

**PROGRAM PREISKAV PREVERJANJA ZASTOPANOSTI BAKTERIJE  
*Pantoea stewartii* V RASTLINAH IN SEMENU KORUZE (*Zea mays* L.)**

Tanja DREO<sup>1</sup>, Primož PAJK<sup>2</sup>, Manca PIRC<sup>3</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>4</sup>

<sup>1,3-4</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

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

**IZVLEČEK**

Z letom 2017 smo v Sloveniji začeli s programom preiskav v okviru katerega bomo preverjali zastopanost bakterije *Pantoea stewartii* (*Erwinia stewartii*) podvrste *stewartii*, povzročiteljice bakterijske uvelosti koruze. Pri okuženih rastlinah so bolezenska znamenja vidna bodisi kot uvelost sadik bodisi kot ožig listov. Bolezen je prisotna in razširjena v ZDA in nekaterih drugih državah, kjer jo učinkovito prenaša ameriška vrsta bolhačev, koruzni bolhač (*Chaetocnema pulicaria*). Bakterija v koruznem bolhaču uspešno prezimi. Bolezen se na dolge razdalje širi predvsem z okuženim semenom. Bakterija je navzoča na površju in v notranjosti semena. Poglavitna gostiteljska rastlina je koruza (*Zea mays* L.). Najbolj občutljiva je sladka koruza (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*). Občasno se lahko okužijo tudi druge rastline, kot so plevel sivozeleni muhvič (*Setaria pallide-fusca*), nekatere trave, ki jim gojimo za krmo, npr. teosinta (*Zea mexicana*) in *Tripsacum dactyloides* ter srečni bambus (*Dracaena sanderiana*). Ni znano, da bi se bakterija pojavljala v Evropi in je zato uvrščena v prilogo II.A.I Direktive Sveta 2000/29/ES ter na seznam A2 pri Evropski organizaciji za varstvo rastlin (EPPO). Z vidika tveganja vnosa na območje Slovenije je najbolj rizičen vnos semena iz območij, kjer je bolezen prisotna, še posebno če gre za seme sladke koruze. V prispevku so predstavljene informacije, ki so pomembne za izvedbo programa preiskave. Poleg informacij o biologiji, simptomatiki, poteh prenosa in možnosti širjenja, je predstavljen način, kako se na podlagi znanih geografskih podatkov (raba zemljišča) uporabi ustrezno metodiko načrtovanih zdravstvenih pregledov rastlin, vzorčenj in testiranj v skladu z uveljavljenimi diagnostičnimi metodami.

**Ključne besede:** boleznin rastlin, bakterijska uvelost koruze, Stewartova bolezen, GIS podatkovna baza

**ABSTRACT**

---

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

<sup>2</sup> univ. dipl. ing. agr., Dunajska 22, SI-1000 Ljubljana

<sup>3</sup> dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>4</sup> prof. dr., prav tam

## **SURVEY ON THE PRESENCE OF BACTERIUM *Pantoea stewartii* IN PLANTS AND SEEDS OF MAIZE (*Zea mays* L.)**

In 2017, the Slovenian plant health authorities started with a national survey on *Pantoea stewartii*, the causative agent of Stewart's wilt in maize (*Zea mays* L.). Infected plants develop either seedling wilt or leaf blight. *Pantoea stewartii* is indigenous to America and has been introduced to other parts of the world with maize seeds in which it is present both on the outside and on the inside. In America, *Chaetocnema pulicaria* is the only known efficient vector and overwintering site of the bacterium. Yellow sticky traps can be used to follow vector populations. The disease is present and widespread in the US and some other American countries. The main host plant is maize (*Zea mays* L.), among which the most sensitive is sweet corn (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*). *P. stewartii* occasionally infects other plants e.g. pale pigeongrass (*Setaria pallida-fusca*), some grasses grown for forage including teosinte (*Zea mexicana*) and *Tripsacum dactyloides*, and lucky bamboo (*Dracaena sanderiana*). *P. stewartii* is not known to occur in Europe and is therefore listed as a quarantine organism (Annex II.A. of Council Directive 2000/29/EC and A2 list of the European Plant Protection Organization (EPPO)). The highest risk of introduction to Slovenia is associated with seeds originating from areas where the disease occurs, especially with seeds of sweet corn. In this article, we summarize information relevant to the survey e.g. biology, symptomatology, possible pathways of introduction, and the use of geographic data for selection of appropriate methodology for visual inspections, sampling, and testing in accordance with established diagnostic protocols.

**Keywords:** bacterial wilt of maize, GIS database, plant diseases, Stewart's wilt

### **1 UVOD**

Z letom 2017 smo v Sloveniji začeli programom preiskav v okviru katerega preverjamo zastopanost bakterije *Pantoea stewartii* (*Erwinia stewartii*), povzročiteljice bakterijske uvelosti koruze. Za to bakterijo ni znano, da bi se pojavljala v Evropi in je zato uvrščena v prilogo II.A.I Direktive Sveta 2000/29/ES ter na seznam A2 pri Evropski organizaciji za varstvo rastlin (EPPO). V programu preiskav sodelujejo Nacionalni inštitut za biologijo (koordinacija in laboratorijska diagnostika), Kmetijski inštitut Slovenije in Kmetijsko gozdarski zavod Maribor (pregledniki) ter Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (EU poročanje). V letu 2017 je načrtovanih 50 zdravstvenih pregledov in odvzem 20 vzorcev rastlin za testiranje na morebitno zastopanost te bakterije. V letu 2018 se program preiskave predvidoma nadaljuje tudi z vključitvijo odvzema vzorcev semena koruze.

### **2 BAKTERIJA**

Bakterijsko uvelost koruze povzroča bakterija *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (*Erwinia stewartii* [Smith 1898] Mergaert in sod. 1993, comb. nov.). Vrsta *Erwinia stewartii* je bila skupaj z vrstami *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae* (Gavini in sod.,

1989), *Erwinia ananas* in *Erwinia uredovora* predstavljena v rod *Pantoea* (Mergaert in sod., 1993).

Znotraj vrste *P. stewartii* sta opisani dve podvrsti, subsp. *stewartii* in subsp. *indologenes*. Prejšnji opisi vrste *E. stewartii* se nanašajo na *P. stewartii* subsp. *stewartii* in ne na subsp. *indologenes*, ki se pogosto pojavlja v semenu koruze, vendar naj ne bi povzročala bolezni. Na podlagi DNA hibridizacijskih študij in analize DNA sekvenc podvrsti *P. stewartii* predstavljata eno vrsto.

Bakterije vrste *P. stewartii* so gram-negativne, paličaste bakterije, velikosti 0,5-1,3 x 1,0-3,0 µm. Ne tvorijo spor in niso gibljive. So oksidaza negativne in fakultativno anaerobne. Celice izolatov *P. s.* subsp. *stewartii* so obdane s polisaharidno kapsulo, ki celice varuje pred izsušitvijo in obrambnimi snovmi, ki jih izločajo rastline (Grimont in Grimont, 2005). Tipski izolat *P. s.* subsp. *stewartii* je NCPPB 2295<sup>T</sup>, ki je bil leta 1970 izoliran v ZDA (Mergaert in sod., 1993).

### 3 GOSTITELJSKE RASTLINE

Poglavitna gostiteljska rastlina je koroza (*Zea mays*), med katerimi je najbolj občutljiva sladka koroza (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*). Občasno se lahko okužijo druge rastline: plevel sivozeleni muhvič (*Setaria pallide-fusca*), nekatere trave, ki jim gojimo za krmo (teosinta [*Zea mexicana*] in *Tripsacum dactyloides*), ter okrasni srečni bambus (*Dracaena sanderiana*).

### 4 RAZŠIRJENOST IN ŠIRJENJE

Bolezen je navzoča in razširjena v ZDA. Navzoča, vendar manj razširjena je v Kanadi, Mehiki, Peruju in nekaterih drugih državah južne Amerike. V Evropi je občasno ugotovljena, vendar naj ne bi bila več navzoča (Avstrija, Italija). S preiskavami so potrdili odsotnost patogena na Nizozemskem (2015), na Hrvaškem (1996) in v Srbiji (1992) (EPPO, 2017).

V Ameriki bolezen učinkovito prenaša ameriška vrsta bolhačev, koruzni bolhač (*Chaetocnema pulicaria*, Coleoptera, Crysomelidae, Alticine). So majhni, črni hroščki, veliki do 2 mm. Koroza je primarni gostitelj hroščka, vendar se odrasli osebkii in larve hranijo tudi na različnih travah. *P. stewartii* subsp. *stewartii* živi v prebavnem traktu hroščka in tako tudi preživi zimo.

Ni znano, da bi bil hrošček zastopan v Evropi (<http://www.plantwise.org>), vendar so v Sloveniji zastopane nekatere druge vrste iz rodu *Chaetocnema*, od katerih jih vsaj sedem živi na travah (Breljih in sod., 2003). Ni znano, da bi te vrste lahko prenašale *P. s.* subsp. *stewartii* oz. omogočale preživetje bakterije prek zime (G. Seljak, os. inf., 9.5.2016).

Nastop bolezenskih znamenj je v neposredni povezavi z bolhačevo populacijsko dinamiko in podlaga napovedovalnega modela razvoja bolezenskih znamenj. Bolezen se na dolge razdalje širi predvsem z okuženim semenom (na površju in v notranjosti semena).

Z vidika vnosa bakterije v Slovenijo največje tveganje predstavlja seme koruze in sladke koruze, ki izvira iz držav, za katere je znano, da se bolezen pri njih pojavlja. Srednje tveganje predstavlja pridelava koruze na območjih v bližini obratov za predelavo in skladiščenje koruze. Druga pridelovalna območja koruze iz semena, ki je bilo pridelano v državah za katere ni znano, da bi se bolezen tam pojavljala, predstavljajo majhno tveganje.

## 5 BOLEZENSKA ZNAMENJA

Ob okužbi pride bodisi do uvelosti sadik bodisi do ožiga listov. Na razvoj bolezenskih znamenj močno vpliva tudi izbor hibrida (sorte) koruze, vendar okužbe brez bolezenskih znamenj niso znane. Do uvelosti sadik prihaja kadar se mlade rastline sistemsko okužijo, npr. iz okuženega semena. Ob okužbi rastline venijo. Ob propadanju stebel pogosto pride do poganjanja stranskih stebel. Če se rastline občutljivih sort okužijo zgodaj, rastline hitro ovenejo ali ostanejo pritlikave. Pri starejših rastlinah se lahko na novem ličju razvije listni ožig, spodnji deli stebel so lahko votli. Na ličju, ki obdaja storže, se lahko razvijejo majhni vodeni madeži. Na notranji strani ličja se bakterije izcejajo iz madežev v obliki majhnih rumenkastih kapljic. Pri sladki koruzi lahko okužba vodi v zgodnejši razvoj cvetov, ki ovenijo in propadejo, preden se pojavijo bolezenska znamenja na drugih delih rastline.

395

Do ožiga listov pride predvsem ob okužbi starejših rastlin. Prva znamenja okužbe rastlin se razvijejo okrog vbodov prenašalca, tkivo okrog vboda postane vodeno. Vzporedno z listnimi žilami se razvijejo blede zelene do rumene proge. Sčasoma progasto tkivo propade, proge se lahko pri občutljivih sortah razširijo po celem listu. Pri občutljivih sortah je pridelek zmanjšan od 40 do 100 % (Pataky, 2004).

Pri odpornih sortah so bolezenska znamenja na rastlini navadno omejena na 2-3 cm okoli vbodov prenašalcev, prihaja do ožiga listov. Sistemska okužba je redka. Bolezenska znamenja ožiga listov je mogoče zamenjati z bolezenskimi znamenji, ki se razvijejo ob okužbi z glivami, npr. vrstami *Exserohilum turcicum*, *Setosphaeria turcica*, *Cochliobolus heterostrophus* in *Cochliobolus carbonum*. Podobne poškodbe se razvijejo ob suši ali pomanjkanju železa. Zamenjava je mogoča tudi z genetsko pogojeno črtavostjo in drugimi bakterijskimi ožigi, ki jih povzročajo vrste *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Burkholderia andropogonis* in *Pantoea ananatis*. Ni poročil, da bi sorodno bakterijo *P. s.* subsp. *indologenes* izolirali iz gostiteljskih rastlin *P. s.* subsp. *stewartii*. Podvrsta *P. s.* subsp. *indologenes* je manj agresiven rastlinski patogen, ki so ga izolirali iz bara (laškega muhviča, *Setaria italica*), sivozelenega muhviča (*Pennisetum americanum*), ananasa (*Ananas comosus*) in stročnice guar (*Cyamopsis tetragonolobus*).

## 6 FITOSANITARNI PREGLEDI IN VZORČENJE

Izvajalci v okviru zdravstvenih pregledov gostiteljskih rastlin preverjajo zdravstveno stanje gostiteljskih rastlin. Tako sta predmet pregledov koruza (*Zea mays*) in sladka koruza (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*).

## 6.1 Načrtovanje pregledov

Ob uporabi podatkovnih baz, ki so na voljo za vodenje različnih registrov, npr. iz registra kmetijskih gospodarstev in dejanske rabe (MKGP) in podatkov iz neposrednih plačil (AKTRP), je mogoče vnaprej načrtovati zdravstvene preglede rastlin. Na podlagi gostote pridelave koruze lahko z ESRI orodji (npr. Arc GIS) določimo lokacije z večjimi tveganji. Možno je vnaprej pripraviti mrežno porazdelitev s kvadranti glede na tveganja in gostote njivskih zemljišč posajenih s koruzo, kjer se opravljajo pregledi. Na ta način se skozi leta gradi podatkovna baza, ki omogoča vpogled v dejansko stanje pregledov in opredelitev statusa bakterije *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*.

## 6.2 Čas pregledov in način pregledov njiv

Priporočen čas pregledov za ugotavljanje uvelosti sadik in sistemskih okužb je od fiziološke faze rastlin BBCH 11 (prvi list razgrnjen) do BBCH 87 (fiziološka zrelost), pri čemer so zgodnejše faze ustreznejše za ugotavljanje venenja sadik. Za ugotavljanje bolezenskih znamenj na listih sta priporočeni dve obdobji pregledov: pregled dva tedna pred in tri tedne po fiziološki fazi BBCH 53 (sredina metličenja) in drugi pregled po BBCH 83 (zgodnja voščena zrelost).

Ob vizualnem pregledu njivo koruze prehodimo v obliki shematičnega vzorca, tako da pokrijemo največje mogoče območje. Za njive pravokotnih oblik se priporoča, da jih prehodimo npr. v obliki črke »W« (Doll *in sod.*, nd.).

## 6.3 Vzorčenje

Vzorči se lahko kadarkoli znotraj časa pregledov ob pojavu bolezenskih znamenj. Pri vzorčenju rastlin vzorčimo dele rastlin s sumljivimi bolezenskimi znamenji, pri čemer pazimo, da se pri vzorčenju odvzame vedno del rastline med bolezenskimi znamenji in na videz zdravim tkivom. Vzorčimo (i) 5-10 listov / storžev / metlic / stebel z bolezenskimi znamenji oz. (ii) pri majhnih rastlinah lahko vzorčimo cele rastline. Ob vzorčenju korenine posebej zapakiramo tako, da zemlja ne zamaže preostalega vzorca. Sum na okužbo se ovrže ali potrdi z laboratorijsko analizo (PM 7/60 (2)).

## 7 DIAGNOSTIKA

Laboratorijske analize in diagnostiko opravljamo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v skladu z mednarodnimi standardi (PM 7/60 (2)). Analize obsegajo nanos na splošna in/ali selektivna gojišča (Ivanoff, 1933), opcijski dodatni presejalni test (imunofluorescenčni test, PCR v realnem času (Tambong *in sod.*, 2008)), ki jim sledi identifikacija bakterij v čisti kulturi s PCR v realnem času in po potrebi določanje DNA črtnih kod (PM 7/129 (1)). Ob prvi potrditvi in po potrebi je predvidena izvedba

testiranja patogenosti na gostiteljskih rastlinah z reizolacijo bakterije (PM 7/60(2)). V letu 2017 je predvidena vpeljava metod ter analiza dvajsetih (20) vzorcev rastlin.

## 8 SKLEPI

Program preiskave zastopanosti bakterijske uvelosti koruze, ki jo povzroča bakterija *Pantoea stewartii* (*Erwinia stewartii*) v letu 2017 izvajamo prvič. Največje tveganje za vnos v Slovenijo predstavlja pridelava koruze iz semena, ki izvira iz držav v katerih je bolezen razširjena. Trenuten status tega organizma v Slovenije je »Odsoten: ni zabeležk o škodljivem organizmu«.

## 9 ZAHVALA

Zahvaljujemo se sodelavcema pri izvajanju Programa preiskav, Janji Lamovšek, Kmetijski inštitut Slovenije in Jožetu Miklavcu, Kmetijsko gozdarski zavod Maribor. Posebna zahvala mag. Gabrijelu Seljaku za dodatne informacije glede zastopanosti prenašalcev v Sloveniji.

## 10 LITERATURA

- Brelih S., Döberl M., Drovenik B., Pirnat A., 2003. Gradivo za favno hroščev (Coleoptera) Slovenije: 1. prispevek: Polyphaga: Chrysomeloidea (= Phytophaga): Chrysomelidae: Alticinae = Materialien zur Käferfauna (Coleoptera) Slowenien: 1. Beitrag: Polyphaga: Chrysomeloidea (= Phytophaga): Chrysomelidae: Alticinae.- Scopolia 50: 1-279.
- Corn flea beetle (*Chaetocnema pulicaria*) [WWW Document], n.d. URL <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=12534> [25.4.2017].
- Doll, J., Grau, C., Jensen, B., Wedberg, J., Meyer, J., n.d. Crop Scouting Manual, A Guide for Wisconsin Corn Production, Integrated Pest Management Program - University of Wisconsin - Extension, Cooperative Extension Service.
- EPPO (2017) EPPO Global Database (available online). URL <https://gd.eppo.int> [21.5.2017].
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., De Ley, J., 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 39, 337–345.
- Grimont, P. A. D., Grimont, F. (2005). Genus XXIII. *Pantoea* Gavini, Mergaert, Beji, Mielcarek, Izard, Kersters and De Ley 1989b, 343VP. V: Brenner, D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. (ur.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> edn, vol. 2, part B, pp. 713–720. New York: Springer.
- Ivanoff SS. 1933. Stewart's wilt disease of corn, with emphasis on the life history of *Phytophomas stewartii* in relation to pathogenesis. J. Agr. Res. 47: 749–770.
- Mergaert, J., Verdonck, L., Kersters, K., 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the Genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and Description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 43, 162–173. doi:10.1099/00207713-43-1-162
- Pataky, J. K. 2004. Stewart's wilt of corn. The Plant Health Instructor. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/StewartWilt.aspx> [28.2.17].
- PM 7/129 (1) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests, 2016. . EPPO Bull 46, 501–537. doi:10.1111/epp.12344.
- PM 7/60 (2) *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, 2016. EPPO Bulletin 46, 226–236. Stewart's wilt of corn [WWW Document], n.d. URL (accessed 2.28.17).

- Tambong, J.T., Mwange, K.N., Bergeron, M., Ding, T., Mandy, F., Reid, L.M., Zhu, X., 2008. Rapid detection and identification of the bacterium *Pantoea stewartii* in maize by TaqMan real-time PCR assay targeting the cpsD gene. J. Appl. Microbiol. 104, 1525–1537. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03674.x.
- UVHVVR, 2017. Programi preiskav za ugotavljanje navzočnosti škodljivih organizmov rastlin za leto 2017. str. 75-81.