

OKUŽENOST JABLAN IN HRUŠK Z VIRUSI V SLOVENIJI

Mojca VIRŠČEK MARN¹, Irena MAVRIČ PLEŠKO²

Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Najbolj razširjeni virusi jablan in hrušk so virus mozaika jablane (*Apple mosaic virus*, ApMV), virus klorotične pegavosti listov jablane (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), virus razbrazdanja debla jablane (*Apple stem pitting virus*, ASPV) in virus jamičavosti debla jablane (*Apple stem grooving virus*, ASGV). Okužbe s temi virusi pogosto ne povzročajo vidnih znamenj okužbe, predvsem v mešanih okužbah pa lahko povzročajo znatne izgube pridelka. V letih 2014, 2015 in 2016 smo na prej omenjene viruse s serološkimi in molekularnimi metodami testirali 132 vzorcev jablan in hrušk različnih sort in starosti iz 15 lokacij po Sloveniji. Ker ti virusi nimajo znanih prenašalcev in se ne prenašajo s cvetnim prahom, so vir okužbe predvsem okužene sadike. Ob vzorčenju smo zato, poleg podatkov o starosti rastlin in sorti, zbrali tudi podatke o statusu sadik. Testirana stara drevesa v travniških nasadih in vrtovih so bila vsa okužena z vsaj enim virusom. Večina je bila sočasno okužena s tremi virusi. Iz tega lahko sklepamo, da se okužbe z ApMV, ACLSV, ASGV in ASPV v Sloveniji pojavljajo že dlje. Tudi v intenzivnih nasadih smo potrdili zelo visoko stopnjo okužbe pri sortah, ki so bile vzgojene iz cepičev zbranih v rodni nasadih in ne iz matičnih dreves. Pri obeh vzorčenih drevesih sorte Granny Smith, ki sta bili vzgojeni iz nepreverjenega materiala iz rodni nasadov, smo tako našli mešano okužbo s kar štirimi virusi. Nasprotno smo okužbo s po enim virusom potrdili le pri dveh od skupno 15 vzorčenih sort iz certifikacijske sheme. Drevesa CAC (Conformitas Agraria Communitatis) izvora so bila bistveno bolj okužena. Naši rezultati kažejo, da zagotavlja uporaba certificiranega razmnoževalnega materiala skoraj popolno odsotnost virusov, medtem ko je lahko CAC material močno okužen.

Ključne besede: detekcija, hruške, jablane, razširjenost virusov, virusi

ABSTRACT

VIRAL INFECTIONS OF APPLES AND PEARS IN SLOVENIA

Apple mosaic virus (ApMV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem pitting virus*, (ASPV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) are the most widespread viruses of apple and pear. Infections with these viruses are frequently latent, but can cause severe yield losses, especially in mixed infections. 132 samples from apples and pears of different varieties and age from 15 locations in Slovenia were tested for the

¹ dr. agr. znan., znanstvena svetnica, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: mojca.marn@kis.si

² dr. mikrobiol., višja znanstvena sodelavka, prav tam

presence of ApMV, ACLSV, ASGV and ASPV in the years 2014, 2015 and 2016 using serological and molecular methods. Since these viruses are not known to be transmitted by vectors or pollen, the main source of infection is the planting material. Data about the type of planting material was therefore collected in addition to the age and variety of sampled trees. Old trees in extensive orchards and gardens were all infected, most of them with a mixture of 3 viruses. These results show that infection with ApMV, ACLSV, ASGV and ASPV have been present in Slovenia for at least 50 years. A very high infection rate with up to 4 viruses was observed in trees originating from graftwood collected in production orchards and not from mother trees. On the contrary only two out of 15 varieties sampled from certified material were infected, each only with one virus. CAC (Conformitas Agraria Communitatis) material showed much higher infection rate. Our results show that the use of certified propagation material mostly ensures the absence of viruses, whereas CAC material can be heavily infected.

Key words: apples, detection, pears, viral presence, viruses

1 UVOD

Okužbe jablan in hrušk z ApMV (virus mozaika jablane, *Apple mosaic virus*, rod *Illarvirus*), ACLSV (virus klorotične pegavosti listov jablane, *Apple chlorotic leaf spot virus*, rod *Trichovirus*), ASPV (virus razbrazdanja debela jablane, *Apple stem pitting virus*, rod *Foveavirus*) in ASGV (virus jamičavosti debela jablane, *Apple stem grooving virus*, rod *Capillovirus*) so pogosto latentne (Paunović in Jevremović, 2008), kar pomeni, da ne kažejo za virusno okužbo značilnih znamenj. Kljub temu lahko povzročajo celo do 60 % izgube pridelka (Arntjen in Jelkmann, 2010). Okužb z virusi ne moremo zdraviti, na voljo imamo le preventivne ukrepe. Pridelava in uporaba brezvirusnega sadilnega materiala je najpomembnejši ukrep borbe proti virusnim obolenjem (Németh, 1986), še zlasti, če virusi nimajo prenašalcev in se ne prenašajo s cvetnim prahom. ApMV, ACLSV, ASGV in ASPV se v naravi prenašajo z vegetativnim razmnoževanjem in morda tudi s stikom korenin, zato je sajenje neokuženih sadik dober način omejevanja škode zaradi okužb z virusi, ki okužujejo pečkato sadje.

V prispevku predstavljamo triletno rezultate vzorčenja in testiranja jablan in hrušk iz vrtov, ekstenzivnih in intenzivnih nasadov različnih starosti, sort in vrste sadik.

2 MATERIAL IN METODE

V letih 2014-2016 smo vzorčili jablane in hruške. Vzorčili smo cvetove, plodiče in mlade liste v aprilu in maju. Ob vzorčenju smo zbirali tudi podatke o starosti dreves, sorti in vrsti sadilnega materiala (certificiran, CAC, nepreverjen). Vse vzorce smo testirali s serološko metodo (ELISA) s protitelesi za ApMV, ACLSV, AGGV in ASPV (proizvajalca Bioreba AG (Reinach, Švica). Za preverjanje oz. potrditev rezultatov serološkega testiranja smo pri številnih vzorcih uporabili tudi metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR). V ta namen smo s kompletom MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po priporočilih

proizvajalca izolirali RNA iz vzorcev ali ekstraktov za ELISA testiranje. Za izolacijo smo uporabili napravo MagMAX Express (Ambion, Thermo Fisher Scientific, ZDA). Alternativno smo uporabili tudi imunsko vezavo (IC). Uporabljeni začetni oligonukleotidi so predstavljeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi in metode uporabljeni za detekcijo ApMV, ACLSV, ASGV in ASPV.

Vir	Metoda	Začetna oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje	Vir
ApMV	IC in dvostopenjski RT-PCR	VP79	CGTCGAGGAAGTTTAGGTTG	Saade et al., 2002
		VP77	GCHTCCYWTWKGGGGCATC	
ACLSV	IC ali izolacija in enostopenjski RT-PCR	ACLSV sense	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	Menzel et al., 2002
		ACLSV antisense	AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	
ASGV	IC ali izolacija in enostopenjski RT-PCR	ASGV sense	GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA	Menzel et al., 2002
		ASGV antisense	AACCCCTTTTGTCTTCAGTACGAA	
ASGV	IC ali izolacija in enostopenjski RT-PCR	ASGV MVM fw	AAGAGAGGATTTAGGTCCTT	nov (Viršček Marn)
		ASGV reverse	ACACTAACCCGGAATGC	Gadiou et al., 2010
ASPV	IC ali izolacija in enostopenjski RT-PCR	ASPV247-F mod	CARTAYTYGCCTTYTAYGCRAAGC	modificirana po Yao et al., 2014
		ASPV247-R mod	CCATDGADCGMATGCGRTACATYTG	
ASPV	IC ali izolacija in enostopenjski RT-PCR	APV forward mod	CWAAYCCWTTTGAACWGG	modificirana po Gadiou et al., 2010
		ASPV MVM re	CAGCATGAGGTTCCAGACAT	nov (Viršček Marn)

306

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Skupno je bila vsaj z enim virusom okužena polovica vzorcev jablan in tretjina vzorcev hrušk. Najbolj so bila okužena stara drevesa v travniških nasadih in vrtovih (preglednica 2). Vsa so bila okužena z vsaj enim virusom, večina pa je bila sočasno

okužena s tremi virusi. Podobno so bile okužene kar 4 od 5 sort iz intenzivnih nasadov, zasajenih s sadikami cepljenimi s cepiči iz rodnih nasadov in ne iz matičnih dreves. Večinoma so bila drevesa okužena z več virusi hkrati, pri obeh vzorčenih drevesih sorte 'Granny Smith' pa smo našli mešano okužbo z vsemi štirimi virusi. Mešane okužbe so pri jablanah in hruškah pogoste (Fajardo in Nickel, 2014) in navadno povzročajo še večje škode od posamičnih okužb. Tudi na Češkem so Grimová in sod. (2016) pri testiranju starih sort v drevesnici in jablan iz starih nasadov v okolici Prage potrdili zelo velik delež okužb (80 %). 69 % vzorcev je bilo okuženih z več kot enim virusom hkrati. Tako Češki kot naši rezultati potrjujejo, da se okužbe jablan z ApMV, ACLSV, ASGV in ASPV na Češkem in v Sloveniji pojavljajo že dlje, saj je bila večina testiranih starih dreves starejša od 50 let.

Največ vzorcev in sort je bilo okuženih z ACLSV. Največji delež okužb s tem virusom smo potrdili v starih drevesih iz ekstenzivnih nasadov in vrtov, kjer je bilo z ACLSV okuženih kar 7 od skupno 8 vzorcev. Na Češkem so v 57 starih sortah iz drevesnice na Moravskem prav tako potrdili zelo visok delež okužb z ACLSV, kar 91,2 %, pri vzorcih starih sort iz drevesnic in vzorcih iz starih nasadov v okolici Prage pa je bilo z ACLSV okuženih 70 % vzorcev (Grimová *et al.*, 2016).

Najmanj vzorcev je bilo okuženih z ApMV. Okužbo s tem virusom smo potrdili le pri treh starih jablanovih drevesih iz ekstenzivnih nasadov, dveh drevesih ene jablanove sorte vzgojenih iz nepreverjenega materiala ter pri edinem vzorčenem drevesu hruševe sorte 'Viljamovka'. Podobno so tudi Čehi v starih drevesih in starih sortah iz drevesnic ugotovili manj okužb z ApMV (pod 20 %) v primerjavi z ACLSV, ASGV in ASPV (Grimová *et al.*, 2016). Znamenja okužbe z ApMV so pri jablani navadno omejena le na del krošnje oz. nekaj vej in so lahko opazna le v določenih letih. Vidna so na listih kot rumene ali kremaste lise, mozaik ali razbarvanja ob žilah, lahko pa se razbarva del lista ali kar cel list (Desvignes, 1999). Ne glede na omejen obseg znamenj okužbe z ApMV le-ta pri preverjanju ali testiranju matičnih dreves večinoma najdemo in okužena drevesa izločimo, zato okužb z ApMV pri jablanah vzgojenih iz certificiranih in CAC sadik nismo potrdili. Okužbe hrušk z ApMV so latentne (Petrzik, 2005), zato okužba Viljamovke CAC izvora ne preseneča.

Najmanj okužb smo potrdili pri drevesih, ki so izhajala iz certifikacijske sheme, kar pomeni, da je izvor sadik zelo pomemben. Drevesa CAC (Conformitas Agraria Communitatis) izvora so bila bistveno bolj okužena. Naši rezultati kažejo, da zagotavlja uporaba certificiranega razmnoževalnega materiala skoraj popolno odsotnost virusov, medtem ko je lahko CAC material močno okužen.

Preglednica 2: Pregled okužb, ugotovljenih v vzorcih različnih sort, starosti in vrste materiala v letih 2014-2016.

Vrsta vzorčenega materiala	Št. vzorčenih sort ¹ (dreves) / št. okuženih sort ¹ (dreves)	Število okuženi sort ¹ / dreves z				Število hkrati okuženih sort ¹ / dreves z			
		ApMV	ACLSV	ASGV	ASPV	enim	dvema	tremi	štirimi virusi

JABLANE									
Intenzivni nasadi do 10 let, standardne sorte, certificiran material	10 (20) / 1 (2)	0/0	1/2	0/0	0/0	1/2	0/0	0/0	0/0
Intenzivni nasadi do 10 let, odporne sorte, certificiran material	3 (6) / 1 (2)	0/0	1/2	0/0	0/0	1/2	0/0	0/0	0/0
Intenzivni nasadi do 10 let, standardne sorte, CAC	16 (37) / 6 (14)	0/0	4/10	4/8	3/5	3/6	3/7	1/1	0/0
Intenzivni nasadi nad 10 let, standardne sorte, CAC	5 (11) / 4 (8)	0/0	4/8	0/0	4/7	1/1	4/7	0/0	0/0
Intenzivni nasadi odporne sorte, CAC ²	14 (29) / 8 (14)	0/0	8/14	3/5	7/12	0/0	7/11	2/3	0/0
Intenzivni nasadi, standardne sorte, nepreverjen material ³	6 (12) / 5 (10)	1/2	4/8	4/7	5/8	2/2	2/3	2/3	1/2
stara ekstenzivna drevesa	8 (8) / 8 (8)	3/3	7/7	4/4	7/7	1/1	1/1	6/6	0/0
HRUŠKE									
Intenzivni nasadi do 10 let, standardne sort certificiran material	2 (4) / 0 (0)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Intenzivni nasadi nad 10 let, CAC	3 (5) / 2 (3)	1/1	1/2	0/0	1/2	1/1	1/2	0/0	0/0

¹ sorta določene starosti, lokacije in izvora

² ena sorta in *M. floribunda* stari nad 10 let

³ 4 sorte do 10 let, ena okrog 40 let

Ponekod smo potrdili okužbe z ACLSV, ASGV in ASPV le pri delu vzorčenih dreves iste sorte, izvora in vrste materiala na isti lokaciji. Najverjetnejši vzrok okužbe le dela dreves iste sorte in izvora na določeni lokaciji je, da je bil okužen le del cepičev in/ali podlag, ki so bile uporabljene za vzgojo sadik. Vzrok je lahko tudi neenakomerna razporeditev virusov po drevesu, zaradi katere se lahko zgodi, da kljub čim bolj naključnemu vzorčenju v vzorcu ni virusa ali pa je koncentracije le-tega prenizka za uspešno detekcijo.

4 SKLEPI

Najpomembnejši zaključki triletnega testiranja jablan in hrušk na viruse so:

- stara drevesa jablan v travniških nasadih in vrtovih so močno okužena, torej se okužbe z ApMV, ACLSV, ASGV in ASPV v Sloveniji pojavljajo že dlje,
- prav tako so močno okužena tudi drevesa jablan, katerih cepiči izvirajo iz nepreverjenih rodnih dreves,
- okužbe se pojavljajo tudi v nasadih CAC materiala,
- okužbe certificiranega materiala so redke.

Naši rezultati kažejo, da zagotavlja uporaba certificiranega razmnoževalnega materiala skoraj popolno odsotnost virusov, medtem ko je lahko CAC material močno okužen, kar lahko vpliva na količino in kakovost pridelka, bujnost rasti in druge pomembne lastnosti dreves v pridelavi.

5 ZAHVALA

Delo je bilo opravljeno v okviru programa strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin za Kmetijski inštitut Slovenije za leta 2014, 2015 in 2016, ki ga je financiralo Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano ter v manjši meri tudi s sredstvi programske skupine Agrobiodiverziteta (P4-0072), ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS.

6 LITERATURA

- Arntjen, A., Jelkmann, W., 2010. Investigation of virus occurrence in different tissues throughout the year and sequence variability of *Apple stem pitting virus*. *Julius-Kühn-Archiv*, 427: 118-121.
- Desvignes, J.C. 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Paris, CTIFL: 3202 str.
- Fajardol, T.V.M., Nickel O. (2014) Simultaneous detection of four viruses affecting apple and pear by molecular hybridization using a polyprobe. *Ciência Rural* 44, 10:1711-1714.
- Gadiou, S., Kundu, J.K., Paunovic S., Garcia-Diez, P., Komorowska, B., Gospodaryk, A., Handa, A., Massart, S., Birisik, N., Takur, P.D., Polischuk, V. 2010. Genetic diversity of flexiviruses infecting pome fruit trees. *Journal of Plant Pathology*, 92, 3: 685-691.
- Grimová, L., Winkowska, L., Zíka, L., Ryšánek, P. 2016. Distribution of viruses in old commercial and abandoned orchards and wild apple trees. *Journal of Plant Pathology*, 98, 3: 549-554.
- Menzel, W., Jelkmann, W., Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99, 1-2: 81-92.
- Németh, M. 1986. *Virus, mycoplasma and rickettsia like diseases of fruit trees*. Budapest, Akademia Kiado:1-841 str.

- Paunović, S., Jevremović D. 2008. Comparative results of detection of pome fruit viruses by different methods. *Acta Horticulturae* 781: 147-154.
- Petrzik, K. 2005. Capsid protein sequence gene analysis of *Apple mosaic virus* infecting pears. *European Journal of Plant Pathology* 111, 4: 355-360.
- Saade, M., Aparicio, F., Sánchez-Navarro, J. A., Herranz, M. C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallás, V. 2000. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridisation and multiplex RT-PCR. *Phytophytology*, 90, 12: 1330-1336.
- Yao, B., Wang, G., Ma, X., Liu, W., Tang, H., Zhu, H., Hong, N . 2014. Simultaneous detection and differentiation of three viruses in pear plants by a multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 196: 113– 119.