

NOVE NAJDBE BAKTERIJE *Xylella fastidiosa* V EVROPI IN CILJNI RAZISKOVALNI PROJEKT V4-1603 XYLVEC

Tanja DREO¹, Erika OREŠEK², Matjaž JANČAR³, Gabrijel SELJAK⁴, Ivan
ŽEŽLINA⁵, Mojca ROT⁶, Maja RAVNIKAR⁷

^{1,4,7} Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

² Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Uprava Republike Slovenije za
varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, Ljubljana

³ Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica,
Koper

^{5,6} Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica,
Nova Gorica

IZVLEČEK

Bakterija *Xylella fastidiosa* (Wells & Raju) je rastlinski patogen, ki povzroča nevarne bolezni na večjem številu rastlinskih vrst. Najbolj znani sta Pierce-ova bolezen vinske trte, ki je razširjena v nekaterih delih ZDA in šarasta bledica agrumov, ki povzroča največ škode v Južni Ameriki. Bakterija se uspešno prenaša z okuženim sadilnim materialom in žuželčimi prenašalci. V EU je bakterija uvrščena med karantenske škodljive organizme. V jeseni 2013 je bila prvič potrjena v Evropi v italijanski pokrajini Apuliji v provinci Lecce, kjer še danes povzroča obsežno propadanje mladih in starih oljk. Kmalu se je pokazalo, da lahko različek vrste *X. fastidiosa*, ki je razširjen v Italiji, okuži številne gostiteljske rastline in še danes odkrivajo nove. Do sedaj so bakterijo na območju EU našli tudi na ozemlju Francije in Španije. V prispevku predstavljamo nove najdbe in nova spoznanja o pojavljanju bakterije *X. fastidiosa* v Evropi ter naše aktivnosti v okviru ciljnega raziskovalnega projekta V4-1603, XylVec.

Ključne besede: bakterijski ožig oljk, karantenske bakterije

ABSTRACT

NEW FINDINGS OF *Xylella fastidiosa* IN EUROPE AND ACTIVITIES WITHIN XYLVEC, A TARGETED RESEARCH PROJECT (V4-1603)

¹ dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: tanja.dreo@nib.si

² mag., Dunajska cesta 22, SI-1000 Ljubljana

³ univ. dipl. inž. agr., Ulica 15. maja 17, SI-6000 Koper

⁴ mag., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

⁵ dr., Pri hrastu 18, SI-5000 Nova Gorica

⁶ univ. dipl. inž. agr., prav tam

⁷ dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

The bacterium *Xylella fastidiosa* (Wells & Raju) is a plant pathogen that causes serious diseases of a large number of plant species. Best known are Pierce's disease of grapevine, which is widespread in some parts of the US, and citrus variegated chlorosis limiting citrus production in South America. The bacterium is spread through infected planting material and insect vectors. In the EU, the bacterium is classified as a quarantine pest. It was found in Europe for the first time in autumn 2013, in Italian province of Lecce in the Puglia region where it is still causing an extensive olive quick decline, affecting both young and old trees. Soon it became clear that the variant of *X. fastidiosa* present in Italy can infect many other host plants and even today, new hosts are being discovered. Until now, the bacterium has been reported also from other EU countries, France and Spain. In this contribution, we present new findings and new knowledge on the occurrence of *X. fastidiosa* in Europe and our activities within a new targeted research project, XylVec (V4-1603) which began in 2016.

Keywords: olive quick decline syndrome, quarantine bacteria

1 UVOD

Xylella fastidiosa (Wells et al., 1987) je karantenska bakterija, ki povzroča boleznin in motnje rasti na večjem številu rastlinskih vrst. Ugotovljena je bila na več kot 300 različnih rastlinskih vrstah, velika večina med njimi so drevesa, grmovnice in druge večletne rastline, okuži pa lahko tudi enoletne rastline.

Domneva se, da bakterija *Xylella fastidiosa* izvira iz Amerike, kjer povzroča gospodarsko škodo na vinski trti (Pierce-ova bolezen) in agrumih (šarasta bledica agrumov) ter občasno na drugih gostiteljskih rastlinah. Iz držav izvora se je bakterija razširila na nova območja. Vnos bakterije *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* na Tajvan je povzročil epidemijo na vinski trti (Su in sod. 2013), o okužbah s to bakterijo na mandljevcih in na vinski trti so poročali tudi iz Irana (Amanifar in sod., 2014). V Evropi so jo prvič potrdili leta 2013 v južni Italiji (Cariddi in sod., 2014) na oljkah.

Vnos tega škodljivega organizma v Evropo predstavlja resno grožnjo za gojenje številnih rastlin v naši državi. Podobno kot za druge bakterijske boleznin rastlin tudi pri okužbah z vrsto *X. fastidiosa* nimamo orodij za zdravljenje okuženih rastlin. Zato so na ravni EU sprejeti ukrepi za preprečevanje vnosa in širjenja te nevarne bakterije. Na nacionalni ravni Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin skupaj s sodelavci od leta 2014 dalje izvaja program preiskave zastopanosti bakterije *X. fastidiosa*, stalni nadzor rastlin na trgu, nekatere dodatne aktivnosti pa se izvajajo v okviru ciljnega raziskovalnega projekta XylVec (CRP V4-1603). Slovenija je sicer ena redkih držav, ki je zastopanost bakterije *X. fastidiosa* preverjala že v preteklosti vzporedno z vpeljavo metod določanja v CRP V4-0313 (Mavrič in sod., 2009).

V prispevku so predstavljene informacije o stanju vrste *X. fastidiosa* v Evropi ter izbrane projektne vsebine.

2 PODVRSTE IN RAZNOLIKOST *X. fastidiosa*

Znotraj vrste *X. fastidiosa* je precej genotipske in fenotipske raznolikosti, čemur so botrovali opisi različnih podvrst, npr. *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, subsp. *pauca*, subsp. *multiplex* in subsp. *sandyi* (Schaad in sod., 2004; Schuenzel in sod., 2005). Podvrste se med seboj razlikujejo tudi po gostiteljskih rastlinah, pri katerih povzročajo gospodarsko škodo, zato je pri diagnostiki pomembno njihovo razlikovanje.

Izolati podvrste *fastidiosa* povzročajo boleznine vinske trte (Davis in sod., 1978) in okužujejo mnoge druge rastline, npr. mandljevce (Chen in sod., 2005). Podvrsta *multiplex* ne okužuje vinske trte, vendar ima po dosedanjih opažanjih najširši spekter gostiteljskih rastlin, ki izražajo bolezenska znamenja. Med gostiteljskimi rastlinami podvrste *multiplex* so mandljevci, breskve, slive in mnoge druge rastline. V južni Ameriki povzroča bolezenska znamenja na agrumih in kavovcih podvrsta *pauca*, medtem ko ožig oleandrov povzroča podvrsta *sandyi*.

Raziskovalci so že zgodaj predpostavili, da je v Južni Ameriki prišlo do medvrstne rekombinacije med podvrstama *pauca* in *multiplex* in da je to razlaga za opažanje, da prihaja do okužb gostiteljskih rastlin, ki jih gojijo že vsaj 250 let, šele v zadnjih 25 letih (Nunney in sod., 2012). Tudi novejša raziskava potrjuje, da so med podvrstami pogoste rekombinacije, izmenjave genetskega materiala, tudi v naravnih razmerah (Coletta-Filho in sod., 2017).

Rekombinacije med podvrstami tako omogočajo bakterijam, da se hitro prilagodijo novemu okolju, tako gostiteljskim rastlinam kot tudi novim prenašalcem. Skupaj z večjim obsegom trgovine in prenosom rastlinskega materiala to predstavlja veliko tveganje za pojav novih patogenih različkov bakterije in novih občutljivih gostiteljskih rastlin.

Za zasledovanje okužb in pojasnjevanje izvora obsežnejših pojavljanj lahko izolate še natančneje okarakteriziramo in na podlagi sekvenc DNK izbranih genov določimo sekvenčni tip *X. fastidiosa*.

3 ZASTOPANOST *X. fastidiosa* V EVROPI

V Evropi se pojavljajo različne podvrste, kar nakazuje, da je bila bakterija vnesena večkrat in zelo verjetno iz različnih virov. V Italiji je v izbruh na oljkah vpletena *X. f. subsp. pauca*, podvrsta, ki je bila prej znana kot povzročiteljica šaraste bledice agrumov v Braziliji in boleznine kavovcev (*Coffea* spp.). Prenašalec bakterije v južni Italiji je navadna slinarica (*Philaenus spumarius*; Saponari in sod., 2014), o kateri prej niso poročali kot o učinkovitem prenašalcu *X. fastidiosa*. Ta je splošno razširjena in pogosta po vsej Evropi in tudi pri nas. Ožige in sušenje so ugotovili tudi na nekaterih drugih gostiteljskih rastlinah: oleandru, češnji, mirti, rožmarinu, mirtolistni grebenuši, žuki, ter na okrasnih rastlinah *Acacia saligna* in *Westringia fruticosa*. Zaradi obširnega in dolgoletnega propadanja večstoletnih oljk, oleandrov in drugih rastlin, poskusi omejevanja širjenja bolezni in sanacije že okuženih nasadov niso bili najbolj uspešni. Posledično se okuženo območje pete italijanskega škornja še vedno širi (Almeida, 2016; Abbott, 2017). Podvrsta *pauca* in isti sekvenčni tip, kot se pojavlja v

južni Italiji (sekvenčni tip ST53, izolat CoDiRO), so pozneje prestregli tudi drugod po Evropi v okuženih kavovcih, vendar se bakterije niso ustalile v naravi.

O okužbah oljk so že pred pojavom v Italiji poročali iz Kalifornije, vendar je bila vpletena druga podvrsta, zaradi različnih dejavnikov pa okužbe niso povzročile gospodarske škode.

Po najdbi bakterije v Italiji so v mnogih državah Evrope intenzivneje preverjali zastopanost *X. fastidiosa*. O najdbah okuženih rastlin v naravi so poročali s Korzike, celinskega dela Francije (okolica Nice), Balearskih otokov in, po zadnjih poročilih, s celinskega dela Španije. V Franciji so ugotovili, da je na Korziki prevladovala *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, medtem ko je bila v celinski Franciji poleg podvrste *multiplex* redkeje ugotovljena *X. fastidiosa* subsp. *sandyi*. Zaznali, vendar ne dokončno potrdili, so tudi okužbe rastlin z različnimi podvrstami in nove rekombinantne seve (Denancé *in sod.* 2017). Na Balearskih otokih v Španiji so v letu 2016 poročali o *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* in dveh drugih podvrstah *X. fastidiosa* (Govern de Les Illes Balears).

Ena najpogosteje okuženih rastlin v Evropi je okrasna rastlina mirtolistna grebenuša (*Polygala myrtifolia*), ki je v zadnjih letih v mediteranskih območjih pogosta v okrasnih zasaditvah. Poleg te so bile v Evropi na različnih lokacijah okužene mnoge druge rastline, npr. oleandri, češnje, začimbnice (rožmarin, sivka, lovor,), navadna žuka, zimzelen, javor, divji špargelj in druge. Zaskrbjujoče novice prihajajo tudi iz Španije, kjer so ugotovili tudi podvrsto *fastidiosa*, t.j. različek, ki v Ameriki okužuje vinsko trto in predstavlja grožnjo za vsa vinorodna območja.

Seznam gostiteljskih rastlin, na katerih je bila v Evropi ugotovljena *X. fastidiosa*, vzdržuje in redno posodablja Evropska komisija (Commission database of host plants found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* in the Union territory). Širši seznam gostiteljskih rastlin na katerih je bila kdajkoli in ne glede na lokacijo zaznana *X. fastidiosa*, je pripravila organizacija EFSA (EFSA Panel on Plant Health (PLH)).

4 BOLEZENSKA ZNAMENJA

Bakterija *Xylella fastidiosa* okužuje mnoge gostiteljske rastline. Bakterije v njih živijo v prevodnih ceveh, ki jih lahko popolnoma zamašijo in prekinejo tok mineralnih snovi in vode. Na rastlinah se to odraža kot venenje, sušenje in splošno odmiranje, ki je izrazitejše pri rastlinah, ki so v stresu, npr. trpijo zaradi pomanjkanja vode. Bolezenskih znamenj na videz najpogosteje ni mogoče razlikovati od fizioloških in nekaterih drugih boleznih. Samo prepoznavanje bolezenskih znamenj, ko okužbe še niso obsežne, zato zahteva veliko pozornosti, spremljanje sušenja v času ter primerjanje sušenja med rastlinami. Rastline so dolga leta lahko okužene v prikriti obliki, brez izrazitih bolezenskih znamenj. Izkušnje od drugod kažejo, da se bakterija zlahka ustali v naših podnebnih razmerah.

Pri oljkah je značilno hitro propadanje dreves. Bakterijski ožig se najprej izrazi kot sušenje listov, vendar hitro napreduje v sušenje poganjkov, manjših vej in delov krošenj. Na jugu Italije se v zgodnjih fazah bolezni sušijo predvsem veje v višjih delih krošenj, pozneje sušenje zajame cele krošnje.

Zgodnja bolezenska znamenja okužbe vinske trte v Ameriki se izrazijo kot nenadno odmiranje tkiva od roba listov proti glavni žili in peclju. Propadlo tkivo rjavi, obdaja ga rumena ali rdečkasta obroba. Ščasoma se celi listi posušijo in odpadejo, medtem ko listni peclji ostanejo na rastlini. Okuženi poganjki neenakomerno dozorevajo in olesenevajo. Močno oslabei okuženi trsi na koncu odmrejo.

Pri slivah, češnjah in mandljevcih prihaja do ožigov listov. Ta je navadno najbolj izrazit pozno poleti, ko rastline trpijo zaradi pomanjkanja vode. Pri breskvah ne prihaja do ožiga listov. Okužba se kaže v bolj temno zelenih listih, ki jeseni pozneje odpadejo kot listi neokuženih rastlin. Okužena mlada drevesa ne rodijo. Navadno ne propadejo, so pa bolj občutljiva za druge škodljive organizme.

Pri okrasnih rastlinah se pojavljajo predvsem ožigi in kloroze listov, sušenje poganjkov, okužene rastline zaostajajo v rasti in kažejo splošno oslabeledost.

Okužene so lahko tudi številne rastline v gozdnih sestojih in v mestnem okolju. Med najpomembnejše možne gostitelje pri nas spadajo hrast (*Quercus* sp.), bukev (*Fagus* sp.), platana (*Platanus* sp.), brest (*Ulmus* sp.), oreh (*Juglans* sp.), javor (*Acer* sp.), trepetlika (*Populus tremula*), murva (*Morus* sp.), vrba (*Salix* sp.) in magnolija (*Magnolia* sp.). Na okuženih drevesnih vrstah se pojavlja predvsem ožig listov, pogosto šele pozno poleti ali zgodaj jeseni. Na robovih listov se pojavljajo ožigi rjave barve in nepravilnih oblik. Na prehodu med zdravim in odmrlim tkivom je viden pas rumeno obarvanega tkiva. Medtem, ko se pri hrastih ožig pojavlja skoraj hkrati na vseh listih, se pri platanah in brestih najprej pojavi na starejših listih.

151

5 CILJNI RAZISKOVALNI PROJEKT XYLVEC (V4-1603)

Namen ciljnega raziskovalnega projekta, ki se je začel v letu 2016, je prispevati k povečanju pripravljenosti sektorja varstva rastlin na morebitni izbruh bakterije *X. fastidiosa* v Sloveniji. Projekt je sestavljen tako, da združuje posebne ekspertize posameznih partnerjev, tako predvsem poznavanje bakterije *X. fastidiosa* in diagnostičnih metod (Nacionalni inštitut za biologijo) s prisotnostjo na terenu, rednim stikom s pridelovalci, poznavanjem prepoznavanja bolezenskih znamenj in entomološkim znanjem (Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica).

Aktivnosti triletnega projekta vključujejo: (i) laboratorijsko detekcijo – prenos diagnostičnih metod na teren ter optimizacija izvajanja testov v laboratoriju, kar bi omogočilo analizo večjega števila vzorcev, (ii) preučevanje dejanskih in potencialnih prenašalcev s poudarkom na območjih z visokim tveganjem, (iii) popis gostiteljskih rastlin, (iv) obveščanje in osveščanje javnosti in (v) pripravo strokovnih podlag za ravnanje v primeru izbruha bolezni povzročene od *X. fastidiosa*. Preučevanje prenašalcev in gostiteljskih rastlin se izvaja na terenu z rednimi pregledi zastopanosti navadne slinarice in drugih vrst žuželk.

V okviru projekta bomo pripravili tudi podlage za ocenjevanje občutljivosti različnih sort oljk na bakterijo *X. fastidiosa*. Eksperimenti na okuženem območju v južni Italiji so namreč pokazali razlike med sortami oljk in identificirali nekatere tolerantne ali deloma odporne sorte.

V letu 2017 smo sodelovali pri različnih dogodkih, na katerih smo to pomembno bolezen predstavljali širši javnosti, npr. delavnicah Zelena čudesa, Dnevu očarljivih rastlin ter Dnevh zaščite in reševanja. 4. oktobra 2017 je bila organizirana delavnica, na kateri smo gostili tudi tujega strokovnjaka z obsežnim poznavanjem izbruhov *X. fastidiosa*. Delavnica je bila v Marezigah in je bila namenjena oljkarjem, drugim pridelovalcem gostiteljskih rastlin *X. fastidiosa* in strokovnim sodelavcem.

6 SKLEPI

Bakterija *X. fastidiosa* predstavlja grožnjo za mnoge prosto rastoče in gojene rastline v Sloveniji. Pri preprečevanju vnosa in širjenja te nevarne bakterije sodeluje mnogo različnih inštitucij in aktivnih posameznikov. Pomembno je, da ob nakupu in vnosu materiala preverimo in zagotovimo, da material ne prihaja iz okuženih območij in da na njem niso zastopani potencialno okuženi prenašalci.

7 ZAHVALA

Ciljni raziskovalni projekt XylVec (V4-1603) financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS s podporo Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS. Program preiskav zastopanosti bakterije *X. fastidiosa* je financiran v okviru strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin preko Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS, Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. Za tehnično podporo in sodelovanje pri predstavljanju tematike širši javnosti se zahvaljujemo sodelavcem Nacionalnega inštituta za biologijo, Špeli Alič, Maruši Pompe Novak, Alexandri Bogožalec Košir, Katarini Bačnik, Attili Urbančiču, Katji Guček in Anji Pecman.

8 LITERATURA

- “Govern de Les Illes Balears - Actualidad Informativa.” Accessed July 18, 2017. <http://www.caib.es/govern/pidip/dadesComunicat.do?lang=es&codi=8993400>.
- Abbott, A. 2017. Italy rebuked in olive fiasco. *Nature* 546: 193-194.
- Almeida, R. P. P. “Can Apulia’s Olive Trees Be Saved?” *Science* 353, no. 6297 (July 22, 2016): 346–48.
- Amanifar N, Taghavi M, Izadpanah K, Babaei G (2014) Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 53(1), 318-327.
- Cariddi C, Saponari M, Boscia D, de Stradis A, Loconsole G, Nigro F, Porcelli F, Potere O, Martelli GP (2014) Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology* 96(2), 425-429.
- Chen, J., Groves, R., Civerolo, E.L., Viveros, M., Freeman, M., Zheng, Y., 2005. Two *Xylella fastidiosa* Genotypes Associated with Almond Leaf Scorch Disease on the Same Location in California. *Phytopathology* 95, 708–714.
- Coletta-Filho, H.D., Francisco, C.S., Lopes, J.R.S., Muller, C., Almeida, R.P.P., 2016. Homologous Recombination and *Xylella fastidiosa* Host–Pathogen Associations in South America. *Phytopathology* 107, 305–312.
- Commission database of host plants found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* in the Union territory - Food Safety - European Commission [WWW Document], n.d. . Food Safety. URL /food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency_measures/xylella-fastidiosa/susceptible_en (accessed 7.18.17).
- Davis, M.J., Purcell, A.H., Thomson, S.V., 1978. Pierce’s Disease of Grapevines: Isolation of the Causal Bacterium. *Science* 199, 75–77.

- Denancé, N., B. Legendre, M. Briand, V. Olivier, C. de Boisseson, F. Poliakoff, and M.-A. Jacques. "Several Subspecies and Sequence Types Are Associated with the Emergence of *Xylella fastidiosa* in Natural Settings in France." *Plant Pathology*, March 1, 2017.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH). "Scientific Opinion on the Risks to Plant Health Posed by *Xylella fastidiosa* in the EU Territory, with the Identification and Evaluation of Risk Reduction Options: *Xylella Fastidiosa* Pest Risk Assessment." *EFSA Journal* 13, no. 1 (January 2015): 3989.
- Mavrič, Irena, Tanja Dreo, Matjaž Hren, Vesna Lokar, Alenka Munda, Hans-Josef Schroers, Gregor Urek, in sod.. Diagnostika povzročiteljev boleznin vinske trte: zaključno poročilo o rezultatih opravljenega raziskovalnega dela na projektu v okviru ciljnega raziskovalnega programa (CRP) "Konkurenčnost Slovenije 2006-2013": V4-0313. Kmetijski inštitut Slovenije, 2009.
- Nunney, L., X. Yuan, R. E. Bromley, and R. Stouthamer. "Detecting Genetic Introgression: High Levels of Intersubspecific Recombination Found in *Xylella fastidiosa* in Brazil." *Applied and Environmental Microbiology* 78, no. 13 (July 1, 2012): 4702–14.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R.K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G.P., Krugner, R., Porcelli, F., 2014. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *J. Econ. Entomol.* 107, 1316–1319.
- Schaad, Norman W., Elena Postnikova, George Lacy, M'Barek Fatmi, and Chung-Jan Chang. "*Xylella fastidiosa* Subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov." *Systematic and Applied Microbiology* 27, no. 3 (January 2004): 290–300.
- Schuenzel, E. L., M. Scally, R. Stouthamer, and L. Nunney. "A Multigene Phylogenetic Study of Clonal Diversity and Divergence in North American Strains of the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*." *Applied and Environmental Microbiology* 71, no. 7 (July 1, 2005): 3832–39.
- UVHVVR, 2017. Programi preiskav za ugotavljanje navzočnosti škodljivih organizmov rastlin za leto 2017. str. 75-81.
- Wells, J. M., B. C. Raju, H.-Y. Hung, W. G. Weisburg, L. Mandelco-Paul, and D. J. Brenner. "*Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: Gram-Negative, Xylem-Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas* Spp." *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, no. 2 (April 1, 1987): 136–43.