

## FITOPLAZME NA SADNEM DREVJU

Jernej BRZIN<sup>1</sup>, Nataša PETROVIČ<sup>2</sup>, Jana BOBEN<sup>3</sup>, Matjaž HREN<sup>4</sup>, Polona KOGOVŠEK<sup>5</sup>,  
Nataša MEHLE<sup>6</sup>, Ivan ŽEŽLINA<sup>7</sup>, Gabrijel SELJAK<sup>8</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>9</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija  
Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica, Pri hrastu 18, 5000 Nova Gorica, Slovenija

## IZVLEČEK

Fitoplazme, najmanjši znani celični organizmi, naseljene v sitastih ceveh floema povzročajo več sto gospodarsko pomembnih boleznih rastlin, ki se prenašajo z žuželčjimi vektorji in vegetativnim razmnoževanjem. Sadno drevje iz družine rožnic v Evropi resno ogrožajo fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (skupina 16SrX), v katero spadajo fitoplazme metličavosti jablan (*apple proliferation*, AP), leptonekroze koščičarjev (*european stone fruit yellows*, ESFY) in propadanja hrušk (*pear decline*, PD). Nadzor fitoplazemskih obolenj sadnega drevja temelji na vizualnih zdravstvenih pregledih gostiteljskih rastlin in potrditvenih laboratorijskih testih, ki pa so v primerih zakasnelega izražanja znamenj na sadilnem materialu ter latentnih okužb nekaterih sort tudi edini način odkrivanja. V zvezi s tem bomo izpostavili težave, ki nastopajo pri odkrivanju bolezenskih znamenj in diagnostiki obolenj. Nedavno smo odkrili fitoplazme tudi v koreninah češenj, kar je v luči novih spoznanj o poteku fitoplazemskih boleznih morebiti povezano z njihovim propadanjem v zadnjih letih. Predstavili bomo zbrane podatke o zastopanosti posameznih fitoplazem na sadnem drevju v Sloveniji.

Ključne besede: detekcija, fitoplazme, leptonekroza, metličavost, sadno drevje

## ABSTRACT

## FRUIT TREE PHYTOPLASMAS

Phytoplasmas are uncultivable, wall-less and the smallest known cellular organisms related to Gram positive bacteria. They live exclusively in the sieve tubes of their plant hosts and cause several hundred important vector-borne and graft-transmissible plant diseases. In Europe, fruit trees of *Rosaceae* family are seriously affected by phytoplasmas of apple proliferation group (16SrX group), which include apple proliferation (AP), european stone fruit yellows (ESFY) and pear decline (PD) phytoplasma. The control of these quarantine diseases is based on prompt removal of infected plants in nurseries and orchards. Advantages and drawbacks of visual and laboratory detection will be put forward in particular regarding latent infections and delayed symptom expression in nursery stocks. Since we have recently detected phytoplasmas in cherry trees the possibility of phytoplasma aetiology of cherry tree decline observed in recent years will be discussed. Current data of fruit tree phytoplasma occurrence in Slovenia will be presented.

Key words: detection, fruit trees, phytoplasma, witches' broom

<sup>1</sup>dr., univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>2</sup>dr., univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>3</sup>univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>4</sup>univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>5</sup>univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>6</sup>univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>7</sup>mag. univ. dipl. inž. kmet., Pri hrastu 18, SI-Nova Gorica

<sup>8</sup>mag. univ. dipl. inž. kmet., Pri hrastu 18, SI-Nova Gorica

<sup>9</sup>prof.dr., univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

## 1. UVOD

Fitoplazme, majhne bakterije brez celične stene, povzročajo več sto boleznih rastlin (Seemüller s sod., 2002). Živijo v sitastih ceveh floema in se prenašajo z žuželčjimi prenašalci in vegetativnim razmnoževanjem. Sadno drevje iz družine rožnic v Evropi resno ogrožajo fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (16SrX), to so fitoplazme metličavosti jablan (*apple proliferation*, AP), leptonekroze koščičarjev (*european stone fruit yellows*, ESFY) in propadanja hrušk (*pear decline*, PD), ki so uvrščene na A2 listo EPPO in na seznam I/A2 karantenskih škodljivih organizmov v Evropski skupnosti. Zastopanost fitoplazem sadnega drevja in njenih prenašalcev v Sloveniji predstavlja nevarnost za širjenje teh boleznih (Seljak in Petrovič, 2000). V zadnjih letih smo uvedli potrditvene laboratorijske teste, ki temeljijo na molekularno bioloških metodah vgnezdene verižne reakcije s polimerazo (nested PCR) ter polimorfizmu dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), za določanje AP pa je na voljo tudi serološki ELISA test (Brzin s sod., 2001). Za uspešen nadzor fitoplazemskih obolenj je bistveno odkrivanje prikritih (latentnih) okužb predvsem sadilnega materiala, ki temelji na poznavanju tolerantnih sort in laboratorijskem testiranju korenin (Brzin s sod., 2003a; Brzin s sod., 2003b). Predstavili bomo zbrane podatke o zastopanosti posameznih fitoplazem na sadnem drevju v Sloveniji ter nekatere rezultate, ki kažejo na možnost povezave med fitoplazmami in propadanjem češenj na Primorskem v zadnjih letih.

## 2. MATERIAL IN METODE

V letih od 2000 do 2004 so bila vzorčena drevesa jablan, hrušk in različnih koščičarjev z znamenji fitoplazemskih obolenj iz različnih predelov Slovenije (Preglednica 1). Za analize latentnih okužb smo vzorčili evropske sorte sliv in mirabolane brez značilnih znamenj boleznih. Vzorčili smo poganjke iz različnih delov krošnje v času od julija do septembra in za odkrivanje latentnih okužb korenine oziroma koreninske poganjke tekom celega leta. Za določanje AP smo v primerih večjega števila vzorcev pred molekularno biološkimi testi kot presejalni test uporabili serološki ELISA test (Brzin s sod., 2003b). Za molekularno biološke analize smo izolirali celokupno DNA iz listnih žil po predhodnem koncentriranju fitoplazem z diferencialnim centrifugiranjem (Ahrens in Seemüller 1992) in iz korenin ali lubja po prirejenem postopku kot v Brzin s sod. (2003). DNA fitoplazem sadnega drevja smo testirali z ugnezdjeno verižno reakcijo s polimerazo (nested PCR). V prvi PCR reakciji smo uporabili univerzalni par oligonukleotidnih začetnikov P1/P7 (Seemüller s sod., 1996), ki pomnožuje DNA vseh tipov fitoplazem. Produkta prve reakcije smo 100-krat redčili v vodi in pomnoževali v drugi reakciji z uporabo oligonukleotidnih začetnikov f01/r01, ki so specifični za fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (Lorenz s sod., 1995). V letu 2004 smo vzorce, ki so kazali znamenja boleznih in so bili negativni na fitoplazme sadnega drevja, analizirali z dodatno ugnezdjeno PCR, kjer smo v drugi reakciji uporabili univerzalne oligonukleotidne začetnike U3/U5 (Seemüller s sod., 1996). Identiteto fitoplazem smo ugotovili z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP; Seemüller s sod., 1996) po obdelavi PCR produktov z encimoma *Ssp I* (Roche Diagnostics, Nemčija) in *BsaA I* (New England Biolabs, VB).

### 3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Fitoplazmo AP smo potrdili na območju Ljubljane, Celja in Maribora (Preglednica 1), vendar je razširjenost zelo verjetno širša. Odkrivanje metličavosti praviloma ni problematično, ker so znamenja bolezn, za razliko od PD in ESFY, zelo značilna. Prav tako ni težavno laboratorijsko potrjevanje, saj v poganjkih praviloma ni težav z inhibitorji PCR, ki bi ovirali molekularno biološke teste, poleg tega pa je na razpolago tudi serološki ELISA test. Kljub značilnim znamenjem metličavosti pa se lahko pojavljajo na mladem sadilnem materialu (Lešnik s sod., 2005) ali v primeru t.i. »ozdravitve« (recovery, Osler s sod., 2001) latentne okužbe, ki jih je mogoče odkriti le z laboratorijskimi testi. »Ozdravitve« se pojavlja pri starejših drevesih, na katerih ni vidnih znamenj bolezn, fitoplazme pa se praviloma nahajajo le v koreninah.

»Ozdravitve« matičnih dreves, ki se uporabljajo za podlage, lahko predstavlja način širjenja bolezn s sadilnim materialom, kar bi bilo v prihodnje smiselno preveriti z laboratorijskimi analizami korenin.

Fitoplazmo PD smo potrdili v večini območij Slovenije (Preglednica 1). Znamenja propadanja hrušk, kot je predčasno in močno rdečenje listov ter zavrti rast, so lahko posledica različnih dejavnikov, zato je laboratorijsko potrjevanje PD nepogrešljivo. Najprimernejši čas za vzorčenje je pozno poletje in jesen, ko so znamenja najznačilnejša, vendar so poganjki v pozni jeseni lahko problematični zaradi inhibitorjev PCR.

Fitoplazmo ESFY smo prav tako potrdili v vzorcih iz skoraj vseh območij Slovenije (Preglednica 1). Zaradi prisotnosti inhibitorjev PCR je problematično testiranje v pozni jeseni (oktobra), saj ESFY v nekaterih vzorcih dreves z značilnimi znamenji z molekularno biološkimi metodami nismo uspeli potrditi, kljub temu da so bile ugotovljene fitoplazme z nespecifično mikroskopsko metodo barvanja DNA z barvilom DAPI. Leptonekroza, poleg marelic in breskev, prizadene predvsem slive kitajsko japonskega izvora, medtem ko so slive evropskega izvora in mirabolane tolerantne (Carraro s sod., 1998). Slednje so kot podlage lahko vir okužbe z ESFY, kar lahko zanesljivo odkrivamo le z laboratorijskimi analizami korenin ali koreninskih poganjkov. Na območjih z močnim pritiskom ESFY je sajenje tolerantnih sort, npr. domače češplje, tudi edini način omejevanja bolezn. Fitoplazma ESFY naseljuje tudi okrasne in divje vrste rodu *Prunus*, zato je le-te potrebno upoštevati kot možen rezervoar bolezn (Carraro s sod., 2002; Brzin s sod., 2003a).

Češnje in višnje naj bi bile na ESFY odporne, saj do okužb pride le redko in dreves ne prizadenejo močno. Fitoplazme iz skupine metličavosti smo potrdili le v enem vzorcu poganjka češnje z znamenji kloroze in zvijanja listov. V zadnjih letih opažamo propadanje češenj in višenj na Primorskem, katerega vzrok ni znan. Poganjki spomladi ob cvetenju popolnoma uvenejo, verjetno zaradi mašenja prevodnih elementov nad mestom cepljenja, saj je les na tem mestu močno porjavel. Zanimivo je, da smo spomladi 2004 v vzorcih korenin češenj s šibkimi znamenji venenja po dodatnem čiščenju DNA z molekularno biološkimi metodami potrdili fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (podatki niso prikazani). Prav tako smo v koreninah opazili fitoplazme z mikroskopsko metodo barvanja z DAPI. V floemu korenin in poganjkov smo opazili še fluorescenco, značilno za monomerne fenolne snovi, katerih kopičenje in polimerizacija v floemu spremlja značilno znamenje fitoplazemskih obolenj - nekroze floema (Brzin, 2004). Sklepamo, da so nekroze floema, ki smo jih opazili v poganjkih, posledica transporta fenolnih snovi iz korenin, kjer nastanejo kot odziv na okužbo s fitoplazmami. Fenolne snovi smo v koreninah opazili tudi v ksilemu, zato bi njihova polimerizacija nad mestom cepljenja lahko prekinila oskrbo z vodo in s tem povzročila venenje. Dosedanji rezultati torej dopuščajo domnevo, da se spomladi, morebiti zaradi dejavnikov okolja kot je npr. suša v predhodni sezoni, fitoplazme razmnožijo v koreninah sicer odpornih češenj. Odziv rastline, ki vključuje močno produkcijo fenolnih snovi, omeji okužbo in hkrati prizadene prevodni sistem dreves.

**Preglednica 1.** Rezultati laboratorijskih testiranj sadnega drevja iz različnih območij Slovenije na fitoplazme metličavosti jablan (AP), propadanja hrušk (PD) in leptonekroze koščičarjev (ESFY) v letih 2000 do 2004. Vzorčeno je bilo drevje z bolj ali manj izrazitimi znamenji fitoplazemskih obolenj in z ugnezdjeno verižno reakcijo s polimerazo (nested PCR) testirano na fitoplazme sadnega drevja. Z analizo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) je bil praviloma potrjen tudi tip fitoplazme.

**Table 1.** Results of laboratory analyses of fruit trees in Slovenia on apple proliferation (AP), pear decline (PD) and European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasmas in the period from 2000 to 2004. Samples from trees with more or less typical symptoms were tested with nested PCR for the presence of fruit tree phytoplasmas (apple proliferation group). Phytoplasma type was in most cases identified with restriction fragment length polymorphism (RFLP).

Območje*	AP	PD	ESFY**
	(število vseh vzorcev / število pozitivnih vzorcev)		
Nova Gorica	1 / 0	25 / 17	146 / 102
Koper	/	/	35 / 16
Kranj	/	/	/
Ljubljana	5 / 4	13 / 2	2 / 1
Novo mesto	8 / 0	1 / 0	3 / 1
Celje	124 / 23	17 / 4	14 / 4
Maribor	57 / 3	3 / 3	7 / 3
Murska Sobota	3 / 0	7 / 4	2 / 2
<b>Slovenija skupaj</b>	<b>198 / 40</b>	<b>66 / 30</b>	<b>199 / 129</b>

\* po enotah Inšpektorata RS za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano

\*\* testirane slive, mirabolane, breskve, marelice, češnje, črni trn in lovorikovec

#### 4. SKLEPI

- Vse tri fitoplazme sadnega drevja so v Sloveniji dokaj razširjene.
- Za uspešen nadzor fitoplazem sadnega drevja je bistveno odkrivanje latentnih okužb.
- Na območjih z močnim pritiskom ESFY je priporočljivo uvajanje tolerantnih sort.
- Propadanje češenj na Primorskem bi lahko bilo povezano s fitoplazmami v koreninah.

#### 5. ZAHVALA

Zahvaljujemo se inšpektorjem Fitosanitarnе inšpekcije Inšpektorata RS za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano ter vsem ostalim, ki so sodelovali pri vzorčenju. Raziskave so potekale v okviru projektov CRP (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP) in Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport Republike Slovenije), PHARE (European Community External Aid), bilateralnega projekta med Slovenijo in Italijo ter strokovnih nalog MKGP.

#### 6. LITERATURA

- Ahrens, U., Seemüller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Brzin, J., Petrovič, N., Seljak, G., Osler, R., Ermacora, P., Loi, N., Carraro, L., Ferrini, F., Reffati E., Ravnkar, M. 2001. Prvi rezultati laboratorijskih analiz zastopanosti fitoplazem na sadnem drevjuv Sloveniji. V: Dobrovoljc, D. (ur.), Urek, G. (ur.), Maček, J. (ur.). Zbornik predavanj in referatov 5. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Čatež ob Savi 6.-8. marec 2001. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2001, str. 217-221.

- Brzin, J., Seljak, G., Ermacora, P., Osler, R., Ravnikar, M., Petrovič, N., 2003a. Določanje fitoplazme leptonekroze koščičarjev v Sloveniji V: Maček, J. (ur.). Zbornik predavanj in referatov 6. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Zreče, 4.-6. marec 2003. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije 2003, str. 254-257.
- Brzin, J., Ermacora, P., Osler, R., Loi, N., Ravnikar, M., Petrovič, N. 2003b. Detection of apple proliferation phytoplasma by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees. *Journal of Plant Disease and Protection*, 110, 5: 476-483.
- Brzin, J. 2004. Določanje fitoplazem in njihov vpliv na nekatere fiziološke procese v koruzi (*Zea mays* L.): doktorska disertacija. Ljubljana: [J. Brzin], 2004.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., Osler, R. 1998. High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. *European Journal of Plant Pathology* 104: 141-145.
- Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P. Loi N. 2002. Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. *Plant Pathology* 51: 4 Page 513-518.
- Lešnik, M., Lešnik, Mo., Ravnikar, M., Brzin, J., Mehle, N., Tojnko, S., Petrovič, N. 2005. Apple proliferation detection and symptom development in apple nursery stock produced from propagation wood collected from infected trees. V pripravi za objavo.
- Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E. 1995. Detection of apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
- Osler, R., Petrovič, N., Ermacora, P., Seljak, G., Brzin, J., Loi, N., Carraro, L., Ferrini, F., Reffati E. 2001. Strategije nadzora nad metličavostjo jablan, resno boleznijo, ki se pojavlja tako v Italiji kot tudi v Sloveniji. V: Dobrovoljc, D. (ur.), Urek, G. (ur.), Maček, J. (ur.). Zbornik predavanj in referatov 5. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Čatež ob Savi 6.-8. marec 2001. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2001, str. 238-243.
- Seemüller, E., Kison, H., Lorenz, K. -H., Schneider, B., Marcone, C., Smart, C.D. and Kirkpatrick B. 1996. Detection and identification of fruit tree phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Pages 56-66 in: Abstract Book of Workshop of the nucleic acid-based technology; Advances in the detection of plant pathogens by polymerase chain reaction (COST 823). Manceau, C., Spak, J., eds. Češke Budejovice, Czech Republic.
- Seemüller, E., Garnier, M., Schneider, B. 2002. Mycoplasmas of Plants and Insects. -V: Razin, S. Herrmann, R. (ur.). *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2002: 91-115.
- Seljak, G., Petrovič, N. 2000. Diffusione e stato della ricerca delle malattie da fitoplasmii in Slovenia. *Petria* 10: 133-139.