

## PREGLED REZULTATOV DOLOČANJA FITOPLAZEM NA KOŠČIČARJIH V LETIH 2000-2006 V SLOVENIJI

Nataša MEHLE<sup>1</sup>, Jernej BRZIN<sup>2</sup>, Jana BOBEN<sup>3</sup>, Matjaž HREN<sup>4</sup>, Jana FRANK<sup>5</sup>, Nataša PETROVIČ<sup>6</sup>, Kristina GRUDEN<sup>7</sup>, Tanja DREO<sup>8</sup>, Ivan ŽEŽLINA<sup>9</sup>, Gabrijel SELJAK<sup>10</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>11</sup>

<sup>1,2,3,4,5,6,7,8,11</sup> Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana  
<sup>9,10</sup> Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica

### IZVLEČEK

Fitoplazme, najmanjši znani celični organizmi, živijo v sitastih ceveh floema in povzročajo številne gospodarsko pomembne bolezni rastlin. Prenašajo se z žuželčjimi vektorji in vegetativnim razmnoževanjem. Sadno drevje iz skupine koščičarjev v Evropi resno ogroža fitoplazma leptonekroza koščičarjev (European stone fruit yellows, ESFY, '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', ki spada v skupino 16SrX). V letih od 2000 do 2006 je bilo skupno testiranih več kot 400 vzorcev koščičarjev iz različnih predelov Slovenije, večina vzorcev je bila nabranih v okviru programa posebnega nadzora ESFY, nekateri brez in nekateri z bolezenskimi znamenji. Testirali smo tudi češnje (*Prunus avium*) iz jugozahodne Slovenije z znamenji venenja in umiranja dreves. Pri vzorcih kjer smo pričakovali nizko koncentracijo fitoplazem in zlasti v primeru koreninskih vzorcev, smo preizkusili več načinov izolacije fitoplazemske DNA. Fitoplazme v vzorcih smo določali z molekularno biološko metodo vgnezdene verižne reakcije s polimerazo (nested PCR) in metodo, ki temelji na polimorfizmu dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) ter z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja DNA. Fitoplazmo smo potrdili v vzorcih odvzetih od breskev, marelic, sliv, češenj, mirabolane in češpljeve boljše.

**Ključne besede:** detekcija, fitoplazme, koščičarji, leptonekroza koščičarjev, metličavost jablan

### ABSTRACT

#### THE RESULTS OF PHYTOPLASMS TESTING IN STONE FRUITS (*Prunus* spp.) IN SLOVENIA ( 2000-2006)

Phytoplasms are small wall-less prokaryotes that live exclusively in sieve tubes of their host plants, and cause many important vector-borne and graft-transmissible plant diseases. In Europe, stone fruits are seriously affected by the European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasma ('*Candidatus Phytoplasma prunorum*'), belonging to the group 16SrX. In years 2000-2006 more than 400 stone fruits sampled in different regions of Slovenia were tested for ESFY. The majority of the sampling was done in frame of a

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

<sup>2</sup> dr., prav tam

<sup>3</sup> dr., prav tam

<sup>4</sup> univ. dipl. biol., prav tam

<sup>5</sup> univ. dipl. zooteh., prav tam

<sup>6</sup> dr., prav tam

<sup>7</sup> doc. dr., prav tam

<sup>8</sup> univ. dipl. mikrobiol., prav tam

<sup>9</sup> dr., Pri hrastu 18, SI-5000 Nova Gorica

<sup>10</sup> mag., prav tam

<sup>11</sup> prof. dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

survey of the presence of ESFY in the country, and samples were taken from the trees with and without expressed symptoms of ESFY. In addition, wilting and dying cherries (*Prunus avium*) from Western Slovenia were sampled. Different extraction methods from the roots and asymptomatic shoots were compared. All samples were tested using methods of nested PCR, RFLP, and sequencing. The phytoplasmas were confirmed in *Prunus persica*, *P. armeniaca*, *P. salicina*, *P. domestica*, *P. avium*, *P. cerasifera* and *Cacopsylla pruni*.

**Key words:** AP, detection, ESFY, phytoplasma, stone fruits

## 1 UVOD

Fitoplazme, najmanjši znani celični organizmi, so bakterije brez celične stene (Seemüller *et al.*, 2002). Sodijo v razred Mollicutes. Imajo majhen genom (600 do 1000 kbp). So intracelularni paraziti, ki živijo izključno v sitastih cevah floema rastlinskih gostiteljev in jih ni mogoče gojiti na gojiščih. Povzročajo več sto gospodarsko pomembnih boleznih rastlin, ki se prenašajo z žuželčjimi vektorji in vegetativnim razmnoževanjem (Seemüller *et al.*, 2002). Okužene rastline imajo pogosto znamenja kopičenja sladkorjev v listih, nekroze floema in nekaterega znamenja, ki kažejo na porušeno ravnovesje rastlinskih hormonov. Fitoplazme so v lesnatih rastlinah zastopane v nizkih koncentracijah. Njihova razporeditev po rastlini je neenakomerna.

Sadno drevje iz družine rožnic v Evropi resno ogrožajo fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (16SrX), to so fitoplazma metličavosti jablan (Apple proliferation, AP, '*Candidatus* Phytoplasma mali'), leptonekroze koščičarjev (European stone fruit yellows, ESFY, '*Candidatus* Phytoplasma prunorum') in propadanja hrušk (Pear decline, PD, '*Candidatus* Phytoplasma pyri') (Seemüller s sod., 2004), ki so uvrščene na seznam I.A.II. škodljivih organizmov v Evropski skupnosti.

Fitoplazma ESFY povzroča pri koščičastih sadnih vrstah iz rodu *Prunus* nevarno bolezen klorotičnega zvijanja listov koščičarjev. V naravi se bolezen prenaša z vegetativnim razmnoževanjem in s splošno razširjenim vektorjem češpljevo bolšico (*Cacopsylla pruni*), zaradi česar se bolezen naglo širi (Carraro *et al.*, 1998). Dokazan je tudi prenos fitoplazme ESFY z breskovim škržatom (*Empoasca decedens*) (Pastore *et al.*, 2004). Sadne vrste iz rodu *Prunus* kažejo različno občutljivost na okužbo s fitoplazmo ESFY, drugače pa se izražajo tudi bolezenska znamenja. Marelica (*Prunus armeniaca*), kitajsko-japonska sliva (*Prunus salicina*) in breskev (*Prunus persica*) so na okužbo z ESFY zelo občutljive in kažejo izrazita bolezenska znamenja (Carraro in Osler, 2003). Ob nizkih zimskih temperaturah pride do poškodb srednje plasti lubja (kambij) kar povzroči sušenje vej v pozni pomladi. Spomladi je značilno bolezensko znamenje razvoj listov še pred cvetenjem. Med poletjem se pojavi zvijanje listov ob glavni listni žili navzgor. Listi so krhki zaradi kopičenja fotoasimilatov. Pojavlja se tudi neenakomerna kloroza listov. Na koncu kratkih poganjkov lahko odganjajo stranski brsti kot tudi brsti na starem lesu, kar povzroči metlast videz poganjkov. Različne vrste sliv *Prunus domestica* (evropska sliva), *Prunus spinosa* (črni trn) in *Prunus cerasifera* (mirabolana) so prav tako zelo dovzetne za okužbo, vendar ne kažejo bolezenskih znamenj, kar pomeni, da so tolerantne (Carraro *et al.*, 2004) in predstavljajo prikrit vir za širjenje okužb. Pri češnji (*Prunus avium*) je ugotovljena visoka stopnja odpornosti na okužbo z ESFY (Jarausch *et al.*, 1999).

V letih 2000 do 2006 smo analizirali več kot 400 vzorcev koščičarjev iz različnih predelov Slovenije ter nekatere potencialne žuželčje prenašalce. Testirali smo tudi češnje iz jugozahodne Slovenije z znamenji venenja in propadanja dreves. V prispevku bomo predstavili rezultate testiranja.

## 2 MATERIALI IN METODE

V letih od 2000 do 2006 je bilo vzorčenih in testiranih 443 vzorcev koščičarjev iz različnih predelov Slovenije in 10 vzorcev prenašalcev fitoplazme leptonekroze koščičarjev (Preglednica 1). Večina vzorcev je bila nabrana v okviru programa posebnega nadzora leptonekroze koščičarjev, ki se v Sloveniji izvaja že od leta 2003 dalje, vodi pa ga Fitosanitarna uprava RS. Vzorčena in testirana so bila tako drevesa s simptomi, kot tudi drevesa brez njih.

Za molekularno-biološke analize smo izolirali celokupno DNA iz listnih žil ali iz prevodnega tkiva lubja (simptomatični vzorci) po predhodnem koncentriranju fitoplazem z diferencialnim centrifugiranjem (Ahrens in Seemüller, 1992) in iz prevodnega tkiva korenin (latentni vzorci) po prirejenem postopku (Brzin *et al.*, 2003). Pri vzorcih kjer smo pričakovali nizko koncentracijo fitoplazem, zlasti pa v primeru koreninskih vzorcev, smo preizkusili več načinov izolacije fitoplazemske DNA. Zaradi neenakomerne razporeditve fitoplazem v drevesu so bili vzorci nabrani na vsaj 3 različnih mestih krošnje oziroma korenin. DNA fitoplazme sadnega drevja smo testirali z vgnezdno verižno reakcijo s polimerazo (nested PCR). V prvi PCR reakciji smo uporabili nekoliko modificiran univerzalni par oligonukleotidnih začetnikov P1/P7, ki pomnožuje DNA vseh tipov fitoplazem (Seemüller *et al.*, 1998). Produkte 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 *et al.*, 1995), ter v primeru negativnega rezultata še z univerzalnimi oligonukleotidnimi začetniki U3/U5 (Lorenz *et al.*, 1995). Identiteto fitoplazme ESFY smo preverili z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP; Seemüller *et al.*, 1998) po obdelavi PCR produkta z encimoma *BsaA I* (New England Biolabs, VB) in *Ssp I* (Promega, USA). Po potrebi smo določali tudi nukleotidno zaporedja DNA (sekveniranje PCR ali nested PCR produkta). V razvoju je tudi PCR v realnem času, vendar so potrebne nadaljnje validacije za potrditev specifičnosti za fitoplazme univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov in sonde.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Od 453 testiranih vzorcev (drevesa s simptomi in drevesa brez bolezenskih znamenj), v obdobju od 2000 do 2006, je bilo pozitivnih 191 (preglednica 1). Najbolj so okužene breskve in marelice, kjer je bila tudi že ugotovljena gospodarska škoda zaradi odmiranja dreves. Domača češplja je na ESFY bolj ali manj tolerantna, kar pomeni, da ne kaže očitnih bolezenskih znamenj, a je kljub temu okužena in zato prikrit vir za širjenje okužb. Fitoplazma leptonekroza koščičarjev je bila potrjena tudi v mirabolani in v vektorju *Caccopsylla pruni*. Nepričakovano pa smo v 4 vzorcih češenj, v enem vzorcu slive (*P. domestica*) in v dveh vzorcih marelice dokazali zastopanost fitoplazme metličavosti jablan (AP) (Mehle *et al.*, 2007).

Leta 2004 smo na češnjah iz jugozahodne Slovenije opazili venenje in kasneje umiranje dreves. Nekroze so bile vidne na cvetnih poganjkih ter na prečnem prerezu veje in debla. Testirali smo 40 vzorcev češenj. Vsi testirani vzorci listnih žil ali floema lubja so bili negativni na fitoplazme, medtem ko smo v štirih vzorcih korenin, vzorčenih iz treh dreves z bolezenskimi znamenji in iz enega drevesa brez bolezenskih znamenj, dokazali prisotnost fitoplazem. Z metodo, ki temelji na določanju polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov in z metodo določanja nukleotidnega zaporedja DNA je bil v vseh štirih vzorcih češenj potrjen tip fitoplazme metličavosti jablan (Mehle *et al.*, 2007). Kljub temu, da v vzorcih češenj, pozitivnih na fitoplazme metličavosti jablan, nismo dokazali prisotnosti drugih patogenih bakterij, še ni razjasnjeno ali je fitoplazma metličavosti jablan dejansko tudi povzročiteljica prej opisanih bolezenskih znamenj na češnjah (Mehle *et al.*, 2007).

Preglednica 1: Rezultati testiranja koščičarjev z bolj ali manj značilnimi bolezenskimi znamenji leptonekroze koščičarjev in brez bolezenskih znamenj na zastopanost fitolazme ESFY v letih od 2000 do 2006

Table 1: Results of testing of symptomatic and asymptomatic stone fruits for ESFY in the period 2000-2006

	Št. testiranih vzorcev (no. of samples)	Št.vzorcev s simptomi (no. of symptoms)	Število pozitivnih vzorcev (no. of positive samples)
Breskev in nektarina ( <i>P. persica</i> )	238	160	104
Marelica ( <i>P. armeniaca</i> )	41	26	29 (2 AP*)
Sliva ( <i>P. salicina</i> , <i>P. domestica</i> )	118	35	45 (1 AP*)
Češnja ( <i>P. avium</i> )	40	30	4 AP*
Višnja ( <i>P. cerasus</i> )	2	0	0
Mirabolana ( <i>P. cerasifera</i> )	3	2	3
Črni trn ( <i>P. spinosa</i> )	1	1	0
Češpljeva bolšica ( <i>Caccopsylla pruni</i> )	8		6
Breskov škržat ( <i>Empoasca decedens</i> )	2		0
<b>SKUPAJ</b>	<b>453</b>	<b>254</b>	<b>191 (7 AP*)</b>

\* V vzorcih koščičarjev smo z metodo določanja polimorfizma dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP) in z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja DNA določili tip fitoplazme metličavosti jablan

\* Apple proliferation was determined by RFLP and sequencing

Fitoplazmo metličavosti jablan smo na koščičarjih dokazali tudi leta 2005 in sicer na enem vzorcu slive, kjer je bilo opaženo pozno cvetenje in na dveh vzorcih marelice z nekrozami na deblu oziroma z venenjem listov (Mehle *et al.*, 2007). Po podatkih iz literature je bila fitoplazma metličavosti jablan najdena na koščičarjih že v preteklosti in sicer na *Prunus salicina* (Japanese plum) (Lee *et al.*, 1995) in kot neobjavljen rezultat tudi na češnjah (Seemüller, neobjavljeno), vendar je naš primer prvi opisan primer najdbe fitoplazme metličavosti jablan na češnjah, marelicah in slivi (*P. domestica*).

Pri vzorcih kjer smo pričakovali nizko koncentracijo fitoplazem in zlasti v primeru koreninskih vzorcev, smo preizkusili več načinov izolacije fitoplazemske DNA. Ugotovili smo, da je za vzorce korenin nujno, da DNA izoliramo po modificirani CTAB izolaciji s korakom razsoljevanja, pred tem pa vzorce korenin stremo v tekočem dušiku ali v modificiranem PGB pufu.

#### 4 SKLEPI

- Sadno drevje iz skupine koščičarjev v Sloveniji resno ogroža fitoplazma leptonekroza koščičarjev. Najbolj okužene so breskve in marelice. Domača češplja je na okužbo s fitoplazmo leptonekroze koščičarjev bolj ali manj tolerantna. Okužba s to fitoplazmo je bila dokazana tudi v mirabolani.
- Fitoplazmo leptonekroze koščičarjev smo dokazali v prenašalcu češpljevi bolšici.
- V vzorcih češenj, slive (*P. domestica*) in marelice smo dokazali tudi prisotnost fitoplazme metličavosti jablan.

#### 5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se vzorčevalcem iz Fitosanitarne inšpekcije Slovenije, Kmetijskega inštituta Slovenije in Kmetijskega zavoda Nova Gorica za nabrane vzorce. Raziskave so potekale v okviru Strokovne naloge Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije, Ciljnih raziskovalnih

programov (V4-0343, V4-0279-99) in Raziskovalnega programa Rastlinska fiziologija in biotehnologija.

## 6 LITERATURA

- Ahrens, U., Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.
- Brzin, J., Ermacora, P., Osler, R., Loi, N., Ravnikar, M., Petrovič, N. 2003. Detection of apple proliferation phytoplasma by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* (1970), vol. 110, no. 5: 476-483.
- Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P., Loi, N. 2004. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma to *Prunus* species by using vector and graft transmission. *Acta Hort.* 657: 449-453.
- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P., Refatti, E. 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *J. Plant Pathol.* 80: 233-239.
- Carraro, L., Osler, R. 2003. European stone fruit yellows: a destructive disease in the Mediterranean basin. V: Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. (ur.). *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*. CIHEAM. Options Mediterraneennes Serie B n.45:113-117.
- Jarusch, W., Eyquard, J. P., Mazy, K., Lansac, M., Dosba, F. 1999. High level of resistance of sweet cherry (*Prunus avium* L.) towards European stone fruit yellows phytoplasmas. *Advances in Horticultural Science*, 13: 108-112.
- Lee, I.-M., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen, D. E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*, 85: 728-735.
- Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E. 1995. Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non ribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.
- Mehle, N., Brzin, J., Boben, J., Hren, M., Frank, J., Petrovič, N., Gruden, K., Dreo, T., Žežlina, I., Seljak, G., Ravnikar, M. 2007. First report of "Candidatus phytoplasma mali" in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. *Plant pathology*, Doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01597.x (v tisku).
- Pastore, M., Raffone, E., Santonastaso, M., Priore, R., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., Simeone, A.M. 2004. Phytoplasma detection in *Empoasca decedens* and *Empoasca* spp. and their possible role as vectors of European stone fruit yellows (16SrX-B) phytoplasma. *Acta Hort.* 657: 507-511.
- Seemüller, E., Garnier, M. & Schneider, B. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In *Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas*, pp.91-116. Edited by S. Razin & R. Herrmann. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Seemüller, E., Kison, H., Lorenz, K.H., Schneider, B., Marcone, C., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C. 1998. Detection and identification of fruit tree phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. In: Manceau C, Spak J, eds. *New technologies to improve phytodiagnosis: Advances in the detection of plant pathogens by polymerase chain reaction*. Luxembourg: Office of the Official Publications of the European Community, 56-66.
- Seemüller, E., Schneider, B. 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 54 (Part 4): 1217-1226.