

JERZY LEWOSZ**MARIA HOŁUBOWSKA**Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

Zabiegi ograniczające rozprzestrzenianie bakteriozy pierścieniowej ziemniaka

Agronomical measures that reduce a spread of potato ring rot

Dokonano przeglądu aktualnej wiedzy na temat sposobów rozprzestrzeniania się bakteriozy pierścieniowej ziemniaka i możliwych zabiegów służących zmniejszeniu ryzyka przenoszenia sprawcy choroby.

Słowa kluczowe: ziemniak, bakterioza pierścieniowa, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

The paper reviews the current knowledge of the ways of the ring rot spread in potato and presents agronomical measures that can be applied to reduce a risk of spread of the bacteria causing this disease.

Key words: potato, ring rot, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

WSTĘP

Bakterioza pierścieniowa bulw ziemniaka wywoływana jest przez bakterie *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann i Kotthoff, 1914; Davies i in., 1984; Cms). W kilku ostatnich latach zaobserwowano w krajach europejskich pojawienie się wielu ognisk choroby, również na terenie Wielkiej Brytanii, gdzie dotychczas bakteria ta nigdy nie występowała. Ocenia się, że straty roczne powodowane przez obecność bakterii dochodzą do kwoty 15 milionów Euro i wynikają one z nakładów niezbędnych na eliminację zainfekowanego materiału, dezynfekcję pomieszczeń i maszyn rolniczych, zwiększenia nakładów na badania i kontrolę materiałów hodowlanych i nasiennych oraz rekompensaty za straty poniesione przez farmerów. Okazało się, że dotychczasowa wiedza na temat epidemiologii i zwalczania bakteriozy pierścieniowej jest niewystarczająca, aby skutecznie wyeliminować te bakterie z upraw ziemniaka. Przy zwalczaniu bakteriozy pierścieniowej na terenie całej Unii Europejskiej obowiązuje Dyrektywa 2000/29/EC a sprawca tej choroby jest na liście organizmów podlegających obowiązkowi zwalczania (EPPO A2; Aneks IAII Dyrektywy 2000/29/EC).

CHARAKTERYSTYKA PATOGENA

Cms wyspecjalizował się w pasożytowaniu w tkance przewodzącej roślin ziemniaka, jakkolwiek po sztucznej infekcji może również pasożytować na innych roślinach *Solanaceae* m.in. pomidora i oberżyny. Wykorzystuje się, zatem w testach diagnostycznych te dwa gatunki jako rośliny indykatorowe. Bakterie *Cms* są Gram-dodatnie, nie zarodnikują, mają kształt pałeczek o wymiarach 0,5–1,0 μm , większość szczepów wytwarza śluz. Szczepy *Cms* są mało zróżnicowane genetycznie wskutek wysokiej specjalizacji wobec roślin gospodarza i bardzo podobnych wymagań biotroficznych (Lee i in., 1997). Komórki *Cms* są trudne w diagnozowaniu wskutek zmiennej morfologii, niskiej specyficzności serologicznej, braku wysoce selektywnych pożywek, oraz występowaniu infekcji latentnej w formie bezobjawowej w pierwszych stadiach infekcji, kiedy to liczebność populacji bakterii w tkankach ziemniaka jest niska i może pozostawać niewykrywalna nawet w kilku kolejnych generacjach zainfekowanych roślin (Franc, 1999). Wzrost kolonii na pożywkach jest bardzo powolny i łatwo tłumiony przez inne szybko rosnące bakterie towarzyszące. Warunki sprzyjające infekcji mogą różnić się od warunków sprzyjających pojawieniu się objawów choroby. Intensywność objawów zależna jest od odmiany i warunków środowiska (Kawchuk i in., 1998). Temperatura 18°–25°C, niska intensywność światła, wysoka wilgotność gleby sprzyjają rozwojowi infekcji, jakkolwiek sucha gleba i temperatury w zakresie 24°–32°C sprzyjają pojawianiu się objawów infekcji w postaci więdnienia roślin. Bakterie źle znoszą wyższe temperatury, stąd bakterioza częściej występuje w krajach o umiarkowanym i chłodnym klimacie. Obecność bakterii w tkance naczyniowej roślin powoduje gromadzenie się śluzu i upośledza transpirację roślin. Z tego powodu porażone rośliny mogą być karłowate, a w późniejszym okresie wegetacji mogą pojawić się objawy więdnienia i zawijania się w górę brzegów liści, żółknięcia i płowienia liści, desykacji i nekrotyzacji blaszek liściowych między żyłkami. W okresach suszy i zaawansowanej infekcji, całe rośliny mogą więdnąć i usychać, jakkolwiek częstsze jest jednostronne więdnienie i usychanie rośliny. Późno pojawiające się objawy więdnienia i zasychania są trudno odróżnialne od naturalnego starzenia się roślin. Takie rośliny mogą dać zainfekowane bulwy, które początkowo z wyglądu nie różnią się od bulw zdrowych. Pierwsze objawy infekcji bulw widoczne są po przekrojeniu bulw w postaci szklistego wyglądu pierścienia tkanki naczyniowej w części stolonowej bulwy. Przy silniejszej infekcji tkanka w tym miejscu może ciemnieć tworząc brunatną lub czarną obwódkę, lub ulegać maceracji przez celulazę bakteryjną, tworząc śluzowatą serowatą wydzielinę bakteryjną oddzielającą część korową od rdzenia bulwy.

SPOSOBY ROZPRZESTRZENIANIA SIĘ PATOGENA

Jedynym znanym naturalnym żywicielem bakterii są rośliny ziemniaka, zatem przyjmuje się, że rozprzestrzenianie się infekcji następuje za pośrednictwem zainfekowanego materiału sadzeniakowego oraz sprzętu używanego przy uprawie roślin i przechowywaniu i sortowaniu bulw. Okolicznością sprzyjającą infekcji jest występowanie

infekcji latentnych — bezobjawowych, które w zależności od odporności odmiany i warunków uprawy mogą przetrwać bez wykrycia nawet w kilku pokoleniach roślin rozmnażanych jako materiał nasienny. Przyjmuje się, że do infekcji dochodzi najłatwiej przy kontakcie bulw zdrowych z zainfekowanymi powierzchniami bulw, maszyn i urządzeń podczas zbioru, przechowywania lub sadzenia. Śluz bakteryjny uwalniany z zmacerowanych bulw może zachować swą infekcyjność nawet przez okres dwu lat, jeżeli pozostanie w wysuszonej postaci na skrzynkach, workach, częściach maszyn. Ryzyko infekcji bulw staje się bardzo wysokie, gdy dochodzi do kaleczenia bulw i kontaktu tkanki naczyniowej z zainfekowanymi powierzchniami bulw i sprzętu. Wielkie ryzyko infekcji stwarza krojenie bulw przeznaczonych na sadzeniaki. Panuje przekonanie, że infekowanie roślin w polu przez rośliny sąsiednie zdarza się rzadko, natomiast możliwe jest przenoszenie bakterii przez glebę wysyconą wodą. Bakterie *Cms* mogą przeżywać od 35 do 52 dni w sterylnej wodzie wodociągowej, a znacznie krócej w niesterylnych wodach powierzchniowych. Zatem rozprzestrzenianie się bakterii wraz z wodą używaną do nawadniania plantacji wydaje się mało prawdopodobne. Udowodniono natomiast przenoszenie bakterii z bulw chorych na zdrowe wraz z wodą używaną do mycia bulw. Niewiele wiadomo na temat udziału owadów gryzących w przenoszeniu bakterii z rośliny na roślinę. W warunkach doświadczalnych wykazano zdolność przenoszenia bakterii przez stonkę ziemniaczaną, mszyce i skoczki, lecz taka możliwość w warunkach naturalnych wydaje się mało prawdopodobna. Długotrwałym źródłem infekcji w polu mogą być rośliny samosiewów ziemniaka — przynajmniej w tych krajach, gdzie mogą one przetrwać okres mrozów.

OGRANICZANIE ROZPRZESTRZENIANIA SIĘ BAKTERIOZY PIERŚCIENIOWEJ

Żadne środki chemiczne i biologiczne nie są skuteczne przy zwalczaniu komórek *Cms* przebywających w osłonie tkanek naczyniowych rośliny. Próby stosowania antagonistycznej mikroflory (Gamard i De Boer, 1995) w uprawach roślin ziemniaka nie były wystarczająco powtarzalne. Próby wprowadzenia odmian odpornych na bakteriozę pierścieniową wykazały, że tzw. odmiany odporne ulegały infekcji, lecz nie przejawiały objawów stając się źródłem infekcji dla innych odmian. Obecnie uważa się, że eliminacja patogena z materiałów nasiennych jest najlepszym sposobem ograniczania bakteriozy pierścieniowej. Obowiązujące obecnie w Unii Europejskiej regulacje prawne zakładają zerową tolerancję *Cms* w certyfikowanych materiałach nasiennych. Tolerancję zerową rozszerza się na cały system reprodukcji nasiennej łącznie z najwcześniejszymi pokoleniami roślin przeznaczonych do rozmnożeń i miejscami, gdzie dokonuje się rozmnożeń i reprodukcji nasiennej wraz z otoczeniem, tj. wszystkimi polami, budynkami i urządzeniami należącymi do gospodarstwa prowadzącego proces reprodukcji nasiennej. Obowiązujący jest także zakaz wprowadzania na terytorium Unii Europejskiej materiału nasiennego nieposiadającego certyfikacji, a także wprowadzania ziemniaków konsumpcyjnych i przemysłowych z krajów, o których wiadomo, że występuje tam *Cms*.

Obecność infekcji latentnych, niewykrywanych podczas inspekcji wzrokowej, wymaga stosowania laboratoryjnych metod diagnostycznych i potwierdzenia obecności *Cms* przy

pomocy biotestu z użyciem roślin indykatorowych. Sposoby wykrywania i postępowania przy badaniu na obecność *Cms* podaje Dyrektywa Rady 93/85/EEC z dnia 4. 10. 1993. Procedura ta obejmuje barwienie Grama, test immunofluorescencyjny (IF) oraz biotest oberżynowy pozwalający na namnożenie populacji *Cms* w oberżynie, a następnie wyizolowanie szczepu *Cms* i jego identyfikację przy pomocy szeregu testów biochemicznych i fizjologicznych. W wielu laboratoriach wypróbowano szereg dodatkowych metod wykrywania *Cms* takich jak test immunoenzymatyczny ELISA, szereg procedur amplifikacji wybranych sekwencji DNA technikami PCR, łącznego stosowania ELISA i FISH (De Boer i Hall, 2000; Pastrik, 2000);. Mimo, że wiele procedur PCR pozwala na kilkukrotne zwiększenie czułości detekcji *Cms* w stosunku do obowiązującej obecnie procedury immunofluorescencyjnej, to nie zostały one jak dotąd wprowadzone jako metody obowiązujące.

Jako standardową próbkę do badań na obecność *Cms* przyjmuje się 200 bulw pobranych przypadkowo z 25 tonowej partii bulw. Daje to 95% prawdopodobieństwo wykrycia *Cms* w partii bulw zainfekowanej na poziomie 1,5%. Przy niższych poziomach infekcji (1,0; 0,5; 0,1 i 0,05%) należałoby pobierać odpowiednio: 300, 600, 3000 i 4600 bulw, aby uzyskać 95% prawdopodobieństwo wykrycia *Cms*.

Przy wykonywaniu wszelkich testów diagnostycznych należy pamiętać, że nie wykrycie *Cms* nie musi znaczyć, że badana partia bulw jest rzeczywiście wolna od *Cms*, ponieważ do badań pobierana jest tylko próbka ze znacznej partii ziemniaków, a niski poziom infekcji latentnej może utrudnić wykrycie komórek bakteryjnych.

Dyrektywa 93/85/EEC zakłada także podejmowanie dodatkowych akcji zmierzających do eliminacji zainfekowanych bulw poprzez przeprowadzanie wybiórczych testów diagnostycznych ziemniaków nasiennych wyprodukowanych w kraju, importowanych oraz ziemniaków konsumpcyjnych. Akcje te zmierzają do:

- objęcia zakazem sadzenia materiałów zainfekowanych oraz „przypuszczalnie zainfekowanych”, które w testach określono jako wolne od infekcji, lecz będących przedmiotem restrykcji,
- mają na celu wykrycie źródła infekcji,
- określenie granic obszaru, jaki mógł być objęty infekcją,
- zatrzymanie do badań wszystkich materiałów o wspólnym pochodzeniu z zainfekowanymi.

Restrykcje produkcyjne dotyczą miejsca gdzie znaleziono zainfekowany materiał i oznaczają one 3–4 letni zakaz uprawy ziemniaków na zainfekowanych polach oraz nakaz niszczenia samosiewów ziemniaka przez okres, co najmniej dwu lat. Po tym okresie pozwala się na sadzenie wyłącznie certyfikowanego materiału nasiennego w pierwszym roku w celu wyprodukowania ziemniaków konsumpcyjnych, które muszą być poddane badaniom po zbiorze. Restrykcje te dotyczą wszystkich pól gospodarstwa gdzie wykryto *Cms* oraz pól sąsiadujących.

Zainfekowany materiał musi być utylizowany w sposób nie sprawiający zagrożenia. Akceptowane jest spalenie, wykorzystanie po uparowaniu jako pasza dla zwierząt, zakopanie głęboko w ziemi w przeznaczonym na to miejscu lub przemysłowe przetworzenie bulw w wyznaczonym zakładzie przemysłowym (gorzelnia, krochmalnia),

posiadającym odpowiedni system odpływu i dezynfekcji ścieków. Ziemniaki określone jako „przypuszczalnie zainfekowane” mogą być przeznaczone do konsumpcji po odpowiednim opakowaniu, lub wykorzystane jako pasza zwierzęca w ściśle kontrolowanych warunkach. Powierzchniowo zanieczyszczony bakteriami sprzęt, maszyny, opakowania powinny zostać zniszczone lub oczyszczone z gleby i zdezynfekowane.

ZALECANE ZABIEGI ZMNIEJSZAJĄCE RYZYKO INFЕКCJI PRZEZ *CMS*

1. Stosowanie tylko certyfikowanego materiału sadzeniakowego, który wyprowadzony został z pewnego źródła wolnego od *Cms*.
2. Sprawdzanie czy materiał nasieny z lat poprzednich i materiały o wspólnym pochodzeniu wolne były od *Cms*.
3. Należy unikać krojenia bulw przeznaczonych do sadzenia, ponieważ jest to zabieg najbardziej ułatwiający infekowanie bulw.
4. Należy wyszukiwać na plantacji rośliny o objawach przypominających bakteriozę pierścieniową (rośliny skarłate, więdnące), bulwy z obrączką gnilną i poddać je testom diagnostycznym.
5. Diagnozowanie i inspekcja plantacji powinna być prowadzona intensywnie przez kilka lat z rzędu, aby uzyskać pewność, że nie jest on zainfekowana przez *Cms*.
6. Należy starannie usuwać samosiewy ziemniaka każdego roku, regularnie w trakcie prac polowych zmywać resztki gleby i odpadki z maszyn i sprzętu, pomieszczeń przeznaczonych do obróbki i przechowywania ziemniaka i je dezynfekować.
7. Komórki *Cms* są wrażliwe na powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne oraz traktowanie wysoką temperaturą (ponad 82°C przez 5 min.)
8. Należy przestrzegać ogólnych zasad fitosanitarnych w gospodarstwie, takich jak: mycie i dezynfekcja odzieży i butów, maszyn, itp.
9. Przejazd sprzętu przez plantację z roślinami zainfekowanymi przyczynia się do rozprzestrzeniania infekcji z udziałem bakteryjnego śluzu i soku zainfekowanych roślin.
10. Należy przestrzegać zasady oddzielnego użytkowania sprzętu i maszyn do produkcji nasiennej i produkcji ziemniaków konsumpcyjnych, a w razie braku oddzielnego sprzętu, należy przeprowadzać dezynfekcję sprzętu za każdym razem przy zmianie plantacji.
11. Najłatwiejszą drogą infekcji są skaleczenia na bulwach i kielkach, zatem podczas zbioru, transportu i sortowania należy unikać warunków sprzyjających urazom mechanicznym.
12. Przemysłowe odpadki bulw i wody ściekowe są potencjalnym źródłem infekcji i należy zadbać, aby utylizować je w sposób właściwy.
13. Istnieją dowody, że woda używana do mycia bulw porażonych *Cms* jest źródłem infekcji kolejnych partii bulw mytych w tej samej wodzie. Należy zmieniać i dezynfekować wodę przy myciu bulw pochodzących z różnych partii.

LITERATURA

- De Boer S. H., Hall J. W. 2000. Reproducibility of enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence for detecting *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in multiple laboratories. OEPP/EPPPO Bulletin 30: 397 — 401.
- Gamard P., De Boer S. H. 1995. Evaluation of antagonistic bacteria for suppression of bacterial ring rot of potato. Europ. J. of Plant Pathol. 101: 519 — 525.
- Franc G. D. 1999. Persistence and latency of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in field grown seed potatoes. Plant Disease 83 (3): 247 — 250.
- Kawchuk L. M., Lynch D. R., Kozub G. C., Nelson G. A., Kulcsar F., Fujimoto D. K. 1998. Multi-year evaluation of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* disease symptoms in cultivated potato genotypes. Amer. J. Potato Res. 75: 235 — 243.
- Lee I. M.; Bartoszyk I. M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E. 1997. Phylogeny and classification in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analyses. Applied and Environ. Microbiol 63 (7): 2631 — 2636.
- Pastrik K.-H. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with co-amplification of host DNA. Europ. J. Plant Pathol. 106: 155 — 165.