

ХАРАКТЕРИСТИКА И ПАТОГЕНИТЕТ НА МЕСТНИ ИЗОЛАТИ НА РОД *Xanthomonas*, ПРИЧИНЯВАЩИ БАКТЕРИОЗА ПО ОРЕХ В БЪЛГАРИЯ

МАРИЯ АНДОНОВА*, МИЛЕНА ДИМОВА**

*Институт по овощарство, Пловдив

**Аграрен университет, Пловдив

Characteristics and Patogenitet an Local Isolates of Race *Xanthomonas* Causing Walnut Bacterial Blight in Bulgaria

M. Andonova*, M. Dimova**

*Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria

**Agricultural University, Plovdiv, Bulgaria

Abstract

A walnut bacterial blight caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* is major bacterial disease occurring in all walnuts growth regions in Bulgaria. Damage an this disease is mainly associated with necrosis premature fruits loss and reduction of yield at harvest. Isolation of leaves, buds, shoots and fruits were collected three years – from early of April to late September (2009 to 2011) of young and old walnuts growth gardens from south and southeast part of country. The obtained isolates were identified on four culture media.

Pathogenicity tests carried out on plants of tobacco, young walnut fruits and walnuts seedlings (Lara – open pollination) in a greenhouse. Isolate № 3-2-9 inoculated directly on young, green fruits from a variety Izvor10 shows typical symptoms of bacterial blight with black spots still soft shell and partially or completely blackened, destroyed nuts in the form of paste consistency.

Several methods are used for artificial infection of walnut seedlings – by scrub of bacterial suspension with quartz sand on leaves, directly spraying the bacterial suspension and through the stem cutting and direct application of bacterial mass. By the second method we observed on the fifth day after inoculation symptoms of bacterial blight in the form of watery-necrotic wed, soaked spots.

Key words: *Juglans regia*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, walnut bacterial blight, isolates, characteristics and patogenitet

Бактерията *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis*, причиняваща болестта бактериоза се смята за една от важните бактериални болести по *Juglans regia* – персийски (английски) орех и другите видове от род *Juglans* sp. Засягат се младите нарастващи органи и патогена причинява некроза. Бактерията атакува висок процент от мъжките и женските цветни пъпки, зелени клонки, плодове и листа, по чиято нерватура се формират кафяво-черни петна, с деформации на листната петура и в редки случаи силно заразените опадват. Повредите по младите плодове са под форма на черни петна, в резултат те или преждевременно окапват, а други достигат размери характерни за сорта, но черупката и ядката им са почернели и унищожени напълно. Най-силно и често се нападат млади и плододаващи орехови дървета, но бактерията не причинява пълното им загиване. Бактериозата по ореха е разпространена масово в промишлените насаждения в нашата страната, като показва тенденция за нарастващо икономическо значение най-вече на площи, където не се провеждат химични третирания. Загубите от болестта варират от местообитанието и климатичните условия през годината, сортова чувстви-

телност и възраст на насажденията, съществуващ инфекциозен фон и динамика на заселване популациите на патогена в ореховите градини.

Болестта е установена за първи път в САЩ (Калифорния) през 1890 г. върху посадъчен материал, пренесен от Франция. Причинителят на това заболяване е идентифициран и описан за първи път от Пьерсе през 1901 година. В последствие болестта бързо се разпространява в съседните страни (Rudolph, 1933).

Географското разпространение на болестта обхваща Южна Африка, част от Азия, Австралия, Нова Зеландия, части от Европа, Бермудите, Северна Америка, Аржентина, Чили и Уругвай (СМІ Map 133, 1964).

Miller and Bollen (1946) смятат, че дъждът е най-важният фактор за разсейване на бактериозата по орех. Насекомите и някои акари също може да допринесат за разнасяне на бактерията (Smith et al., 1921). Ark (1944) посочва полена от заразени реси, които са почернели и са в различна степен деформирани за друг агент за разпространение на болестта и заразяване на женските цветове, но Miller and Bollen (1946) не смятат предаването с инфекциран полен на патогена за важно в Орегон.

Опити на Ercolani (1962) потвърждават за предаването на *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* със заразен полен за напълно възможни. Инфектирането е през естествените устица (стомата) или рани от различно естество, като бактерията презимува в заразени пъпки и клонови, но не и във окапал растителен материал от листа и плодове на орех. Почти всички видове от род *Juglans* са чувствителни и се заразяват от бактерията *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, но се различават по степента си на чувствителност. Силна чувствителност към патогена проявяват *J. hindsii* Jeps, *J. mandshurica* и особено *J. regia* L. (Belisrio, 1999). *Juglans nigra* L. (черен орех) е вид, сочен като най-устойчив на бактериозата.

Целта на настоящата разработка беше да се изолират бактерии, потенциални причинители на бактериозата по орех и да се установи тяхната патогенност.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучванията са проведени в Лабораторията по имунитет и оранжерийен комплекс на Институт по овощарство в Пловдив.

Изоляции с типични симптоми на бактериозата са направени от листа, пъпки, леторасли и плодове и са събирани три години – от началото на месец април до края на септември (от 2009 до 2011 г.) от млади, плододовоаци и стари градини на южната и югоизточна част на страната. Получени са 130 бактериални изолата от орехови дървета и е направен първичен скрининг върху две стандартни хранителни среди (NYDA, GYCA). Избрани са девет бактериални изолата. Проучвани са културалните особености на изолатите: Л-1, И-5, Х-1, С-4, М-3, № 3-2-3, № 3-2-9, № 2-3-1 и С-2 върху стандартни и селективни хранителни среди (YDC, TBM, SQ и YPGA).

Изолатите са тествани върху тютюневи растения от сорта Бърлей. Бактерийните изолати са култивирани върху хранителна среда YPGA за 48 h в термостат при $t = 25 - 27$ °C. Мътността на получената бактериална суспензия е CFU = $1,5 \times 10^8$ и е установена по два метода. Окомерно – чрез сравнение мътност със стандартна епруветка по скалата на Mc Farland и спектрофотометрично, по скала в (%). Мътността е определяна при дължина на вълната $\lambda = 640$ nm на спектрофотометър и при 73 – 74% варираща мътност. Хиперсензитивната реакция върху листата на тютюн се отчита след 48 h.

Заразяването на младите плодчета от орех сорт Извор 10 се осъществява чрез убождания на мезокарпа на плода със спринцовка – на пет места по пет убождания.

С всеки изолат се заразяват три плода, инжектираната бактериална суспензия е с мътност CFU = $1,5 \times 10^8$. Контролните варианти се накапват със стерилна вода. Инокулираните плодчета се поставят във влажна камера. На 24-я ден се изчислява

процентът зараза и прогресията на проникването на всеки изолат в мезокарпа и вътрешната част на плода и новооформящата се ядка.

Заразени и тествани са орехови семена, свободно опрашване – Лара с изолат № 3-2-9, като са използвани три метода за инокулация по три повторения и една контрола за всеки метод на заразяването.

Първи метод на инокулация – с предварително подготвена бактериална суспензия от изолат № 3-2-9 на свежа 48 h бактериална култура, предварително суспендирана във физиологичен разтвор SPS и измерен титър, съответно CFU = 3×10^8 . Заразяването става посредством кварцов пясък и натривка на най-горния сложен лист и неговия срещуположен. За сравнение се оставя контрола, заразена по същия начин, но със стерилна вода. Семенците се поставят при условия на влажна камера за 96 h, създадена чрез полиетилен. Наблюдава се за симптоми на бактериозата, нормално след 25 – 30 дни след заразата.

Втори метод на инокулация – заразяването е чрез директно пулверизиране на бактериална суспензия от изолат № 3-2-9 с мътност CFU = 3×10^8 . Създаване на същите условия на доотглеждане, описани при първия метод.

Трети метод на инокулация – изолатът се тества чрез комбиниране на два метода за инокулация – директно внасяне на 15 µl бактериална суспензия със същия титър в направен срез около 1 cm в стъбълцето на семената. Съвместно с този метод се използва и инокулиране на горен млад сложен лист чрез натривка с кварцов пясък. Създаване на същите условия на отглеждане.

Степента на нападение от бактериозата по листата се отчита по 5-степенна скала в класове, като се пресмята процентът напетнена листна повърхност, както следва: 0 клас – няма петна; 1 клас – по-малко от 1% от листната повърхност са повредени от бактериозата; 2 клас – по-малко от 10% нападение; 3 клас – по-малко от 40% от листната повърхност са повредени от бактериозата; 4 клас – повредите са от 40 до 80% от листната повърхност; 5 клас – повече от 80% нападение.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Повечето от посочените изолати образуват културални характеристики върху средите YDC, YPGA и TBM, характерни за *X. arboricola*, с мукоидни, жълто оцветени колонии 2 – 3 mm/диаметър, закръглени краища, лъскави на вид и лигави. Върху хранителна среда SQ (Lee, 1992), която е характерна и помага за идентификацията на повечето видове от род *Xanthomonas* се наблюдава на 4 – 6-я ден около бактериалната шриха тревисто да тъмнозелено оцветяване, което се отчита като позитивна реакция.

Върху тютюневи растения най-характерни симп-

Таблица 1. Симптоми по плод и ядка на сорт Извор 10 и заразеност на плодовете (%) от бактериини изолати
Table 1. Symptoms on fruit and nuts and percentage contamination of fruits (%) in Izvor 10 of bacterial isolates

Сорт/изолат № Cultivar/isolates №	Заразеност на плодове Contamination of fruits (%)	Описание на симптоми по ядка и обвивка (черупка) на плод Description of symptoms on kernel and shell per fruit
Извор 10/ Izvor 10 № Control	0%	По ядка и кора няма симптоми на бактериоза, с чиста ядка и ново-образувана черупка.
Извор 10/ Izvor 10 № Л-1	62,2%	Сливане на някои петна в общо некротично петно. Почерняване над кората (мезокарпа), на мястото на пробода има покафеняване на един от плодовете, ендокарп и ядка – чисти.
Извор 10/ Izvor 10 № И-5	44,5%	Сливане на някои петна в общо некротично петно, почерняване до черупката на едно от убожданията, ядка чиста.
Извор 10/ Izvor 10 № X-1	49,0%	На мястото на убожданията (мезокарпа) има некроза, ядката е чиста.
Извор 10/ Izvor 10 № С-4	47,0%	Сливане на някои петна в общо некротично петно, ендокарп и ядка са чисти.
Извор 10/ Izvor 10 № М-3	55,5%	Сливане на някои петна в общо некротично петно, бактерията е проникнала до черупката (ендокарп), изразяващо се с почерняване, ядка чиста.
Извор 10/ Izvor 10 № 3-2-3	64,5%	Сливане на някои петна в общо некротично петно, в мястото на пробода има лека некроза с разкашкване и омекване на мезокарп (зелена обвивка), ядка чиста.
Извор 10/ Izvor 10 № 3-2-9	60,0%	Цялостно загиване на два от плодовете и покафеняване на ядките, другият плод с чиста ядка.
Извор 10/ Izvor 10 № 2-3-1	47,0%	В мястото на убождането има лека некроза с покафеняване на мезокарпа, ядката е чиста и бяла.
Извор 10/ Izvor 10 № С-2	53,4%	В мястото на убождането има лека некроза с покафеняване на мезокарпа, ядката е чиста и бяла.

Таблица 2. Характеристика и патогенитет на тестваните девет бактериини изолата върху хранителна среда тютюн и орехов плод
Table 2. Characterization and pathogenitit the tested nine bacterial isolates, on medium, tobacco and nutty fruit

Бактериен изолат Bacteria isolate (№)	Реакция върху тютюневи растения Reaction on tobacco plants	Реакция върху орехови плодчета Reaction on walnut fruits	Характеристика върху среда YDC Characterization on media YDC	Характеристика върху среда TBM Characterization on media TBM	Характеристика върху среда SQ Characterization on media SQ	Характеристика върху среда YPGA Characterization on media YPGA
№ Л-1	-	+	+	+/-	+	+/-
№ И-5	+/-	-	+	+/-	+	+/-
№ X-1	+	+/-	+	+/-	+	+
№ С-4	+/-	+/-	+	+	+	+
№ М-3	+	+	+	+	+	+
№ 3-2-3	+	+	+	+	+	+
№ 3-2-9	+	+	+	+	+	+
№ 2-3-1	+/-	-	+	+	+	+/-
№ С-2	+	+/-	+	+/-	+	+
№ Контрола	-	-	-	-	-	-

Легенда: (+) - положителна реакция; (-) - отрицателна реакция; (+/-) - варираща реакция.

YDC – yeast extract 10.0 g, CaCO₃ powder 20.0 g, Dextrose 20.0 g, distilled water to 1.0 L (pH 6.8 – 7.0).

TBM – peptone 10.0 g, KBr 10.0 g, H₃BO₃ 0.30 g, agar 15.0 g, distilled water to 1.0 L. After autoclaving add CaCl₂ 2.0 g, Tween 80 - 20.00 ml (pH 6.8 – 7.0).

SQ – succinic acid disodium salt 10.0 g, quinic acid 5.0 g, K₂HPO₄ 1.5g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, agar 15.0 g, distilled water to 1 L (pH 7.2 – 7.5). After autoclaving add 7.5 ml 20% MgSO₄ x 7H₂O.

YPGA - yeast extract 5.0 g, bacto peptone 5.0 g, glucose 10.0 g, agar 20.0 g, distilled water to 1.0 L, (pH 6.5 – 7.0).

томи (хлоротично-некротични петна) и хиперсензитивна реакция след 48 h на зараза дават изолатите № 3-2-9, № 3-2-3, както и № М-3 и № С-2.

Изчилено в процент, нападението върху млади орехови плодчета Извор 10 след 24 дни от инокулацията с девет бактериални изолата, дава да се проследи, че при изолат с № 3-2-3 нападението е съответно 64,5%, като се наблюдава некроза на

зелената обвивка. Висок процент на зараза проявяват и изолатите с № Л-1 (62,2%), следвани от № 3-2-9 с 60,0%, при който двете плодчета са напълно загинали и ядката е почерняла (табл. 1).

Характеристиките и патогенитета на тестваните девет бактриални изолата върху тютюн, орехови плодчета и четири хранителни среди са посочени в (табл. 2).

Заразени и тествани са орехови семенащи,

свободно опрашване – Лара с изолат № 3-2-9. Бактериалният изолат № 3-2-9, изолиран през пролетта на 2010 г. от района на с. Брестник, показва най-добри характеристики и патогенитет.

Най-характерни симптоми със силна некроза и воднисто-мокри, просмукани петна се наблюдават при втория метод – чрез директно впръскване на бактерията под формата на суспензия. Процентно нападението, изчислено общо за трите метода е $i = 35,82\%$.

Първият метод на тестиране патогеността на изолата върху орехови семена дава слаби резултати – около 1% степен на нападение, отговарящ на първи клас. При втория метод с директно пулверизиране на суспензия върху листата индексът на нападение от бактериоза е $i = 27,08\%$, отговарящ съответно на трети клас на нападение. Това дава възможност този метод да бъде приложен като такъв, с който може да се тестват изолирани бактерии за кратък период от време и да се види тяхната патогенност и тип на проявление. А при третия метод степента на нападение е по-малка от 10%, съответно отговаряща на втори клас на зараза, като при разреза и вкарване на бактериална маса резултатът беше отрицателен и не се наблюдават симптоми на некроза в стъблото, поради което го считаме за неуспешен. От трите метода на заразяване най-добри резултати дава вторият метод на директно пулверизиране на суспензия.

ИЗВОДИ

Бактериалните изолати № М-3, № С-2 и № 3-2-9 дават типични културални характеристики за род *Xanthomonas* върху четирите тествани хранителни среди и проява на хлоротично-некротични петна върху листа на тютюн.

Изолати № Л-1 и № 3-2-3, инокулирани върху млади орехови плодчета от българския сорт Извор 10 дават най-висок процент на зараза (62,2% и 64,5%). При изолат № 3-2-9 заразеността е 60% и показва типични симптоми на бактериоза, с черни

петна по още меката черупка и частично или напълно почернели, унищожени ядки във вид на кашеста консистенция.

От използваните три метода на изкуствено заразяване на орехови семена с изолат № 3-2-9, лесноприложим и най-добри резултати с типични симптоми на бактериоза дава вторият метод – директно пулверизиране на бактериална суспензия.

ЛИТЕРАТУРА

Джувинов, В., С. Гандев, К. Куманов, В. Арнаудов. 2009. Орех. Монография. „Биофрут БГ”, Пловдив.

Ark, P. A. 1944. Pollen as a source of walnut bacterial blight infection. *Phytopathology*, 34: 330-334

Du Plessis, H. J., T. J. van der Westhuizen. 2008. Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *Juglandis* from (Persian) English Nursery Trees in South Africa. *Journal of Phytopathology*, Vol. 143, 8: 449-454

Frutos, D., G. Lopez, M. Lopez, C. Moragrega, A. Guevara, A. Arrieta. 2010. Spreading model of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* on *Juglans regia* L. Host selections grown in a shading shelter. Scientific report COST 873.

Giraud, M., J. Prunet, A. Chevallier, S. Romain, V. Thiriaud, I. Santrac and O. Bray. 2010. Study of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* Population Dynamics in French Walnut Orchards over Three Years *Acta Horticulturae*, 861, ISHS: 439-441

Lee, Y. A., D. Hildebrand and M. Schroth. 1992. Use of Quinate Metabolism as a Phenotypic Property to Identify Members of *Xanthomonas campestris* DNA Homology Group 6. *The American Phytopathological Society*, Vol. 82, No. 9: 971-973.

Miller, P. W. and W. B. Bollen. 1946. Walnut bacteriosis and its control. U. S. Dept. Agr., Bur. Plant Industry, Soils and Agr. Eng., Oregon State College, Corvallis. Agr. Expt. Sta. Tech. Bul. 9.

Normes OEPP EPPO Standards Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/22, 2004, OEPP/ EPPO, Bulletin 34.

Pierce, N. 1901. Walnut bacteriosis. *Bet. Gazette*, 31: 272-273

Smith, C. O. 1921. Some studies relating to infections of and resistance to walnut blight. *California Dept. Agr. Monthly Bul.*, 10: 367-371