

KARANTENSKA BAKTERIJA *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* NA FIŽOLU

Tanja DREO¹, Tina DEMŠAR², Maja RAVNIKAR³

^{1,2,3}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,
Ljubljana

IZVLEČEK

Bakterija *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), ki povzroča navadno bakterijsko pegavost fižola je na IIA2 karantenski listi. Glavni gostitelj je fižol (*Phaseolus vulgaris*). Najugodnejše razmere za razvoj bolezni so visoka vlaga in višje temperature (28°C). V ugodnih razmerah za razvoj resne epifitocije in do polovične izgube pridelka na polju zadostuje že ena okužena rastlina na 10000 zdravih. Najpomembnejši način širjenja te bakterije je sajenje okuženega semena, ki je lahko brez znamenj bolezni in se najde v na videz zdravih strokih. V okuženem semenu ali na njegovem površju lahko bakterija preživi dlje od obdobja njegove kalivosti. Bakterijo *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* dokazujemo z laboratorijskimi testi, ker podobna znamenja bolezni povzročajo tudi drugi patogeni organizmi, ki pa nimajo karantenskega statusa. Iz tkiva z znamenji bolezni je izolacija bakterij hitra in enostavna. Določanje bakterije v semenih brez znamenj bolezni je zahtevnejše, ker je v semenu bakterij malo in so neenakomerno razporejene. Izolacijo iz semena dodatno otežuje tretiranje semen in zastopanost drugih bakterij. Poglavitni ukrepi preprečevanja bolezni so uporaba zdravega semena, sajenje ob ustreznem času, kolobar z negostiteljskimi rastlinami in uporaba rezistentnih kultivarjev. Možno je tudi razkuževanje okuženega semena.

Ključne besede: fižol, bakterija, navadna pegavost, *Xanthomonas*

ABSTRACT

QUARANTINE BACTERIA *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ON BEANS

Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), causative agent of common bacterial blight of beans is included in Slovenian IIA2 quarantine list. Main host is common beans (*Phaseolus vulgaris*). Optimal conditions for disease development are moisture and higher temperatures (28°C). One infected plant per 10.000 healthy ones is enough for development of a serious epiphytotic. Main route of spread is by planting infected seed. Infected seed may not show any symptoms and can be developed in healthy or infected pods. In and on seed bacteria can survive longer than the seed itself. Because other pathogens that do not have quarantine status can cause similar symptoms laboratory tests are necessary for confirmation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. From symptomatic tissues bacteria can be readily and quickly isolated. Determination of seed contamination is difficult due to their small numbers and uneven distribution. Chemical seed treatment and other microorganisms present in or on seeds can also hinder isolation. Disease control includes planting healthy seed, rotation of beans with non-host plants and use of resistant cultivars. Decontamination of seed is possible using chemical and physical treatment or meristem culture.

Keywords: beans, bacteria, common blight, *Xanthomonas*

¹ univ. dipl. mikrobiol., Večna pot 111, SI-1001 Ljubljana

² univ. dipl. biol., prav tam

³ prof. dr. biol. znan., prav tam

1 UVOD

Pridelovanje fižola je razširjeno po vsem svetu. Najugodnejša temperatura za rast fižola je 16-21°C, medtem ko je najugodnejša temperatura za razvoj navadne bakterijske pegavosti 28°C. Bolezen je razširjena tudi v Evropi, v večini držav lokalno. V nekaterih območjih predvsem na jugu in vzhodu kjer so razmere za razvoj bolezni ugodne, na primer tudi v Avstriji in na Madžarskem, pa je bolj razširjena (Distribution maps of quarantine pests for European Union and Mediterranean Plant Protection Organization. 1998).

Glavni gostitelj karantenske bakterije, ki bolezen povzroča, je navadni fižol, *Phaseolus vulgaris*, enoletnica pri kateri bolezen okužuje vse nadzemne dele. Naravni gostitelji so tudi nekatere druge stročnice (*Phaseolus lunatus* - limski fižol, *Vigna aconitifolia*, *Vigna radiata* – zlati fižol), ki pa v Evropi niso razširjene. Bolezen je pomembna, ker skupaj s fižolovim ožigom (gliva *Colletotrichum lindemuthianum*), belo gnilobo (gliva *Sclerotinia sclerotiorum*) in virusom navadnega fižolovega mozaika povzroča največje izgube pridelka (Compendium of Bean Diseases, 1994). V ugodnih razmerah povzroča prave fitocije in povzroči tudi do 50% in večje izgube pridelka. Na Nacionalnem inštitutu za biologijo smo bakterijo laboratorijsko dokazali že leta 1996 v sortah Zorin in Starozagorski. V letu 2002 smo skupaj s fitosanitarnimi inšpektorji v okviru Twinning projekta med Slovenijo in Nizozemsko, ki ga je vodila Uprava za varstvo rastlin RS opravili vizualne preglede nasadov fižola in odvzeli 10 vzorcev, ki so kazali znamenja bolezni. V istem letu smo testirali en vzorec semena fižola brez znamenj bolezni.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Vizualni pregledi

Opravljena sta bila dva vizualna pregleda. 26. 8. 2002 je bil vizualni pregled opravljen na Primorskem področju, 28. 8. 2002 pa na območju Štajerske.

2.2 Vzorci

Skupno je bilo testiranih 11 vzorcev fižola.

V okviru Twinning projekta so bili na Štajerskem odvzeti štirje (4) vzorci listov in štirje (4) vzorci strokov. Na Primorskem je bil odvzet en vzorec listov in en vzorec strokov fižola. Vzorci z znamenji bolezni so bili testirani na bakteriji *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoli*. En vzorec semena fižola brez znamenj bolezni smo testirali na bakterijo *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*.

2.3 Izolacija bakterij iz rastlin z znamenji bolezni

Po površinski sterilizaciji smo izrezali tkivo na meji med zdravim in okuženim. Tkivo smo stresali v pufru. Ekstrakt smo nanесли na splošno gojišče YPGA. Po 3 dneh inkubacije smo izbrali kolonije z značilno morfologijo in jih precepili.

2.4 Izolacija bakterij *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* iz semena fižola brez znamenj bolezni

Izolacija je potekala v laboratoriju za bakteriologijo Plant Protection Service na Nizozemskem. Vzorec je bil razdeljen v pet podvorcev po 100 semen. Podvorce smo stresali v pufru pri 4°C čez noč. Ekstrakt smo nacepili na splošno gojišče YPGA in selektivni gojišči PTS ter NSCAA (Schaad in sod., 2001). Po inkubaciji 2 do 7 dni smo izbrali kolonije z značilno morfologijo in jih precepili.

2.5 Potrditveni testi

Bakterije smo potrjevali z biokemijskimi testi kot so opisani v Braun-Kiewnick, A. in Sands, D.C. (2001) in Schaad, N. W. in sod., 2001 ter testom patogenosti na tobaku (Klement in sod., 1990).

Trije izolati so bili verificirani v laboratoriju za bakteriologijo Plant Protection Service v Wageningnu na Nizozemskem kjer so za potrjevanje uporabili opazovanje morfologije na gojiščih, biokemijske teste, test indirektna imunofluorescence in analizo profila maščobnih kislin.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Podatki o vzorcih in rezultati testiranja so prikazani v preglednici 1.

Znamenja bolezn, kot smo jih opazili ob vizualnih pregledih, so ustrezala opisom v literaturi (Compendium of Bean Diseases, 1994).

Pege na listih, ki so sprva vodene, so bile ob pregledih in vzorčenjih večje in obkrožene s tankim robom rumenega tkiva. Rumeni obroč je običajno izrazitejši v primeru okužbe z bakterijo *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoli* vendar znamenje ni dovolj značilno da bi omogočalo razlikovanje.

Stroki se okužijo bodisi z neposrednim prehodom bakterije prek stene ali iz okužene rastline prek žilnega sistema. Pege so sprva majhne, vodene, sčasoma pa se povečajo in potemniijo. Pege na strokih iz katerih smo uspeli izolirati bakterijo *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* so bili obdani s tankim rdečerjavim robom. Včasih lahko na pegah opazimo kapljice rumenega bakterijskega izcedka. Ko se te posušijo, na površini ostane krhka belkasta prevleka.

V 4 od 11 vzorcev nismo izolirali patogenih bakterij. V enem primeru smo glede na znamenja bolezn sklepali da gre za fižolov ožig za katerega so značilna podobna znamenja bolezn in vzorec izločili iz testiranja.

V ostalih vzorcih z znamenji bolezn so bile bakterije zastopane v velikem številu. Kljub temu z vizualnim pregledovanjem večinoma nismo mogli ločiti med obema patogenima bakterijama, ki okužujeta fižol. Podobna znamenja bolezn lahko opazimo tudi pri mastni fižolovi pegavosti, ki jo povzroča bakterija iz rodu *Pseudomonas*, ki ni karantenska. To bakterijo smo določili v dveh vzorcih (598/02 in 632/02). V enem primeru sta bili v rastlini hkrati zastopani obe bakteriji kar še dodatno otežuje prepoznavanje bolezn.

Izolacija bakterij iz vzorcev z znamenji bolezn je enostavna in hitra. Celotno testiranje traja 5 do 10 dni pri čemer največ časa vzame sama rast in morebitno čiščenje zraslih kolonij.

Zaradi podobnih znamenj bolezn, ki jih lahko povzročajo drugi patogeni organizmi pa je laboratorijsko potrjevanje za dokazovanje navadne bakterijske fižolove pegavosti nujno.

Testiranje semena na bakterijo *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* je zahtevnejše in hkrati pomembno, saj je okuženo seme poglaviti način širjenja te bolezn. Znotraj stroka z izraženimi znamenji bolezn praviloma najdemo okuženo seme, vendar je seme lahko okuženo tudi če strok ne kaže znamenj bolezn.

V takšnem semenu je lahko tudi do 100.000 bakterij (Weller, D. M. & Saettler, A. W., 1980). Bakterije se nahajajo na površju in v notranjosti semena zato je površinsko razkuževanje le delno učinkovito. Ob kalitvi semena se bakterije začnejo namnoževati med celicami dokler ne dosežejo žilnega sistema po katerem se širijo naprej. Pri tem lahko nastanejo lokalne ali sistemske okužbe. Za razvoj okužene rastline iz semena zadostuje že 1.000 – 10.000 bakterij na seme (Weller, D. M. & Saettler, A. W., 1980). Iz madežev pa tudi iz propadlih okuženih rastlin se bolezen v ugodnih razmerah širi znotraj ene rastline in med rastlinami. Ugodne razmere so predvsem višja temperatura (28°C) in vlaga, ki sta tudi pri nas pogosti. Bakterije se prenašajo z vetrom, dežjem, v ZDA so opazili tudi prenos z insekti, možen pa je tudi mehanski prenos.

Preglednica 1: Vzorci fižola testirani na patogene bakterije v letu 2002 in rezultati testiranj
 Table 1: Bean samples tested for plant pathogenic bacteria in 2002 with results

Področje vzorčenja	Oznaka vzorca	Tip vzorca	Znamenja bolezní ¹	Najdene bakterije ²
Primorska	598/02	listi	+	Psph
	597/02	stroki	+	Neg
Štajerska	617/02	listi	+	Neg
	622/02	listi	+	Xcph ⁴
	623/02	listi	+	Xcph ⁴
	626/02	listi	+	Xcph
	618/02	stroki	+	Neg
	630/02	stroki	+	Xcph
	631/02	stroki	+	<i>Colletotrichum</i> ³
	632/02	stroki	+	Psph Xcph
	1345/02	semena	-	Xcph ⁴

¹ + = znamenja bolezní, - = znamenj bolezní ni

² Psph = *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoli*, Xcph = *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, Neg = nismo izolirali patogenih bakterij

³ Analize niso bile opravljene, glede na simptome fižolovega ožiga, ki ga povzroča *Colletotrichum lindemuthianum*

⁴ Izolati dodatno potrjeni v laboratoriju za bakteriologijo v Plant Protection Service (Wageningen, Nizozemska)

Če okužene rastline ne odstranimo pravočasno, lahko že ena sama rastlina na 10.000 zdravih povzroči pravo epidemijo (Weller, D. M. & Saettler, A. W., 1980). Bakterije v/na semenu preživijo dlje od obdobja njegove kalivosti (Arnaud-Santana, E. *in sod.*, 1991). Zimo preživijo tudi v ostankih okuženega rastlinskega materiala.

Težave, ki so pri testiranju semena, so predvsem nizka koncentracija bakterij, tretiranje semen z različnimi kemičnimi razkužili, ki pogosto močno zavirajo rast bakterij na gojiščih in predvsem nehomogena razporeditev bakterij v vzorcu. V vzorcu 10.000 semen (4-20 kg fižola) zadostuje že eno okuženo za kasnejši razvoj epifitocije.

Za testiranje semena se večinoma uporablja izolacija bakterij iz vzorca z namakanjem v pufu in nanos ekstrakta na splošna ali selektivna gojišča. Metode v različnih laboratorijih niso usklajene, razlikujejo se predvsem v količini testiranega vzorca, ki je bistvenega pomena za doseganje primerne občutljivosti (Seed Health Testing Methods, Reference Manual, 2002). Tudi če upoštevamo vse naštet, z metodami, ki se uporabljajo za testiranje semen ne moremo zagotoviti, da seme v primeru negativnega rezultata ni okuženo. Kljub temu nam metode omogočajo zaznati relativno nizke koncentracije bakterij in nudijo dodatni nadzor bolezní. Ne more pa biti testiranje semena edini način zatiranja.

Ukrepi za preprečevanje bolezní so predvsem uporaba zdravega semena. Širjenje bolezní omejujemo tudi s triletnim kolobarjem z negostiteljskimi rastlinami na primer koruzo, žiti, vrtninami in odstranjevanjem vseh rastlin fižola, ki zrastejo iz semena, ostalega na polju.

Izogibamo se delu z rastlinami ko so mokre in skušamo skrajšati obdobja vlage in zmanjšati količino vlage, na primer tako da ne zalivamo z meglenjem. Bolezen lahko delno omejimo s škropljenjem z bakrovimi pripravki. Nekateri priporočajo sajenje tolerantnih sort vendar le-te lahko predstavljajo vir okužbe za druge občutljive sorte.

Seme je mogoče razkužiti s kemijsko fizikalnimi metodami na primer s suhim segrevanjem semena pri skoraj 50°C 3 dni, ki mu sledi namakanje v natrijevem hipokloritu in namakanje v raztopini antibiotika streptomicina. Možno je tudi odstranjevanje patogena s

kulturo meristema. Pri tej metodi izoliramo celice iz rastnega vršička, ki navadno niso okužene in iz njih na posebnih gojiščih vzgojimo nove rastline. Gojišča so kompleksna in specifična za vsako sorto fižola. Razvoj takega gojišča zahteva vsaj 1-2 leti. Na Nacionalnem inštitutu za biologijo je bila razvita in uspešno uporabljena metoda odstranjevanja patogenov s kulturo meristema za sorto Zorin in Starozagorski (Ravnikar, M. in sod., 1997; Grum, M. in Ravnikar, M., 1997).

Obe metodi razkuževanja moramo povezati s fitosanitarnim nadzorom zraslih rastlin.

4 SKLEPI

Navadna bakterijska fižolova pegavost je v Sloveniji verjetno precej razširjena. Bolezen je v preteklosti že ogrozila in še ogroža ohranitev slovenskih sort fižola. Ustrezni ukrepi pridelovalcev fižola so skupaj z nadaljnjimi fitosanitarnimi pregledi nujni za preprečevanje širjenja te bolezni.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Upravi RS za varstvo rastlin in semenarstvo MKGP, fitosanitarnim inšpektorjem Inšpektorata RS za kmetijstvo, gozdarstvo, lovstvo in ribištvo, Ministrstvu za šolstvo znanost in šport in dr. Jaapu Janseju iz bakteriološkega laboratorija Plant Protection Service, Wageningen, Nizozemska.

6 LITERATURA

- Arnaud-Santana, E., Pena-Matos, E., Coyne, D. P. & Vidaver, A. K. 1991. Longevity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infested dry bean (*Phaseolus vulgaris*) debris. *Plant disease* 75[9]: 952-953.
- Braun-Kiewnick, A. in Sands, D.C. *Pseudomonas*. V: Schaad, N.W., Jines, J.B., Chun, W. (ur.). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2001. St'Paul, The American Phytopathological Society: 84-117.
- Compendium of Bean Diseases. 1994. Hall, R. (ur.). St'Paul: The American Phytopathological Society: 73 str.
- Distribution maps of quarantine pests for European Union and Mediterranean Plant Protection Organization. 1998. Smith, J. M., Charles, L. M. F. (ur.). Wallingford. New York: CABI Publishing, EPPO: map 283.
- Grum, M. in Ravnikar, M. 1997. Bakterije iz rodu *Pseudomonas* kot patogeni na fižolu. V: Maček, J. (ur.). Zbornik predavanj in referatov 3. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 4.-5. marec 1997. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 1997: 265-268.
- Klement, Z., Mavridis, A., Rudolph, K., Vidaver, A., Pérombelon, M.C.M., Moore, L.W. 1990. Inoculation of plant tissues. V: Methods in phyto bacteriology. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (ur.). Budapest: Akadémiai Kiadó: 95-124.
- Ravnikar, M., Grum, M., Mavrič, I., Camloh, M. 1996. Določanje in eliminacija bakterij in virusov pri fižolu (*Phaseolus vulgaris* L.), ki se prenašajo s semenom. V: Novi izzivi v poljedelstvu '96: zbornik simpozija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, 1996: 195-199.
- Schaad, N.W., Jines, J.B., Lacy, G.H. *Xanthomonas*. V: Schaad, N.W., Jines, J.B., Chun, W. (ur.). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2001. St'Paul, The American Phytopathological Society: 175-199.
- Seed Health Testing Methods, Reference Manual. 2002. van Ettehoven, K. (ur.). Method Be3.1, Method Be3.2.
- Weller, D. M. & Saettler, A. W. 1980. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. *Phytopathology* 70[2]: 148-152.