

REZULTATI SPREMLJANJA POJAVA FITOPLAZEM AP (*CANDIDATUS PHYTOPLASMA MALI*) IN PD (*CANDIDATUS PHYTOPLASMA PYRI*) V SLOVENIJI

Mojca LEŠNIK¹, Ema PAVLIČ NIKOLIĆ², Mario LEŠNIK³

^{1,2}MKGP RS, Inšpektorat RS za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano, Fitosanitarna inšpekcija
³Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Maribor

IZVLEČEK

Predstavljeni so podatki o pojavljanju fitoplazem povzročiteljic metličavosti jablan (apple proliferation - *Candidatus Phytoplasma mali*) in odmiranja hrušk (pear decline - *Candidatus Phytoplasma pyri*) v drevesnicah in matičnih nasadih, ugotovljeni pri delu fitosanitarne inšpekcije v obdobju od leta 2000 do 2008. Da bi ugotovili fitosanitarni status razmnoževalnega materiala je bilo v drevesnicah in matičnih nasadih odvzetih veliko vzorcev, ki so jih analizirali z uporabo različnih molekularskih PCR detekcijskih metod. Rezultati kažejo na konstantno zastopanost obeh fitoplazem v razmnoževalnem materialu. Pomembno je, da pridelujemo in sadimo neokužene sadike, da s tem zmanjšamo na minimum začetni inokulum povzročiteljev bolezni v sadovnjakih, ker so populacije vektorjev velike in ker je uspešnost zatiranja vektorjev v Sloveniji pogosto premalo učinkovita.

Ključne besede: *Candidatus phytoplasma mali*, *Candidatus phytoplasma pyri*, fitosanitarni ukrepi, jabolana, hruška

ABSTRACT

RESULTS OF SURVEILLANCE OF OCCURRENCE OF AP (*CANDIDATUS PHYTOPLASMA MALI*) IN PD (*CANDIDATUS PHYTOPLASMA PYRI*) PHYTOPLASMA IN SLOVENIA

Data on occurrence of apple proliferation disease (c.o. *Candidatus Phytoplasma mali*) and pear decline disease (c.o. *Candidatus Phytoplasma pyri*) in nurseries and plantations of mother trees, carried out by phytosanitary inspection services are presented for the period from 2000 to 2008. Many samples were taken in nurseries and plantations of mother trees and were subjected to different molecular detection PCR methods to evaluate the presence of phytoplasma and the phytosanitary status of propagation material. Results show constant presence of both phytoplasmas on propagation material. It is very important to produce and to plant healthy stocks to minimize the starting inoculum of phytoplasma at planting of new orchards, since vector populations in Slovenia are big and their control is usually not sufficient.

Key words: apple, *Candidatus phytoplasma mali*, *Candidatus phytoplasma pyri*, phytosanitary measures, pear

¹ mag. agr. znan., Vodovodna 34, SI-2000 Maribor

² mag. agr. znan., Opekarniška cesta 2, SI-3000 Celje

³ izr. prof., dr. agr. znan., Vrbanska 30, SI-2000 Maribor

1 UVOD

Povzročiteljici fitoplazmoz metličavosti jablan (v nadaljevanju AP – Apple proliferation – *Candidatus phytoplasma mali*) in odmiranja hrušk fitoplazma (v nadaljevanju PD – Pear decline – *Candidatus phytoplasma pyri*) sta nadzorovana škodljiva organizma s seznama I.A.II iz priloge I, del A Direktive Sveta št. 2000/29/ES in liste karantenskih škodljivih organizmov A2 organizacije EPPO. Obe fitoplazmi sta uvrščeni v skupino fitoplazem apple proliferation. Glavna gostiteljska rastlina AP je jablana (*Malus domestica* Borkh.), medtem ko je gospodarsko najpomembnejša gostiteljska rastlina PD hruška (*Pyrus communis* L.). Posebej nevarni sta zato, ker povzročata velike izgube pridelkov in ker se ju s kemičnimi in biocidnimi sredstvi ne da zatirati. Proti njima se lahko borimo le s preventivnimi ukrepi. Škode, ki jih povzročata so velike in trajne. V primeru okužb s PD navadno delno ali popolnoma propadajo okužena hruševa drevesa, medtem, ko se pri jablanah okuženih z AP soočamo predvsem z veliki izgubami kakovosti pridelka, drevje pa ne propada.

Na osnovi vizualnih opazanj znakov okužb sumimo, da se v Sloveniji PD vedno pogosteje pojavlja že od sedemdesetih let naprej (Vrabl, 1981; Maček, 1986). Z laboratorijskimi postopki je bila potrjena PD v Sloveniji leta 2000 (Seljak in Petrovič, 2001). AP smo v Sloveniji prvič uradno potrdili leta 1985 (Šarič in Cvjetković, 1985) v okolici Ormoža, kjer je bilo v 10 ha sadovnjaku jablan sorte 'Rdeči delišes' najdenih 70 % dreves z značilnimi znamenji. Od tedaj naprej domnevamo, da sta obe fitoplazmi v Sloveniji trajno zastopani. Prenašata se z razmnoževalnim in sadilnim materialom (s cepljenjem) ter naravnimi prenašalci iz skupine bolšic rodu *Cacopsylla* (Homoptera: Psyllidae) na persistenten način (Purcel, 1982). Obstaja velika verjetnost, da je mogoč tudi prenos preko koreninskega sistema med sosednjimi gostiteljskimi drevesi, zlasti v primeru okužb z AP (Lešnik s sod., 2008). Prenašalci fitoplazem iz skupine metličavost jablan, so tako glede mehanizmov prenosa in glede gostiteljskih rastlin, vrstno specializirani (Carraro s sod. 2001; Osler in Ermacora, 2003). V primeru AP so kot naravni prenašalci ugotovljene bolšice *Cacopsylla melanoneura* in *Cacopsylla costalis*, v primeru PD pa je v naših krajih najpomembnejša *Cacopsylla pyri*, medtem ko je *Cacopsylla pyricola* v naših razmerah manj pomemben prenašalec PD, ker se pojavlja pogosto. Z ekološko in integrirano pridelavo sadja se povečujejo populacije naravnih prenašalcev, kar povečuje naravno širjenje fitoplazem. Rastline so le sekundarni in slučajni gostitelji fitoplazem, primarni gostitelji so bolšice. S stališča fitosanitarne kontrole je pomembno stalno nadziranje pridelave sadilnega in razmnoževalnega materiala v drevesnicah, matičnih nasadih in zarodiščih podlag. V primeru najdb okuženih rastlin pa je potrebno hitro in učinkovito odrejanje fitosanitarnih ukrepov. Vzorčenje v objektih za pridelavo sadilnega in razmnoževalnega materiala sadnih rastlin za izvajanje laboratorijskih testov je eden od preventivnih ukrepov za preprečevanje širjenja obeh fitoplazem.

2 MATERIAL IN METODE DELA

Fitosanitarna inšpekcija pri rednih zdravstvenih pregledih objektov pridelave sadilnega in razmnoževalnega materiala in pooblaščenim uradnim preglednikom v postopku uradnega potrjevanja opravljamo zdravstvene preglede v drevesnicah, matičnih nasadih in zarodiščih podlag (v nadaljevanju mesta pridelave) s pripadajočimi varovalnimi pasovi. Inšpekcija opravlja preglede v objektih sadnih rastlin vzgojne stopnje standard, pooblaščenim preglednikom (KIS) pa v objektih pridelave sadnih rastlin vzgojne stopnje osnovni I, II in certificirano. Preglede rodnihih nasadov in vrtov s sadnimi rastlinami se izvaja v primeru prijav strank o sumu na okužbe. Pri pregledih opazujemo drevesa in sadike na pojav značilnih znamenj okužbe (metlice, rozetavost, povečani prilističi, rdečenje, spremembe listnih robov...). Vzorce

za laboratorijsko testiranje se odvzame, če se opazijo znamenja okužbe z nadzemnih delov rastlin (poganjki) ali pa korenine v primeru vzorčenja na latentne okužbe. Po posebnih zahtevah s seznama IV.A.II. (posebne zahteve v notranjosti in pri uvozu) Direktive Sveta št. 2000/29/ES je predpisano testiranje na pojav AP z indikatorskimi rastlinami. Določila omenjenega predpisa so glede testiranja zastarela, saj so zdaj razvite že mnogo bolj občutljive in hitrejše uradno potrjene laboratorijske detekcijske metode (npr. različne molekularne metode kot je PCR), ki se pri laboratorijskih testih zdaj redno uporabljajo. Najprimernejši čas za vzorčenje je oktober in november, pred odpadanjem listja, ko so koncentracije fitoplazem v nadzemnem delu dreves največje. Vzorce se pošilja v laboratorijsko analizo na NIB, kjer vzorce testirajo z ELISA in/ali molekulskimi PCR testi. Mesta pridelave z gostiteljskimi rastlinami AP in PD inšpektorji in pregledniki pregledamo dvakrat letno, drugi pregled v času jeseni je za opazovanje značilnih znamenj obeh fitoplazmoz bolj ugoden, saj so znamenja bolj izrazita v jesenskem času pred odpadanjem listja.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Število vzorcev po letih se z izjemo leta 2000, ki je bilo začetno leto sistematičnega vzorčenja in leta 2001, ko je bila izvedena širša akcija vzorčenja zaradi preverjanja pojava in razširjenosti AP, bistveno ne razlikuje.

3.1 Rezultati in razprava glede analize pogostosti okužb z AP fitoplazmo

Preglednica 1: Število odvzetih in z laboratorijskimi testi dokazano okuženih vzorcev z AP za obdobje 2000-2008

Število odvzetih vzorcev 2000-2008										
Leta	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Skupaj
Proizvodni nasadi	14	0	0	0	0	5	2	3	1	25
Mesta pridelave	7	106	82	54	56	60	56	67	53	541
Skupaj	21	106	82	54	56	65	58	70	54	566
Število in odstotek pozitivnih vzorcev 2000-2008										
Proizvodni nasadi	13	0	0	0	0	0	0	0	1	14
Mesta pridelave	6	10	6	9	9	2	2	9	7	60
Skupaj	19 (90,5%)	10 (9,4%)	6 (7,3%)	9 (16,7%)	9 (16,1%)	2 (3,1%)	2 (3,4%)	9 (12,5%)	8 (14,8%)	74 (13,1%)

Po oceni je vsaj polovica vzorcev bila odvzeta za testiranje na latentne okužbe. Pri oceni razmerja med skupnim številom odvzetih in pozitivnih vzorcev je to dejstvo potrebno upoštevati. Opažamo, da obstaja zelo visoka korelacija med pozitivnimi rezultati (potrjena okužba) in pojavom znamenj okužbe na drevesih ali sadikah. Tako da z natančno opravljenim pregledom lahko najdemo okužena drevesa z razvitimi znamenji v visokem odstotku (optimistična ocena tudi do 80 %). Z vzorčenjem na latentne okužbe (ni vizualnih znamenj) lahko le naključno najdemo latentno okužene rastline. V obdobju 2000-2008 je bilo 74 analiziranih vzorcev od skupno 566 odvzetih pozitivnih kar znaša 13 %. Okužbe so bile

najdene na mestih pridelave sadilnega in razmnoževalnega materiala vzgojne stopnje standard ter v rodni nasadih in vrtovih. V nasadih certificiranih sadik, matičnem nasadu osnovne I stopnje in zarodiščih podlag osnovni I stopnje in II stopnje, prisotnost AP ni bila potrjena. Okužbe so bile potrjene po območju celotne Slovenije razpršeno v odvisnosti od mest pridelave.

3.2 Rezultati in razprava glede analize pogostosti okužb z AP fitoplazmo

Izpreglednice 2 je razvidno, da je število odvzetih vzorcev ne glede na leto odvzema večje na mestih pridelave razmnoževalnega materiala, saj je izvajanje nadzora bolj pomembno pri sadilnem in razmnoževalnem materialu, kot v rodni nasadih in vrtovih.

Preglednica 2: Število odvzetih in z laboratorijskimi testi dokazano okuženih vzorcev s PD za obdobje 2004-2008

Število odvzetih vzorcev 2004-2008						
Leta	2004	2005	2006	2007	2008	Skupaj
Proizvodni nasadi-vrtovi	12	4	4	2	5	27
Mesta pridelave	30	29	17	34	27	137
Skupaj	42	33	21	36	32	164
Število in odstotek pozitivnih vzorcev 2004-2008						
Leta	2004	2005	2006	2007	2008	Skupaj
Proizvodni nasadi- vrtovi	10	2	3	2	1	18
Mesta pridelave	10	13	5	3	9	40
Skupaj	20 (47,6%)	15 (45,4%)	8 (38,1%)	5 (13,9%)	10 (31,2%)	58 (35,3%)

Vzorci so bili odvzeti večinoma na sadilnem in razmnoževalnem materialu hrušk kategorije standard. V povprečju od leta 2004 do 2008 je bilo pozitivnih 35 % vzorcev od skupno odvzetih 164. Vzorci so bili odvzeti za laboratorijsko testiranje ob sumu na pojav AP in le v redkih primerih na latentne okužbe. Zaradi tega je tudi odstotek okuženih vzorcev večji kot pri testiranjih na AP. Tudi pri PD opazamo, da se okužbe pojavljajo po celotni Sloveniji v odvisnosti od lokacij rastišč hruške. Problem pri preprečevanju širjenja je pojav naravnih prenašalcev, pri katerih se razvija odpornost na fitofarmaceutska sredstva in pomanjkanje sredstev za zatiranje v primeru ekološke in integrirane pridelave. Pri izvajanju vzorčenj v drevesnicah opazamo na sadikah značilna znamenja za okužbo s PD, vendar laboratorijski testi okužbe vedno ne potrdijo. Sadike imajo lahko podobna znamenja v primeru drugih fizioloških motenj, kot so slabo zrasla mesta med podlago in cepičem, prevezana sadika s stisnjenimi prevodnimi cevmi, inkompatibilnost med podlago in cepičem, neustrezna reakcija tal in podobno, ki učinkujejo na podoben način kot motnje zaradi okužbe s PD.

Obseg pojavljanja PD fitoplazme v Sloveniji ni povsem dokumentiran. Glede na vizualna opazovanja v naravi se zdi, da je fitoplazma veliko bolj razširjena, kot kažejo rezultati vzorčenja in testiranja (Lešnik, 2008).

Lahko rečemo, da je obseg nadzora razmnoževalnega materiala v pogledu odkrivanja okužb in zagotavljanja ustrezne kakovosti zadovoljiv. S tega stališča izvajamo ustrezne ukrepe za omejevanje širjenja AP in PD. Stopnje okuženosti nasadov so dokaj visoke, kljub temu, da sadimo kakovosten sadilni material. Pri praktičnem delu ugotavljamo, da zelo verjetno nismo dovolj učinkoviti pri omejevanju populacij vektorjev. Pri AP je potrebno največjo pozornost nameniti populacijam vrste *C. melanoneura*. Ta bolšica se iz gozdov seli v nasade že zgodaj spomladi v začetku marca, to je bolj zgodaj, kot začnemo s škroplilno sezono pri jablanah. Osnovno strokovno vprašanje v zvezi z zatiranjem bolšic je, kako široko je zatiralno okno? Po navedbah iz starejše literature bolšice v trenutku, ko se preselijo iz gozdov še niso sposobne prenašati AP fitoplazme, kljub temu, da jo lahko imajo v hemolimfi še iz jesenskega obdobja prejšnjega leta (Frisinghelli s sod., 2000; Carraro s sod., 2001; Tedeschi s sod., 2002, 2003; Seemüller s sod. 2003, Jarausch s sod., 2003, 2004). Nekaj časa se morajo hraniti (akvizicijsko in celacijsko obdobje) in šele nato, ko se tudi floemi dreves aktivirajo, lahko prenašajo fitoplazmo. Danes nekateri teh ugotovitev ne podpirajo več popolnoma in puščajo tudi možnost, da lahko bolšice v določenem obsegu prenašajo AP fitoplazmo takoj, ko se preselijo (Jarausch s sod., 2007; Carraro s sod., 2007, Tedeshi in Alma, 2007; Pedrazzoli s. sod., 2007). Če to drži tudi za naše razmere, je potrebno biti previden in opraviti dvoje nanosov insekticidov proti njim. Enega v začetnem obdobju preleta in še enega pozneje ob klasičnem predspomladanskem škropljenju. Takšna taktika, je še posebej priporočljiva za objekte pridelave razmnoževalnega materiala.

Pri PD so razmere glede zatiranje vektorjev še bistveno težje, saj je vektor (*C. pyri*) sposoben prenašati PD fitoplazmo večji del rastne dobe (vsaj 9 mesecev). Med rastno dobo je potrebno pri izbiri insekticidov upoštevati vse integrirane strategije za upočasnjevanje pojavov odpornosti na insekticide. Eden od dodatnih ukrepov je tudi uporaba insekticidov pred zimskim mirovanjem. S tem in zgodnjo spomladansko uporabo insekticidov zmanjšamo možnost zgodnjih spomladanskih reinfekcij dreves. Pri hruškah cepljenih na kutino ima obseg spomladanskih reinfekcij z bolšicami zelo velik vpliv na stopnjo izražanja bolezenskih znamenj. Morda je bolje več insekticidov uporabiti zgodaj spomladi in jeseni, kot pa med letom.

4 SKLEPI

Glede na rezultate opravljenih pregledov za obdobje 2000-2008 lahko trdimo, da sta obe fitoplazmi AP in PD trajno zastopani na območjih ugodnih za pridelavo sadnih gostiteljskih rastlin v Sloveniji. Na mestih pridelave sadilnega in razmnoževalnega materiala vzgojne stopnje standard sta zastopani in nadzorovani, ukrepi zatiranja se redno izvajajo. V objektih za pridelavo sadilnega in razmnoževalnega materiala vzgojne stopnje certificirano in osnovni matični nasadi, še niso bile potrjene, kljub vsakoletnim laboratorijskim testom in vizualnim pregledom, kar kaže na ustrezno kakovost certificiranega razmnoževalnega materiala. Zavedati se moramo, da sajenje sicer zdravih neokuženih sadik ne da rezultatov, če jih sadimo v okolje, kjer je velik vektorski kužnostni potencial, zaradi katerega so lahko naši nasadi latentno okuženi in kot taki, ne nudijo podlage za ekonomsko uspešno pridelovanje sadja.

5 LITERATURA

- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P., Refatti, E. 2001.- Fruit tree phytoplasma diseases diffused in nature by psyllids.- *Acta Horticulturae*, 550: 345-350.
- Direktiva Sveta št. 2000/29/ES; Seznam I.A.II in IV.A.II.
- Frisinghelli, C., Delaiti, L., Grandi, M. S., Forti, D., Vindimidian, M. E. 2000.- *Cacopsylla costalis* (Flor, 1981) as a vector of Apple Proliferation in Trentino.- *Journal of Phytopathology*, 148: 425-431.

- Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch W., Krczal, G., Seemüller, E., Dickler, E. 2003.- First report of *Cacopsylla picta* as a vector for apple proliferation phytoplasma in Germany.- *Plant Disease*, 87: 101.
- Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch W., Krczal, G. 2004.- Overwintering adults and springtime generation of *Cacopsylla picta* (synonym *C. costalis*) can transmit apple proliferation phytoplasmas.- *Acta Horticulturae*, 657: 409-413.
- Jarausch, B., Fuchs, A., Schwind, N., Krczal, G., Jarausch W. 2007 *Cacopsylla picta* as most important vector for 'Candidatus Phytoplasma mali' in Germany and neighbouring regions. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 189-190, 2007
- Lešnik, M., Brzin, J., Mehle, N., Ravnikar, M. 2008. Transmission of Candidatus phytoplasma mali by natural formation of root bridges in M9 apple rootstock. *Agricultura*, 6, 43-46.
- Lešnik, M. 2008. Arhiv fitosanitarne inšpekcije. Strokovno mnenje glede ukrepov pri najdbah hruševih dreves okuženih s fitoplazmo Pear decline, Maribor, 10 s.
- Maček, J. 1986. Posebna fitopatologija: Patologija sadnega drevja in vinske trte. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 276 str.
- Pedrazzoli, F., Gualandri, V., Forno, F., Mattedi, L., Malagnini, V., Salvadori, A., Sttoppa, G., Ioriatti, C. 2007. Acquisition capacities of the overwintering adults of the psyllid vectors of 'Candidatus Phytoplasma mali' *Bulletin of Insectology* 60 (2): 195-196,
- Purcell, A. H. 1982. Insect vector relationship with prokaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 20: 397-427.
- Seljak, G. in Petrovič, N. 2001. Pregled razširjenosti in stanje raziskanosti fitoplazmatskih bolezni vinske trte in sadnega drevja v Sloveniji. *Sodobno kmetijstvo*, 34 (11-12): 466-471.
- Seemüller, E., Berwarth, C., Dicker, E. 2003. Die Apfeltriebsucht wird durch Blattsauger übertragen. *Obstbau*, 4: 212-214.
- Šarić, A. in Cvjetković, B. 1985. Nalaz mikoplazmama sličnih organizama u jabuci sa simptomima proliferacije i kruški sa simptomima propadanja. *Znanstvene edicije Fakulteta poljoprivrednih znanosti sveučilišta u Zagrebu*, 68: 61-67.
- Tedeschi, R., Bosco, D., Alma, A. 2002.- Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in Northwestern Italy.- *Journal of Economic Entomology*, 95: 544-551.
- Tedeschi, R., Visentin, C., Alma, A. Bosco, D., 2003.- Epidemiology of apple proliferation (AP) in northwestern Italy. Evaluation of the frequency of AP-positive in naturally infected populations of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae).- *Annals of Applied Biology*, 142: 285-290.
- Tedeschi, R. in Alma, A. 2007. Transmission of Apple Proliferation Phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura*. *Journal of Economic Entomology*, 97, 1:8-13.
- Vrabl, S. 1981. Varstvo sadnih rastlin in vinske trte. Univerza v Mariboru, 138 str.