

BAKTERIJSKA PEGAVOST LISTOV BOŽIČNIH ZVEZD TER DRUGE BAKTERIJSKE BOLEZNI OKRASNIH RASTLIN

Manca PIRC¹, Tanja DREO², Jana ERJAVEC³, Irena MIKLIČ LAUTAR⁴,
Maja RAVNIKAR⁵

^{1,2,3,5} Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Ljubljana

⁴ Fitosanitarna inšpekcija, Ljubljana

IZVLEČEK

Za bakterijske bolezni rastlin ni učinkovitega kemijskega varstva, zato je njihova določitev in identifikacija še posebej pomembna, saj omogoča pravočasno izločanje obolelih rastlin in s tem omejitve škode. Pri okrasnih rastlinah so pogosti povzročitelji bakterijskih bolezni bakterije iz rodov *Xanthomonas* in *Pseudomonas*, ki povzročajo značilne pege na listih in s tem zmanjšujejo vrednost rastlin. Veliko gospodarsko škodo lahko povzročajo tudi povzročiteljice mehkih gnilob iz rodov *Pectobacterium* in *Dickeya*. V preteklih letih smo pojav bakterij testirali na okrasnih rastlinah pelargonij, krizantem in božičnih zvezd, redkeje tudi na vzorcih orhidej, bršljana, lovorikovca, mačeh in nageljnov. Z uporabo kombinacij različnih laboratorijskih diagnostičnih metod smo največkrat potrdili pojav bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* v pelargonijah, pri krizantemah pa pojav bakterij povzročiteljic mehkih gnilob. Pri vzorcih božičnih zvezd smo v letu 2009 prvič v Sloveniji laboratorijsko potrdili pojav bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*. Ta bakterija je uvrščena na seznam A2 organizacije EPPO na osnovi analize tveganja (PRA), pogostejšega pojavljanja v zadnjih letih ter občasnega povzročanja velike škode. Bakterijo smo izolirali iz peg na listih božičnih zvezd. Bakterijo smo identificirali z analizo DNA zaporedja gena *gyrB* in analizo prstnih odtisov DNA bakterij s testom BOX-PCR. Patogenost bakterije smo potrdili s testom patogenosti na božičnih zvezdah.

Ključne besede: okrasne rastline, *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*, bakterijske bolezni rastlin, božične zvezde, molekularne analize

ABSTRACT

BACTERIAL LEAF SPOT OF POINSETTIA AND OTHER BACTERIAL DISEASES OF ORNAMENTAL PLANTS

Common bacterial pathogens of ornamental plants come from genera *Xanthomonas* and *Pseudomonas* that cause characteristic spots on leaves and thereby reduce the value of plants. Bacteria from genera *Pectobacterium* and *Dickeya* cause soft rot which can also lead to severe economic losses. Since there is no effective chemical protection for bacterial diseases of plants, their determination and identification is particularly important because it allows the timely elimination of diseased plants, and thus limit the damage. Several different species of ornamental plants were tested for the presence of bacterial pathogens in recent years. Most commonly tested were pelargoniums, chrysanthemums and poinsettias. We

¹ dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, e-mail: manca.pirc@nib.si

² dr. biol. znan., prav tam

³ univ. dipl. mikrob., prav tam

⁴ mag., Parmova 33, 1000 SI-Ljubljana

⁵ prof. dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

have also received samples of orchids, ivy, Cherry laurel, pansies and carnations. Using combinations of laboratory diagnostic methods we have confirmed the presence of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in pelargoniums and the presence of soft-rot bacteria in chrysanthemums. *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* in poinsettia plants was confirmed in Slovenia for the first time in 2009. This bacterium is listed on the A2 list of EPPO organization based on Pest Risk Analysis (PRA), because of its increasing occurrence and sometimes extensive damage to the plants. *X. axonopodis* pv. *poinsettiicola* bacteria were isolated from spots on poinsettia leaves. Bacterial DNA of purified typical colonies was subject to sequence analysis of the *gyrB* gene and analysis of DNA fingerprints with the BOX-PCR. Pathogenicity of the isolates was confirmed by the pathogenicity test on poinsettias and subsequent reisolation and confirmation of their identity of bacteria.

Keywords: ornamental plants, *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*, bacterial diseases of plants, poinsettias, molecular methods

1 UVOD

S povečanjem svetovne trgovine v Evropo in Slovenijo prihaja čedalje več okrasnih rastlin, med njimi tudi nove vrste. Skupaj z rastlinami prihajajo tudi novi povzročitelji bolezni. Ti lahko povzročijo, da rastline v celoti propadejo ali imajo zaradi izraženih bolezenskih znamenj zmanjšano vrednost, saj ne ustrezajo za prodajo.

Rastlinske patogene bakterije se pogosto nahajajo na rastlinah, vendar povzročajo bolezenska znamenja pogosto le takrat, ko so ugodne razmere za njihovo rast in razmnoževanje. Navadno se bolezenska znamenja razvijejo ob visoki zračni vlagi, če so rastline pretesno skupaj in ob slabem kroženju zraka med rastlinami. Za bakterijske okužbe so rastline dovzetne tudi ob stresu, ki pa ga lahko povzročijo različni dejavniki: premalo ali preveč vode, slaba osvetlitev, nihanje temperature, slabo odvajanje vode iz zemlje, preveliki ali premajhni lončki ter pomanjkanje ali presežek hranil (Pfleger in Gould, 2009).

Bakterije, ki najpogosteje povzročajo bolezenska znamenja pri okrasnih rastlinah so iz rodov *Xanthomonas* in *Pseudomonas* ter bakterije, ki povzročajo mehko gnilobo in so bile nekdanje uvrščene v rod *Erwinia*, sedaj pa so jih taksonomsko uvrstili v rodova *Pectobacterium* in *Dickeya*. Pri rastlinskih patogenih bakterijah je zelo pogosta razvrstitev v patovarje, ki niso taksonomska enota, vendar so vezani na gostiteljsko rastlino. Pogosto je patovar določene vrste bakterije slabo definiran, kar močno otežuje ali celo ne omogoča klasifikacije novih izolatov. Metode določanja so tako pogosto generične, čas testiranja je neposredno odvisen od natančnosti opisa vrste bakterij in obstoja zanje specifičnih reagentov (protiteles, oligonukleotidnih začetnikov) in lahko traja od enega do več tednov. Dodatno se čas testiranja podaljša zaradi potrditve Kochovih postulatov z izvedbo testa patogenosti na gostiteljski rastlini, iz katere smo pridobili izolat, ter reizolacije bakterij in potrditve identičnosti izolatov. Celotno testiranje in identifikacija povzročitelja je zelo pomembna predvsem z vidika pravilnega pristopa k zatiranju ter razumevanja bolezni.

V preglednici 1 so zbrane nekatere najpogostejše povzročiteljice bakterijskih bolezni pri okrasnih rastlinah z bolezenskimi znamenji, ki jih povzročajo. Nekateri od teh organizmov se nahajajo na seznamih škodljivih organizmov, ki so priloge Direktivi Sveta 2000/29/ES (UL L 169, 10.07.2000) ali na seznamih škodljivih organizmov organizacije EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization; <http://www.eppo.org/>). Primer je bakterija *Ralstonia solanacearum* (preglednica 1), ki ima zelo širok krog gostiteljskih rastlin. Bakterija je na podlagi gostiteljskih rastlin razdeljena v različne rase in na osnovi sposobnosti uporabe treh heksoznih alkoholov in treh disaharidov v biovarje (Hayward, 1994). Za Slovenijo je najpomembnejša bakterija *Ralstonia solanacearum* rasa 3, biovar 2, ki povzroča rjavo gnilobo krompirja. Med drugim je bakterija v Evropo prišla iz Kenije s potaknjenci *Pelargonium*

zonale (Janse *et al.*, 2004). Na seznam A2 škodljivih organizmov organizacije EPPO sta uvrščeni tudi bakteriji *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, ki povzroča bolezenska znamenja na difenbahijah in pa bakterija *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*, ki okužuje božične zvezde in nekatere druge rastline (preglednica 1). V letu 2009 smo analizirali vzorec božične zvezde, ki je imel značilna bolezenska znamenja za bakterijo *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*. Do takrat je bila bakterija v Evropi opisana leta 2003 v Italiji in Nemčiji ter leta 2007 na Češkem in v Avstriji (EPPO, 2010). Diagnostični protokol za določanje te bakterije ni na voljo, zato smo za potrditev te bakterije izbrali priporočene metode iz literature ter uporabili določene generične metode (BOX-PCR, sekvenca gena *gyrB* ter biokemijske teste).

Preglednica 1: Seznam najpogostejših rastlinskih patogenih bakterij, gostiteljskih rastlin, ki jih okužujejo ter najpogostejša bolezenska znamenja, ki jih povzročajo (Daughtrey *et al.*, 1995, Janse 2006)

Bakterija	Gostiteljska rastlina	Bolezenska znamenja
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Širok krog gostiteljskih rastlin med okrasnimi rastlinami in zelenjadnicami (npr. <i>Pelargonium</i> spp., <i>Hedera helix</i> , <i>Calathea</i> , <i>Dieffenbachia</i> , <i>Dendranthema x grandiflorum</i> ,...)	pege na listih
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Od okrasnih rastlin najpogosteje <i>Euphorbia</i> , <i>Hibiscus</i> , <i>Capsicum</i> , <i>Hydrangea</i>	Razjede, pege na listih, uvelost ovršnih listov in popkov
Patovarji bakterije <i>Pseudomonas syringae</i>		
pv. <i>hibiscus</i>	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Mastne pege na listih
pv. <i>tagetis</i>	<i>Tagetes</i> sp.	
pv. <i>primulae</i>	<i>Primula</i> spp.	
pv. <i>syringae</i>	Širok krog gostiteljskih rastlin	
Patovarji bakterije <i>Xanthomonas hortorum</i>		
pv. <i>pelargonii</i>	<i>Pelargonium</i> in <i>Geranium</i> spp.	Mastne pege na listih, venenje rastlin
pv. <i>hederae</i>	<i>Hedera helix</i>	Mastne pege na listih
Patovarji bakterije <i>Xanthomonas axonopodis</i>		
pv. <i>poinsettiicola</i> *	<i>Euphorbia pulcherrima</i> , <i>Euphorbia mili</i> , <i>Codiaeum variegatum</i>	Mastne pege na listih, nekateri patovarji povzročajo venenje rastlin
pv. <i>begoniae</i>	<i>Begonia</i>	
pv. <i>diefenbachiae</i> *	<i>Dieffenbachia</i> spp.	
pv. <i>fici</i>	<i>Ficus</i> spp.	
pv. <i>malvacearum</i>	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	
<i>Ralstonia solanacearum</i> **	Širok krog gostiteljskih rastlin (rasa 3, biovar 2; <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Pelargonium zonale</i> ,...)	Rumenenje spodnjih listov, ki postanejo nekrotični, venenje celotnih rastlin
<i>Pectobacterium</i> spp., <i>Dickeya</i> spp.***	Širok krog gostiteljskih rastlin (npr. <i>Begonia</i> spp., <i>Dahlia</i> spp., <i>Chrysanthemum</i> spp., <i>Zea mays</i> , <i>Dieffenbachia</i> spp., <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Philodendron</i> spp...)	Gniloba stebila in korenin
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Širok krog gostiteljskih rastlin (npr. <i>Aster</i> spp., <i>Chrysanthemum</i> spp., <i>Ficus</i> spp., <i>Rosa</i> spp.,...)	Tumorji na različnih delih rastlin

* Bakterija uvrščena na A2 seznamu škodljivih organizmov organizacije EPPO

** Bakterija uvrščena na seznam I.A.II Direktive Sveta 2000/29/ES in na A2 seznam škodljivih organizmov organizacije EPPO

*** Bakterija *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* uvrščena na seznam II.A.II Direktive Sveta 2000/29/ES na rastlinah *Dianthus* L. za saditev ter bakterija *Dickeya (Erwinia) chrysanthemi* na A2 seznam škodljivih organizmov organizacije EPPO

2 MATERIAL IN METODE

V letu 2009 in 2010 smo v testiranje za pojav bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* prejeli 22 vzorcev božičnih zvezd različnih kultivarjev (Christmas feeling pink, Christmas carol, Saturnus red, Crazy marble star, Cortez red, Tosca red in drugi) z bolezenskimi znamenji v obliki nekrotičnih peg. Tkivo, izrezano iz okolice peg, smo inkubirali 20 min ter izvedli izolacijo bakterij na splošnih gojiščih (YPGA, King B, Wilbrink). Pri vzorcih, kjer smo opazili bakterije, ki so po morfologiji ustrezale bakterijam iz rodu *Xanthomonas*, smo izvedli test hipersenzitivne reakcije na rastlinah paradižnika ter identifikacijske teste: test BOX-PCR (Versalovic *et al.*, 1994), biokemijske teste, ter analizo talilne temperature PCR produkta gena *gyrB*. Izolat prvega prejetega vzorca D1632-4 smo poslali v potrditev v FERA (The Food and Environment Research Agency) laboratorij v Veliko Britanijo, kjer so izvedli sekvenciranje gena *gyrB* (Parkinson *et al.* 2009) Test patogenosti izolatov smo izvedli na božičnih zvezdah s pršenjem suspenzije na spodnje površine listov (Lelliot in Stead, 1987). Po razvoju bolezenskih znamenj na testnih rastlinah, smo izvedli reizolacijo bakterij in jih identificirali z metodo BOX-PCR. Na podlagi vpeljanih metod in rezultatov smo izdelali shemo testiranja zastopanosti bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* v vzorcih božičnih zvezd.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Od prejetih 22 vzorcev božičnih zvezd s sumom na bakterijo *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* ali druge bakterije, smo to bakterijo potrdili pri 9 vzorcih (41 %) kjer so tudi bila izražena tipična bolezenska znamenja. Pri ostalih vzorcih pa so bile opažene pege ali nekroze lahko posledica zastopanosti drugega organizma ali fizioloških dejavnikov. Za potrditev bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* je bilo potrebnih vpeljati tako biokemijske kakor tudi molekularne teste. Rezultate testov izoliranih bakterij smo primerjali s tipskim sevom patovarja bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* LMG 849. Ugotovili smo, da enako kakor sev LMG 849, tudi vsi izolati povzročajo hipersenzitivno reakcijo na paradižniku, so negativni na oksidazo, imajo sposobnost hidrolize škroba in tributirina in tvorijo kislino iz saharoze ter šibko oksidativno razgrajujejo glukozo. Z metodo BOX-PCR smo ugotovili, da se prstni odtisi naših izolatov v primerjavi s sevom LMG 849 razlikujejo le enem fragmentu, kar je pričakovana raznolikost za to bakterijo v tem testu. Prvi izolat (D1632/09-4) smo poslali v potrditev (verifikacijo) v tuj laboratorij, kjer so na podlagi sekvence gena *gyrB* izolat identificirali kot *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* (99% identičnost z referenčnim sevom *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* LMG 5401). Kot alternativo metodi sekvenciranja smo uvedli tudi analizo talilne temperature PCR produkta gena *gyrB* s katero lahko hitro identificiramo izolate v laboratoriju. Izolati so po 10 dneh inkubacije na testiranih rastlinah božičnih zvezd povzročili razvoj značilnih peg. Iz njih smo izvedli reizolacijo bakterij ter reizolirane izolate identificirali z BOX-PCR. Analiza je pokazala, da imajo izolati pred testom patogenosti in po njem identični prstni odtis DNA, kar pomeni, da so testirani izolati povzročili opažena bolezenska znamenja.

Na podlagi vpeljanih metod in pridobljenih rezultatov iz vseh pozitivnih in negativnih vzorcev v preteklih dveh letih smo izdelali shemo testiranja božičnih zvezd na pojav bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*, ki je del diagnostičnega postopka v sistemu kakovosti, na podlagi katerega izvajamo testiranje.

Rezultati analiz kažejo, da se ta bakterija v zadnjih letih precej pogosto pojavlja in povzroča težave proizvajalcem. Najboljše varstvo pred to bakterijo je zdrav rastlinski material ter ustrezna higiena pri razmnoževanju ter gojenju rastlin. Ob pojavu bolezni pa čim hitreje odstranjevanje obolelih delov in ustrezno uničenje.

4 SKLEPI

S povečanjem svetovne trgovine tudi v Slovenijo prihaja več okrasnih rastlin iz tujine in s tem se povečuje tudi možnost vnosa za Slovenijo novih škodljivih organizmov. Tak primer je bil v letu 2009 tudi vnos bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* na božičnih zvezdah. Bakterija sicer redkeje povzroča propad cele rastline, vendar že zaradi videza, obolele rastline izgubijo ekonomsko vrednost. Poleg tega, da bakterije lahko povzročajo škodo na okrasnih rastlinah pa je še pomembnejše, da so te rastline vir za prenos na ostale kulturne rastline, kakor je primer prenosa bakterije *Ralstonia solanacearum* iz pelargonij na krompir. Zato sta nadzor in analiza okrasnih rastlin na rastlinske patogene bakterije zelo pomembna.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se sodelavcem Fitosanitarne inšpekcije za nabrane vzorce in koristne informacije o stanju pri pridelovalcih ter Fitosanitarni upravi RS in Fitosanitarni inšpekciji za sofinanciranje ter Lidiji Matičič, Alešu Blatniku in Špeli Prijatelj Novak za pomoč pri izvedbi laboratorijskih testov.

6 LITERATURA

- Daughtrey, M.L., Wick, R.L., Peterson, J.L. 1995. Compendium of Flowering Potted Plant Diseases. The American Phytopathological Society, USA
- EPPO. 2010. *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*. Bacterial leaf spot of poinsettia. Dostopno na: http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/XANTPN_a.htm
- Hayward AC. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. V: Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Hayward, A.C., Hartman, G.L. (eds.). Wallingford: CABI Publishing: 123-135.
- Janse, J.D., van den Beld, H.E., Elphistone, J., Simpkins, S., Tjou-Tam-Sin, N.N.A., van Vaerenbergh, J. 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, Race 3 in Pelargonium zonale cuttings. Journal of plant pathology, 86 (2), 147-155
- Janse, J.D. Phytobacteriology: Principles and Practice. 2006., CABI Publishing, 175-269
- Lelliott, R. A., Stead, D. E. 1987. Host tests. In: Methods in Plant Pathology. Vol 2. Blackwell, Oxford
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J., Stead, D. 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of gyrB sequences. Int J Syst Evol Microbiol 59 (2009), 264-274
- Pfleger, F.L., Gould, S.L.. 2009. Bacterial Leaf Diseases of Foliage Plants. Dostopno na: <http://www.extension.umn.edu/distribution/horticulture/dg1170.html> (10.5.2011)
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., and Lupski, J.R. 1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Meth.Cell. Mol. Biol. 5: 25-40