bolezenskih znamenj pri sorti Desireé, ki je bila okužena z vbodom čiste kulture ter z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije $10^5$ cfu/ mL tri tedne po presaditvi.....	49
<b>Slika 33:</b> Primerjava napredovanja bolezenskih znamenj pri sorti Desireé, ki je bila okužena z vbodom čiste kulture ter vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije $10^5$ cfu/mL, dva tedna (zgornji del slike) oziroma tri tedne (spodnji del slike) po presaditvi, glede na isti dan ocenjevanja bolezenskih znamenj.....	50
<b>Slika 34:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na krompirju sorte Desireé.	51
<b>Slika 35:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na krompirju sorte Igor.	51
<b>Slika 36:</b> Test patogenosti <i>R. solanacearum</i> na krompirju sorte Sante.	52
<b>Slika 37:</b> Primerjava bolezenskih znamenj pri testu patogenosti <i>R. solanacearum</i> na krompirju sorte Desireé, okuženim z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije $10^5$ cfu/mL (slika levo) ter koncentracije $10^6$ cfu/mL (slika desno).....	53
<b>Slika 38:</b> Test patogenosti na krompirju sorte Desireé, okuženim z bakterijsko suspenzijo koncentracije $10^5$ cfu/mL, glede na različne stopnje bolezenskih znamenj..	54
<b>Slika 39:</b> Očitno venenje listov ki ga povzroča <i>R. solanacearum</i> .	54
<b>Slika 40:</b> Odtis različnih delov rastline paradižnika na plošči SMSA glede na različne dneve po inokulaciji bakterije (dpi).	55

## KAZALO PRILOG

- Priloga A** Test patogenosti na paradižniku sorte Moneymaker.
- Priloga B** Test patogenosti na paradižniku sorte Roma.
- Priloga C** Podatki za višino rastlin pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma v centimetrih.
- Priloga D** Podatki za število listov pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma.
- Priloga E** Rezultati testa patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Desireé, Igor in Sante, okuženem z vbodom čiste kulture
- Priloga F** Rezultati testa patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Desireé, Igor in Sante, okuženem z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije
- Priloga G** Rezultati testa patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Desireé, ki je bil star 3 tedne.
- Priloga H** Prikaz bolezenskih znamenj pri rastlinah sorte Desireé različnih starosti glede na isti dan ocenjevanja bolezenskih znamenj
- Priloga I** Prikaz bolezenskih znamenj pri krompirju sorte Desireé, okuženem z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL
- Priloga J** Prikaz bolezenskih znamenj pri krompirju sorte Desireé, okuženem z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^6$  cfu/mL

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

cfu/ mL	angl. colony forming unit per mililiter štetilo bakterij v millilitru, ki na gojišču oblikujejo kolonije
DNA	dezoksiribonukleinska kislina angl. deoxyribonucleic acid
EG	angl. endoglucanase endoglukanaza
ELISA	angl. Enzyme Linked Imunno-Sorbent Assay encimski imunski test
EPPO/OEPP	angl. European and Mediterranean Plant Protection Organization fran. Organisation Européenne et méditerraneen pour la Protection des Plantes Evropska organizacija za varstvo rastlin
EPS	angl. extracellular polysaccharide ekstracelularni polisaharid
FAP	angl. fatty acid profiling profil maščobnih kislin
FISH	angl. fluorescent in-situ hybridisation fluorescentna in situ hibridizacija
NA	angl. Nutrient agar hranilni agar
PAGE	angl. polyacrylamide gel electrophoresis poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	angl. phosphate buffer saline fosfatni pufer z dodanim NaCl
PCR	angl. polymerase chain reaction verižna reakcija s polimerazo
PG	angl. polygalacturonase poligalakturonaza

PME	angl. pectin methyl esterase pektin metilesteraza
SMSA	angl. semiselective media from south Africa modificirano delno semiselektivno gojišče iz Južne Afrike
SPA	angl. sucrose peptone agar agar s sukozo in peptonom
T <sub>opt</sub>	angl. optimum temperature najugodnejša temperatura
TTC	angl. Kelman's tetrazolium media Kelmanovo gojišče s tetrazolom
YPGA	angl. yeast peptone glucose agar agar s kvasnim ekstraktom, peptonom in glukozo

## 1 UVOD

Paradižnik in krompir sta pomembni poljščini v prehrani, katerih uporaba je razširjena po celem svetu. Istočasno se z njima razširja tudi patogena bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi in sod. (1995), ki je po Gramu negativna bakterija in spada med betaproteobakterije v družini *Burkholderiaceae* (Council Directive 98/57/EC..., 1998).

Bakterija povzroča rjavo gnilobo krompirja in bakterijsko venenje številnih rastlin, saj napada več kot 200 rastlinskih vrst. Največ škode povzroča v tropskih in subtropskih območjih, pojavlja pa se tudi v hladnejših predelih sveta. Bakterija je uspešna pri širjenju, lahko prezivi v vodi in se prenaša preko namakalnih sistemov, rek ter obvodnega plevela grenkoslada (Hayward in sod., 1998). Preživi lahko tudi v tleh, ob neugodnih razmerah celo več let (Wale in sod., 2008).

Ker se bakterija zelo hitro razširja in povzroča veliko gospodarsko škodo, so različne organizacije že sprejele stroge ukrepe, s katerimi poskušajo preprečiti njen nadaljnje širjenje. Poskušajo najti učinkovito sredstvo za nadzor bolezni, vendar poleg kolobarjenja, manipulacije s prstjo in razvijanja odpornih vrst rastlin še ni na voljo učinkovitega biološkega ali kemičnega sredstva za zatiranje patogene bakterije. Dolga leta je bila priljubljena uporaba antibiotika streptomicina, vendar se njegova uporaba zaradi razvoja odpornih sevov patogene bakterije zmanjšuje. Med kmetovalci je precej razširjena tudi uporaba kemičnih sredstev, kot je 3-(3-indolil)butanojska kislina (Nonomura in sod., 2001) ter ostalih pesticidov, ki nimajo večjega učinka in poleg tega precej obremenjujejo okolje.

Prav to je vzrok, da raziskovalci iščejo nova, naravna in okolju prijaznejša protimikrobna sredstva, s pomočjo katerih bi lahko učinkovito nadzorovali bakterijske bolezni. Slaba stran takih sredstev je, da nanje močno vplivajo okoljski dejavniki, ki zmanjšujejo njihovo učinkovitost. Uporaba nekaterih rastlinskih in mikrobnih molekul se je izkazala za perspektivno orodje v boju proti *R. solanacearum*. Tako so na podlagi antagonističnega delovanja proti *R. solanacearum* preizkušali učinkovitost bakterij *Acinetobacter sp.* in *Enterobacter sp.* (Xue in sod., 2009) ter uporabljali rizobakterije, ki pospešujejo rast rastlin

(Guo in sod., 2004). Tudi nekatera eterična olja, ki jih pridobivajo iz določenih rastlinskih vrst imajo protimikrobni učinek. Taka sta timol in olje palmarosa, ki ju pridobivajo iz timijana in rastline *Cymbopogon martinii* ter predstavljata alternativo proti že obstoječim, okolju neprijaznima hlapnim sredstvom (Ji in sod., 2005).

Poleg vseh protimikrobnih sredstev, ki jih preizkušajo, je za preprečevanje širjenja ter zatiranja bolezni, pomembno tudi razumevanje ekologije patogene bakterije ter njene sposobnosti preživetja. Veliko raziskav je že bilo narejenih na posameznih rastlinskih vrstah, ki gostijo patogeno bakterijo v različnih podnebnih krajih, malo manj pa na posameznih sortah krompirja ter paradižnika.

### 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil preveriti občutljivost posameznih rastlin paradižnika in krompirja na okužbo s patogeno bakterijo *Ralstonia solanacearum* glede na različne sorte rastlin in način inokulacije. Preverili smo tudi, če starost rastline ob inokulaciji vpliva na izražanje bolezenskih znamenj. Poleg tega smo spremljali gibanje bakterije po rastlini z nanosom posameznih delov rastline na gojišče. Pridobljeni podatki bodo osnova za opazovanje delovanja antibakterijskih susbstanc.

### 1.2 HIPOTEZE

Glede na literaturo in predhodna testiranja predvidevamo, da *R. solanacearum* povzroča bolezenska znamenja na različnih sortah paradižnika in krompirja in da se bolezenska znamenja med sortami razlikujejo. Poleg tega pričakujemo, da različni načini inokulacije ter starost rastline vplivajo na izražanje bolezenskih znamenj. Pri testu nanosa rastlin na gojišče pričakujemo, da se bo bakterija po vstopu v rastlino gibala po rastlini navzgor.

## 2 PREGLED OBJAV

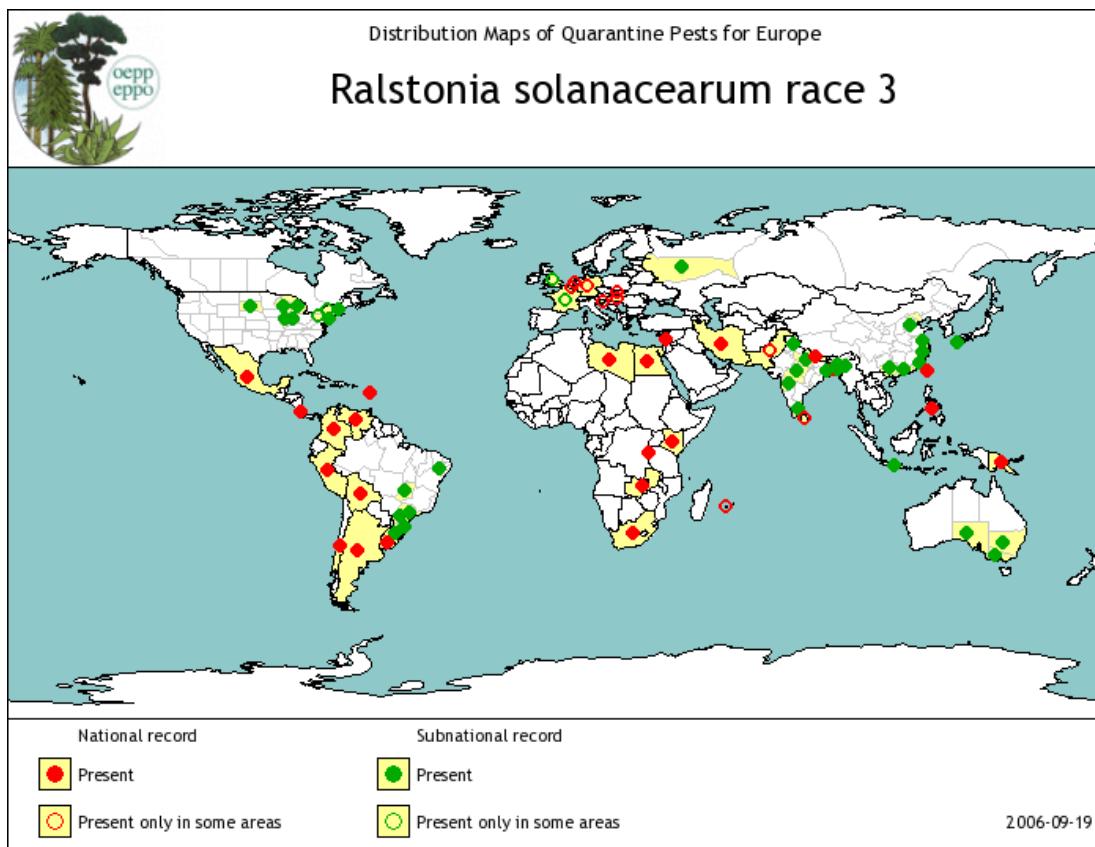
### 2.1 PATOGENEZA

Že konec 19. stoletja so poročali o bakterijskem venenju krompirja, tobaka, paradižnika in arašidov, ki ga povzroča bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi in sod. (1995), prej znana tudi kot *Pseudomonas solanacearum* (Smith, 1896) Smith 1914, *Burkholderia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al. 1992 (EPPO, 2004).

Bakterija je aerobna, po Gramu negativna palčka, velikosti  $0,5 \times 2,0 \mu\text{m}$ , ki se premika z enim do štirimi polarnimi bički (Roberts in sod., 2004). Taksonomsko je uvrščena med betaproteobakterije, red *Burkholderiales*, družino *Burkholderiaceae* in rod *Ralstonia*. Je neflorescentna in pogosto tvori rjav pigment. Kot rezervno hrano kopiči polihidroksibutirat (Council Directive 98/57/EC..., 1998). Raste relativno hitro in tvori kolonije, ki so vidne že po dveh dneh po precepu na gojišče z agarjem (Van der Wolf in De Boer, 2007).

*R. solanacearum* največ škode povzroča v tropskih, subtropskih in nekaterih toplejših območjih sveta, pojavlja se tudi v hladnejših predelih (Slika 1). Povzroča rjavo gnilobo krompirja in bakterijsko venenje številnih rastlin kot so rastline iz družine razhudnikov (paradižnik, krompir, tobak, jajčevec), enokaličnice (predvsem banana, ingver) in mnoge drevesne in grmovne vrste (murva, oliva, manioka, evkaliptus) (Genin in Boucher, 2002; Roberts in sod., 2004).

Bakterija je občutljiva na izsušitev in na sol, ki jo uniči že pri zelo nizkih koncentracijah v tekočem gojišču. Optimalna temperatura za rast večine sevov je 30-32 °C, nekateri pa rasteju tudi pri nižjih temperaturah. Če bakterijo vzdržujemo v tekočem, slabo prezračevanem gojišču, lahko izgubi virulentnost in preide iz gibljive oblike v avirulentno, negibljivo obliko. Kolonije virulentnih sevov so na SMSA gojišču nepravilno okrogle, bele z rdečasto piko v centru kolonije, medtem ko so avirulentne okrogle, mazave in temno rdeče (Kelman, 1981).



Slika 1: Območje razširjenosti *R. solanacearum* (rasa 3) po svetu. (EPPO, 2006)

Bolezen rjave gnilobe krompirja se je v evropske države razširila preko severno Afriških držav, kjer je bolezen nekaj zadnjih desetletij endemična. Uporaba namakalnih sistemov in globalno segrevanje ozračja sta še dodatno prispevala k razširjanju bolezni. Trenutno je glavni poudarek na raziskovanju epidemiologije rjave gnilobe v hladnejših predelih, kakor tudi na proučevanju ekologije patogene bakterije in njeni neverjetni zmožnosti prezivetja v najrazličnejših razmerah. Patogena bakterija je tako uspešna, ker lahko prezivi in se prenasa z obvodno rastlino grenkosladom (*Solanum dulcamara*), rekami in ostalimi vodnimi viri ter z industrijskimi in gospodinjskimi odpadnimi vodami. Za razumevanje prezivetja v okuženih gostiteljskih plevelih in v zemlji, predvsem v globljih plasteh zemlje je potrebno še marsikaj raziskati (Hayward in sod., 1998).

## 2.2 BOLEZENSKA ZNAMENJA

Pri okužbi krompirja z bakterijo *R. solanacearum* se najprej pojavi venenje listov in stebla, ki je najintenzivnejše v najtoplejšem delu dneva, medtem ko si ponoči rastlina opomore. Iz stebla se na mestu poškodbe izteka bel sluzast bakterijski izcedek. Če odrežemo steblo rastline in ga namočimo v vodo, se iz žil razlijejo sluzaste niti. Sčasoma si rastlina ne opomore več, pojavijo se rumeno-rjave nekrotične razjede in rastlina odmre. Včasih se tekom razvijanja bolezni tik nad zemljo na steblu pojavi progasto rjavo razbarvanje in listi lahko dobijo bronast odtenek. Pri gomoljih krompirja se bolezenska znamenja kažejo kot sluzast izcedek, ki izteka iz žilnega tkiva. Najprej začne odmirati žilni krog, ki postane rjav, kasneje se nekroza razširi na okoliško tkivo. Zunanjih bolezenskih znamenj na gomolju krompirja ponavadi ni (EPPO, 2004). Lahko pa se pojavijo predvsem v zadnji fazi bolezni, ko okužba izbruhne navzven skozi stolon in brst gomolja, ki se obarvata rdečkasto rjavo. Nastanejo tudi rahlo vbočene razjede, skozi katere se izteka bakterijski izcedek, ki povzroča prijemanje prsti na gomolj (Council Directive 98/57/EC..., 1998).



Slika 2: Izcedek *R. solanacearum* iz prerezanega stebla rastline. (Clemson University, 2010)

Pri paradižniku se bolezenska znamenja najprej pojavijo pri mladih listih, ki začnejo veneti, ko so dnevne temperature najvišje in so razmere za rast in razvoj bakterije *R. solanacearum* najugodnejše. Na steblu se žilno tkivo rjavo razbarva in pojavi se bel ali rumenkast bakterijski izcedek. Kmalu zatem začne propadati celotna rastlina. Če so razmere za rast patogene bakterije manj ugodne, bolezen napreduje počasneje (EPPO, 2004).

Bolezenska znamenja, kot je venenje rastlin, niso nujno posledica delovanja patogene bakterije *R. solanacearum*, ampak jih lahko povzročajo tudi drugi mikroorganizmi, kot so *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Erwinia chrysanthemi* in *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Dobra preliminarna testa sta prerez gomolja, kjer opazujemo pojav sluzastega izcedka in potopitev stebla rastline v vodo, kjer se ob prisotnosti *R. solanacearum* iztekajo sluzaste niti. Bolj zanesljiv hiter test pa naredimo z uporabo seroloških testov, ki vsebujejo visoko specifična monoklonska protitelesa. Končno identifikacijo izvedemo v diagnostičnem laboratoriju (EPPO, 2004).

### 2.3 SEVI

Posamezni sevi *R. solanacearum* se razlikujejo glede na gostitelja, geografsko razširjenost, patološke in fiziološke lastnosti. Buddenhagen in sod. (1962) ter Hayward (1991) delijo *R. solanacearum* na 5 ras, ki temeljijo na krogu gostiteljev in 5 biovarjev, ki temeljijo na biokemijskih značilnostih.

Preglednica 1: Razdelitev *R. solanacearum* na rase in biovarje (Roberts in sod., 2004; EPPO, 2004)

Rasa	Biovar	Geografska razširjenost	Gostitelji	Temperaturni optimum
1	1, 3, 4	tropsko območje po vsem svetu	krompir, paradižnik, tobak, jajčevec, poper	$T_{opt} = 35^{\circ}\text{C}$
2	1	tropska območja Južne Amerike in Filipini	banane (Moko bolezen), in <i>Heliconia spp.</i> na Filipinih povzroča t.i. bugtok bolezen (na posebni vrsti banan)	$T_{opt} = 35^{\circ}\text{C}$
3	2	višji predeli tropskih in subtropskih predelov ter hladnejša območja	krompir, paradižnik, občasno tudi pelargonija, jajčevec in pleveli iz družine <i>Solanaceae</i>	$T_{opt} = 27^{\circ}\text{C}$
4	3, 4	Azija	ingver	$T_{opt} = 35^{\circ}\text{C}$
5	5	Kitajska	murve	$T_{opt} = 35^{\circ}\text{C}$

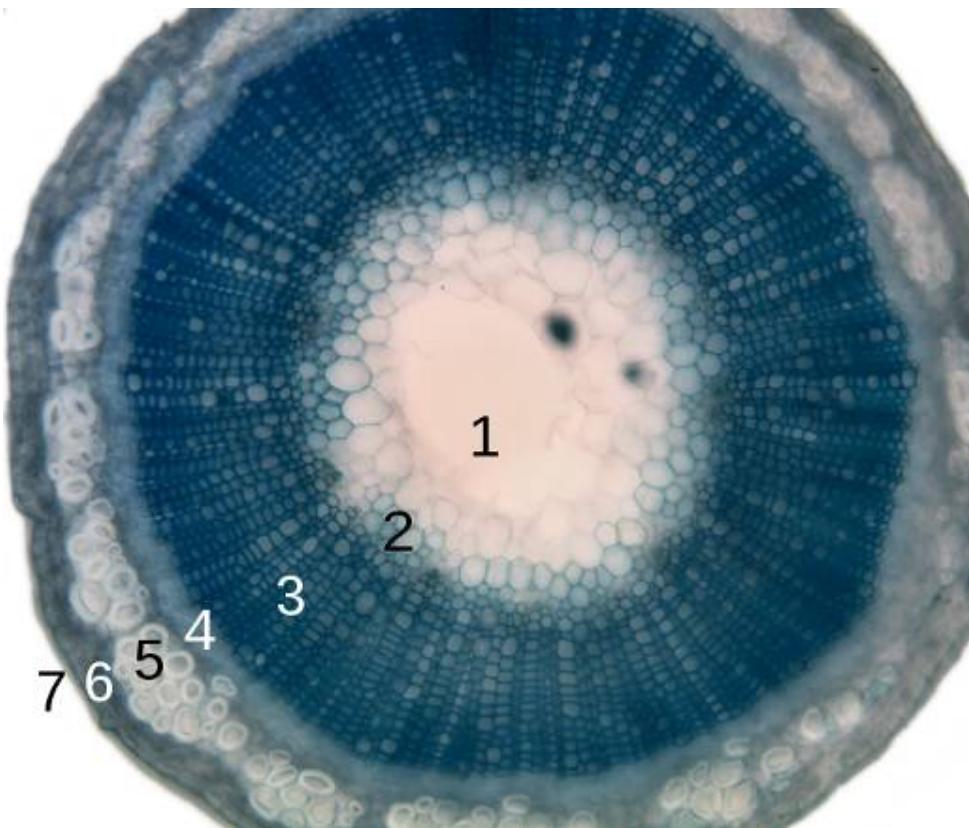
Bakterija *R. solanacearum* se ponavadi prenaša z okuženimi gomolji, lahko pa tudi z okuženo vodo in zemljo. Bakterija lahko v zemlji v ostankih poljščin in gostiteljskih plevelih preživi dalj časa in čaka na ugodne razmere za rast in razvoj (Wale in sod., 2008). V rastlini vstopi skozi korenine, preko rastnih razpok, poškodb, ki jih povzročijo nematode, insekti ali kmetijsko orodje (Roberts in sod., 2004). Bakterijske celice potujejo navzgor po rastlini od mesta inokulacije s hitrostjo 0,4 – 0,8 mm/h in navzdol s hitrostjo 0,1 – 0,2 mm/h. Potovanje navzgor po rastlini je hitrejše zaradi vodnega toka, ki teče skozi ksilemsko tkivo (Fujie in sod., 2009).

Po inokulaciji se *R. solanacearum* po gostiteljski rastlini v glavnem razširja po ksilemskem ožilju, čeprav včasih ne po celi rastlini. Fujie in sod. (2009) so ugotovili, da so žilni oddelki ksilemskega tkiva pri paradižniku neodvisni drug od drugega, kar je vzrok, da se *R. solanacearum* ne more hitro premikati skozi žilni sistem rastline. Ta prekinjenost

žilnega sistema je verjetno eden od vzrokov, zakaj bakterijske celice niso prisotne po celi rastlini, kljub očitnim zunanjim bolezenskim znamenjem.

V ugodnih razmerah se venenje rastline pojavi že nekaj dni po okužbi. Bakterija napade znotraj celične prostore parenhimskega tkiva v skorji (Slika 3) in preuredi celično steno tako, da nastanejo žepki, napoljeni z bakterijskimi celicami in polisaharidi ter celičnimi ostanki (Roberts in sod., 2004). V ksilemskem tkivu se *R. solanacearum* namnoži tudi do  $10^{10}$  celic/cm steba, sočasno je z naraščanjem števila celic venenje rastline intenzivnejše. Ko rastlina propade, se bakterija sprosti nazaj v zemljo, kjer živi kot saprofitski organizem, dokler spet ne najde ustreznega gostitelja (Genin in Boucher, 2002).

V toplem podnebju in visoki vlažnosti je rast in razvoj bakterije zelo hiter in s tem je hitrejši tudi razvoj bolezenskih znamenj. Če je podnebje hladnejše in je temperatura zemlje pod 15 °C, lahko do izbruha bolezni mine več let. Okužba je poleg tega lahko latentna, kar pomeni, da rastline nimajo vidnih bolezenskih znamenj (Wale in sod., 2008). Kako dolgo je bakterija sposobna preživeti v zemlji brez gostitelja je odvisno od bakterijskega seva, vrste zemlje in vlažnosti. V takih primerih najdlje preživi v zelo vlažni zemlji z nizkim, kislim pH, čeprav jo ob prisotnosti gostitelja najdemo v najrazličnejših tipih prsti pri širokem razponu pH (Roberts in sod., 2004).



Slika 3: Prečni prerez rastlinskega steba (1 – stržen, 2 – protoksilem, 3 – ksilem, 4 – floem, 5 – sklerenhim, 6 – skorja, 7 – povrhnjica). (McKenzie, 2007)

Ugotovili so, da je *R. solanacearum* sposobna razviti posebno stanje nizke metabolne aktivnosti, ko so celice sicer žive, vendar se ne delijo in tako lahko preživijo kar nekaj časa v neugodnih razmerah. Tem celicam pravimo VBNC (angl. viable but nonculturable) in se pojavijo, ko se bakterija znajde v zemlji brez primernega gostitelja in so prisotne dokler bakterija spet ne vstopi v primerno rizosfero. Takrat okoljski faktorji omogočijo celicam VBNC da spet pridobijo popolno aktivnost in lahko normalno okužijo gostiteljsko rastlino. V gostiteljski rastlini z napredovanjem okužbe narašča tudi delež bakterijskih celic, ki se spremenijo nazaj v celice VBNC. Ko rastlina propade, se lahko v takšni obliki sprostijo v zemljo in čakajo na primernega gostitelja (Grey in Steck, 2001).

## 2.4 ODGOVOR RASTLINE

Pomemben faktor patogenosti pri *R. solanacearum* je ekstracelularni polisaharid (EPS), ki moti transport vode in pomaga zaščititi bakterijsko površino pred rastlinskimi obrambnimi mehanizmi. Prav tako k venenju rastlin prispevajo ekstracelularni encimi, kot so poligalakturonaza (PG), pektin metilesteraza (PME) in endoglukanaza (EG), ki razgrajujejo celično steno in povzročajo razpad žilnega tkiva ter zaustavlja transport vode po rastlini. Te ekstracelularne encime nadzoruje mehanizem zaznavanja gostote bakterij (angl. quorum sensing), ki zavira produkcijo teh encimov, dokler ni dosežena kritična celična masa bakterij. Quorum sensing omogoča bakteriji, da pri nizki celični gostoti razvije dejavnike, ki so pomembni v zgodnji fazи patogenosti (gibljivost, produkcija sideroforjev), pri visoki celični gostoti pa dejavnike, ki so potrebni v pozni fazи razvoja bolezni (EPS, PME, glukanaza). Predvidevajo, da genetski regulatorni aparat zavira encimsko produkcijo, dokler se bakterijske celice ne namnožijo v zadostnem številu, da lahko izničijo delovanje rastlinskih obrambnih mehanizmov (Van der Wolf in De Boer, 2007). Z naraščanjem bakterijske populacije začne globalni virulenčni regulator spodbujati nastajanje EG in EPS, sočasno pa zavirati PG in gibljivost bakterije (Tans-Kersten in sod., 2001).

Predvidevajo, da *R. solanacearum* izmenično prehaja med dvema fenotipoma. Kadar je koncentracija celic nad  $10^8$  CFU/mL, prevladuje visoko virulentni fenotip. Takrat se tvorijo velike količine EPS in razni encimi, ki razgrajujejo celično steno. Nastajanje teh snovi je pomembno za naselitev gostiteljskega tkiva ali za izogibanje gostiteljskim obrambnim mehanizmom. Kadar je celična gostota pod  $10^7$  CFU/mL, prevladuje nizko virulentni fenotip, kar se kaže kot zmanjšana gibljivost bakterije ter nižja produkcija EPS in nekaterih encimov za razgrajevanje celične stene. Tak fenotip je bolje prilagojen za preživetje v zemlji, za saprofitski način življenja in v zgodnjih parazitskih fazah (Denny in sod., 1998).

Bakterija je v ksilemskem tkivu okužene rastline skoraj popolnoma negibljiva in tudi pri populaciji okrog  $10^9$  CFU/mL je gibljivih manj kot 5 % celic. Gibljivost je pomembna za

popolno virulentnost *R. solanacearum*, ni pa nujna, ko bakterija enkrat prispe v žilni sistem gostiteljske rastline. Sposobnost gibanja bakterije je pomembna za kemotakso v zemlji, ko se bakterija orientira in išče primeren kraj na korenini za vstop v rastlico (Tans-Kersten in sod., 2001). Ugotovili so, da ima *R. solanacearum* zapleten in učinkovit sistem za kemotakso, ki jo uporablja za premikanje na ugodnejša področja k primernim gostiteljem. Ko iz zemlje vstopi v korenino, si v koreninskem protoksilemu najde primerno nišo za naselitev. Takrat bakterija več ne potrebuje gibljivosti, saj jo vodni tok potegne v steblo rastline od koder se razširi po rastlini (Yao in Allen, 2006).

Biček prispeva k virulentnosti bakterije le v zgodnji fazi okužbe, ob vstopu bakterije v rastlico. Raziskave kažejo, da biček deluje kot antigen in izzove rastlinski imunski sistem, ki prepozna flagelin, zato se bakterija temu v rastlini izogne tako, da izgubi gibljivost. Prednost gibljive patogene bakterije je v tem, da se lahko z napredovanjem bolezni premakne iz okuženih ksilemskih trahej v neokužene traheje in ksilemske parenhimske celice. Gibljivost je pomembna tudi za tvorbo biofilma na stenah trahej. Ti specializirani skupki ščitijo bakterijo pred rastlinsko obrambo in ji omogočajo preživetje v latentni fazi in pri saprofitskem načinu življenja. Flagelarni kompleks ima morebiti bolj neposredno vlogo tudi pri bakterijskem venenju rastlin, saj je več proteinov, ki sestavljajo biček, evolucijsko povezanih s sistemom izločanja tipa III, ki omogoča neposredno injiciranje bakterijskih virulenčnih dejavnikov v rastlinsko ali živalsko celico. Verjetno tudi flagelarni aparat *R. solanacearum* lahko prenaša virulenčne dejavnike (Tans-Kersten in sod., 2001).

## 2.5 ZAZNAVANJE OKUŽBE IN NADZOR BOLEZNI

*R. solanacearum* je karantenska bakterija, ki jo poskušajo obvladovati in nadzorovati predstavniki številnih organizacij kot so EPPO v Evropi, APPC (ang. Asia and Pacific Plant Protection Comission) v Aziji, IAPSC (ang. Interafrican Phytosanitary Council) v Afriki in NAPPO (ang. North American Plant Protection Organization) ter COSAVE (špa. Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur) v Ameriki. Bakterija povzroča ekonomsko škodo na različne načine:

1. Ob okužbi s patogeno bakterijo je potrebno uničenje pridelka med rastjo in skladiščenjem gomoljev.
2. Ob ugotovitvi latentne okužbe gomoljev se okuženo seme zavrne in uniči.
3. Posledično se izgubi izvozne trge, obenem pa je težko vzpostaviti nove.

Gledano z globalne perspektive je *R. solanacearum* takoj za glivo *Phytophthora infestans*, ki povzroča krompirjevo plesen, ekonomsko najpomembnejši patogeni mikroorganizem krompirja (Van der Wolf in De Boer, 2007).

Bolezen, ki jo povzroča *R. solanacearum* na krompirju, lahko ostane prikrita in se širi tako z razmnoževanjem krompirja, kot tudi s skladiščenjem. Patogena bakterija se lahko razširja tudi preko površinskih voda in namakalnih sistemov, divjih rastlin iz družine razhudnikov (grenkoslad) ter preživi zimo v divje rastočih paradižnikovih in krompirjevih rastlinah (samosevcih). Bolezen se lahko prenese tudi s kontaminacijo zdravega pridelka s kontaminiranim kmetijskim orodjem za sajenje in spravilo pridelka (Council Directive 98/57/EC..., 1998).

Svet evropske unije je zato sprejel direktivo (Council Directive 98/57/EC..., 1998), po kateri države članice skušajo določiti nahajališče in razširjenost rastlin, ki so okužene z *R. solanacearum*, ter preprečiti njihovo širjenje. Če se na rastlinah paradižnika in krompirja ter gomoljih krompirja pojavijo očitna znamenja bakterijskega venenja ozziroma rjave gnilobe krompirja, se za potrditev bolezni najprej opravijo hitri presejalni testi; test izcedka iz steba (slika 2), zaznavanje poli-β-hidroksibutiratnih (PHB) zrnec, test z nilskim modrilom, test z barvilm sudan črno, test imunofluorescence (IF), test ELISA ali test PCR (verižna reakcija s polimerazo).

Tem presejalnim testom sledi postopek izolacije, kjer iz okuženega rastlinskega materiala pripravimo ekstrakt in ga nanesemo na enega izmed osnovnih hranilnih gojišč kot so NA, YPGA in SPA, na Kelmanovo gojišče TTC, ki vsebuje trifeniltetrazolijev klorid ali pa na selektivno gojišče SMSA. Nato plošče inkubiramo tri dni pri 28 °C. Inkubacija lahko traja tudi do 6 dni, če je rast počasna, vendar se na gojišču SMSA lahko pojavijo netipične kolonije (Council Directive 98/57/EC..., 1998).

Preglednica 2: Virulentne in avirulentne kolonije na osnovnih in selektivnih gojiščih pri procesu izolacije *Ralstonie solanacearum* (Council Directive 98/57/EC..., 1998).

gojišče	virulentne kolonije	avirulentne kolonije
<b>NA, YPGA, SPA</b>	biserno bele barve, ploske, nepravilne oblike, fluidne	bele, ploščate, suhe
<b>TTC</b>	kremaste, ploske, nepravilne oblike, fluidne, krvavo rdeče obarvane v sredini	mazave, temno rdeče barve
<b>SMSA</b>	mlečno bele barve, ploske, nepravilne oblike, fluidne, krvavo rdeče obarvane v sredini	manj fluidne, suhe, rožnate oziroma rdeče barve

Po inkubaciji pregledamo plošče in če se pojavijo virulentne ali avirulentne kolonije (Preglednica 2), je treba opraviti še potrditvene teste.

S potrditvenimi testi dokončno potrdimo prisotnost bakterije. Za identifikacijo *R. solanacearum* se uporablja test IF, test ELISA, test PCR, FISH (fluorescentna in situ hibridizacija), profil proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo – PAGE ter profil maščobnih kislin – FAP. Narediti moramo tudi test patogenosti, da potrdimo virulentnost kulture, ki smo jo identificirali kot *R. solanacearum*. Pripravimo bakterijsko suspenzijo, s katero okužimo pet do deset rastlin paradižnika v fazi, ko rastline razvijejo dva do tri prave liste. Gojimo jih do dva tedna pri temperaturi 22-28 °C pri visoki relativni vlažnosti in spremljamo bolezenska znamenja (Council Directive 98/57/EC..., 1998).

Včasih je z gojenjem na ploščah težko dobiti čisto kulturo patogenega mikroorganizma, še posebej če želimo izolirati *R. solanacearum* iz rastlinskega materiala, vzorcev zemlje ali iz namakalne vode, saj lahko plošče prerastejo saprofiti. Takrat so primernejše direktne detekcijske metode, kot so ELISA, IF, PCR in metoda, ki sta jo leta 1994 razvila Seal in Elphinstone, ki temelji na pomnoževanju in ujemanju z označenimi sondami DNA.

Direktne metode morajo biti zadosti hitre, specifične in občutljive za material, ki ga raziskujemo. Katero metodo izbrati, je odvisno od specifičnosti uporabe. ELISA je ekonomsko gledano ena izmed najcenejših hitrih metod, ki pa lahko zaradi navzkrižne reakcije z drugimi bakterijami poda lažno pozitiven rezultat. Zato je pozitivne rezultate potrebno dodatno potrditi s PCR, gojenjem na ploščah ali testom patogenosti. Čeprav je metoda PCR najhitrejša in najbolj občutljiva, je potrebno optimizirati veliko dejavnikov (reakcijski pufer ter koncentracija deoksinukleotid trifosfatov, začetnikov in magnezijevih ionov), ki lahko znatno vplivajo na občutljivost reakcije. Potrebna je tudi notranja kontrola, ki izloči lažne negativne rezultate (Seal, 1998).

Klasični protokoli testiranja bolezni so lahko zamudni, saj zahtevajo izolacijo, čiščenje, identifikacijo in demonstracijo patogenosti bakterije na rastlinah, kar lahko traja več dni ali tednov. Zato so znanstveniki razvili metodo TaqMan PCR, ki temelji na 5' nukleazni aktivnosti *Taq* DNK polimeraze in fluorogenih sondah DNA. Vsaka sonda, ki je izdelana, da se specifično hibridizira s tarčnim produktom PCR, je označena s fluorescentno in dušilno molekulo (ang. quencher). Tekom pomnoževanja produktov PCR sonda DNA zaradi delovanja *Taq* DNK polimeraze razpade in označevalca se ločita, zaradi česar pride do oddajanja fluorescence, ki jo lahko zaznamo z fluorometrom.

Fluorogena 5' nukleazna reakcija, ki temelji na PCR, je primerna za zaznavanje in identifikacijo *R. solanacearum* neposredno iz okuženega rastlinskega tkiva in je po občutljivosti in specifičnosti primerljiva z obstoječimi PCR protokoli. Proces je robusten, hiter in avtomatiziran, v kratkem času se obdela veliko vzorcev. Poleg tega se s TaqMan PCR izognemo gelski elektroforezi in barvanju tarčne DNA z etidijevim bromidom, kar običajno sledi reakciji PCR (Weller in sod., 2000).

Za zaznavanje nizke koncentracije bakterijske populacije v vodi je primerna metoda pomnoževanja s Co-PCR (kooperacijska verižna reakcija s polimerazo), saj je mnogo bolj občutljiva in specifična od običajne PCR reakcije. V vodnem vzorcu lahko brez ekstrakcije DNA s Co-PCR zaznamo manj kot 1 cfu/mL populacije *R. solanacearum* (Caruso in sod., 2003). Tehnika s Co-PCR se izvede v enostavni reakciji s tetra začetnimi oligonukleotidi

(angl. primer), ki temelji na sočasnem delovanju vseh štirih primerjev (Olmos in sod., 2002).

Na podlagi Olmosove raziskave iz leta 2002, Caruso (2003) predvideva, da reakcija treh primerjev omogoča njihovo sočasno delovanje, ki v enem samem pomnoževanju prinese novo začetno mesto za dva specifična proizvoda. Reverzna veriga najkrajšega amplikona, ki nastane pri sočasnem delovanju začetnikov, se uporabi kot dodaten začetnik, da poveča donos največjega amplikona, ki je kot končen produkt viden na agaroznem gelu. Druga veriga najkrajšega amplikona, ki ne poteka reverzno, se uporabi za nastanek novega reverznega začetnika, ki sodeluje v reakciji kot pomožni začetni oligonukleotid.

## 2.6 ZATIRANJE BOLEZNI

Znanstveniki se že več let ukvarjajo z različnimi idejami, kako nadzorovati in obvladati bolezen, ki jo povzroča *R. solanacearum* in ki posledično prinaša velike ekonomske izgube. Razvili so več strategij, kot so odporne gostiteljske rastline, kolobarjanje, manipulacije s prstjo, integrirana in biološka kontrola. Na biokontrolna sredstva zelo vplivajo okoljske razmere kot so temperatura, vlažnost in tudi gnojenje zemlje, kar zmanjša njihovo učinkovitost. Drug problem je uporaba mikrobnih produktov, ki zahteva gojenje in shranjevanje mikroorganizmov. Predvsem slednje je lahko problematično, saj je lahko življenska doba ob neprimernih razmerah in temperaturah hranjenja živilih organizmov kratka. Uspešna metoda za dolgotrajnejšo učinkovitost temelji na vodni fazi (Guo in sod., 2004).

Xue je in sodelavci (2009) na podlagi antagonističnega delovanja proti *R. solanacearum* preizkušal učinkovitost bakterij *Acinetobacter sp.* in *Enterobacter sp.*, za katera se je izkazalo, da slednji bolje učinkuje proti bakterijskemu venenu. Da bi našli primerno metodo za inokulacijo, so primerjali metodi namakanja korenin v biozaščitno sredstvo in močenje tal s suspenzijo iz vidika rizokompetence, učinkovitosti sredstva in pospeševanja rasti rastlin. Namakanje korenin se je izkazalo za bolj učinkovito, poleg tega je donos pridelka večji.

Kot potencialno biozaščitno sredstvo se med drugim uporablja rizobakterije, ki pospešujejo rast rastlin. Bakterijske suspenzije so tudi po dveh letih shranjevanja proizvajale učinkovito biokozaščitno sredstvo. Suspenzijo so 100-krat razredčili z vodo in jo dodali gnojilu, s katerim so posuli tla (Guo in sod., 2004).

Uporaba živih mikrobnih biozaščitnih sredstev je v primerjavi z uporabo antibiotikov pri kmetovalcih slabo sprejeta. Živi mikrobi se velikokrat izkažejo za dokaj neučinkovite, poleg tega tudi ni primerne metode za nanos različnih biozaščitnih sredstev. Glavni vzrok za zmanjšano učinkovitost inhibitornih sredstev so številni patogeni mikroorganizmi, ki poleg tarčne patogene bakterije živijo v istem okolju. Biokozaščitno sredstvo, ki ga ponavadi razvijejo v kontroliranih razmerah v rastlinjaku, zavira le določeno patogeno bakterijo, medtem ko ostalih bolezni na polju ne more nadzirati (Xue in sod., 2009).

Za nadzor patogenih bakterij je zelo razširjena uporaba 3-(3-indolil)butanojske kisline (IBA), ki se uporablja tudi pri hidroponskem gojenju rastlin. Predvsem na Japonskem se vedno bolj razširja hidroponsko gojenje paradižnika, saj je enostavno nadzorovati rastne dejavnike poleg tega je donos velik. Ker pa nasade ogrožajo bakterijski in glivni povzročitelji bolezni, za zatiranje uporabljam nekatere derivate indola, kot je IBA, ki na rastlinah ne pusti posledic. Tako je uporaba IBA v hidroponskem kmetijstvu postala rutinska (Nonomura in sod., 2001).

Kljud temu, da uporaba pesticidov na Kitajskem velja za najbolj učinkovito in najhitrejšo metodo za zatiranje rastlinskih škodljivcev, pa še vedno ni na voljo učinkovitega sredstva za zdravljenje bakterijskega venenja rastlin. Za nadzor te bolezni velja za najučinkovitejše sredstvo streptomycin, vendar ga kmetje vseeno ne uporabljam več pogosto, ker so za učinkovitost potrebne velike doze antibiotika. Zaradi prekomerne uporabe antibiotika v zadnjih desetletjih, je namreč prišlo do bakterijske odpornosti na to zdravilo, zato v ospredje spet prihaja uporaba biokontrolnih sredstev z živimi mikrobi (Xue in sod., 2009).

Nekatere hlapne sestavine, ki jih pridobivajo iz rastlin, kot sta timol in olje palmarose, tudi predstavljajo učinkovito kontrolno sredstvo proti rastlinskim patogenom. Timol in olje

palmarosa, ki ju proizvajata timijan *Thymus* in rastlina iz skupine limonskih trav *Cymbopogon martinii*, delujeta protibakterijsko. Takšne hlapne sestavine predstavljajo obetajočo in okolju prijazno alternativo že obstoječim hlapnim sredstvom kot sta metil bromid in kloropikrina. Uporaba timola, odpornih vrst paradižnika in ostalih obetajočih sestavin, kot je acibenzolar-S-metil bo morda dosegla večjo uspešnost pri nadzoru bolezni bakterijskega venenja (Ji in sod., 2005). Olja timola, palmarose in drugih rastlin v rodu *Cymbopogon* zavirajo rast populacije *R. solanacearum* v tleh in zmanjšujejo učinek bakterijskega venenja rastlin. Rastlinska eterična olja in njihove sestavine so zaradi svojega fungicidnega, nematocidnega in protibakterijskega delovanja primerna za integrirano kmetijstvo (Pradhanang in sod., 2003).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MIKROORGANIZMI**

Za raziskovanje smo uporabili bakterijsko kulturo *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi in sod. 1996, sev NCPPB 4156 (angl. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria).

Bakterijo smo vzdrževali v čisti kulturi na trdnem gojišču YPGA pri temperaturi 28 °C. Najkasneje po enem tednu smo bakterijo precepili na sveže gojišče.

#### **3.2 GOJIŠČA IN PUFRI**

Gojišči YPGA in SPA smo uporabljali za vzdrževanje čiste bakterijske kulture *R. solanacearum*, za opazovanje rasti kolonij in za preverjanje živosti bakterije v bakterijski suspenziji ter določanje cfu/mL.

Gojišče SMSA smo uporabljali za spremeljanje viruletnosti bakterije *R. solanacearum*, ki se kaže v tipični morfologiji kolonij ter za določanje cfu/mL v bakterijski suspenziji.

##### **3.2.1 Sestava gojišč**

Za pripravo vseh gojišč in pufrov smo uporabljali deionizirano vodo, pridobljeno s sistemom Milli QUF Plus proizvajalca Millipore.

Gojišče SPA

Gojišče z agarjem (Lelliot in Stead, 1987) je vsebovalo:

saharoza (Kemika)	20 g
pepton Difco (Bacto)	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Kemika)	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O (Kemika)	0,25 g
agar (Oxoid No. 1)	15 g
bidestilirana voda	1000 mL

pH gojišča smo umerili na 7,2-7,4. Steklenice z gojiščem smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C in pritisku  $2,34 \times 10^5$  Pa. Gojišče smo ohladili ter ga še pred strditvijo razlili v petrijevke.

#### Gojišče YPGA

kvasni ekstrakt (Difco)	5 g
proteozni pepton (Oxoid)	5 g
glukoza (Kemika)	10 g
agar (Oxoid No. 3)	12 g
bidestirlirana voda	1000 mL

pH gojišča smo umerili na 7,2-7,4. Pollitske steklenice z gojiščem smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in pritisku  $2,34 \times 10^5$  Pa. Ohlajeno gojišče smo še pred strditvijo sterilno razlili v petrijevke.

#### Gojišče SMSA

Gojišče SMSA z agarjem Difco (Elphinstone in sod., 1996) je vsebovalo:

kazamino kisline	1 g/L
pepton	10 g/L
glicerol	5 mL/L
agar	15 g/L

bidestilirana voda                            1000 mL

pH gojišča smo umerili na 6,5. Steklenice z gojiščem smo nato avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in pritisku  $2,34 \times 10^5$  Pa. Ko se je gojišče ohladilo na približno 50 °C, smo dodali še naslednje raztopine:

bacitracin	1250 U / 0,5 L SMSA
kristal violet	2,5 mg / 0,5 L SMSA
polimiksin B sulfat	300.000 U / 0,5 L SMSA
kloramfenikol	2,5 mg / 0,5 L SMSA
TTC	25 mg / 0,5 L SMSA
penicilin G	412,5 U / 0,5 L SMSA

Nato smo gojišče razlili v petrijevke. Raztopine antibiotikov so bile pripravljene kot založne raztopine.

#### Fosfatni pufer (0,02 M PBS)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,071 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8 g
bidestilirana voda	1000 mL

pH pufra smo umerili na 7,2. Pollitske steklenice s puferom smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in pritisku  $2,34 \times 10^5$  Pa. Pufer smo uporabljali za pripravo bakterijskih suspenzij.

### 3.3 PRIPRAVLJANJE BAKTERIJSKE SUSPENZIJE

#### 3.3.1 Določanje koncentracije bakterij po McFarlandu

Standard po McFarlandu se uporablja za oceno koncentracije bakterij v suspenziji. Za določanje števila celic primerjamo optično gostoto bakterijske suspenzije z optično gostoto raztopin  $\text{BaCl}_2$  v  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Za natančnejše določanje števila celic dodatno izmerimo absorbanco bakterijske suspenzije.

Raztopine pripravimo v desetih epruvetah, ki so osnova McFarlandove lestvice (Preglednica 3). Epruvete s pripravljenimi raztopinami zamašimo z gumijastimi zamaški in jih shranimo v hladilnik pri 4 °C. Pred uporabo vsako epruveto dobro pretresememo, da premešamo usedlino.

Bakterijsko suspenzijo pripravimo v 0,01 M PBS, tako da s trdnega gojišča postrgamo bakterije in jih prenesemo v epruveto s pufrom. Suspenzijo večkrat premešamo, da je raztopina homogena.

Preglednica 3: Priprava raztopin za določanje koncentracije bakterij po McFarlandu.

McFarlandova lestvica	1 % BaCl <sub>2</sub> (mL)	1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)	Ustreza koncentraciji bakterij ( $\times 10^8$ celic na mL)
1	0,1	9,9	3,0
2	0,2	9,8	6,0
3	0,3	9,7	9,0
4	0,4	9,6	12,0
5	0,5	9,5	15,0
6	0,6	9,4	18,0
7	0,7	9,3	21,0
8	0,8	9,2	24,0
9	0,9	9,1	27,0
10	1,0	9,0	30,0

### 3.3.2 Merjenje absorbance

Motnost bakterijske suspenzije lahko natančneje ocenimo z merjenjem absorbance pri 595 nm ( $A_{595}$ ).

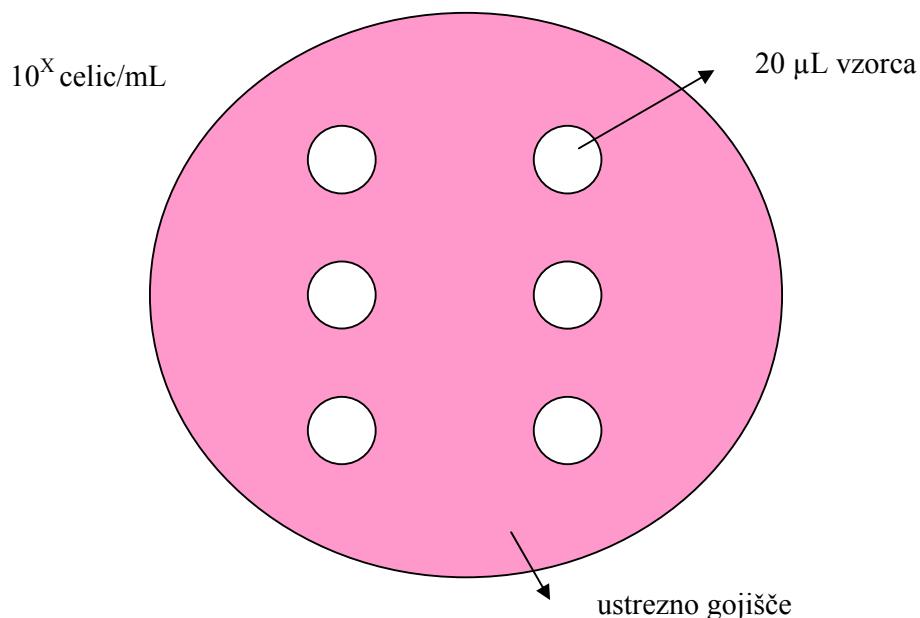
V mikrotitrsko ploščice smo v več ponovitvah nanesli 200  $\mu$ L bakterijske suspenzije, ki smo ji želeli določiti približno koncentracijo ter standard po McFarlandu. Za merjenje smo uporabili spektrofotometer Tecan Genios, za njegovo upravljanje pa program Magellan 6.4. Po končanem merjenju smo iz podatkov oblikovali umeritveno krivuljo. Iz enačbe premice smo nato izračunali, koliko pufra moramo dodati, da bo koncentracija celic v bakterijski suspenziji  $10^8$  celic/mL. Suspenzijo smo nato ustreznost redčili do koncentracije  $10^5$  celic/mL.

### 3.3.3 Določanje števila kolonij (cfu/mL)

Število kolonij določamo z nanosom bakterijskih suspenzij na ustreznega gojišča. Uporabljali smo gojišči YPGA in SMSA. Na gojišču SMSA lahko poleg zraslih kolonij opazujemo tudi njihovo tipično morfologijo in tako ugotovimo, če so kolonije virulentne ali avirulentne.

Na gojišče smo v šestih ponovitvah nanesli po  $20 \mu\text{L}$  bakterijske suspenzije. Nanašali smo bakterijske suspenzije različnih koncentracij od  $10^0$  do  $10^6$  celic/mL. Petrijevke smo shranili pri  $28^\circ\text{C}$  nekaj dni ter nato prešteli zrasle kolonije in izračunali cfu/mL.

Koncentracija:



Slika 4: Primer nanašanja vzorca bakterijske suspenzije za določanje števila kolonij (cfu/mL).

### 3.4 GOJENJE NA GOSTITELJSKIH RASTLINAH – TEST PATOGENOSTI

Kot gostiteljski rastlini za *R. solanacearum* smo uporabili paradižnik *Lycopersicon esculentum* sorte Moneymaker in Roma ter krompir *Solanum tuberosum* sorte Desirée, Igor in Sante.

#### 3.4.1 Paradižnik

Semena paradižnika sort Moneymaker in Roma smo najprej posejali v lončka in ju shranili v rastni komori RK-1H pri dnevni temperaturi 22 °C in nočni temperaturi 18 °C, osvetlitvi 5000 luksov in 16 urni fotoperiodi.

Po približno desetih dneh, ko so imeli paradižniki dva klična lista, smo jih presadili posamezno v lončke in jih pripravili za selitev v rastlinjak. Tam smo ustreznno pripravili delovno površino, jo razkužili z 70 % etanolom, zaščitili s folijo in pripravili pladnje za lončke iz folije, da bi preprečili navzkrižno kontaminacijo rastlin.

Rastline smo okužili na tri različne načine:

- Vbrizgavanje bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL. V laminariju smo po metodi McFarland in z merjenjem absorbance pri  $A_{595}$  sterilno pripravili bakterijsko suspenzijo tako, da smo z iglo postrgali z gojišča čisto bakterijsko kulturo in jo v pufru redčili do primerne koncentracije. Ko smo dosegli željeno koncentracijo bakterij  $10^5$  cfu/mL, smo z injekcijo vbrizgali približno 40  $\mu\text{L}$  suspenzije v steblo rastline med klična lista (Slika 5).
- Zalivanje z bakterijsko suspenzijo koncentracije  $10^5$  cfu/mL (5mL na rastlino), ne da bi pri tem predhodno poškodovali korenine ali steblo rastlin.
- Vbod čiste bakterijske kulture. Z gojišča smo z iglo postrgali čisto bakterijsko kulturo in jo brez redčenja vnesli neposredno v rastlino tako, da smo iglo s celicami

vbodli v steblo rastline med klična lista. Koncentracija bakterij je pri tej metodi dosti višja od koncentracije bakterijske suspenzije.



Slika 5: Vbrizgavanje bakterijske suspenzije v steblo paradižnika med klična lista.

Pri vseh treh načinih inokulacije smo uporabili tudi negativno kontrolo, kjer smo namesto suspenzije oziroma čiste kulture uporabili 0,01 M PBS pufer.

Rastline smo nato gojili v rastlinjaku (slika 6), kjer smo nastavili dnevno in nočno temperaturo na 25 °C, pri osvetlitvi 5000 luksov in pri 16 urni fotoperiodi. Nato smo od 3. do 8. dneva po inokulaciji spremljali in ocenjevali pojav bolezenskih znamenj. Za ocenjevanje bolezenskih znamenj smo uporabili lestvico po Winsteadu in Kelmanu (1952) (Preglednica 4).

Preglednica 4: Lestvica za ocenjevanje bolezenskih znamenj pri paradižniku in krompirju (Winstead in Kelman, 1952)

Ocena	Opis bolezenskih znamenj
0	ni znamenj bolezni
1	1 list ovenel
2	2 ali 3 listi oveneli
3	vsi listi razen vrha oveneli
4	vsi listi oveneli
5	propad rastline



Slika 6: Inkubacija okuženega paradižnika v rastlinjaku.

Za uspešno širjenje *R. solanacearum* po rastlini je pomembna visoka relativna vlaga nad 70 %, ki smo jo dosegli s poplavljanjem pladnjev v rastlinjaku.

### 3.4.2 Krompir

Rastline krompirja smo vzgojili iz tkivnih kultur ter jih nato prestavili v rastno komoro. V fazi, ko so rastline razvile 2 do 3 liste, smo jih prestavili v rastlinjak in jih za inokulacijo z bakterijo pripravili na enak način kot paradižnik.

V laminariju smo pripravili bakterijsko suspenzijo  $10^5$  cfu/mL (ozioroma  $10^6$  pri enem testu). Kot negativno kontrolo smo uporabili 0,01 M PBS pufer.

Krompir smo inokulirali z:

- Vbrizgavanjem bakterijske suspenzije (približno 40  $\mu$ L) v steblo rastline, ki smo jo pripravili na enak način kot pri inokulaciji paradižnika..
- Vbodom čiste kulture *R. solanacearum*, ki smo jo z iglo postrgali z gojišča ter brez redčenja vnesli neposredno v steblo rastline.



Slika 7: Prikaz mesta vboda na krompirju.

Nato smo rastline gojili v rastlinjaku pri dnevni temperaturi 28 °C, nočni temperaturi 25 °C, osvetlitvi 5000 luksov in pri 16 urni fotoperiodi (Slika 8). Naslednjih 14 dni smo spremljali pojavljanje bolezenskih znamenj, predvsem v prvem tednu, ko je napredek bolezni najhitrejši.



Slika 8: Inkubacija okuženega krompirja v rastlinjaku.

### 3.5 NAČIN OCENJEVANJA BOLEZENSKIH ZNAMENJ

Po inokulaciji rastlin z bakterijo, smo od 2. do 8. dne spremljali pojavljanje bolezenskih znamenj. Za ocenjevanje bolezenskih znamenj smo uporabili lestvico po Winsteadu in Kelmanu (1952) (Preglednica 4). Merili smo tudi višino rastlin in šteli liste, vendar se metoda ni izkazala za učinkovito, zato smo jo pri nadaljnjih eksperimentih opustili.



Slika 9: Prikaz bolezenskih znamenj pri paradižniku (lestvica bolezenskih znamenj od 1 do 5).



Slika 10: Primer bolezenskih znamenj pri krompirju v primerjavi z negativno kontrolo.

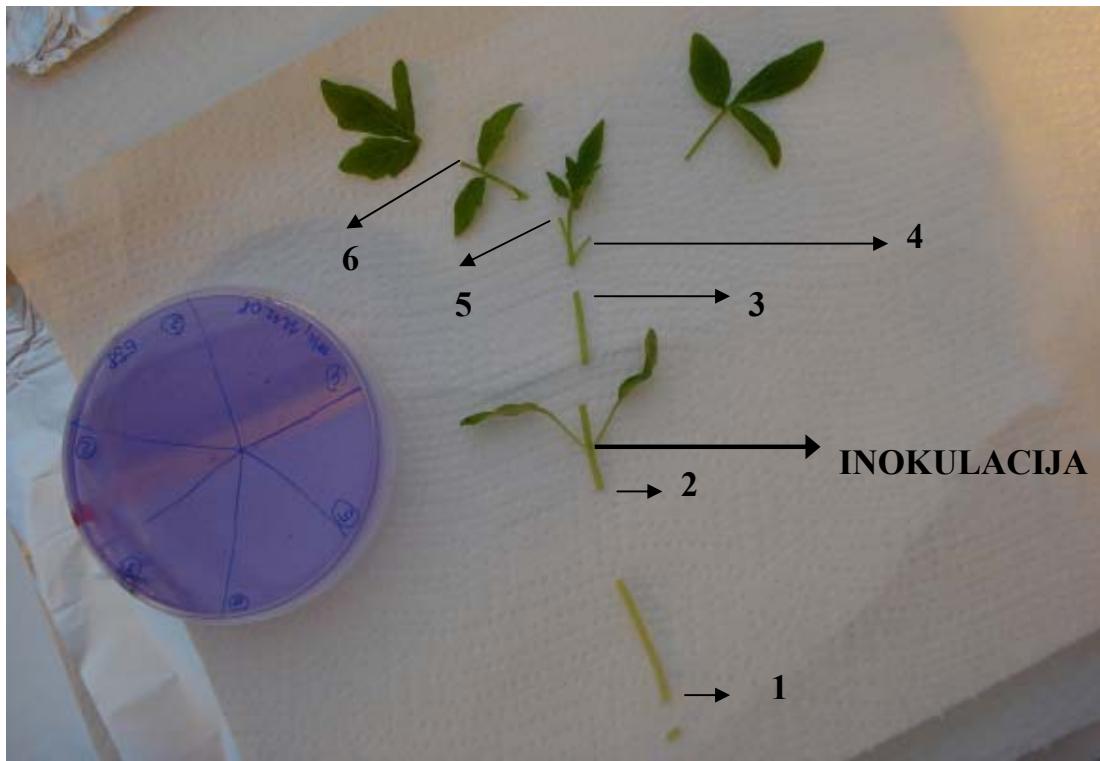


Slika 11: Primerjava bolezenskih znamenj pri krompirju. (levo so rastline brez bolezenskih znamenj-0 po lestvici ocenjevanja, desno so propadle rastline-5 stopnja po lestvici)

### 3.6 ODTIS PARADIŽNIKA NA SMSA GOJIŠČU

Po inokulaciji paradižnika z bakterijsko suspenzijo, smo 2., 3., 4. in 7 dan naredili odtis posameznih delov rastline na gojišču, da smo časovno spremljali širjenje *R. solanacearum* po rastlini. Predvidevali smo, da se bakterija širi po steblu navzgor, zato smo tudi vzorčili od spodaj navzgor ter sproti ožigali skalpel, da ne bi prišlo do kontaminacije.

Ustrezno smo pripravili delovno površino, pribor za vzorčenje ter ploščo z gojiščem, ki smo jo razdelili na šest delov. Izbrali smo rastlino in jo v sterilnih razmerah s skalpelom, ki smo ga sproti ožigali, da bi preprečili prenos bakterij, odrezali tik nad zemljo. Rastlino smo po površini razkužili s 70 % etanolom, da smo se znebili drobcev zemlje in drugih bakterij ter gliv. Nato smo jo od spodaj navzgor po steblu razrezali na šestih mestih (Slika 12) ter posamezne dele odtisnili na selektivno gojišče. Plošče z odtisi smo shranili pri 28 °C. V primeru, da je bila bakterija prisotna v določenem delu rastline, je kot pozitiven rezultat zrasla kolonija na gojišču. Na podlagi tega smo nato sklepali kako se bakterija širi po rastlini.



Slika 12: Prikaz mest na paradižniku, kjer smo delali odtise na ploščo z gojiščem.

Mesta na rastlini, kjer smo delali odtise na plošče z gojiščem:

1. tik nad zemljo (spodnji del stebla)
2. 1 cm pod mestom inokulacije
3. tik pod prvim nodijem
4. 0,5 cm od začetka peclja manjšega lista
5. 0,5 cm od začetka peclja večjega lista
6. na koncu peclja večjega lista.

### 3.7 OBDELAVA PODATKOV

Za obdelavo podatkov smo uporabljali statistični program R, ki je prosto dostopen na svetovnem spletu in ga razvija skupina-R. (WU, 2009)

Program se uporablja za manipulacijo s podatki, izračun in grafični prikaz. Na grafu se z vmesnimi presledki izrišejo okvirji z ročaji, ki jasno prikazujejo razpršenost in asimetričnost podatkov ter opredelijo osamelce. V statistiki so takšni grafi z okvirji priročen način za grafični prikaz številčnih podatkov. Na okvirju z ročajem se izriše 5 vrednosti:

1. najmanjša vrednost
2. spodnji kvartil (Q1): to je vrednost od katere je 25 % vrednosti slučajne spremenljivke manjših in 75 % vrednosti večjih od vrednosti kvartila
3. mediana oz. srednja vrednost (Q2): ta kvartil razdeli populacijo na dva enaka dela; polovica podatkov (dve četrtini) vrednosti slučajne spremenljivke je manjših in druga polovica (dve četrtini) podatkov je večjih od vrednosti kvartila.
4. zgornji kvartil (Q3): to je vrednost od katere je tri četrtine vrednosti slučajne spremenljivke manjših in ena četrtina večjih od vrednosti kvartila.
5. največja vrednost.

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI GOJENJA NA GOSTITELJSKIH RASTLINAH – TEST PATOGENOSTI

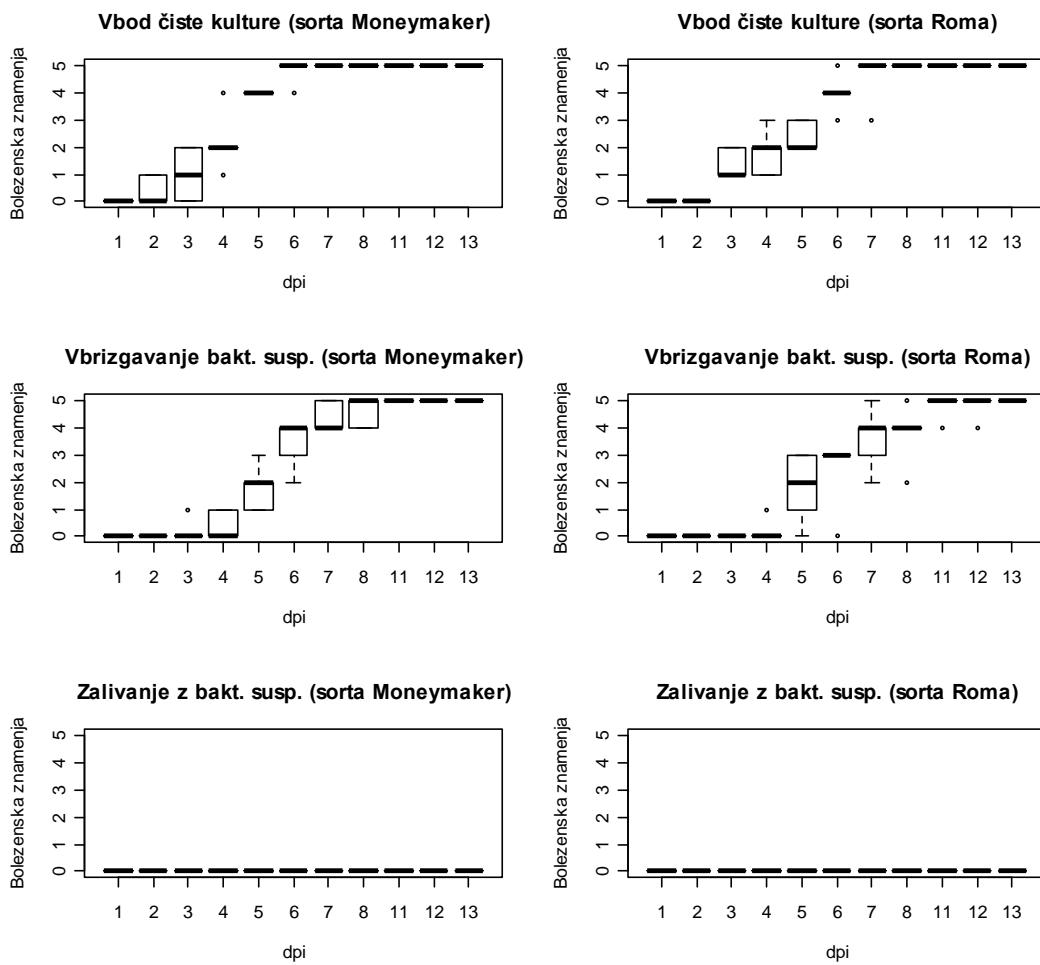
#### 4.1.1 Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku

Testne rastline paradižnika so bile na stopnji rasti z dvema ali tremi pravimi listi. Za vrednotenje bolezenskih znamenj smo uporabili lestvico po Winsteadu in Kelmanu (1952). (Preglednica 4)

Za bakterijsko koncentracijo  $10^5$  cfu/mL smo se odločili na podlagi preliminarnih testov (Skubic, 2007), ki so pokazali, da je to najnižja koncentracija bakterij, s katero dosežemo razvoj bolezenskih znamenj pri vseh rastlinah v testni skupini. Če želimo podaljšati čas napredovanja bolezenskih znamenj, moramo izbrati nižjo koncentracijo bakterije ter rastline inkubirati pri nižji temperaturi in nižji stopnji vlažnosti. Ker smo želeli, da bolezenska znamenja na testnih rastlinah postopoma napredujejo, smo okužene rastline inkubirali pri stalni temperaturi  $25^{\circ}\text{C}$  ter visoki vlažnosti.

Za vsak način inokulacije smo testirali 5 rastlin ter 3 rastline za negativno kontrolo. Rastline smo zaporedoma pregledovali 8 dni po inokulaciji ter 11. in 12. dan. Rezultati so prikazani v poglavju Priloge v Prilogi A in Prilogi B.

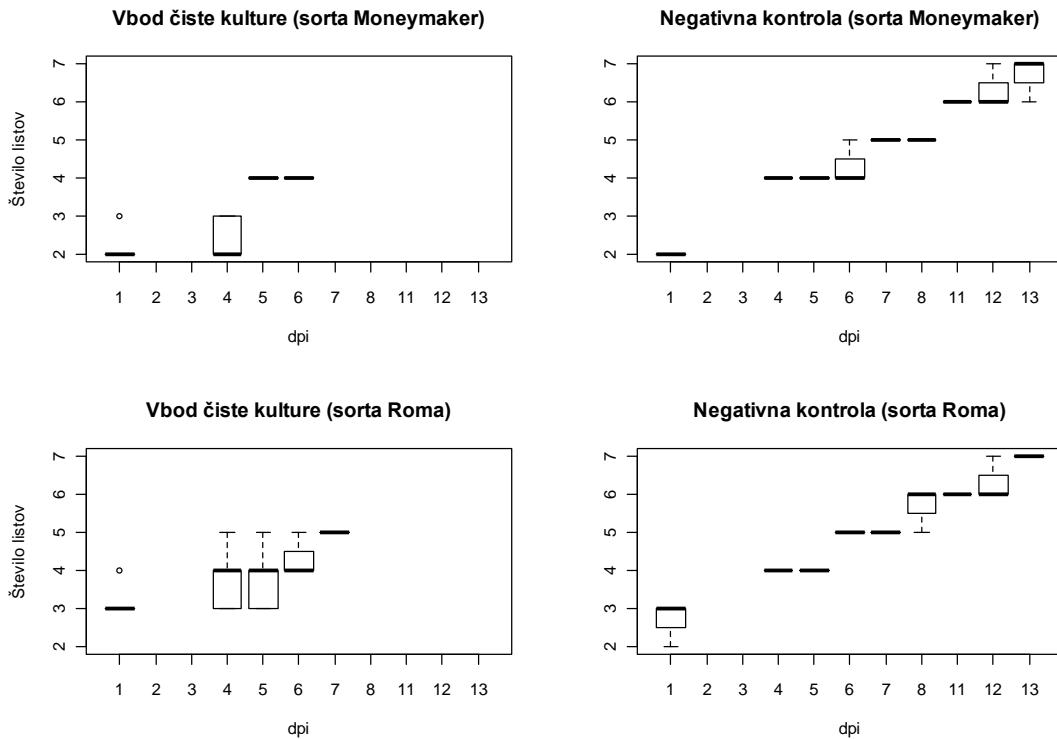
Na podlagi dobljenih rezultatov (Priloga A in B v poglavju Priloge) smo lahko primerjali učinkovitost različnih metod okuževanja rastlin ter katera sorta se uspešneje bori s patogeno bakterijo. Rezultati iz Priloge A in B so prikazani na Sliki 13.



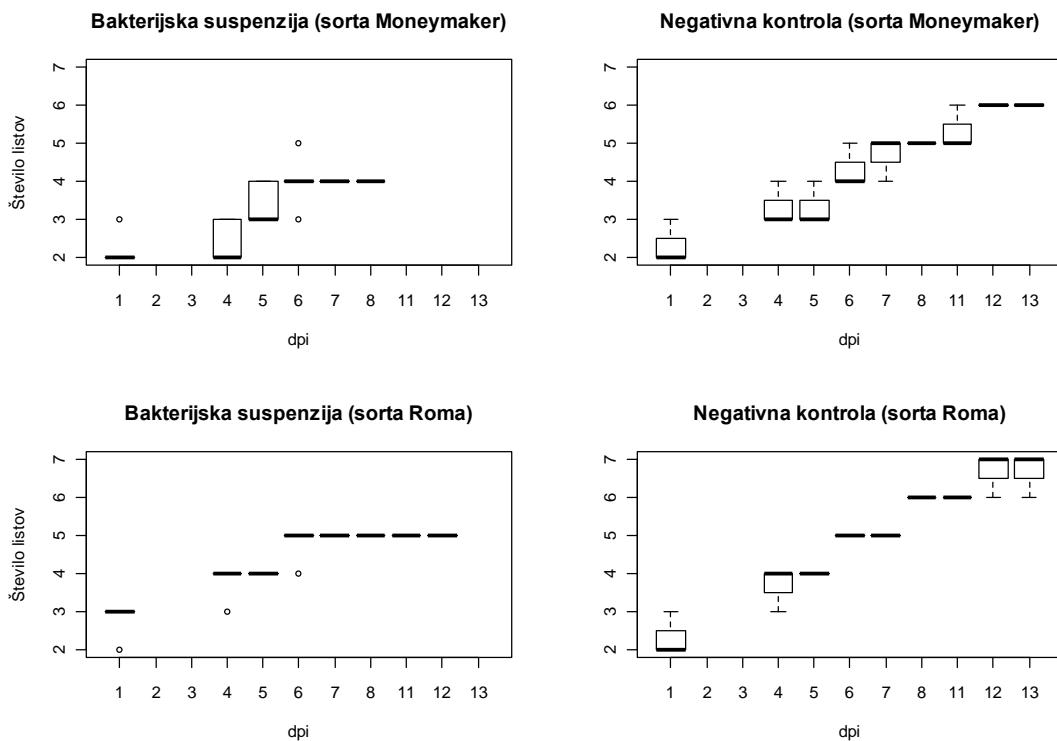
Slika 13: Primerjava različnih metod inokulacije rastlin pri dveh različnih sortah paradižnika. dpi-dnevi po okužbi.

Rastline negativne kontrole niso kazale bolezenskih znamenj. Na podlagi dobljenih rezultatov smo testne rastline, ki so bile okužene z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo koncentracije  $10^5$  cfu/mL ponovno zalili, vendar se rezultati niso spremenili. Ker metoda z zalivanjem ni bila učinkovita, smo jo pri nadaljnjih testih patogenosti *R. solanacearum* opustili in testirali le metodi vboda čiste kulture in vbrizgavanje bakterijske suspenzije neposredno v steblo rastline. Poleg bolezenskih znamenj smo spremajali tudi višino rastlin in šteli liste. Višino rastlin smo merili od zemlje do vrha rastline.

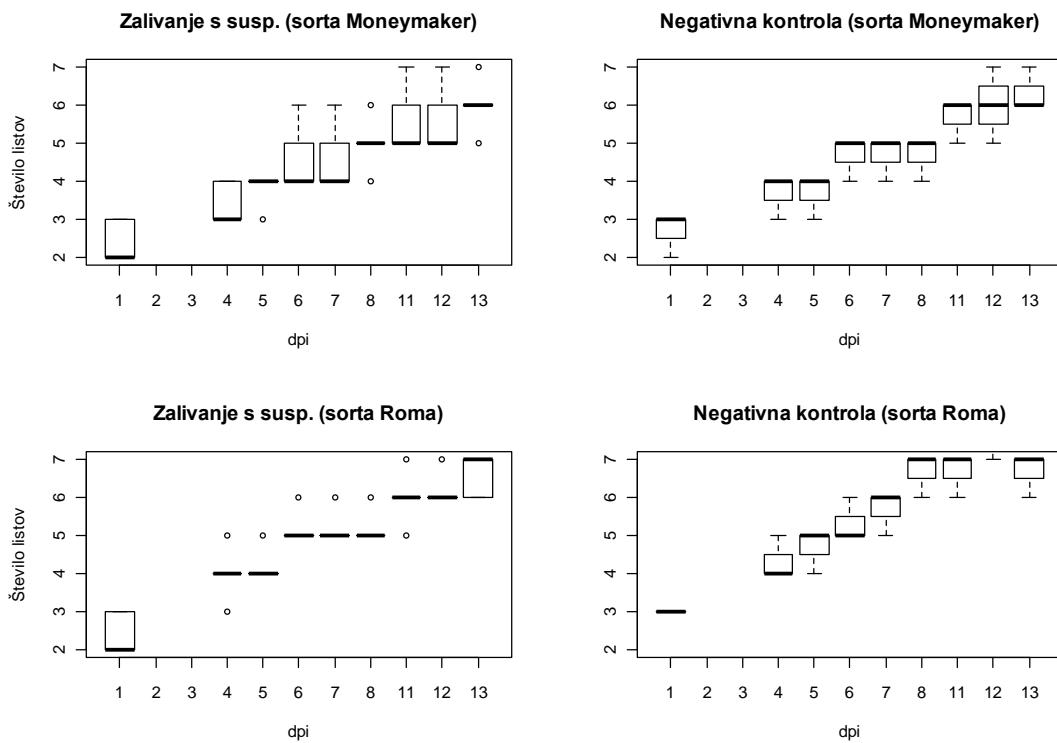
Podatki za število listov in višino rastlin pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku Moneymaker in Roma so prikazani v poglavju Priloge v Prilogi C ter D.



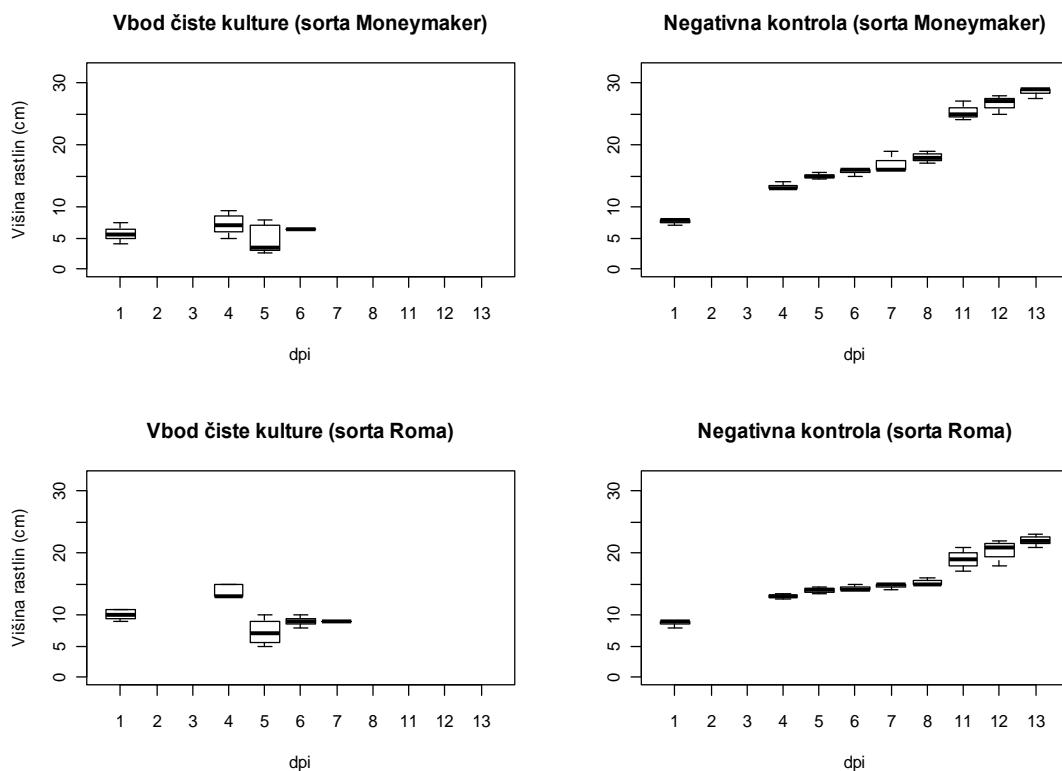
Slika 14: Število listov pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma, po okužbi rastlin z vodom čiste kulture (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec). dpi-dnevi po okužbi.



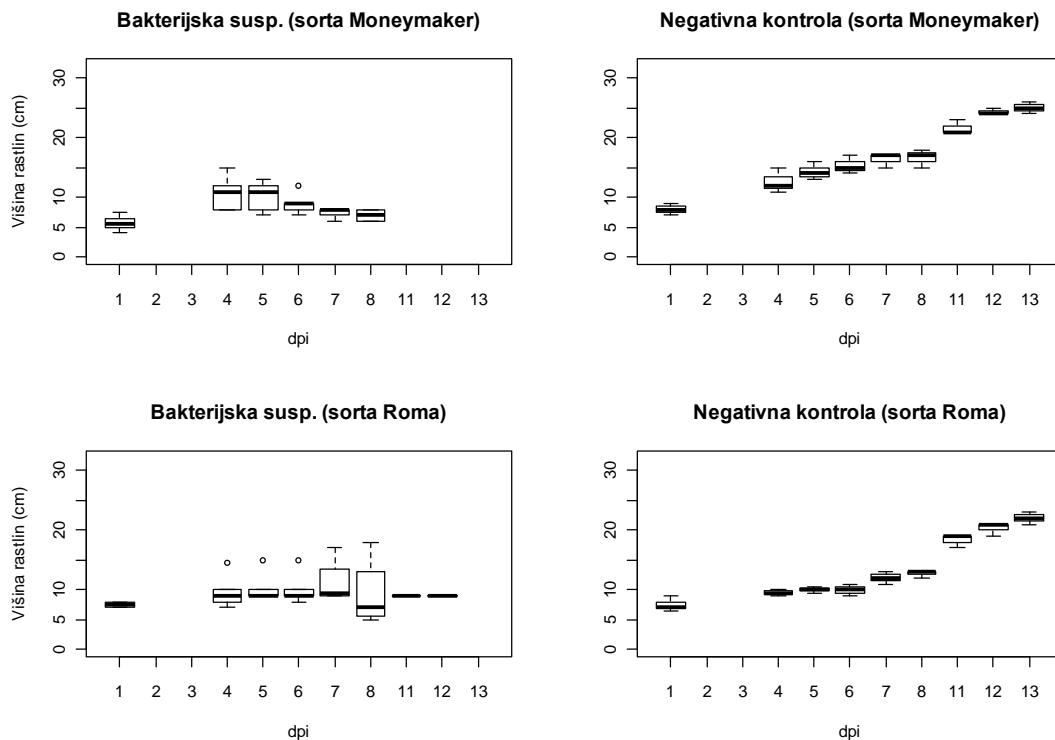
Slika 15: Število listov pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma po okužbi rastlin z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec). dpi-dnevi po okužbi



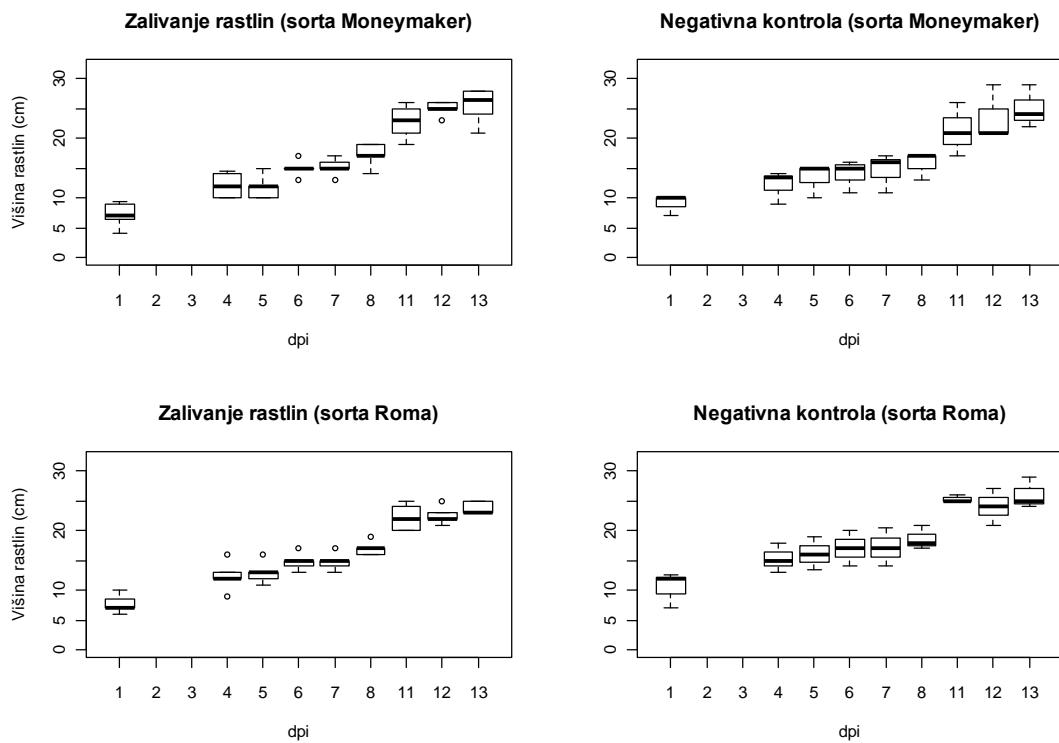
Slika 16: Število listov pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma po okužbi rastlin z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo koncentracije  $10^5$  cfu/mL (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec). dpi-dnevi po okužbi.



Slika 17: Višina rastlin pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma, po okužbi rastlin z vbodom čiste kulture (desni stolpec) in pri negativni kontroli (levi stolpec). dpi-dnevi po okužbi.



Slika 18: Višina rastlin pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma po okužbi rastlin z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec). dpi-dnevi po okužbi.



Slika 19: Višina rastlin pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma po okužbi rastlin z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo koncentracije  $10^5$  cfu/mL (levi stolpec) in pri negativni kontroli (desni stolpec). dpi-dnevi po okužbi.



Slika 20: Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte MoneyMaker, 5. dan po inokulaciji. Levo rastline okužene z vbodom čiste kulture, na sredini z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije, desno z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo.



Slika 21: Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Roma, 5. dan po inokulaciji. Levo rastline inokulirane z vbodom čiste kulture, na sredini z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije, desno z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo.



Slika 22: Bolezenski znaki pri paradižniku sorte Moneymaker, okuženim z vbodom čiste kulture. Levo obolela rastlina-vsi listi razen vrha oveneli, desno negativna kontrola, 5. dan po inokulaciji.



Slika 23: Bolezenski znaki pri paradižniku sorte Moneymaker in Roma, okuženim z vbodom čiste kulture. Levo paradižnik sorte Moneymaker, desno paradižnik sorte Roma, 5. dan po inokulaciji.



Slika 24: Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker , 11. dan po inokulaciji. Levo rastline okužene z vbodom čiste kulture, na sredini z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije, desno z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo.



Slika 25: Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Roma, 11. dan po inokulaciji. Levo rastline okuženene z vbodom čiste kulture, na sredini z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije, desno z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo.



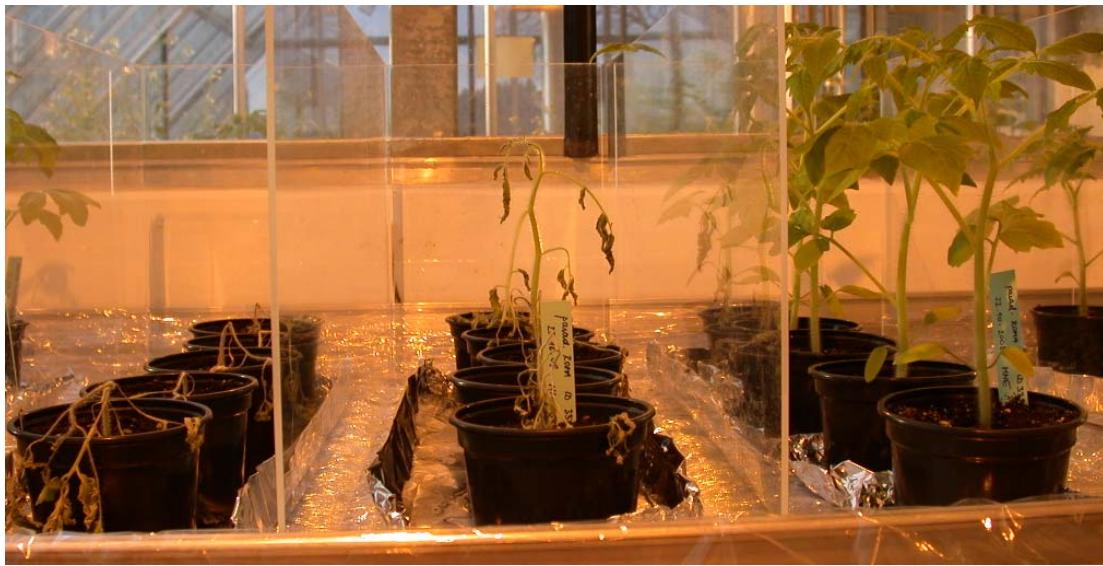
Slika 26: Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker, 11. dan po inokulaciji. 1- rastline okužene z vbodom čiste kulture, 2- z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije, 3- z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo, 4- negativna kontrola.



Slika 27: Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Roma, 11. dan po inokulaciji. 1-rastline okužene z vbodom čiste kulture, 2- z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije, 3- z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo, 4- negativna kontrola.



Slika 28: Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker , 11. dan po inokulaciji. Levo rastline okužene z vbodom čiste kulture, na sredini z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije, desno z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo.



Slika 29: Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Roma, 11. dan po inokulaciji. Levo rastline okužene z vbodom čiste kulture, na sredini z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije, desno z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo.

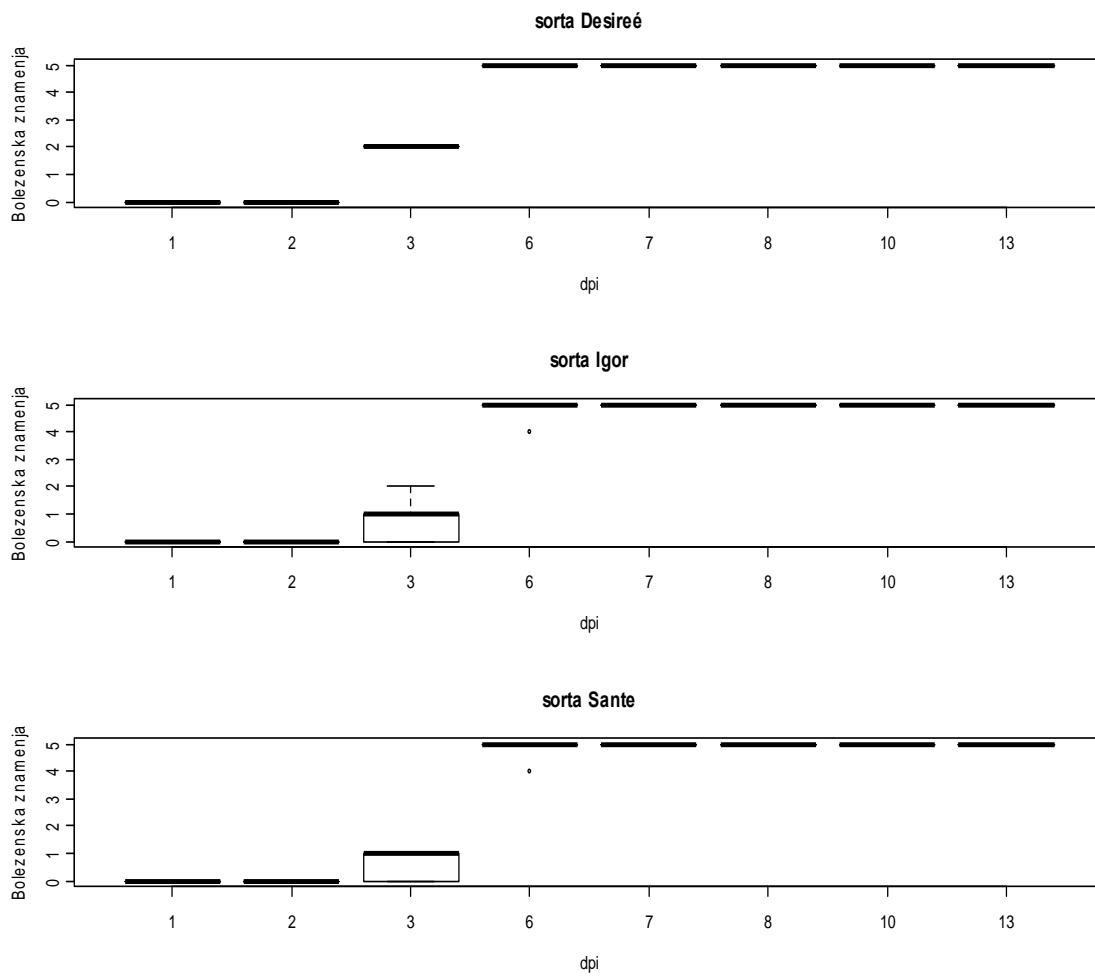
#### 4.1.2 Test patogenosti *R. solanacearum* na krompirju

Za preučevanje vpliva patogene bakterije *R. solanacearum* na testne rastline, smo uporabili krompir (*Solanum tuberosum*) sorte Desireé, Igor in Sante. Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili pri testu patogenosti na paradižniku, smo se odločili, da rastline okužimo le z vbodom čiste bakterijske kulture in z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije  $10^5$  cfu/mL neposredno v steblo rastline. Ker smo podobno kot pri gojenju paradižnika žeeli opazovati hiter odziv rastlin, smo okužene testne rastline inkubirali pri temperaturi od 25-28 °C in visoki vlažnosti zraka. Ugotovili smo, da se pojavljajo manjše razlike pri različnih sortah v odgovoru na okužbo.

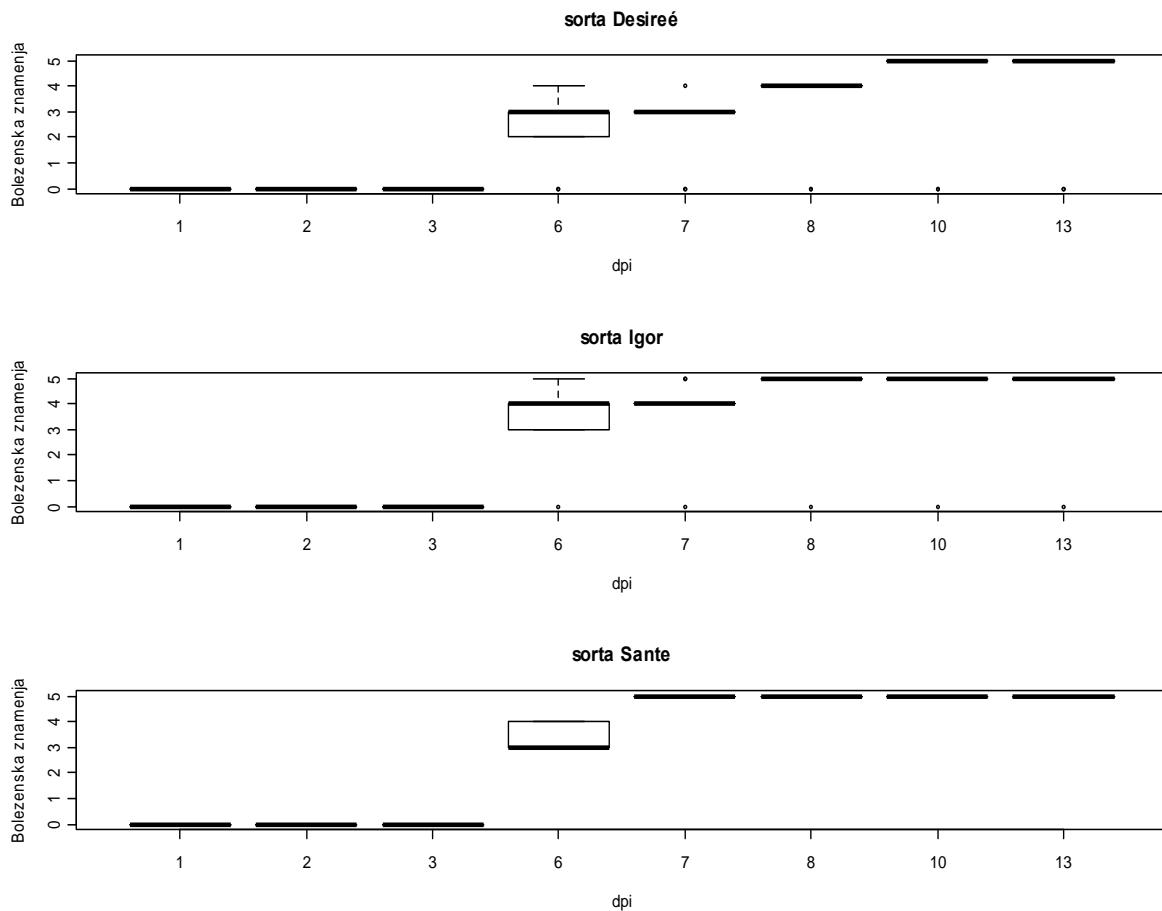
Poleg tega, da smo spremljali odziv rastlin glede na različni metodi okuževanja in odziv posameznih sort krompirja, smo žeeli tudi primerjati, kako se rastlina odzove, če jo okužimo pri različni starosti. Tako smo nekaj testnih rastlin sorte Desireé okužili pri starosti 2 tednov, ostale rastline pa pri starosti 3 tednov. Rastline sorte Igor in Sante smo okužili le pri starosti 2 tednov, ko so bile na stopnji rasti 2 ali 3 pravih listov.

Pri metodi okuževanja z vbodom čiste kulture smo za vsako sorto krompirja imeli 5 testnih rastlin ter 2 negativni kontroli. Pri okuževanju z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije smo pri vsaki sorti krompirja testirali 10 rastlin in 3 negativne kontrole (izjema je bil Sante, kjer smo testirali 5 rastlin in 3 negativne kontrole). Enako število testnih rastlin smo imeli tudi pri sorti Desireé, ki je bila ob okužbi stara 3 tedne. Rastline stare 2 tedna, smo pregledovali 1., 2., 3., 6., 7., 8., 10. in 13 dan po inokulaciji, rastline stare 3 tedne pa 1., 3., 4., 6., 7., 9. in 13. dan po inokulaciji. Ugotovili smo, da starost rastlin ob inokulaciji nima vpliva na poznejše izražanje bolezenskih znamenj, saj se le-ta pri testnih rastlinah obeh skupin niso bistveno razlikovala.

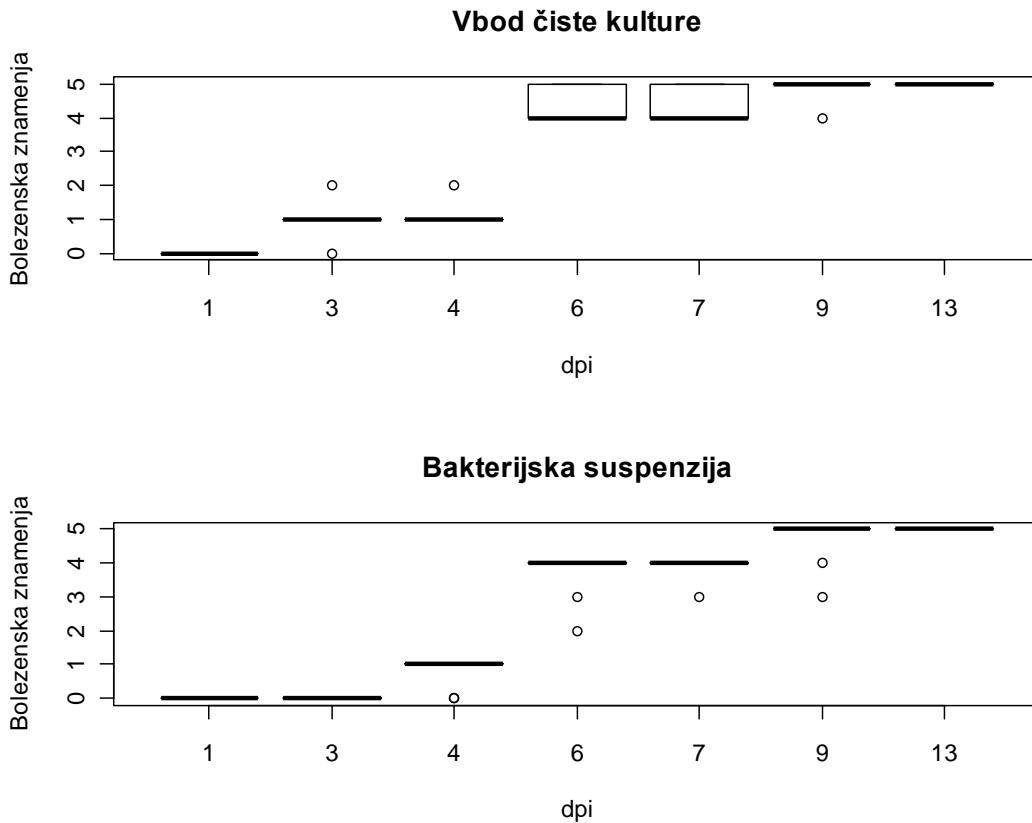
Bolezenska znamenja smo ocenjevali po lestvici Winsteeda in Kelmana (1952) (Preglednica 4). Rezultati testa patogenosti so prikazani v poglavju Priloge, v Prilogi E, F in G. Negativne kontrole pri vseh rastlinah niso kazale bolezenskih znamenj.



Slika 30: Primerjava bolezenskih znamenj pri sortah krompirja, ki so bile okužene z vbodom čiste kulture dva tedna po presaditvi. dpi-dnevi po okužbi.

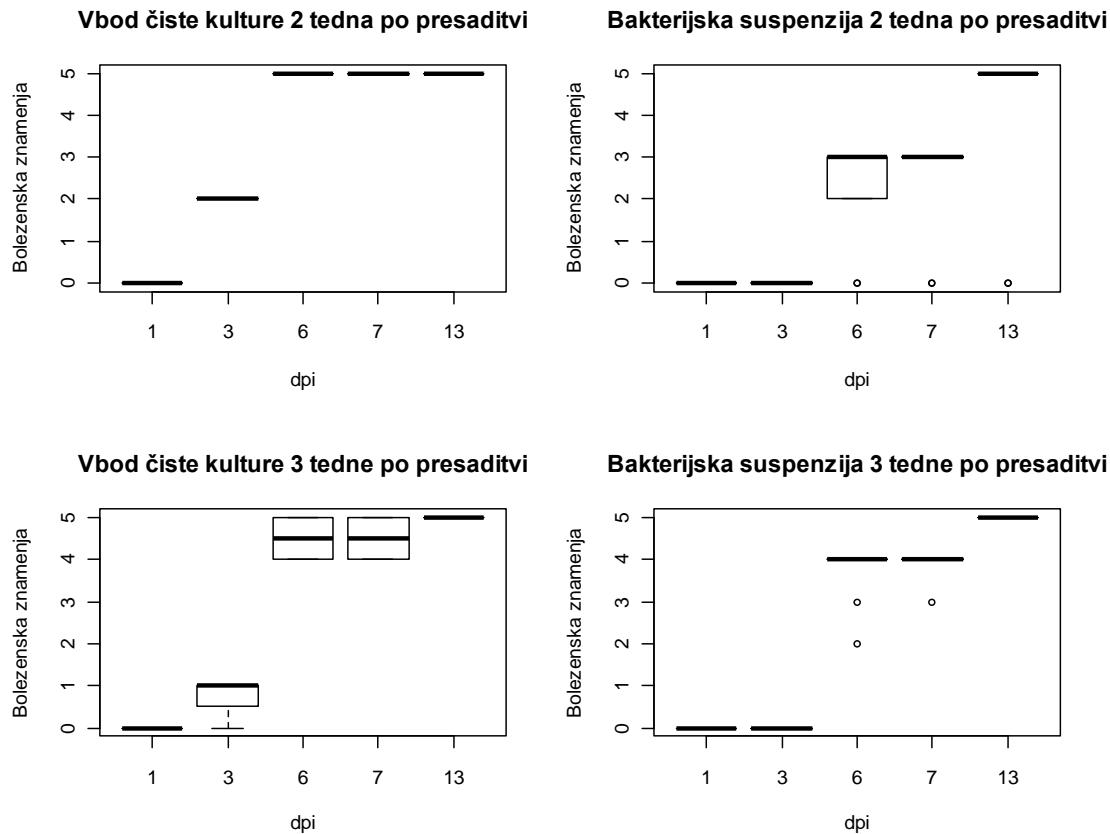


Slika 31: Primerjava bolezenskih znamenj pri sortah krompirja, ki so bile okužene z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL dva tedna po presaditvi. dpi-dnevi po okužbi.



Slika 32: Primerjava bolezenskih znamenj pri sorti Desireé, ki je bila okužena z vbodom čiste kulture ter z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/ mL tri tedne po presaditvi. dpi-dnevi po okužbi.

Za lažjo primerjavo napredovanja bolezenskih znamenj pri rastlinah sorte Desireé različnih starosti, so v poglavju Priloge v Prilogi H rezultati predstavljeni glede na iste dneve opazovanja in ocenjevanja rastlin.



Slika 33: Primerjava napredovanja bolezenskih znamenj pri sorti Desireé, ki je bila okužena z vodom čiste kulture ter vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL, dva tedna (zgornji del slike) oziroma tri tedne (spodnji del slike) po presaditvi, glede na isti dan ocenjevanja bolezenskih znamenj. dpi, dnevi po okužbi.



Slika 34: Test patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Desireé. Levo rastlina okužena z vbodom čiste kulture, desno negativna kontrola, starost rastlin 2 tedna, 6. dan po inokulaciji.



Slika 35: Test patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Igor. Levo rastlina okužena z vbodom čiste kulture, desno negativna kontrola, starost rastlin 2 tedna, 6. dan po inokulaciji.



Slika 36: Test patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Sante. Levo rastlina okužena z vbodom čiste kulture, desno negativna kontrola, starost rastlin 2 tedna, 6. dan po inkulaciji.

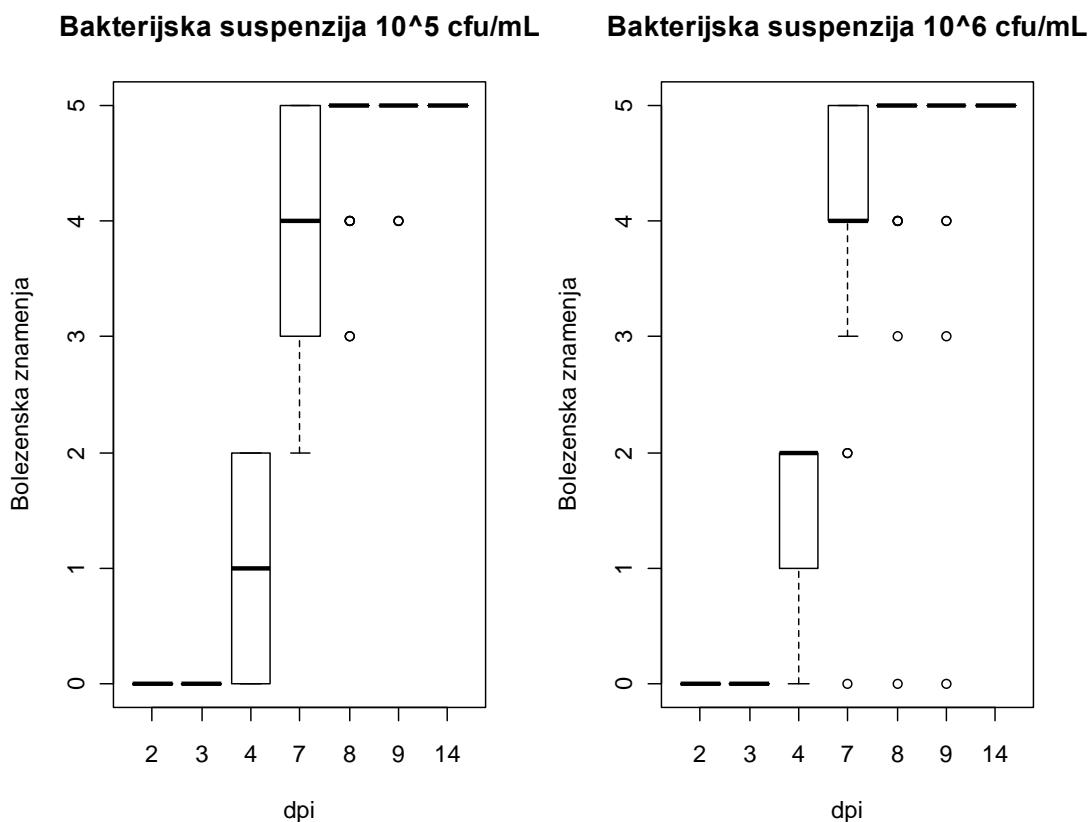
#### **4.1.3 Test patogenosti *R. solanacearum* pri krompirju sorte Desireé – primerjava odziva testnih rastlin glede na različno koncentracijo bakterij**

Ker se v predhodnih poskusih na krompirju niso izrazila bolezenska znamenja pri vseh testnih rastlinah, smo poleg učinkovitosti bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL želeli še preveriti odziv rastlin na okužbo z bakterijsko koncentracijo  $10^6$  cfu/mL.

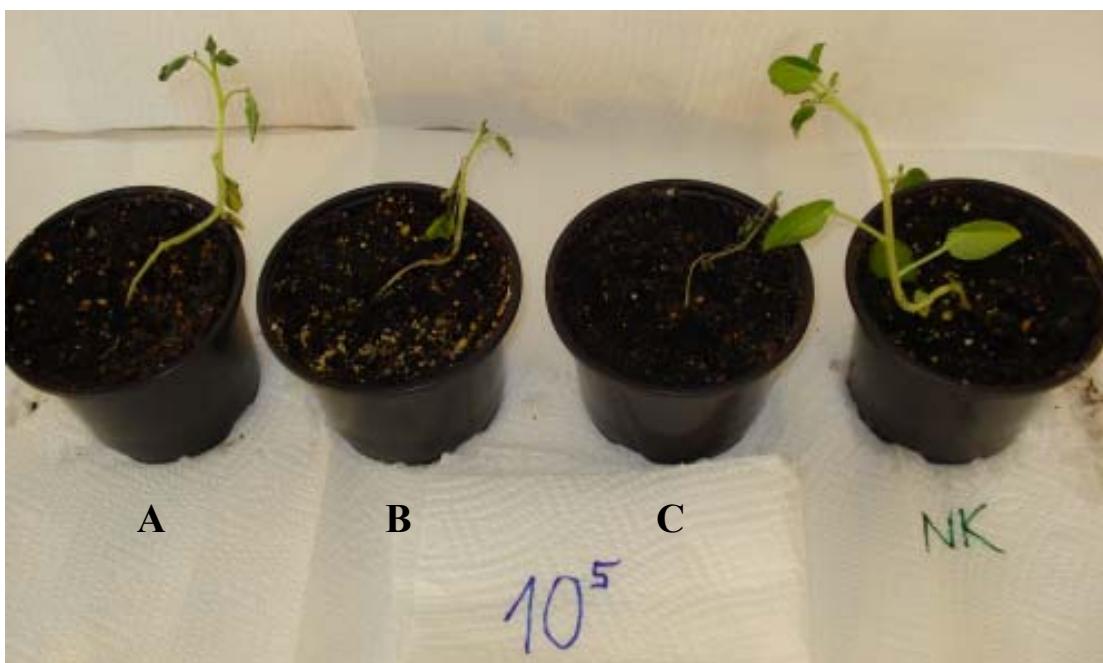
Pripravili smo 30 testnih rastlin krompirja sorte Desireé za posamezno koncentracijo, od katerih je pri vsaki seriji bilo pet rastlin namenjenih negativni kontroli. Glede na prejšnji poskus okuževanja rastlin pri dveh različnih starostih smo se odločili, da rastline okužimo pri starosti dveh tednov, ker so mlajše, manjše, manj razvite in najverjetneje bolj dovetne za okužbo. Ustrezno smo pripravili delovno površino in rastline okužili z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  ter  $10^6$  cfu/mL v steblo med klična lista. Rastline smo inkubirali v rastlinjaku pri temperaturi 25-28 °C ter visoki vlažnosti zraka. Po

pričakovanju so bolezenska znamenja napredovala hitreje pri testnih rastlinah, okuženih z višjo koncentracijo bakterij.

Bolezenska znamenja, ki smo jih opazovali 2., 3., 4., 7, 8., 9. ter 14. dan po inokulaciji, so prikazana v poglavju Priloge v Preglednici I in J.



Slika 37: Primerjava bolezenskih znamenj pri testu patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Desireé, okuženim z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL (slika levo) ter koncentracije  $10^6$  cfu/mL (slika desno). dpi, dnevi po inokulaciji.



Slika 38: Test patogenosti na krompirju sorte Desireé, okuženim z bakterijsko suspenzijo koncentracije  $10^5$  cfu/mL, glede na različne stopnje bolezenskih znamenj. (A- 3, B- 4, C- 5, NK-negativna kontrola).



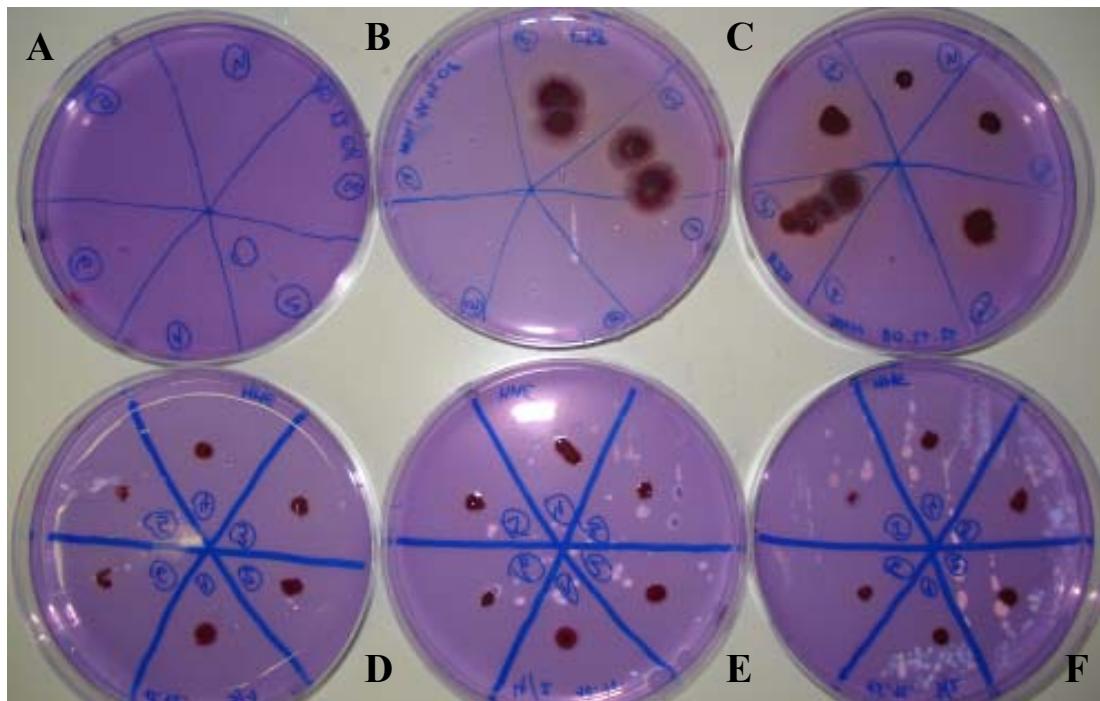
Slika 39: Očitno venenje listov krompirja, ki ga povzroča *R. solanacearum*.

## 4.2 ODTIS PARADIŽNIKA NA SMSA GOJIŠČU

Za spremljanje potovanja *R. solanacearum* po gostiteljski rastlini smo testno rastline paradižnika razrezali na več mestih (Slika 12) ter rastlino odtisnili na SMSA gojišče, kjer je ob morebitni prisotnosti bakterije po nekaj dneh zrasla kolonija. Test smo delali 2., 3., 4. in 7. dan po inokulaciji rastline z bakterijo na rastlinah, ki so po lestvici ocenjevanja kazale bolezenska znamenja stopnje 3 in 4. Rezultati so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Prikaz rezultatov testa z odtisom. +, kolonija na gojišču SMSA; dpi, dnevi po okužbi.

Del rastline, ki smo ga odtisnili	2 dpi	3dpi	4 dpi	7dpi
tik nad zemljo (spodnji del steba)	-	-	-	+
1 cm pod mestom inokulacije	-	+	+	+
tik pod prvim nodijem	-	+	+	+
0,5 cm od začetka peclja manjšega lista	-	-	+	+
0,5 cm od začetka peclja večjega lista	-	-	+	+
na koncu peclja večjega lista.	-	-	+	+



Slika 40: Odtis različnih delov rastline paradižnika na plošči SMSA glede na različne dneve po inokulaciji bakterije (dpi). (A: 2. dpi, B: 3. dpi, C: 4. dpi, D,E,F: 7. dpi).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Test patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku

5.1.1.1 Odziv različnih sort testnih rastlin paradižnika (Moneymaker in Roma) na različne načine inokulacije

Za najučinkovitejši način inokulacije bakterij se je izkazala metoda vboda čiste bakterijske kulture, saj so rastline sorte Moneymaker kot rastline sorte Roma začele hitro kazati bolezenska znamenja (Slika 13). Ta način inokulacije je tako učinkovit, saj dejansko vnesemo v rastlino precej večjo koncentracijo bakterij kot pri inokulaciji z bakterijsko suspenzijo. Pri rastlinah sorte Moneymaker se je venenje rastlin začelo že drugi dan po inokulaciji, pri Romi pa tretji dan. Rastline so pri sorti Moneymaker popolnoma propadle že sedmi dan po inokulaciji, pri sorti Roma pa dan pozneje. Predvsem pri sorti Moneymaker je opaziti hiter preskok bolezenskih znamenj iz stopnje 2 do stopnje 5, medtem ko so bolezenska znamenja pri sorti Roma napredovala enakomerneje. Ali je sorta Moneymaker res bolj občutljiva od Rome z gotovostjo težko trdimo, saj smo na posamezno testno skupino imeli le pet testnih rastlin. Rastline negativne kontrole pri nobeni izmed skupin pri vseh načinih inokulacije niso kazale bolezenskih znamenj.

Pri inokulaciji z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL so se bolezenska znamenja pojavila četrti in pet dan po inokulaciji rastlin (Slika 13). Pri obeh sortah so bolezenska znamenja napredovala enakomerneje kot pri inokulaciji z vbodom čiste kulture. To smo tudi pričakovali, saj so že preliminarni testi Skubic (2007) pokazali, da je koncentracija  $10^5$  najnižja, pri kateri se pojavi bolezenska znamenja pri vseh testnih rastlinah in kjer lahko spremljamo enakomerno propadanje rastlin zaradi delovanja patogene bakterije. Spet so podobno kot pri inokulaciji z vbodom čiste kulture bolezenska znamenja za en dan hitreje napredovala pri sorti Moneymaker. Pri sorti Roma so rastline še osmi dan po inokulaciji kazale bolezenska znamenja stopnje 2 po lestvici ocenjevanja (Preglednica 4), torej so imele rastline 2 do 3 uvele liste, medtem ko so imele rastline sorte

Moneymaker uvele vse liste ali so popolnoma propadle. Pri sorti Moneymaker rastline po osmem dnevu po inokulaciji popolnoma propadejo, medtem ko je pri sorti Roma bilo prisotnih nekaj izjem, ki so morda posledica neenakomerne inokulacije in so vse rastline propadle šele trinajsti dan po inokulaciji.

Zalivanje testnih rastlin z bakterijsko suspenzijo  $10^5$  cfu/mL se je izkazalo za neuspešno pri obeh sortah paradižnika (Slika 13). Ko po 13 dnevih po inokulaciji še ni bilo vidnega nobenega bolezenskega znamenja, smo rastline ponovno zalili z bakterijsko suspenzijo in jih še 14 dni pustili v rastlinjaku, vendar kljub temu ni prišlo do pojava bolezenskih znamenj. Pričakovali smo, da bo bakterija v rastlino vstopila skozi korenine, saj so že Roberts in sod. (2004) ugotovili, da lahko bakterija v rastlino vstopa tudi preko korenin in rastnih razpok. Morda bi morali rastline inkubirati dlje časa ali uporabiti višjo koncentracijo bakterijske suspenzije. Poleg tega je bil to edini način inokulacije rastlin z bakterijo, ko nismo bakterije neposredno vnesli v rastlino, temveč le na zunanjost rastline. Pri ostalih dveh načinih inokulacije smo bakterijo vnesli neposredno v steblo rastline. Ko bakterija enkrat vdre v žilni sistem, jo vodni tok potegne navzgor in se lahko neomejeno razširi po rastlini. (Yao in Allen, 2006). Ena izmed možnosti je, da bi inokulirali rastni substrat, inkubirali nekaj dni kot so to storili Pradhanang in sodelavci (2003) in vanj posadili sadike paradižnika.

#### 5.1.1.2 Spremljanje števila listov

Pri načinu inokulacije z vbodom čiste kulture so ob začetku testa rastline obeh sort imele dva do tri prave liste (Slika 14). Pri sorti Moneymaker so rastline do šestega dne po inokulaciji razvile štiri liste, medtem ko so rastline negativne kontrole imele že vsaj pet listov. Po 6. dnevu so rastline testne skupine že propadle. Pri Romi so rastline do sedmega dne po inokulaciji razvile pet listov, prav toliko listov je razvila skupina negativne kontrole. Opazili smo, da med sortama ni bistvene razlike glede rasti oziroma razvoja listov, saj so testne rastline sorte Roma že na začetku testa imele po en list več od sorte Moneymaker. Tudi če primerjamo negativno kontrolo obeh sort vidimo, da ni velikih razlik, saj so do konca testa do trinajstega dne po inokulaciji, ko so propadle že vse testne rastline, rastline negativne kontrole obeh sort razvile šest do sedem listov.

Tudi pri inokulaciji z bakterijsko suspenzijo so rastline sorte Roma ob začetku testa imele razvit list več od sorte Moneymaker, pri kateri je večina rastlin imela dva lista (Slika 15). Do osmega dne po inokulaciji, ko so propadle že skoraj vse rastline, so rastline sorte Moneymaker razvile štiri liste, medtem ko so rastline negativne kontrole imele pet listov. Pri Romi je bilo do dvanajstega dne po inokulaciji razvitih pet listov, medtem ko so imele rastline negativne kontrole šest do sedem listov. Med sortama po številu listov ni razlike, razlikujeta se pa po razvoju bolezenskih znamenj glede na način inokulacije. Predvsem pri sorti Roma se pri inokulaciji z bakterijsko suspenzijo listi razvijajo hitreje, saj so tudi bolezenski znaki v primerjavi z inokulacijo z vbodom čiste kulture napredovali počasneje. Pri sorti Moneymaker tako očitnih razlik ni, vendar smo pri inokulaciji s suspenzijo šesti dan po inokulaciji zabeležili rastlino s petimi listi, naslednji dan pa so vse imele štiri liste, kar pomeni da mladi listi začnejo veneti in odpadati. Bolezenska znamenja se najprej pojavijo prav na mladih listih, ki začnejo hitro veneti, še posebej ob visokih dnevnih temperaturah (EPPO, 2004).

Pri inokulaciji z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo (Slika 16) so testne rastline obeh sort in rastline negativne kontrole v 13 dneh razvile sedem listov. Ker ni prišlo do pojava bolezenskih znamenj, so se listi pri vseh rastlinah enakomerno razvijali. Malo hitreje so se razvijali listi pri sorti Roma, vendar zaradi majhne testne skupine ne moremo trditi, da gre za razliko med sortama.

#### 5.1.1.3 Višina rastlin

Pri inokulaciji z vbodom čiste kulture so rastline napredovale v rasti do četrtega dne po inokulaciji (Slika 17), ko zaradi intenzivnega napredovanja bolezni začnejo veneti in se upogibati. Tako se zmanjšuje tudi višina rastlin, ki pa se med obema sortama ne razlikuje preveč, saj so že na začetku testa bile rastline sorte Rome višje od sorte Moneymaker. Rastline negativne kontrole rastejo enakomerno, pri sorti Moneymaker so trinajsti dan po inokulaciji višje od rastlin sorte Roma.

Pri inokulaciji rastlin z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije (Slika 18) smo zaradi počasnejšega napredovanja bolezni rast rastlin lahko spremljali dlje časa kot pri inokulaciji

z vbodom čiste kulture. Rastline sorte Moneymaker so po četrtem in petem dnevu po inokulaciji začele nazadovati v rasti, medtem ko se rast pri Romi od četrtega do dvanajstega dne po inokulaciji ni bistveno spreminja, oziroma je bila sprememba v višini zelo majhna.

Rastline, ki so bile zalite z bakterijsko suspenzijo (Slika 19) so zaradi odsotnosti bolezenskih znamenj v rasti lepo enakomerno napredovali. Testne rastline in rastline negativne kontrole sorte Moneymaker so nekaj cm višje od rastlin sorte Roma, vendar podobno kot pri ostalih načinih inokulacije težko trdimo, da gre za razliko med sortama, saj je število rastlin premajhno. Razlike so pri načinih inokulacije, saj pri vodu čiste kulture rastline hitro propadejo, medtem ko pri inokulaciji z vbrizganjem bakterijske suspenzije traja dlje časa, da se pojavi bolezenski znaki, zato ima tudi rastlina več časa za rast.

#### 5.1.1.4 Splošne ugotovitve testa patogenosti na paradižniku

Pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku smo ugotovili, da se bolezenska znamenja pri obeh sortah (Moneymaker in Roma) najhitreje izrazijo pri inokulaciji z vbodom čiste kulture (Slika 13). Ob tovrstni inokulaciji rastline precej hitro popolnoma propadejo, zato je za spremljanje napredovanja bolezenskih znamenj na različnih sortah primernejša metoda inokulacije z vbrizganjem bakterijske suspenzije. Pri tej metodi je koncentracija bakterij bistveno manjša in bolezenska znamenja, ki se kažejo predvsem kot venenje mladih listov, se pojavljajo počasneje in niso tako intenzivna kot pri metodi voda, kjer sledi hiter preskok bolezenskih znamenj iz stopnje 2 na stopnjo 5 po lestvici ocenjevanja (Preglednica 4). Poleg tega se pri metodi inokulacije z vodom pri rastlinah razvije manj listov in ne dosežejo takšne višine, kot če jih inokuliramo z bakterijsko suspenzijo. Metoda inokulacije z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo pri našem testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku na žalost ni uspela in je ne moremo primerjati z ostalima metodama inokulacije.

Da se sorti Moneymaker in Roma razlikujeta med seboj po dovozetnosti za okužbo težko trdimo, saj smo imeli majhno testno skupino, poleg tega so bile rastline sorte Roma

malenkost bolj razvite, saj je večina imela 3 prave liste, medtem ko so rastline sorte Moneymaker imele le 2 prava lista. Tudi rastline sorte Moneymaker so bile nižje, čeprav so rastline negativne kontrole v primerjavi s sorto Roma ob koncu testa dosegle višjo višino. To pa bi lahko pomenilo, da sorte Moneymaker raste hitreje od Rome in če bi imeli večjo testno skupino ter večjo skupino negativne kontrole ter podobno razvite rastline, ki bi bile enako visoke in imele enako število listov, bi najverjetneje ugotovili, da se sorti v resnici razlikujeta. Za zdaj smo ugotovili le, da so bolezenski znaki pri obeh uspešnih načinih inokulacije malenkost hitreje napredovali pri sorti Moneymaker, kar pa je po vsej verjetnosti posledica manjših testnih rastlin.

### **5.1.2 Test patogenosti na krompirju**

#### **5.1.2.1 Odziv različnih sort testnih rastlin krompirja (Desiré, Igor in Sante) na inokulacijo z vbodom čiste bakterijske kulture ter vbrizgavanjem bakterijske suspenzije**

Pri inokulaciji testnih rastlin krompirja z vbodom čiste kulture (Slika 30) pri vseh treh sortah Desireé, Igor in Sante ni večjih razlik. Pri vseh sortah so se bolezenska znamenja začela razvijati že tretji dan po inokulaciji rastlin z bakterijo. Od bolezenskega znamenja stopnje 1 po lestvici ocenjevanja (Preglednica 4) je sledil hiter preskok na stopnjo 5, kar pomeni da so rastline popolnoma propadle že šesti dan po inokulaciji. Rastline negativne kontrole pri vseh sortah in načinih inokulacije niso kazale bolezenskih znamenj.

Nasprotno so se bolezenska znamenja pri vseh treh sortah krompirja pri inokulaciji z vbrizganjem bakterijske suspenzije ( Slika 31) koncentracije  $10^5$  cfu/mL pojavila šele po tretjem dnevu po inokulaciji rastlin z bakterijo. Šesti dan po inokulaciji, ko smo ocenjevali bolezenska znamenja, so le-ta bila že 3 ali 4 stopnje, kar pomeni da je bilo uvelikih tri ali več listov, oziroma so oveneli vsi listi razen vrha. Od šestega do osmega dne po inokulaciji so bolezenska znamenja pri sorti Desireé in Igor napredovala enakomerneje kot pri sorti Sante, kjer je preskok iz stopnje 3 na stopnjo 5. Čeprav so bolezenska znamenja napredovala počasneje kot pri inokulaciji rastlin z vbodom čiste kulture, zaradi

manjkajočih ocen od tretjega do šestega dneva ter majhnega števila rastlin ne moremo trditi, da se izražanje bolezenskih znamenj med sortami res razlikuje.

Pri sortah Desireé in Igor nekaj testnih rastlin pri inokulaciji z bakterijsko suspenzijo do trinajstega dne po inokulaciji ni razvilo bolezenskih znamenj, kar pa seveda še ne pomeni, da *R. solanacearum* v rastlini ni bila prisotna. Morda smo naredili eksperimentalno napako in vbrizgali manjši volumen suspenzije ali pa bi morali rastline inkubirati dlje časa. Včasih pride do latentne okužbe, kar pomeni, da rastline nimajo vidnih bolezenskih znamenj in lahko do izbruha bolezni traja več let (Wale in sod. 2008). Poleg tega se morajo bakterijske celice namnožiti v zadostnem številu, da lahko izničijo delovanje rastlinskih obrambnih mehanizmov in šele takrat začnejo proizvajati encime, ki jim omogočajo preživetje v gostiteljski rastlini (Van der Wolf in De Boer, 2007).

#### 5.1.2.2 Odziv testnih rastlin sorte Desireé glede na različno starost ob inokulaciji

Pri inokulaciji krompirja sorte Desireé z vodom čiste kulture tri tedne po presaditvi, se bolezenska znamenja pojavijo že tretji dan po inokulaciji in napredujejo zelo hitro, medtem ko se pri isti sorti pri inokulaciji z bakterijsko suspenzijo pojavijo šele četrti dan in napredujejo enakomerneje (Slika 32).

Bistvene razlike med napredovanjem bolezenskih znamenj pri rastlinah sorte Desireé stare dva do tri tedne ob inokulaciji ni. Opazili pa smo razlike pri razvoju bolezenskih znamen glede na različne načine inokulacije. Podobno kot pri paradižniku se na rastlinah hitreje razvijejo bolezenska znamenja pri načinu inokulacije z vodom čiste kulture tako pri rastlinah starih dva kot tri tedne, medtem ko tiste, okužene z bakterijsko suspenzijo, propadajo postopoma in počasneje (Slika 33). Zaradi majhnega števila rastlin težko trdimo, da starost rastlin ob inokulaciji ne igra velike vloge. Fikre (2006) je raziskoval vpliv starosti rastlin ob inokulaciji na izražanje bolezenskih znakov. Pri poskusu je uporabil rastline krompirja, paradižnika, jajčevca, popra in tobaka, ki so imele razvite 1-2, 3-4 ali 5-6 pravih listov. Ugotovil je, da starost ob inokulaciji nima nobenega vpliva na izražanje bolezenskih znamenj pri paradižniku, krompirju in jajčevcih, znatno pa vpliva na izražanje

bolezenskih znamenj pri tobaku in popru, saj so rastline s 5-6 pravimi listi kazale povečano odpornost na patogeno bakterijo.

#### 5.1.2.3 Odziv testnih rastlin sorte Desireé glede na različno bakterijsko koncentracijo

Bolezenska znamenja so se pri obeh skupinah testnih rastlin razvila četrti dan po inokulaciji (Slika 37). Rastline, ki so bile inokulirane z bakterijsko suspenzijo  $10^5$  cfu/mL so večinoma imele ovenel en pravi list ( stopnja 1 po lestvici ocenjevanja, Preglednica 4, str. 26), medtem ko so rastline, inokulirane z bakterijsko suspenzijo koncentracije  $10^6$  cfu/mL, imele večinoma bolezenska znamenja stopnje 2, kar pomeni dva do tri uvele liste. Tudi v naslednjih dneh po inokulaciji so rastline okužene z višjo koncentracijo kazale večjo občutljivost, saj smo bolezenska znamenja pri večini rastlin ocenili od 4-5, to je ovenelost vseh listov razen vrha (4) oziroma popoln propad rastline (5), medtem ko so rastline, inokulirane z nižjo koncentracijo, dobile oceno 2-5.

#### 5.1.2.4 Splošne ugotovitve testa patogenosti na krompirju

Pri testu patogenosti *R. solanacearum* na krompirju smo ugotovili, da se podobno kot pri testu s paradižnikom, bolezenska znamenja hitreje pojavijo pri načinu inokulacije z vbodom čiste kulture in preskočijo iz stopnje 1-2 po lestvici ocenjevanja na stopnjo 5, medtem ko se pri inokulaciji z bakterijsko suspenzijo pri vseh treh sortah Desireé, Igor in Sante izražajo počasneje. Katera sorta je najobčutljivejša težko povemo, saj so rezultati precej podobni, rastline se še najbolj razlikujejo po zunanjosti (Slika 34, 35, 36). Rastline sorte Desireé so najbolj čvrste, imajo velike liste, medtem ko so rastline sorte Sante bolj šibke in dolge, imajo manjše listke, ki hitro odpadajo. Da bi ugotovili, če se sorte razlikujejo po doveznosti za okužbo z *R. solanacearum*, bi morali imeti večjo skupino testnih rastlin. Pri ponovnih testih bi morali spremljati predvsem 3., 4. in 5. dan po inokulaciji, saj se očitno takrat bolezenska znamenja začnejo razvijati, česar mi nismo spremljali in zato ne moremo povedati, katera sorta je najobčutljivejša.

Ugotovili smo tudi, da starost rastlin krompirja ob inokulaciji nima posebne vloge, saj smo tako pri sorti Desireé stari dva tedna, kot pri tisti stari tri tedne ob inokulaciji, dobili

podobne rezultate. Edina razlika je spet bila med načinoma okužbe, saj so bolezenski znaki napredovali hitreje pri inokulaciji z vbodom čiste kulture.

Preverjali smo tudi vpliv različnih koncentracij bakterijskih suspenzij na izražanje bolezenskih znamenj na sorti Desireé in ugotovili, da se pri obeh koncentracijah ( $10^5$  ter  $10^6$  cfu/mL) bolezenska znamenja pojavijo 4. dan po inokulaciji ter hitreje napredujejo pri višji koncentraciji. Nekaj rastlin je po stopnji bolezenskih znakov sicer odstopalo od povprečja, kar pa bi lahko pripisali eksperimentalni napaki. V bistvu je bakterijska suspenzija koncentracije  $10^5$  cfu/mL dovolj visoka za ponovljivo izražanje bolezenskih znakov.

### **5.1.3 Odtis paradižnika na gojišču SMSA**

Pri testu, kjer smo posamezne dele paradižnika prerezali ter odtisnili na gojišče, smo bakterijo tretji dan po inokulaciji najprej zaznali tik pod mestom inokulacije ter na mestu, kjer izrašča prvi nodij. Četrти dan po inokulaciji je bila bakterija prisotna že na vseh testnih mestih razen tik nad zemljo, kjer smo vzorčili spodnji del steba. Šele sedmi dan po inokulaciji je bila bakterija prisotna na vseh delih. Bakterija namreč ob vstopu v rastlinski žilni sistem potuje hitreje navzgor po rastlini kot navzdol, zaradi vodnega toka, ki teče skozi ksilemsko tkivo (Fujie in sod., 2009). Test odtisa paradižnika na SMSA gojišča je potrdil našo hipotezo, da se bakterija najprej širi navzgor po rastlini in šele nato navzdol proti koreninam.

## 5.2 SKLEPI

Najučinkovitejši način inokulacije za spremeljanje bolezenskih znamenj tako na paradižniku kot na krompirju je metoda vbrizgavanja bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL, ki je najprimernejša za ponovljivo spremeljanje bolezenskih znakov na testnih rastlinah.

Starost testnih rastlin ob inokulaciji nima vloge pri kasnejšem izražanju bolezenskih znakov.

Posamezne sorte paradižnika in krompirja so pokazale manjše razlike v odgovoru na okužbo, vendar je za določitev stopnje občutljivosti potrebno teste ponoviti z večjim številom testnih rastlin.

Pridobljeni podatki bodo osnova za opazovanje delovanja antibakterijskih substanc.

## 6 POVZETEK

Patogena bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi in sod. (1995) povzroča rjavo gnilobo krompirja in bakterijsko venenje paradižnika ter številnih drugih, gospodarsko pomembnih rastlinskih vrst. Pri širjenju je zelo uspešna, saj se prenaša preko namakalnih sistemov, obvodnih rastlin ter številnih drugih vodnih virov, sposobna je tudi dalj časa preživeti v zemlji brez gostitelja.

*R. solanacearum* je karantenska bakterija, ki jo poskušajo obvladovati in nadzorovati predstavniki številnih organizacij po svetu tako, da skušajo določiti nahajališče in razširjenost patogene bakterije ter preprečiti njeno razširjanje. Za potrditev okužbe z *R. solanacearum* se opravijo hitri presejalni testi, temu sledi izolacija bakterije ter na koncu še potrditveni testi, ki dokončno potrdijo okužbo s patogenim mikroorganizmom. Opravi se tudi test patogenosti na gostiteljskih rastlinah, ki jih okužimo z bakterijsko suspenzijo in spremljamo napredovanje bolezenskih znamenj, ki se kažejo kot venenje listov in steba, razne nekrotične razjede ter dokončni propad rastline.

S testom patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku ter krompirju smo spremljali napredovanje bolezenskih znamenj pri posameznih sortah rastlin in pri različnih načinih inokulacije. Za najuspenejši način inokulacije testnih rastlin se je izkazala metoda vbrizgavanja bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL, ki je najprimernejša za ponovljivo spremeljanje bolezenskih znakov tako na paradižniku kot na krompirju. Metoda vboda čiste bakterijske kulture, ki jo postrgamo z gojišča in vbodemo direktno v steblo rastline je zaradi visoke koncentracije bakterij preveč agresivna in sproži hitro odmiranje rastlin, zato težko spremljamo napredovanje bolezenskih znamenj. Prav tako je neprimerna metoda inokulacije rastlin z zalivanjem z bakterijsko suspenzijo.

Posamezne sorte paradižnika (Moneymaker in Roma) in krompirja (Desireé, Igor in Sante) so za okužbo s patogeno bakterijo različno dojemljive, saj so se pokazale manjše razlike v odgovoru na okužbo. Sorte se sorte med seboj razlikujejo tudi morfološko. Pri testu patogenosti na paradižniku je bolj občutljiva sorta Moneymaker, ki je bolezenske znamenja

začela kazati malenkost hitreje kot Roma. Pri testu patogenosti na krompirju so bile razlike med sortami manj očitne, vendar bi pri obeh rastlinskih vrstah za natančno določitev stopnje občutljivosti posameznih sort bilo treba teste ponoviti z večjim številom testnih rastlin.

Starost rastlin ob inokulaciji nima vpliva na poznejše izražanje bolezenskih znamenj. Testne rastline sorte Desireé, ki so bile ob inokulaciji z bakterijsko suspenzijo stare dva oziroma tri tedne, niso kazale razlik v izražanju bolezenskih znamenj.

Koncentracija bakterijske suspenzije vpliva na izražanje bolezenskih znamenj, saj so le-ta pri testnih rastlinah sorte Desireé hitreje napredovala pri inokulaciji z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^6$  cfu/mL, vendar je za ponovljivost testa patogenosti najprimernejša bakterijska koncentracija  $10^5$  cfu/mL.

S testom odtisa posameznih delov paradižnika na SMSA gojišča smo dokazali, da bakterija ob vstopu v gostiteljsko rastlino najprej potuje po steblu navzgor in se razširi po rastlini in šele nato navzdol proti koreninam.

Podatke, ki smo jih pridobili v okviru diplomske naloge, bodo osnova za nadaljnje raziskovanje delovanja antibakterijskih substanc.

## 7 VIRI

Buddenhagen I.W., Sequeira L., Kelman A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 52: 726-726

Caruso P., Bertolini E., Cambra M., López M.M. 2003. A new and sensitive co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *Journal of Microbiological Methods*, 55: 257-272

Clemson University. 2010. Bacterial wilt of tomato. Clemson, Clemson Public Service Activities: 1 str.

[http://www.clemson.edu/.../bac\\_wilt\\_tomato.html](http://www.clemson.edu/.../bac_wilt_tomato.html) (april 2010)

Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et. al. 1998. Official Journal of the European Communities, 41, L235: 1-39

Denny T.P., Flavier A.B., Clough S.J., Saile E., Ganova-Raeva L.M., Schell M.A. 1998. Regulation of virulence by endogenous signal molecules and the importance of extracellular polysaccharide during infection and colonization. V: Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects. Prior Ph., Allen C., Elphinstone J. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 164-170

Elphinstone J.G., Hennessy J., Wilson J.K., Stead D.E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO/OEPP Bulletin, 29: 663-678

EPPO. 2004. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) Standards. Diagnostic protocols for regulated pests. EPPO Bulletin, 34: 155-157

EPPO. 2006. Distribution maps of quarantine pests for Europe: *Ralstonia solanacearum* race 3. Paris, EPPO- European and Mediterranean Plant Protection Organization: 1 str.  
<http://pqr.eppo.org/datas/PSDMS3/PSDMS3.png> (april 2010)

Fikre L. O. 2006. Biochemical, pathological and genetic characterization of strains of *Ralstonia solanacearum* (Smith) from Ethiopia and biocontrol of *R. solanacearum* with bacterial antagonists., Dissertation. Hannover, Univerza v Hannovru: 139 str.

Fujie M., Takamoto H., Kawasaki T., Fujiwara A., Yamada T. 2009. Monitoring growth and movement of *Ralstonia solanacearum* cells harboring plasmid pRSS12 derived from bacteriophage ΦRSS1. Journal of Bioscience and Bioengineering, 10, 10: 1-6

Genin S., Boucher C. 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of major pathogen unveiled by analysis of its genome. Molecular Plant Pathology, 3, 3: 111-118

Grey B. E., Steck T. R. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. Applied and Environmental Microbiology, 67, 9: 3866-3872

Guo J.-H., Qi H.-Y., Guo Y.-H., Ge H.-L., Gong L.-Y., Zhang L.-X., Sun P.-H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Biological Control, 29: 66-72

Hayward A.C. 1991. Biology and epidemiology of a bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review Phytopathology, 29: 65-87

Hayward A.C., Elphinstone J.G., Caffier D., Janse J., Stefani E., French E.R., Wright A.J. 1998. Round table on bacterial wilt (brown rot) of potato. V: Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects. Prior Ph., Allen C., Elphinstone J. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 420-430

Ji P., Momol T., Olson S. M., Pradhanang P.M., Jones J.B. 2005. Evaluation of Thymol thymol as Biofumigant biofumigant for Control control of Bacterial bacterial Wilt wilt of Tomato tomato Under under Field field Conditionsconditions. Plant Disease, 89: 497-500

Kelman A. 1981. Brown rot. V: Compendium of potato disease. Hooker W.J. (ed.). St.Paul, The American Phytopathological Society: 29-31

Lelliott R.A., Stead D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. V: Methods in plant pathology, Vol. 2. Preece T.F. (ed.). Oxford, Blackwell: 216 str.

Nonomura T., Matsuda Y., Bingo M., Onishi M., Matsuda K., Harada S., Toyoda H. 2001. Algicidal effect of 3-(3-indolyl)butanoic acid, a control agent of the bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum*. Crop Protection, 20: 935-939

Olmos A., Bertolini E., Cambra M. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. Journal of Virological Methods, 106, 1: 51-59

Pradhanang P.M., Momol M.T., Olson S.M., Jones J.B. 2003. Effects of Plant plant Essential essential oils on *Ralstonia solanacearum* Population population Density density and Bacterial bacterial Wilt wilt Incidence incidence on Tomatotomato. Plant Disease, 87: 423-427

Roberts P.D., Adkins S., Pernezny K., Jones J.B. 2004. Disease of pepper and their management. V: Diseases of fruits and vegetables: Vol. 2: Diagnosis and management. Naqvi S.A.M.H. (ed.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 333-387

Seal S. 1998. Molecular methods for detection and discrimination of *Ralstonia solanacearum*. V: Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects. Prior Ph., Allen C., Elphinstone J. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 103-109

Seal S., Elphinstone J. 1994. Advances in detection and identification of *P. Solanacearum*. V: Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Hayward A.C. and Hartman G. L. (ed.). Wallingford, CAB International: 35-57

Skubic J. 2007. Vpliv ekstraktov gliv na rastlinske patogene bakterije, diplomsko delo. Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Medoddelčni študij mikrobiologije: 68 str.

Tans-Kersten J., Huang H., Allen C. 2001. *Ralstonia solanacearum* need motility for invasive virulence on tomato. Journal of Bacteriology, 183, 12: 3597-3605

Van der Wolf J.M., De Boer S.H. 2007. Bacterial Pathogens pathogens of Potatopotato. V: Potato Biology biology and Biotechnologybiotechnology: Advances and Perspectivesperspectives. Vreugdenhil J., Bradshaw J., Gebhardt C., Govers F., MacKerron D.K.L., Taylor M.A., Ross H.A. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 595-619

Wale S., Platt H.W., Cattlin N. 2008. Diseases, pests and disorders of potatoes. Burlington, Academic Press: 24-25

Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Applied and Environmental Microbiology, 66, 7: 2853-2858

McKenzie R.R. 2007. Stem histology cross section tag. San Francisco, Wikimedia Commons. 1 str.

[http://www.google.com/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/\(april 2010\)](http://www.google.com/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/(april 2010))

Winstead N.N., Kelman A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 42: 628-634

WU. 2009. The comprehensive R network. Wien, WU-Wirtschafts Univerzität Wien: 1 str.  
<http://cran.r-project.org>, (avgust 2010)

Xue Q.-Y., Chen Y., Li S.-M., Chen L.-F., Ding G.-C., Guo D.-W., Guo J.-H. 2009. Evalution of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt tomato. Biological Control, 48: 252-258

Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta H., Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutrophus* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology, 39: 897-904

Yao J., Allen C. 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. Journal of Bacteriology, 188, 10: 3697-3708

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Marini Dermastia, ki mi je omogočila delo na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, za zanimivo temo, vse nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala recenzentki prof. dr. Maji Ravnikar za vse koristne nasvete in hiter pregled diplomske naloge.

Za vso neprecenljivo pomoč pri izvedbi poskusov, zbiranju literature, interpretaciji podatkov, oblikovanju diplomske naloge in prijateljski odnos se zahvaljujem Jani Erjavec.

Hvala tudi Tanji Dreо, ki me je uvajala v delo, usmerjala pri izdelavi diplomske naloge ter Ireni Ježek, ki mi je pomagala pri izvajanju poskusov.

Najlepša hvala vsem zaposlenim na NIB za potrežljivost in pomoč pri praktičnem delu moje naloge, še posebej Lidiji Matičič, ki mi je iz tkivnih kultur pripravljala rastline krompirja.

Nazadnje se zahvaljujem tudi svojim staršem in sestri za vso potrežljivost, tolažbo in podporo, ki so mi jo nudili tekom študija, ter vsem prijateljem, ki so mi pomagali pri oblikovanju diplomske naloge, verjeli vame ter mi stali ob strani.

## PRILOGE

## TEST PATOGENOSTI NA PARADIŽNIKU

Priloga A: Test patogenosti na paradižniku sorte Moneymaker (M-Moneymaker, V-vbod, S-suspenzija, Z-zalivanje, NK-negativna kontrola, dpi-dnevi po inokulaciji).

Priloga B: Test patogenosti na paradižniku sorte Roma (R-Roma, V-vbod, S-suspenzija, NK-negativna kontrola, dpi-dnevi po inokulaciji).

Priloga C: Podatki za višino rastlin pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma v centimetrih (M-Moneymaker, R-Roma, V-vbod, S-suspenzija, Z-zalivanje, NK-negativna kontrola, dpi-dnevi po inokulaciji, NA-ni podatka).

vzorec	1dpi	2dpi	3dpi	4dpi	5dpi	6dpi	7dpi	8dpi	11dpi	12dpi	13dpi
MV1	5,5	NA	NA	6	3,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MV2	5	NA	NA	7	2,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MV3	6,5	NA	NA	8,5	7	6,5	NA	NA	NA	NA	NA
MV4	7,5	NA	NA	9,5	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MV5	4	NA	NA	5	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NKMV1	8	NA	NA	14	15,5	16	19	19	27	28	29
NKMV2	8	NA	NA	13	14,5	16	16	18	25	25	29
NKMV3	7	NA	NA	13	15	15	16	17	24	27	27,5
MS1	5,5	NA	NA	12	12	9	8	8	NA	NA	NA
MS2	5	NA	NA	8	7	7	NA	NA	NA	NA	NA
MS3	6,5	NA	NA	11	11	9	8	NA	NA	NA	NA
MS4	7,5	NA	NA	8	8	8	6	6	NA	NA	NA
MS5	4	NA	NA	15	13	12	NA	NA	NA	NA	NA
NKMS1	7	NA	NA	11	13	14	15	15	23	24	25
NKMS2	9	NA	NA	15	16	17	17	18	21	24	24
NKMS3	8	NA	NA	12	14	15	17	17	21	25	26
MZ1	9	NA	NA	14	10	13	13	14	19	23	21
MZ2	7	NA	NA	12	12	17	17	19	25	26	28
MZ3	9,5	NA	NA	14,5	15	15	15	19	23	25	24
MZ4	4	NA	NA	10	12	15	16	17	21	25	26,5
MZ5	6,5	NA	NA	10	10	15	15	17	26	26	28
NKMZ1	7	NA	NA	9	10	11	11	13	17	21	24
NKMZ2	10	NA	NA	13,5	15	16	17	17	21	21	22
NKMZ3	10	NA	NA	14	15	15	16	17	26	29	29
RV1	11	NA	NA	15	7	9	NA	NA	NA	NA	NA
RV2	9	NA	NA	13	5,5	9	NA	NA	NA	NA	NA
RV3	11	NA	NA	13	9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
RV4	9,5	NA	NA	13	5	8	NA	NA	NA	NA	NA
RV5	10	NA	NA	15	10	10	9	NA	NA	NA	NA

se nadaljuje

nadaljevanje Priloga C: Podatki za višino rastlin pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma v centimetrih (M-Moneymaker, R-Roma, V-vbod, S-suspenzija, Z-zalivanje, NK-negativna kontrola, dpi-dnevi po inokulaciji, NA-ni podatka).

vzorec	1dpi	2dpi	3dpi	4dpi	5dpi	6dpi	7dpi	8dpi	11dpi	12dpi	13dpi
NKRV1	9	NA	NA	12,5	13,5	14	14	15	17	18	21
NKRV2	9	NA	NA	13,5	14,5	15	15	16	19	21	23
NKRV3	8	NA	NA	13	14	14	15	15	21	22	22
RS1	7	NA	NA	7	9	9	9	8	NA	NA	NA
RS2	8	NA	NA	14,5	15	15	17	18	9	9	NA
RS3	8	NA	NA	10	9	8	NA	NA	NA	NA	NA
RS4	7,5	NA	NA	9	9	9	9	6	NA	NA	NA
RS5	7	NA	NA	8	10	10	10	5	NA	NA	NA
NKRS1	9	NA	NA	10	10,5	11	13	13	19	21	22
NKRS2	7	NA	NA	9,5	9,5	9	11	12	17	19	21
NKRS3	6,5	NA	NA	9	10	10	12	13	19	21	23
RZ1	8,5	NA	NA	12	13	15	15	17	24	23	23
RZ2	10	NA	NA	16	16	17	17	19	25	25	25
RZ3	7	NA	NA	12	12	14	14	16	20	21	25
RZ4	6	NA	NA	13	13	15	15	16	22	22	23
RZ5	7	NA	NA	9	11	13	13	17	20	22	23
NKRZ1	12,5	NA	NA	15	16	17	17	18	25	24	25
NKRZ2	12	NA	NA	18	19	20	20,5	21	26	27	29
NKRZ3	7	NA	NA	13	13,5	14	14	17	25	21	24

Priloga D: Podatki za število listov pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma (M-Moneymaker, R-Roma, V-vbod, S-suspenzija, Z-zalivanje, NK-negativna kontrola, dpi-dnevi po inokulaciji, NA-ni podatka).

vzorec	1dpi	2dpi	3dpi	4dpi	5dpi	6dpi	7dpi	8dpi	11dpi	12dpi	13dpi
MV1	2	NA	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MV2	2	NA	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MV3	2	NA	NA	3	4	4	NA	NA	NA	NA	NA
MV4	3	NA	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MV5	2	NA	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NKMV1	2	NA	NA	4	4	4	5	5	6	6	7
NKMV2	2	NA	NA	4	4	4	5	5	6	6	6
NKMV3	2	NA	NA	4	4	5	5	5	6	7	7
MS1	2	NA	NA	2	4	4	4	4	NA	NA	NA
MS2	2	NA	NA	2	3	3	NA	NA	NA	NA	NA
MS3	2	NA	NA	3	3	4	4	NA	NA	NA	NA
MS4	2	NA	NA	3	3	4	4	4	NA	NA	NA
MS5	3	NA	NA	2	4	5	NA	NA	NA	NA	NA
NKMS1	2	NA	NA	3	3	4	4	5	5	6	6
NKMS2	3	NA	NA	4	4	5	5	5	6	6	6
NKMS3	2	NA	NA	3	3	4	5	5	5	6	6
MZ1	3	NA	NA	4	4	6	6	6	7	7	7
MZ2	2	NA	NA	3	4	4	4	5	5	5	6
MZ3	3	NA	NA	4	4	5	5	5	6	6	6
MZ4	2	NA	NA	3	3	4	4	4	5	5	5
MZ5	2	NA	NA	3	4	4	4	5	5	5	6
NKMZ1	2	NA	NA	3	3	4	4	4	5	5	6
NKMZ2	3	NA	NA	4	4	5	5	5	6	7	7
NKMZ3	3	NA	NA	4	4	5	5	5	6	6	6
RV1	3	NA	NA	3	3	4	NA	NA	NA	NA	NA
RV2	3	NA	NA	4	4	4	NA	NA	NA	NA	NA
RV3	3	NA	NA	4	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
RV4	3	NA	NA	3	3	4	NA	NA	NA	NA	NA
RV5	4	NA	NA	5	5	5	5	NA	NA	NA	NA

se nadaljuje

nadaljevanje Priloga D: Podatki za število listov pri testu patogenosti *R. solanacearum* na paradižniku sorte Moneymaker in Roma (M-Moneymaker, R-Roma, V-vbod, S-suspenzija, Z-zalivanje, NK-negativna kontrola, dpi-dnevi po inokulaciji, NA-ni podatka).

vzorec	1dpi	2dpi	3dpi	4dpi	5dpi	6dpi	7dpi	8dpi	11dpi	12dpi	13dpi
NKRV1	3	NA	NA	4	4	5	5	6	6	7	7
NKRV2	3	NA	NA	4	4	5	5	5	6	6	7
NKRV3	2	NA	NA	4	4	5	5	6	6	6	7
RS1	3	NA	NA	4	4	5	5	5	NA	NA	NA
RS2	3	NA	NA	4	4	5	5	5	5	5	NA
RS3	3	NA	NA	4	4	5	NA	NA	NA	NA	NA
RS4	3	NA	NA	4	4	5	5	5	NA	NA	NA
RS5	2	NA	NA	3	4	4	5	5	NA	NA	NA
NKRS1	2	NA	NA	4	4	5	5	6	6	6	6
NKRS2	3	NA	NA	3	4	5	5	6	6	7	7
NKRS3	2	NA	NA	4	4	5	5	6	6	7	7
RZ1	3	NA	NA	4	4	5	5	5	6	6	7
RZ2	3	NA	NA	5	5	6	6	6	7	7	7
RZ3	2	NA	NA	4	4	5	5	5	6	6	7
RZ4	2	NA	NA	4	4	5	5	5	6	6	6
RZ5	2	NA	NA	3	4	5	5	5	5	6	6
NKRZ1	3	NA	NA	5	5	6	6	7	7	8	7
NKRZ2	3	NA	NA	4	5	5	6	7	7	8	7
NKRZ3	3	NA	NA	4	4	5	5	6	6	7	6

## TEST PATOGENOSTI NA KROMPIRJU

Priloga E: Rezultati testa patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Desireé, Igor in Sante, okuženem z vbodom čiste kulture (D-Desireé, I-Igor, S-Sante, V-vbod, dpi-dnevi po inokulaciji). Starost krompirja je bila 2 tedna.

vzorec	1 dpi	2 dpi	3 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	10 dpi	13 dpi
DV1	0	0	2	5	5	5	5	5
DV2	0	0	2	5	5	5	5	5
DV3	0	0	2	5	5	5	5	5
DV4	0	0	2	5	5	5	5	5
DV5	0	0	2	5	5	5	5	5
IV1	0	0	2	5	5	5	5	5
IV2	0	0	1	5	5	5	5	5
IV3	0	0	0	5	5	5	5	5
IV4	0	0	1	5	5	5	5	5
IV5	0	0	0	4	5	5	5	5
SV1	0	0	1	4	5	5	5	5
SV2	0	0	1	5	5	5	5	5
SV3	0	0	0	5	5	5	5	5
SV4	0	0	1	5	5	5	5	5
SV5	0	0	0	5	5	5	5	5

Priloga F: Rezultati testa patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Desireé, Igor in Sante, okuženem z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije (D-Desireé, I-Igor, S-Sante, S-suspenzija, dpi-dnevi po inokulaciji). Starost krompirja je bila 2 tedna.

vzorec	1 dpi	2 dpi	3 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	10 dpi	13 dpi
DS1	0	0	0	4	4	4	5	5
DS2	0	0	0	0	0	0	0	0
DS3	0	0	0	3	3	4	5	5
DS4	0	0	0	3	3	4	5	5
DS5	0	0	0	3	3	4	5	5
DS6	0	0	0	3	3	4	5	5
DS7	0	0	0	0	0	0	0	0
DS8	0	0	0	3	3	4	5	5
DS9	0	0	0	2	3	4	5	5
DS10	0	0	0	2	3	4	5	5
IS1	0	0	0	3	4	5	5	5
IS2	0	0	0	0	0	0	0	0
IS3	0	0	0	4	4	5	5	5
IS4	0	0	0	4	4	5	5	5
IS5	0	0	0	4	5	5	5	5
IS6	0	0	0	4	4	5	5	5
IS7	0	0	0	3	4	5	5	5
IS8	0	0	0	4	4	5	5	5
IS9	0	0	0	4	4	5	5	5
IS10	0	0	0	5	5	5	5	5
SS1	0	0	0	3	5	5	5	5
SS2	0	0	0	3	5	5	5	5
SS3	0	0	0	4	5	5	5	5
SS4	0	0	0	4	5	5	5	5
SS5	0	0	0	3	5	5	5	5

Priloga G: Rezultati testa patogenosti *R. solanacearum* na krompirju sorte Desireé, ki je bil star 3 tedne. Rastline so bile okužene z vbodom čiste kulture (V) ter z vbrizgavanjem bakterijske suspenzije (S), (dpi-dnevi po inokulaciji).

vzorec	1 dpi	3 dpi	4 dpi	6 dpi	7 dpi	9 dpi	13 dpi
DV1	0	2	2	4	4	4	5
DV2	0	1	1	5	5	5	5
DV3	0	0	1	4	4	5	5
DV4	0	1	1	4	4	5	5
DV5	0	1	1	5	5	5	5
DS1	0	0	1	4	4	5	5
DS2	0	0	1	4	4	5	5
DS3	0	0	1	4	4	5	5
DS4	0	0	0	2	3	3	5
DS5	0	0	0	3	4	4	5
DS6	0	0	1	4	4	5	5
DS7	0	0	1	4	4	5	5
DS8	0	0	1	4	4	5	5
DS9	0	0	1	4	4	5	5
DS10	0	0	1	4	4	5	5

Priloga H: Prikaz bolezenskih znamenj pri rastlinah sorte Desireé različnih starosti glede na isti dan ocenjevanja bolezenskih znamenj (D-Desireé, V-vbod, S-suspenzija, dpi-dnevi po inokulaciji).

vzorec	1 dpi	3 dpi	6 dpi	7 dpi	13 dpi
starost krompirja 2 tedna	DV1	0	2	5	5
	DV2	0	2	5	5
	DV3	0	2	5	5
	DV4	0	2	5	5
	DV5	0	2	5	5
	DS1	0	0	4	4
	DS2	0	0	0	0
	DS3	0	0	3	3
	DS4	0	0	3	3
	DS5	0	0	3	3
	DS6	0	0	3	3
	DS7	0	0	0	0
	DS8	0	0	3	3
	DS9	0	0	2	3
	DS10	0	0	2	3
starost krompirja 3 tedne	DV1	0	2	4	4
	DV2	0	1	5	5
	DV3	0	0	4	4
	DV4	0	1	4	4
	DV5	0	1	5	5
	DS1	0	0	4	4
	DS2	0	0	4	4
	DS3	0	0	4	4
	DS4	0	0	2	3
	DS5	0	0	3	4
	DS6	0	0	4	4
	DS7	0	0	4	4
	DS8	0	0	4	4
	DS9	0	0	4	4
	DS10	0	0	4	4

Priloga I: Prikaz bolezenskih znamenj pri krompirju sorte Desireé, okuženem z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^5$  cfu/mL (D-Desireé, dpi-dnevi po inokulaciji, NK-negativna kontrola).

	vzorec	2dpi	3dpi	4dpi	7dpi	8dpi	9dpi	14dpi
10 <sup>5</sup> cfu/ml	D1	0	0	2	5	5	5	5
	D2	0	0	0	3	4	4	5
	D3	0	0	0	4	5	5	5
	D4	0	0	2	5	5	5	5
	D5	0	0	1	4	4	5	5
	D6	0	0	0	2	3	4	5
	D7	0	0	2	5	5	5	5
	D8	0	0	2	3	4	5	5
	D9	0	0	2	5	5	5	5
	D10	0	0	1	3	5	5	5
	D11	0	0	0	3	5	5	5
	D12	0	0	1	5	5	5	5
	D13	0	0	2	5	5	5	5
	D14	0	0	0	2	3	4	5
	D15	0	0	2	5	5	5	5
	D16	0	0	1	5	5	5	5
	D17	0	0	2	4	5	5	5
	D18	0	0	1	4	5	5	5
	D19	0	0	0	4	5	5	5
	D20	0	0	2	5	5	5	5
	D21	0	0	1	5	5	5	5
	D22	0	0	2	5	5	5	5
	D23	0	0	0	3	4	5	5
	D24	0	0	2	4	5	5	5
	D25	0	0	2	4	5	5	5
NK	D26	0	0	0	0	0	0	0
	D27	0	0	0	0	0	0	0
	D28	0	0	0	0	0	0	0
	D29	0	0	0	0	0	0	0
	D30	0	0	0	0	0	0	0

Priloga J: Prikaz bolezenskih znamenj pri krompirju sorte Desireé, okuženem z vbrizganjem bakterijske suspenzije koncentracije  $10^6$  cfu/mL (D-Desireé, dpi-dnevi po inokulaciji, NK-negativna kontrola).

	vzorec	2dpi	3dpi	4dpi	7dpi	8dpi	9dpi	14dpi
$10^6$ cfu/ml	D31	0	0	0	3	4	5	5
	D32	0	0	0	2	3	3	5
	D33	0	0	0	2	4	4	5
	D34	0	0	2	5	5	5	5
	D35	0	0	2	4	5	5	5
	D36	0	0	2	4	5	5	5
	D37	0	0	0	0	0	0	5
	D38	0	0	2	5	5	5	5
	D39	0	0	2	5	5	5	5
	D40	0	0	2	5	5	5	5
	D41	0	0	2	5	5	5	5
	D42	0	0	2	5	5	5	5
	D43	0	0	2	5	5	5	5
	D44	0	0	2	4	5	5	5
	D45	0	0	2	5	5	5	5
	D46	0	0	2	4	5	5	5
	D47	0	0	0	3	4	4	5
	D48	0	0	2	4	5	5	5
	D49	0	0	2	5	5	5	5
	D50	0	0	0	3	4	5	5
	D51	0	0	1	4	5	5	5
	D52	0	0	2	4	5	5	5
	D53	0	0	2	4	5	5	5
	D54	0	0	2	5	5	5	5
	D55	0	0	1	4	5	5	5
NK	D56	0	0	0	0	0	0	0
	D57	0	0	0	0	0	0	0
	D58	0	0	0	0	0	0	0
	D59	0	0	0	0	0	0	0
	D60	0	0	0	0	0	0	0

