

KORENJE PO EVROPI JE POGOSTO OKUŽENO Z BAKTERIJO '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', KI SE PRENAŠA S SEMENOM IN ŽUŽELČJIMI PRENAŠALCI - KAKO JE PRI NAS?

Tanja DREO¹, Mojca VIRŠČEK MARN², Erika OREŠEK³

¹Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

²Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

³Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Bakterija '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (Liefting *in sod.*, 2009) je po Gramu negativna bakterija omejena na floem gostiteljskih rastlin in hemolimfo žuželčjih prenašalcev, različnih vrst bolšic. Največjo nevarnost predstavlja bakterija za krompir (*Solanum tuberosum* L.), pri katerem okužba povzroča značilno progavost notranjosti gomoljev (angl. »zebra chip«), zaradi katere so gomolji neuporabni za namene pri katerih je pomemben tudi njihov videz (npr. za čips, ocvrt krompirček). Poleg krompirja bakterija okužuje paradižnik (*Solanum lycopersicon*), papriko (*Capsicum annum*), jajčevac (*Solanum melongena*) ter druge rastline iz družine razhudnikovk in rastline iz družine kobulnic (Apiaceae). Opisani so različni haplotipi bakterije, ki se tudi biološko razlikujejo. Bakterija je zastopana v Severni in Srednji Ameriki, kjer jo prenaša bolšica *Bactericera cockerelli*, ki se v Evropi ne pojavlja. V Evropi se bakterija pojavlja v pridelavi korenja (*Daucus carota*), zelene (*Apium graveolens*) in pastinaka (*Pastinaca sativa*). Bolezenska znamenja na nadzemskih delih okuženih rastlin so podobna znamenjem, kakršna povzročajo fitoplazme. Koreni okuženih kobulnic so manjši in tvorijo več stranskih korenin. Bakterija se na daljše razdalje, domnevno z nizko učinkovitostjo, prenaša z okuženim semenom (Bertolini *in sod.*, 2015) in med rastlinami z okuženimi bolšicami. V Sloveniji smo z nadzorom bakterije '*Ca. Liberibacter solanacearum*' začeli v letu 2016. Opravili smo nadzor 10 lokacij pridelave korenja, zelena in pastinaka in odvzeli 5 vzorcev korenja s sumljivimi znamenji, vendar v njih nismo potrdili te bakterije. V prispevku povzemamo strokovne informacije, pomembne za izvajanje programa preiskav '*Ca. Liberibacter solanacearum*' ter pomen bakterije za Slovenijo.

Gljučne besede: »zebra chip«, kobulnice, bakterioze

ABSTRACT

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

² dr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

³ mag., Dunajska 22, SI-1000 Ljubljana

CARROTS IN EUROPE ARE FREQUENTLY INFECTED WITH SEED AND VECTOR TRANSMITED BACTERIA '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' - WHAT IS THE SITUATION IN SLOVENIA?

Bacterium '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (Liefting *et al.*, 2009) is a Gram negative bacterium limited to the phloem of host plants and hemolymph of its insect vectors. It causes zebra chip of potato (*Solanum tuberosum* L.) making the tubers unusable for production of fries and chips. It also infects tomato (*Solanum lycopersicon*), pepper (*Capsicum annum*), eggplant (*Solanum melongena*), and other plants of Solanaceae and Apiaceae families. Several haplotypes that vary in biological properties are described. '*Ca. Liberibacter solanacearum*' is widespread in North and Central America where it is efficiently transmitted by potato psyllid, *Bactericera cockerelli*. This psyllid is not known to occur in Europe. The bacterium has been reported to occur in carrots (*Daucus carota*), celery (*Apium graveolens*) and parsnip (*Pastinaca sativa*) from the south and north of Europe. Symptoms on above ground plant parts are similar to those caused by phytoplasma. Infected roots of Apiaceae plants are smaller and show proliferation of secondary roots. In carrots, bacterium can be spread long distance with infected seeds (Bertolini *et al.*, 2015) and between infected plants with infected psyllids. In Slovenia, the survey of '*Ca. Liberibacter solanacearum*' started in 2016. Ten sites of production of carrot, celery and parsnip were visited and five samples of carrots with suspicious symptoms were analyzed and found negative for the presence of '*Ca. Liberibacter solanacearum*'. Here, we summarize the information relevant to the survey including visual inspections, sampling and diagnostics of '*Ca. Liberibacter solanacearum*', as well as its relevance to Slovenia.

386

Keywords: 'zebra chip', Apiaceae, bacterial diseases

1 UVOD

Bakterija '*Ca. Liberibacter solanacearum*' je škodljivi organizem, ki je uvrščen v EPPO prilogo A1. Zaenkrat bakterija ni uvrščena v priloge direktive 2000/29/ES. Bakterija predstavlja tveganje za pridelavo rastlin v Evropi in v Sloveniji, zato njeno zastopanost preverjamo tudi v okviru programa preiskav. V prispevku povzemamo strokovne informacije pomembne za izvajanje programa preiskav.

2 GOSTITELJSKE RASTLINE IN '*Ca. Liberibacter solanacearum*'

Bolezenska znamenja, ki jih povzroča bakterija '*Ca. Liberibacter solanacearum*', so v 90-tih letih prejšnjega stoletja opazili na krompirju v Mehiki, drugih državah Centralne Amerike in pozneje v Teksasu, kjer so predelovalci zaradi neustreznega videza, progavosti gomoljev, zavrnili večino krompirja. Leta 2008 so pridelovalci v Kaliforniji in na Novi Zelandiji (Liefting in sod., 2009) poročali o novih težavah na paradižniku, za katere se je pozneje pokazalo, da imajo enak vzrok (Crosslin in sod., 2010). Povzročiteljica okužb, bakterija '*Ca. Liberibacter solanacearum*' (Liefting in sod., 2009a, 2009b), je po Gramu negativna bakterija omejena na floem gostiteljskih

rastlin in hemolimfo žuželčjih prenašalcev, različnih vrst bolšic. Bakterije zaenkrat ni mogoče gojiti v aksenični kulturi.

Bolezen se še vedno pojavlja v ZDA in na Novi Zelandiji. V Evropi je bila večkrat ugotovljena, vendar je omejeno razširjena. O njej poročajo tako z juga Evrope, iz Španije in Francije (Munyanza in sod., 2010; Alfaro-Fernández in sod., 2012; Loiseau in sod., 2014), Avstrije (NPPO of Austria, 2015) in Nemčije (Munyanza in sod., 2015), kot tudi iz skandinavskih držav (Haapalainen in sod., 2016).

Največjo nevarnost predstavlja bakterija za krompir (*Solanum tuberosum* L.) pri katerem okužba povzroča značilno progavost notranjosti gomoljev (angl. »zebra chip«), zaradi katere so gomolji neuporabni za namene pri katerih je pomemben tudi njihov videz (npr. za čips, ocvrt krompirček). Na okužbo občutljive rastline so poleg krompirja še paradižnik (*Solanum lycopersicon*), paprika (*Capsicum annuum*) in jajčevac (*Solanum melongena*). Bakterija okužuje tudi druge rastline iz družine razhudnikovk in rastline iz družine kobulnic (Apiaceae), med katerimi so najpomembnejše korenje (*Daucus carota*), zelena (*Apium graveolens*) in pastinak (*Pastinaca sativa*). V obširnejši francoski raziskavi so okužbe ugotovili tudi pri krebujlici, komarčku in peteršilju (Hajri in sod., 2017).

Bolezenska znamenja na nadzemskih delih okuženih rastlin (razhudnikovk in kobulnic) so podobna znamenjem kakršna povzročajo fitoplazme. Pojavlja se zakrnela rast, rozetavost, rumenenje ali vijolična obarvanost listov, rozetavost, povečano izraščanje stranskih poganjkov, tvorba zračnih gomoljev in motena tvorba plodov. Koreni okuženih kobulnic so manjši in tvorijo več stranskih korenin. Kobulnice so lahko okužene tudi če ne kažejo bolezenskih znamenj.

Opisanih je bilo pet haplotipov bakterije, A-E, ki naj bi bili omejeni glede na prenašalce, geografsko razširjenost in deloma gostiteljske rastline, torej se tudi biološko razlikujejo. Haplotipe identificiramo s sekvenciranjem izbranih odsekov DNA. Razlike med različki, ki okužujejo razhudnikovke in druge rastline, so potrdile tudi novejša raziskave celotnih genomskih zaporedij (Wang in sod., 2017), vendar novejša izkušnje raziskovalcev kažejo, da se lahko v rastlinah in semenih pojavljajo tudi različki, ki jih ni mogoče nedvoumno uvrstiti v že opisane haplotipe. Njihove biološke značilnosti še niso povsem jasne.

Haplotipa A in B sta povezana z boleznimi v krompirju in drugih razhudnikovkah. Oba prenaša krompirjeva bolšica (*Bactericera cockerelli*). Haplotip A (sinonim *Ca. Liberibacter psyllauros*; Hansen in sod., 2008) je zastopan v srednji in severni Ameriki in na Novi Zelandiji. Haplotip B je razširjen v srednji Ameriki in v ZDA (Teksas, Kansas, Nebraska). Vrsta *B. cockerelli* je tudi sama po sebi invazivna žuželka in je lahko pomemben škodljivec krompirja, paradižnika in paprike. Ta bolšica izvira iz severne Amerike in v Sloveniji ni zastopana. O haplotipu C največ poročajo iz severne Evrope in Nemčije, medtem ko iz Mediteranskih držav poročajo o haplotipih D in E. Haplotip C prenaša predvsem korenjeva bolšica (*Trioza apicalis*). Korenjeva bolšica je zastopana v Sloveniji; primerki so bili nabrani predvsem na smrekah, na katerih prezimijo odrasli osebki (info: mag. Gabrijel Seljak, KGZS Nova Gorica). Haplotip D (Nelson in sod., 2016) prenaša *Bactericera trigonica*. O njej poročajo iz držav, v katerih se pojavljata haplotipa D in E, torej iz Češke, Madžarske,

Srbije in drugih (EPPO Global Database). Zastopana je tudi v Sloveniji (info: mag. Gabrijel Seljak, KGZS Nova Gorica).

Raziskovalci poročajo tudi o vmesnih haplotipih, vendar še ni jasno, ali gre res za vmesne haplotipe ali le mešane okužbe. Ravno tako ni jasen morebitni biološki pomen vmesnih haplotipov. V teku je več študij drugih žuželk, ki bi lahko prenašale to bakterijo, pri čemer je za Evropo najbolj kritičen prenos na krompir in med rastlinami krompirja.

Bertolini in sod. (2014) so v Španiji na korenju pokazali precej visoko stopnjo prenosa bakterije '*Ca. Liberibacter solanacearum*' s semenom (med 12 in 42 %). Prenosa s semenom v takšnem obsegu pozneje niso uspeli potrditi (Loiseau in sod., 2017). Druge poti prenosa in širjenja so okužen sadilni in razmnoževalni material gostiteljskih rastlin, druge okužene rastline ter okuženi prenašalci.

3 TVEGANJE ZA SLOVENIJO

Poročila o škodah na koblunnicah zaradi okužb s '*Ca. Liberibacter solanacearum*' se zelo razlikujejo. Zunaj Evrope o težavah ne poročajo. Ravno tako pridelovalci v Evropi navadno ne opažajo velikega vpliva na količino pridelka ali njegov okus pri korenju, pri katerem bakterije povzročajo rumenice. Drugače je pri stebelni zeleni in nekaterih drugih koblunnicah, pri katerih lahko okužbe prizadanejo videz pridelka, ki se mu zato zmanjša tržna vrednost. Mnoge koblunnice so lahko okužene brez izraženih bolezenskih znamenj in so lahko vir okužbe za zdrave rastline.

Največje tveganje predstavlja bakterija za krompir, zato je najbolj nevaren vnos haplotipov in prenašalcev, ki okužujejo krompir in druge razhudnikovke. Zaenkrat o okužbah s temi haplotipi v Evropi niso poročali. Iz Španije so poročali o naravni okužbi krompirja s haplotipom E, pri kateri so gomolji kazali značilno progavost. Kljub temu opažanja kažejo, da je epidemiološki pomen takšnih okužb majhen zaradi odsotnosti prenašalcev, ki bi okužbo učinkovito širili med rastlinami (Palomo in sod., 2014). Učinkovita okužba krompirja in širjenje bolezni tako najverjetneje zahtevata vnos haplotipov, ki okužujejo krompir, skupaj s prenašalci.

Glede na relativno razširjenost '*Ca. Liberibacter solanacearum*' na koblunnicah v Evropi, je bilo kar nekaj študij namenjenih preučevanju možnosti preskoka bakterije iz koblunnic na razhudnikovke. Poskusi prenosa bakterije iz okuženega krompirja na korenje s krompirjevo bolšico (*Bactericera cockerelli*) so pokazali, da je prenos neučinkovit (Munyaneza in sod., 2016). Ravno tako je prenos nekrompirjevih haplotipov iz okuženih koblunnic na krompir mogoč le v manjši meri. Korenjeva bolšica (*B. trigonica*) je prenesla bakterijo na le 3 % rastlin krompirja v primerjavi z 80 % prenosom na korenje in 70 % na zeleno (Antolinez in sod., 2017). Seveda ni mogoče izključiti možnosti prilagoditve haplotipov na nove gostiteljske rastline ali pojav že zastopanih žuželk kot novih prenašalcev te bakterije.

4 PROGRAM PREISKAV IN LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

V programu preiskave, ki se na območju celotne Slovenije zaradi tveganja, ki ga bakterija predstavlja za Slovenijo, izvaja od leta 2016, sodelujejo Kmetijski inštitut Slovenije (koordinacija in pregledi), Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (EU poročanje) ter Nacionalni inštitut za biologijo (laboratorijska diagnostika) (UVHVVR, 2017). Ker je bakterija v Evropi zastopana na kobulnicah, so bili predmet pregledov in vzorčenja v prvem letu programa preiskav korenje, zelena in pastinak. V nadaljevanju se bodo pregledi in vzorčenja predvidoma izvajali tudi na rastlinah in gomoljih krompirja, nekaterih drugih razhodnikovkah ter še nekaterih gojenih in divjih kobulnicah

Zaradi podobnosti bolezenskih znamenj drugim boleznim, še posebno tistim, ki jih povzročajo fitoplazme, je sum na zastopanost '*Ca. Liberibacter solanacearum*' potrebno potrditi ali ovreči z laboratorijsko analizo.

Za laboratorijsko analizo vzorčimo cele rastline oz. vsaj 3-5 listov z bolezenskimi znamenji (vključno z glavnimi žilami in peclji). Bakterija lahko rastline okužuje tudi v obliki prikrite okužbe. V tem primeru vzorčimo cele rastline oz. vsaj 5-10 listov iz različnih delov rastlin. Koncentracija bakterije je navadno najvišja v mladih, razvijajočih se listih.

Gomolji krompirja z vidnimi bolezenskimi znamenji vsebujejo le nizke koncentracije bakterij, zato se priporoča, da se testirajo posamično. Postopki vzorčenja in testiranja za učinkovitejše določanje latentne prisotnosti '*Ca. Liberibacter solanacearum*' v vzorcih večih gomoljev so še v razvoju.

Laboratorijske analize in diagnostiko opravlja Nacionalni inštitut za biologijo v skladu z osnutkom nove verzije EPPO diagnostičnega protokola in mednarodnimi publikacijami. Za detekcijo uporabljamo metodi PCR v realnem času, ki so ju opisali Li in sod. (2009) ter Teresani in sod. (2014). Za nadaljnjo identifikacijo in potrjevanje sumljivih vzorcev se lahko izvedejo dodatne analize sekveniranja DNA, s katerimi določimo tudi haplotip bakterije. Določanje bakterije je mogoče tudi v žuželčjih prenašalcih.

5 SKLEPI

Na podlagi zdravstvenih pregledov na njivah in laboratorijskih analiz je status tega organizma na območju Slovenije 'Odsoten: ni zapisov o škodljivem organizmu, potrjeno s preiskavo'. V primeru, da se bakterija pojavi v Evropi tudi na krompirju, bo to najbolj ogrožena gostiteljska rastlina.

6 ZAHVALA

Zahvaljujemo se mag. Gabrijelu Seljaku za dodatne informacije glede zastopanosti prenašalcev v Sloveniji, Upravi Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin za podporo projekta Phylib II (ERA-NET Euphresco) in sodelavcem na projektu za izmenjavo informacij, Lidiji Matičič, Nacionalni inštitut za biologijo, za tehnično pomoč pri vpeljavi metod laboratorijske diagnostike ter sodelujočim preglednikom. Delo je bilo financirano v okviru strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin na Nacionalnem inštitutu za biologijo in na Kmetijskem inštitutu Slovenije preko Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS, Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.

7 LITERATURA

- Alfaro-Fernández, A., Cebrián, M.C., Villaescusa, F.J., de Mendoza, A.H., Ferrándiz, J.C., Sanjuán, S., Font, M.I., 2012. First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in Carrot in Mainland Spain. *Plant Disease* 96, 582–582.
- Antolínez, C.A., Fereres, A., Moreno, A., 2017. Risk assessment of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' transmission by the psyllids *Bactericera trigonica* and *B. tremblayi* from Apiaceae crops to potato. *Scientific Reports* 7, 45534.
- Bertolini, E., Teresani, G.R., Loiseau, M., Tanaka, F. a. O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M.M., Cambra, M., 2015. Transmission of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in carrot seeds. *Plant Pathol* 64, 276–285.
- Crosslin, J., Munyaneza, J., Brown, J., Liefing, L., 2010. A History in the Making: Potato Zebra Chip Disease Associated with a New Psyllid-borne Bacterium. A Tale of Striped Potatoes. APSnet Feature Articles.
- EPPO (2017) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppe.int>
- Haapalainen, M., Kivimäki, P., Latvala, S., Rastas, M., Hannukkala, A., Jauhiainen, L., Lemmetty, A., Pirhonen, M., Virtanen, A., Nissinen, A.I., 2017. Frequency and occurrence of the carrot pathogen '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotype C in Finland. *Plant Pathology* 66, 559–570.
- Hajri, A., Loiseau, M., Cousseau-Suhard, P., Renaudin, I., Gentit, P., 2017. Genetic Characterization of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Haplotypes Associated with Apiaceous Crops in France. *Plant Disease* 101, 1383–1390.
- Hansen, A.K., Trumble, J.T., Stouthamer, R., Paine, T.D., 2008. A New Huanglongbing Species, "*Candidatus Liberibacter psyllaurosus*," Found To Infect Tomato and Potato, Is Vected by the Psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Appl Environ Microbiol* 74, 5862–5865.
- Li, W., Abad, J.A., French-Monar, R.D., Rascoe, J., Wen, A., Gudmestad, N.C., Secor, G.A., Lee, I.-M., Duan, Y., Levy, L., 2009. Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in potato plants with zebra chip. *J. Microbiol. Methods* 78, 59–65.
- Liefing, L.W., Sutherland, P.W., Ward, L.I., Paice, K.L., Weir, B.S., Clover, G.R.G., 2009a. A New '*Candidatus Liberibacter*' Species Associated with Diseases of Solanaceous Crops. *Plant Disease* 93, 208–214.
- Liefing, L.W., Weir, B.S., Pennycook, S.R., Clover, G.R.G., 2009b. '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', associated with plants in the family Solanaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2274–2276.
- Loiseau, M., Garnier, S., Boirin, V., Merieau, M., Leguay, A., Renaudin, I., Renvois, J.-P., Gentit, P., 2014. First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in Carrot in France. *Plant Disease* 98, 839–839.
- Loiseau, M., Renaudin, I., Cousseau-Suhard, P., Poliakoff, F., Gentit, P., 2017. Transmission tests of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' by carrot seeds. *Acta Hort.* 1153, 41–46.
- Munyaneza, J.E., Fisher, T.W., Sengoda, V.G., Garczynski, S.F., Nissinen, A., Lemmetty, A., 2010. First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" Associated with Psyllid-Affected Carrots in Europe. *Plant Disease* 94, 639–639.
- Munyaneza, J.E., Swisher, K.D., Hommes, M., Willhauck, A., Buck, H., Meadow, R., 2015. First Report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Associated With Psyllid-Infested Carrots in Germany. *Plant Disease* 99, 1269.
- Munyaneza, J.E., Mustafa, T., Fisher, T.W., Sengoda, V.G., Horton, D.R., 2016. Assessing the Likelihood of Transmission of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' to Carrot by Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioziidae). *PLOS ONE* 11, e0161016.
- Nelson, W.R., Sengoda, V.G., Alfaro-Fernandez, A.O., Font, M.I., Crosslin, J.M., Munyaneza, J.E., 2013. A new haplotype of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" identified in the Mediterranean region. *Eur J Plant Pathol* 135, 633–639.
- NPPO of Austria. "First Report of '*Candidatus Liberibacter Solanacearum*' in Austria." EPPO Reporting Service 02-2015: 2015/029.

- Palomo JL, Bertolini E, Martin-Robles MJ, Teresani G, Lopez MM & Cambra M (2014) Detección en patata en España de un haplotipo de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' no descrito en solanáceas. Abstracts of XVII Congress of Spanish Phytopathological Society, pp. 125. Lleida, Spain.
- Teresani, G.R., Bertolini, E., Alfaro-Fernández, A., Martínez, C., Tanaka, F.A.O., Kitajima, E.W., Roselló, M., Sanjuán, S., Ferrándiz, J.C., López, M.M., Cambra, M., Font, M.I., 2014a. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with a Vegetative Disorder of Celery in Spain and Development of a Real-Time PCR Method for Its Detection. *Phytopathology* 104, 804–811.
- UVHVVR, 2017. Programi preiskav za ugotavljanje navzočnosti škodljivih organizmov rastlin za leto 2017. str. 75-81.
- Wang, J., Haapalainen, M., Schott, T., Thompson, S.M., Smith, G.R., Nissinen, A.I., Pirhonen, M., 2017. Genomic sequence of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" haplotype C and its comparison with haplotype A and B genomes. *PLOS ONE* 12, e0171531.