

SPREMLJANJE POJAVA BAKTERIJSKIH BOLEZNI NA STROČNICAH

Janja LAMOVŠEK¹

¹Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLEČEK

V letih 2017 in 2018 smo spremljali pojav bakterijskih boleznih na soji (*Glycine max* L. Merr.) in fižolu (*Phaseolus vulgaris* L.). Glavni namen naloge je bila identifikacija povzročiteljev bakterioz na soji zaradi povečane pridelave soje v zadnjih letih. Preglede in vzorčenja smo opravljali v poletnih mesecih (junij-avgust) v Prekmurju in na Gorenjskem. V večini primerov smo bolezenska znamenja opažali na listih, redkeje na steblih in strokih. Opažena bolezenska znamenja so bila podobna bakteriozam na fižolu. Bakterije smo iz rastlinskih tkiv izolirali z uporabo standardnih metod ter jih identificirali z analizami MALDI-TOF in metodo določevanja nukleotidnega zaporedja genov *gyrB* in *rpoD* (t.i. barcoding). Iz vzorcev listov, kjer so se pojavljale manjše vodene rumenorjave pege s svetlo obrobo, smo identificirali bakterije iz rodu *Pseudomonas*. Potrdili smo vrsto *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (bakterijska pegavost soje) ter ostale patogene pseudomonade (*P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *P. viridiflava* in *P. syringae*). Redkeje smo opažali rjavkaste pege z rumenim obročem s prisotnim rumenkastim eksudatom ob listnih žilah na spodnji strani listov. Ponekod so imeli listi videz razcefranosti zaradi združevanja in izpadanja posušenih peg. Opisana znamenja so značilna za bakterijsko mozoljavost soje (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), a prisotne so bile tudi bakterije vrste *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, ki povzročajo navadno bakterijsko pegavost fižola. V letu 2018 smo spremljali tudi bakterioze na fižolu. Potrdili smo patogene vrste *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (mastna fižolova pegavost), *P. viridiflava* ter *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. V enem samem zgledu smo identificirali tudi patogeno vrsto *X. arboricola*. Iz vzorca krmnega graha (*Pisum sativum* L. var. *arvense*) z znamenji mehke gnilobe na stebelu smo identificirali bakterije iz rodu *Erwinia*. Ni znano, da bi omenjene bakterije v Sloveniji povzročale večjo gospodarsko škodo. Ker pa se večina njih prenaša z okuženim semenskim materialom, svetujemo pridelovalcem uporabo zdravega in certificiranega semena.

Glavne besede: soja, bakterioze, mastna fižolova pegavost, pegavost soje, barcoding

ABSTRACT

MONITORING OF BACTERIAL DISEASES ON LEGUMES

In 2017-2018 we were monitoring bacterial diseases on soybean (*Glycine max* L. Merr.) and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Initially, the goal was to identify bacterial

¹ dr., Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: janja.lamovsek@kis.si

pathogens on soybean as the productions has increased significantly over the last years. Monitoring and sampling were performed in summer months (June-August) in region of Prekmurje and Gorenjska. The symptoms were mainly observed on leaves, less on stems and pods, and resembled those of bacterial diseases on beans. Standard bacterial isolation techniques were used. Isolates were identified with MALDI-TOF and barcode sequence analysis (*gyrB*, *rpoD*). Leaf samples exhibiting symptoms of small, water-soaked, yellow-to-brown spots surrounded by light halo, were associated with *Pseudomonas* species infection. Bacterial blight of soybean (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*) was common as well as other pathogenic *Pseudomonas* species (*P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *P. viridiflava*, *P. syringae*). Less frequently we observed symptoms of angular brown spots with yellowish exudate on the lower leaf surface. Due to spot merging and drying the infected leaves often had ragged look. These symptoms are characteristic for bacterial pustule disease of soybean (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), but we also isolated *X. axonopodis* pv. *phaseoli* that causes common bacterial blight disease of beans. In 2018 we extended the monitoring to common beans. We confirmed the presence of halo blight disease caused by *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, and other pathogens (*P. viridiflava*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*). There was also one case of infection caused by *X. arboricola*. One sample of fieldpea (*Pisum sativum* L. var. *arvense*) exhibited symptoms of soft rot on stem. We isolated and identified bacteria from genus *Erwinia*. All identified bacterial pathogens of soybean and beans are not economically important in Slovenia. However, most of them are seed transmissible. We therefore encourage producers to use healthy and certified seed material to minimize yield loss.

Key words: soybean, bacteriosis, halo blight, blight of soybean, barcoding

1 UVOD

Svetovna pridelava soje (*Glycine max* L. Merr.) se povečuje. V letu 2013 so jo gojili v najmanj 70 državah, največ v Združenih državah Amerike (31 %) in v Braziliji (31 %) ter v Argentini (19 %), na Kitajskem (5 %), v Indiji (4 %), Paragvaju (3 %) in Kanadi (2 %) (Hymowitz in sod., 2015). Kazalniki za leto 2019 napovedujejo podobno razmerje (Statista, 2019). V svetovnem merilu je ocena škode zaradi bakterijskih bolezni na soji izredno majhna (0,1 % izgub v svetovni pridelavi soje). Kljub temu je škoda lahko veliko večja ob ugodnih klimatskih razmerah, navadno na ožjih pridelovalnih območjih. Pridelava soje se je v Sloveniji v zadnjih letih povečala za okoli desetkrat (preglednica 1).

Preglednica 1: Pridelava soje v Sloveniji v letih 2013-2018 (Vir: SURS, 2019)

Leto	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Površina (ha)	278	404	1705	2466	2908	1756
Pridelek na ha (t/ha)	1,7	2,6	2,7	3,0	2,7	3,0

Ob pregledovanju informacij s slovenskega spleta o boleznih soje je razvidno, da manjkajo podatki o pojavu bakterijskih bolezni na soji. Zato smo v letih 2017 in 2018 preučevali bolezni na soji z namenom priprave seznama glavnih bakterijskih

Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije (Plant Protection Society of Slovenia), 2019

povzročiteljev bolezn. Zaradi sorodnosti soje z drugimi stročnicami, smo v raziskavo vključili tudi bakterijske povzročitelje bolezn na navadnem fižolu (*Phaseolus vulgaris* L.).

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Pregledi in vzorčenja

Preglede in vzorčenja smo opravljali v poletnih mesecih (junij-avgust) v Prekmurju, na Gorenjskem, na Dolenjskem ter v okolici Ljubljane. Skupno smo pregledali 21 lokacij: 13 njiv soje, 7 njiv fižola in eno njivo krmnega graha. Ker smo iskali znamenja bakterijskih bolezn, smo z ene lokacije odvzeli več vzorcev z različnimi bolezenskimi znamenji.

2.2 Izolacija in identifikacija bakterij iz rastlinskih tkiv

Bakterije smo izolirali iz rastlinskih tkiv (listi, stebala ali stroki) tik ob meji med zdravim in obolelim delom. Izrezano tkivo smo macerirali in inkubirali v pufru (0,1 M MgSO₄) ter nacepili razredčine suspenzije na plošče s trdnim gojiščem King's B (KB). Nacepljene plošče smo inkubirali 4-5 dni na 25 °C. Ob pregledu kolonij smo se osredotočali le na bakterije iz rodu *Pseudomonas* in *Xanthomonas*, za katere je znano, da spadajo med najpomembnejše bakterijske rastlinske patogene. Za natančnejšo in hitrejšo identifikacijo smo uporabili metodo MALDI TOF in tako zožili izbor možnih patogenih organizmov.

2.3 Identifikacija sevov (*barcoding*)

Bakterijsko DNA izbranih sumljivih sevov smo izolirali po metodi termalne lize (95 °C, 5 min). Metodo PCR smo uporabili za pomnoževanje dveh taksonomsko pomembnih genov, in sicer gena za sigma dejavnik RNA polimeraze (*rpoD*) ter gena za girazo (*gyrB*). Vsi postopki priprave reakcijskih mešanic in razmerij med oligo začetniki so bili povzeti po avtorjih navedenih ob oligo zaporedjih v preglednici 2.

Fragmente PCR smo ločiti z agarozno elektroforezo, jih izrezali, očistili (QIAquick gel extraction kit, Qiagen) ter poslali na sekveniranje po metodi Sanger (Macrogen Europe). Vsa dobljena zaporedja smo analizirali z algoritmom Blastn. Zanesljivi zadetki so tisti, ki imajo vrednost E čim bližje 0.0 in čim večje ujemanje baz s primerjanim referenčnim zaporedjem.

2.4 Testi patogenosti na gostiteljskih rastlinah

Patogenost bakterijskih izolatov smo preverili na mladih (2-4 tedne starih) rastlinah v rastlinjaku in ob pojavu značilnih bolezenskih znamenj ponovno izolirali patogeni organizem. V liste 2-4 tedne starih rastlin (soja ali fižol) smo injicirali okoli 10 µl sveže bakterijske kulture (24h) testiranega izolata. Prvih 24h smo vzdrževali višjo vlago v prostoru, nato pa rastline opazovali 4 tedne. Po razvoju znamenj, smo patogene bakterije izolirali iz listov in opravili potrditev.

Preglednica 2: Seznam vseh uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov za identifikacijo bakterijskih sevov.

Ime oligo začetnika	zaporedje 5'-3'	gen / rod	vir
PsEG30F	ATYGAAATCGCCAARCG	<i>rpoD</i> /	Mulet in sod., 2009
PsEG790R	CGGTTGATKTCCTTGA	<i>Pseudomonas</i>	
XrpoD1F	TGGAACAGGGCTATCTGACC	<i>rpoD</i> /	Young in sod., 2008
XrpoD1R	CATTCYAGGTTGGTCTGRTT	<i>Xanthomonas</i>	
gyrBBAUP2	GCGGAAGCGGCCNGSNATGT A	<i>gyrB</i> / <i>Pseudomonas</i> ,	Santos and Ochman, 2004
APrU	TGTAACGACGGCCAGTGCN GGRTCYTTYTCYTGRCA	<i>Xanthomonas</i>	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000
M13(-21)	TGTAACGACGGCCAGT		
2F	ACCGTCGAGTTCCGACTACGA	<i>gyrB</i> /	Richert <i>et al.</i> , 2005
6R	AGSACGATCTTGTGGTA	<i>Curtobacterium</i>	

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Skupno smo opravili 33 izolacij na trdnih gojiščih in 123 analiz MALDI TOF, da smo identificirali 40 bakterijskih sevov večinoma iz rodov *Pseudomonas* in *Xanthomonas*.

412

3.1 Patogeni iz rodu *Pseudomonas*

Iz vzorcev soje smo najbolj pogosto izolirali bakterije vrste *P. savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) (povzročitelje bakterijske listne pegavosti) ter *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (preglednica 3). Slednji patovar se pogosteje pojavlja na fižolu, a se pojavlja tudi na soji. Kljub temu, da oba patovarja povzročata podobna bolezenska znamenja na soji in fižolu, se razlikujeta v tvorbi fitotoksinov. Bakterije iz patovarja *glycinea* tvorijo fitotoksin koronatin, medtem ko bakterije iz patovarja *phaseolicola* proizvajajo fazeolotoksin (Bender in sod., 1999). Na gojišču morfoloških razlik med kolonijami patovarjev ne moremo opaziti. Oboji tvorijo drobne, belkaste do prozorne, svetleče, okrogle kolonije in izločajo fluorescentno zeleno barvilo v trdno gojišče KB. Večino patogenov iz rodu *Pseudomonas* smo izolirali iz vodenih peg na listih, nekaj tudi iz nekrotičnih stebel. Najbolj prepoznavno znamenje okužbe s pseudomonadami so manjše vodene pege, ki jih obdaja rumeno zelen sij. Kadar je okužba močnejša, se lahko pege združijo v večje zaplate nekrotičnega tkiva, ki se posuši in izpade z listov. Takšni listi imajo razcefran videz (Hartman in sod., 2015). V letu 2018 smo na posevkih fižola z močno izraženimi znamenji bakterioz potrdili prisotnost pseudomonad, in sicer vrste *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (preglednica 4).

Patogenost izolata iz Genterovcev (D03/17-2) smo potrdili na soji, kar je bila prva laboratorijsko potrjena najdba te bakterije v Sloveniji.

3.2 Patogeni iz rodu *Xanthomonas*

Za bakterije iz rodu *Xanthomonas* je značilno, da bolezen povzročajo ob višjih temperaturah in v letu 2018 smo imeli vroče in vlažno poletje, torej idealne razmere za razvoj številnih bakterioz.

V dveh vzorcih soje iz Moravskih toplic, ki sta bila odvzeta na sum okužbe z glivami, smo identificirali povzročitelja bakterijske mozoljavosti soje (*X. axonopodis* pv. *glycines*) (preglednica 2). Bakterije so bile na gojišču KB videti kot drobne, prozorno rumene, svetleče, okrogle kolonije. Okuženost listov s ksantomonadami prepoznamo po majhnih rumeno zelenih lisah z opečnato obarvano sredico, ki je rahlo privzdignjena. Lise so opazne tako na zgornji kot na spodnji strani listov. Razcefran videz obolelih listov je podoben kot pri navadni bakterijski pegavosti fižola. Patogenost izolata iz Moravskih toplic (G02/17-2) smo potrdili na soji, kar je bila prva laboratorijsko potrjena najdba te bakterije v Sloveniji.

Preglednica 3: Povzročitelji bakterijskih bolezní na soji in lokacije najdb v letih 2017 in 2018.

Leto	Povzročitelj bolezni	Število lokacij	Lokacije	Čas vzorčenja
2018	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2	Komenda, Lahovče	konec junija-začetek julija
2017	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	4	Moravske toplice, Genterovci, Račja vas, Cerklje ob Krki	julij, začetek avgusta
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	2	Moravske toplice	začetek avgusta

413

V dveh vzorcih listov fižola smo potrdili navadno bakterijsko pegavost fižola, ki jo povzroča bakterija *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xaph). V enem od teh okuženih vzorcev smo identificirali tudi patogeno bakterijo *Pseudomonas viridiflava*. V drugem vzorcu fižola, ki je bil odvzet na Klancu pri Komendi, smo identificirali vrsto *Xanthomonas arboricola*. Bakterije so na gojišču imele značilen videz kolonij kot ostale ksantomonade. Izolat je tudi dal pozitivno reakcijo na tobaku (HR test), vendar nam do zdaj še ni uspelo natančneje določiti patovarja.

3.3 Bakterije mehkih gnilob na krmnem grahu

Odvzeli smo en vzorec krmnega graha, ki je na strokih kazal znamenja mehkih, mokrih nekroz. Vzorec je bil odvzet v obdobju močnega deževja (junij 2018) in omenjena bolezenska znamenja so se pojavljala na skoraj 20 % posevka. Iz okolice nekrotičnih mest na listih smo izolirali bakterije iz rodu *Erwinia*. Za te bakterije je znano, da povzročajo mehke gnilobe na številnih rastlinskih vrstah. Bakterije smo identificirali na podlagi analize MALDI TOF MS, ter dodatno z molekularnimi analizami na genih *recA* in *dnaJ* (Waleron in sod., 2002, Marin in sod., 2011).

Preglednica 4: Povzročitelji bakterijskih bolezni na fižolu in lokacije najdb v letu 2018.

Povzročitelj bolezni	Število lokacij	Lokacije	Čas vzorčenja
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2	Komenda, Voklo	junij
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2	Savlje	julij
<i>Xanthomonas arboricola</i>	1	Lahovče	junij
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1	Savlje	julij

3.4 Združba bakterij v simptomatičnih vzorcih

Z analizo MALDI TOF MS smo v vzorcih identificirali tudi številne druge bakterije, ki so se pojavljale v združbi skupaj s patogeni. Najpogosteje smo iz vzorcev izolirali vrsto *Pantoea agglomerans*, za katero je znano, da ima lahko pozitiven učinek na rastline in se uporablja kot biotični agens. V vzorcih so se pogosto pojavljale tudi različne nepatogene ksantomonade in pseudomonade (preglednica 5).

Preglednica 5: Združba bakterij, ki se je pojavljala skupaj s patogenimi bakterijami.

Povzročitelj bolezni	Najdba v istem vzorcu (MALDI TOF MS)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>
	<i>Pantoea agglomerans</i>
	<i>Kosakonia cowanii</i>
	<i>Xanthomonas arboricola</i>
	<i>Paenibacillus</i> sp.
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	nepatogene pseudomonade
	nepatogene pseudomonade
	<i>Pantoea agglomerans</i>
	<i>Sphingomonas</i> sp.
	<i>Xanthomonas campestris</i> (nepatogen)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Xanthomonas arboricola</i>
	<i>P. viridiflava</i> (patogen)
	nepatogene pseudomonade
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (nepatogen)
	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	<i>Kosakonia cowanii</i>
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>
	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Xanthomonas arboricola</i>	nepatogene pseudomonade
	<i>Pantoea agglomerans</i>
brez najdb bakterijskih patogenov	<i>Pantoea agglomerans</i>
	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>Sphingomonas</i> sp.
	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Arthrobacter</i> sp.
	<i>Acinetobacter</i> sp.

414

4 SKLEPI

Glavni namen naloge je bila identifikacija povzročiteljev bakterijskih bolezni na soji zaradi povečane pridelave soje v Sloveniji. Ob pregledu posevkov smo ugotovili, da se bolezenska znamenja bakterioz pojavljala na skoraj vseh pregledanih lokacijah, pri čemer so prevladovala znamenja listne pegavosti na soji (Psg) in znamenja obročkastega ožiga na fižolu (PspH). Tako na soji kot fižolu smo potrdili prisotnost patogenih bakterij iz rodu *Xanthomonas* (Xag, Xaph). Vsi patogeni, ki smo jih identificirali, se širijo s semenom, zato je skrb za zagotavljanje kakovostnega semena bistven preventivni ukrep za preprečevanje širjenja bolezni. Navkljub omejenemu obsegu naloge, rezultati nakazujejo, da je razširjenost patogenih bakterij na posevkih soje v Sloveniji večja kot smo sprva predvidevali. Ali zastopanost omenjenih bakterij predstavlja tveganje za domače pridelovalce je odvisno od vremenskih razmer, mikroklima v posevku in zdravja semenskega materiala. Trenutno iz sosednjih držav ne poročajo o večjih izgubah pridelkov soje, kljub pojavu bakterioz (Popović in sod., 2010).

5 ZAHVALA

Za podporo se zahvaljujemo Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, UVHVVR (C2337-19-000016), programski skupini Agrobiodiverziteta (P4-0072) ter projektu FP7 CropSustain (FP7-REGPOT-CT2012-316205). Zahvala gre tudi sodelavcem OVR, še zlasti Neji Marolt, Ireni Mavrič Pleško in Metki Žerjav.

6 LITERATURA

- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F., Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 2: 266-292.
- Hartman, G.L. 2015. Worldwide importance of soybean pathogens and pests. V: Hartman, G.L., Rupe, J.C., Sikora, E.J., Domier, L.L., Davis, J.A., Steffey, K.L. (ur.). *Compendium of Soybean Diseases and Pests*, 5.izd., The American Phytopathological Society, Minnesota, ZDA, 2015: 4-5.
- Hartman, G.L., Rupe, J.C., Sikora, E.J., Domier, L.L., Davis, J.A., Steffey, K.L. 2015. *Compendium of Soybean Diseases and Pests*, 5.izd., The American Phytopathological Society, Minnesota, ZDA, 2015: 201 str.
- Hymowitz, T., Nelson, R.L., Sinclair, J.B., Hartman, G.L. 2015. History and growth of the soybean plant. V: Hartman, G.L., Rupe, J.C., Sikora, E.J., Domier, L.L., Davis, J.A., Steffey, K.L. (ur.). *Compendium of Soybean Diseases and Pests*, 5.izd., The American Phytopathological Society, Minnesota, ZDA, 2015: 1-4.
- Marín, F., Santos, M., Carretero, F., Yau, J. A., Diáñez, F. 2011. *Erwinia aphidicola* isolated from commercial bean seeds (*Phaseolus vulgaris*). *Phytoparasitica*, 39, 5: 483.
- Mulet, M., Bannasar, A., Lalucat, J., García-Valdés, E. 2009. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Molecular and cellular probes*, 23, 3-4: 140-147.
- Popović, T., Balaž, J., Nikolić, Z., Starović, M., Gavrilović, V., Aleksić, G., Vasić, M., Živković, S. 2010. Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. *African Journal of Agricultural Research*, 5, 19: 2730-2736.
- Richert, K., Brambilla, E., Stackebrandt, E. 2005. Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria, order Actinomycetales. *Journal of microbiological methods*, 60: 115-123.
- Santos, S. R., Ochman, H. 2004. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environmental Microbiology*, 6, 7: 754-759.

- Statista. 2019. Leading soybean producing countries worldwide from 2012/13 to 2018/19 (in million metric tons). <https://www.statista.com/statistics/263926/soybean-production-in-selected-countries-since-1980/> (maj, 2019)
- SURS. <https://www.stat.si/StatWeb/Field/Index/11> (marec, 2019)
- Waleron, M., Waleron, K., Podhajska, A. J., Łojkowska, E. 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology*, 148, 2: 583-595.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., Harayama, S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146, 10: 2385-2394.
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M., Fargier, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and applied microbiology*, 31, 5: 366-377.