

## PRVI REZULTATI LABORATORIJSKIH ANALIZ ZASTOPANOSTI FITOPLAZEM NA SADNEM DREVJU V SLOVENIJI

Jernej BRZIN<sup>1</sup>, Nataša PETROVIČ<sup>2</sup>, Gabrijel SELJAK<sup>3</sup>,  
Ruggero OSLER<sup>4</sup>, Paolo ERMACORA<sup>5</sup>, Nazia LOI<sup>6</sup>, Luigi CARRARO<sup>7</sup>,  
Francesca FERRINI<sup>8</sup>, Elvio REFFATTI<sup>9</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>10</sup>

<sup>1,2,10</sup> Nacionalni inštitut za biologijo,

Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

<sup>3</sup> Kmetijsko veterinarski zavod Nova Gorica

<sup>4,5,6,7,8,9</sup> Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante,  
Universita degli Studi di Udine

### IZVLEČEK

Metličavost jablan (*Apple proliferation*, AP), propadanje hrušk (*Pear decline*, PD) in leptonekroza koščičarjev (*European stone fruit yellows*, ESFY) so nevarna fitoplazemska obolenja sadnega drevja, ki v posameznih območjih Evrope že resno ogrožajo pridelavo sadja. V zadnjih letih na osnovi vizualnih pregledov sadovnjakov poročajo o povečani zastopanosti in širjenju teh obolenj v Sloveniji. Uvedli smo molekularno biološke in serološke metode za hitro in zanesljivo odkrivanje fitoplazem na sadnem drevju. V letu 2000 smo na izbranih lokacijah v Sloveniji z omenjenimi metodami analizirali 48 sadnih dreves ter nekatere potencialne žuželčje prenašalce. Rezultati laboratorijskih testiranj so potrdili sum na obstoj vseh treh fitoplazem sadnega drevja v Sloveniji.

**Ključne besede:** detekcija, ELISA, fitoplazme, PCR, RFLP, sadno drevje

### ABSTRACT

#### FIRST RESULTS ON LABORATORY ANALYSES OF PHYTOPLASMAS ON FRUIT TREES

In Europe, all rosaceous fruit trees are severely affected by diseases caused by phytoplasmas. Recently, progress of these diseases in Slovenia is reported based on visual assessments of symptoms. For the routine detection of fruit tree phytoplasmas new sensitive and specific molecular and serological methods were introduced. The pres-

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

<sup>2</sup> dr. biol. znan., SI-1000 Ljubljana, prav tam

<sup>3</sup> mag., dipl. ing. kmet., SI-5000 Nova Gorica, Primorska 18

<sup>4</sup> red. prof., Vialle delle Scienze 208, I-33100 Udine, Italy

<sup>5</sup> dr., raziskovalni doktorand, prav tam

<sup>6</sup> red. prof., prav tam

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

<sup>8</sup> dipl. ing. kmet., prav tam

<sup>9</sup> zasl. prof., prav tam

<sup>10</sup> prof. dr. biol. znan., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ence of *Apple proliferation* (AP), *Pear decline* (PD) and *European stone fruit yellows* (ESFY) phytoplasmas was tested in 48 fruit trees from different regions in Slovenia. The results confirmed the presence of all three fruit tree phytoplasma.

**Key words:** detection, ELISA, fruit tree, PCR, phytoplasma, RFLP

## 1. UVOD

Fitoplazme so majhne bakterije brez celične stene, ki živijo le v floemskih celicah rastlinskih gostiteljev. Povzročajo neozdravljiva obolenja rastlin, ki se prenašajo z žuželčnimi vektorji in cepljenjem. Metličavost jablan (*Apple proliferation*, AP), propadanje hrušk (*Pear decline*, PD) in leptonekroza koščičarjev (*European stone fruit yellows*, ESFY) so nevarna fitoplazemska obolenja sadnega drevja, ki v posameznih območjih Evrope že resno ogrožajo pridelavo sadja (Osler s sod., 1999). Fitoplazme AP, PD in ESFY so sorodne fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (*Apple proliferation group*) (Seemüller s sod., 1994). Vse tri so na evropski karantenski listi A2. V Sloveniji sta AP in PD na A2 in ESFY na A1 listi. V zadnjih letih na osnovi vizualnih pregledov sadovnjakov poročajo o povečani zastopanosti in širjenju teh obolenj v Sloveniji (Seljak in Petrovič, 2000). Zanesljiva potrditev bolezenskih povzročiteljev je možna le z laboratorijskimi analizami, ki so bile dosedaj opravljene v zelo omejenem obsegu v tujini. V zadnjih dveh letih smo zato na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo NIB, v Centru Planta, ob pomoči laboratorija Univerze Udine, Italija ter ob sodelovanju s Kmetijsko veterinarskim zavodom Nova Gorica, uvedli laboratorijske postopke za rutinsko odkrivanje fitoplazem na sadnem drevju. Z novimi občutljivimi in specifičnimi molekularno biološkimi in serološkimi metodami je možno hitro in zanesljivo odkrivanje vseh treh fitoplazem sadnega drevja. V letu 2000 smo z omenjenimi metodami analizirali 48 sadnih dreves ter nekatere potencialne žuželčje prenašalce na izbranih lokacijah v Sloveniji.

## 2. MATERIAL IN METODE

### 2. 1. Vzorčenje

Drevesa za analizo zastopanosti fitoplazem sadnega drevja smo izbrali na podlagi značilnih bolezenskih znamenj fitoplazemskih obolenj. Analizirali smo 27 jablan, 8 hrušk in 13 koščičarjev (nektarin, sliv in marelic) iz različnih predelov Slovenije (*preglednica 1*). Večino dreves smo analizirali večkrat, od maja do oktobra v letu 2000. Vzorcili smo liste iz različnih delov krošnje, pri jablanah tudi veje in korenine. Nabirali smo žuželčje vektorje ESFY (*Cacopsylla pruni*) in PD fitoplazme (*Cacopsylla pyri*) ter odrasle osebkke uporabili za analizo prisotnosti fitoplazem.

### 2. 2. Molekularne metode detekcije fitoplazem

#### 2. 2. 1. Polimerazna verižna reakcija (PCR)

Celokupno DNA iz 1,5 g rastlinskega tkiva (prevodno tkivo listov, vej ali korenin) smo ekstrahirali po postopku za obogatitev s fitoplazmami (Kirckpatrick, 1993). DNA iz žuželčjih vektorjev smo ekstrahirali po Doyle s sod. (1990) iz 10-20 osebkov. S PCR reakcijo smo določili zastopanost fitoplazem skupine metličavosti jablan z uporabo za to skupino specifičnih oligonukleotidnih začetnikov f01/r01 (Seemüller s sod., 1996). Vzorce, kjer nismo dobili pomnoženega PCR produkta smo naknadno analizirali z metodo "nested" PCR: pomnožene PCR produkte dobljene z univerzalnim parom

oligonukleotidnih začetnikov P1/P7 smo ponovno pomnožili z f01/r01 oligonukleotidnimi začetniki (Seemüller s sod., 1996). PCR produkte smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (1% agaroz, 100 V, 20 min).

### **2. 2. 2. Analiza polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP analiza)**

Posamezne fitoplazme znotraj skupine metličavosti jablan smo določili na osnovi RFLP analize. PCR produkte, dobljene z uporabo oligonukleotidnih začetnikov f01/r01, smo obdelali z restrikcijskima encimoma SspI in BseAI (Boehringer-Mannheim). Dobljeni restrikcijski profil, ki je značilen za posamezno fitoplazmo skupine metličavosti jablan (Seemüller s sod., 1996), smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (2% agaroz, 75 V, 90 min.).

### **2. 3. Serološke metode detekcije fitoplazem**

S serološkima metodama encimsko imunskega testa (ELISA) in imunofluorescence (IF) smo določali le zastopanost fitoplazme metličavosti jablan (AP) za katero so na voljo specifična monoklonska protitelesa.

#### **2. 3. 1. ELISA**

1 g floemskega tkiva jablan (listov, vej ali korenin) smo analizirali po postopku kot ga priporoča proizvajalec specifičnih protiteles za fitoplazmo AP (Bioreba AG, Reinach, Švica).

#### **2. 3. 2. IF**

Analizirali smo 1-2 cm dolge in 0,5-1 cm debele koščke vej in korenin jablan z monoklonskimi protitelesi specifičnimi za fitoplazmo AP (1F4/1E2, darilo N. Loi, Univerza Udine, Italija) po postopku opisanem v Loi s sod. (1998).

## **3. REZULTATI IN DISKUSIJA**

V zadnjih dveh letih smo uvedli rutinske laboratorijske analize zastopanosti fitoplazem v sadnem drevju in njihovih prenašalcih. Prvi rezultati laboratorijskih testiranj v letu 2000 so potrdili sum na obstoj vseh treh fitoplazem sadnega drevja v Sloveniji (preglednica 1), ki je izhajal iz vizualnih pregledov obolelih rastlin (Seljak in Petrovič, 2000).

Obstoj fitoplazme AP smo potrdili v 20 jablanah na območju Pohorja in v dveh na območju Ljubljane (preglednica 1). Potencialnih prenašalcev nismo analizirali. Fitoplazmo PD smo potrdili v 6 hruškah na območju Primorske medtem, ko je v prenašalcu *Cacopsylla pyri* (Carraro s sod., 1998b) nismo našli (preglednici 1 in 2). Fitoplazmo ESFY smo potrdili v 9 koščičarjih in v žuželčjem prenašalcu *Cacopsylla pruni* (Carraro s sod., 1998a) iz območja Primorske (preglednici 1 in 2).

**Preglednica 1:** Prikaz rezultatov testiranja na obstoj fitoplazem sadnega drevja z molekularnimi in serološkimi metodami v letu 2000. Testirana drevesa so bila izbrana na podlagi vizualne ocene bolezenskih znamenj v različnih predelih Slovenije (AP-metličavost jablan, PD-propadanje hrušk, ESFY-leptonekroza koščičarjev).

**Table 1:** Results of laboratory tests on fruit tree phytoplasmas in year 2000. Symptomatic trees were selected in different regions of Slovenia and tested with molecular and serological methods (AP-Apple Proliferation, PD-Pear Decline, ESFY-European stone fruit yellows).

VRSTA	SORTA	LOKACIJA	RASTIŠČE	STAROST DREVES	ŠT. POZITIVNIH/ŠT. TESTIRANIH	FITOPLAZMA
jablana	Zl. delišes	Zrkovci	drevesnica	1 leto	6/8	AP
jablana	Elstar	Bukovica	drevesnica	1 leto	1/1	AP
jablana	Idared	Poh. Dvor	nasad	12 let	5/5	AP
jablana	Zl. delišes	Poh. Dvor	nasad	12 let	3/3	AP
jablana	Melros	ePoh. Dvor	nasad	12 let	1/2	AP
jablana	Gloster	Poh. Dvor	nasad	12 let	2/2	AP
jablana	Elstar	Poh. Dvor	nasad	12 let	2/2	AP
jablana	ni podatka	Lj.-Vič	vt	20 let	1/1	AP
jablana	ni podatka	Dobrenje	vt	40 le	11/3	AP
hruška	različne sorte	Bilje	intr. nasad	5 let	5/7	PD
hruška	ni podatka	Komen	vt	7 let	1/1	PD
sliva	različne sorte	Bilje	intr. nasad	5 let	3/4	ESFY
marelica	ni podatka	Komen	vt	7 let	5/5	ESFY
nektarina	ni podatka	Potoče	nasad	6 let	1/4	ESFY

**Preglednica 2:** Prikaz rezultatov testiranja na zastopanost fitoplazem v žuželčjih prenašalcih PD (*Cacopsylla pyri*) in ESFY (*Cacopsylla pruni*) v letu 2000 (PD-propadanje hrušk, ESFY-leptonekroza koščičarjev).

**Table 2:** Results of laboratory tests on fruit tree phytoplasmas in insect vectors of PD (*Cacopsylla pyri*) and ESFY (*Cacopsylla pruni*) in year 2000 (PD-Pear Decline, ESFY-European stone fruit yellows).

VEKTOR	GOSTITELJ	LOKACIJA	VZORČENJE	FITOPLAZMA
<i>Cacopsylla pyri</i>	hruška	introdukcijski nasad Bilje	16.5.00	ni prisotna
<i>Cacopsylla pyri</i>	hruška	nasad v okolici N. Gorice	20.6.00	ni prisotna
<i>Cacopsylla pruni</i>	breskev	introdukcijski nasad Bilje	20.6.00	ESFY

Iz rezultatov laboratorijskih analiz omejenega števila analiziranih dreves lahko sklepamo o precejšnji zastopanosti fitoplazme AP v Sloveniji. Fitoplazmi PD in ESFY smo za zdaj potrdili le na območju Primorske. ESFY fitoplazmo smo prvič potrdili tudi v žuželčjem prenašalcu *Cacopsylla pruni* (Carraro s sod., 1998a), ki je v Sloveniji splošno razširjen (Seljak in Petrovič, 2000). Verjetnost širjenja ESFY je zato velika in je smiselna njena čimprejšnja uvrstitev na slovensko karantensko listo A2.

V prihodnje so potrebne sistematične raziskave zastopanosti fitoplazem sadnega drevja v Sloveniji, vključno z inventarizacijo znanih in potencialnih prenašalcev ter analizo njihove okuženosti. Le na osnovi realne ocene razširjenosti teh boleznin in njihovih prenašalcev je možno odločanje o ukrepih kot so kontrola prenašalcev, prenos drevesnic v neokužena področja ali celo opustitev določenih nasadov (Osler s sod., 2001).

#### 4. SKLEPI

Z novimi občutljivimi in specifičnimi molekularno biološkimi in serološkimi metodami smo potrdili sum na obstoj fitoplazem metličavosti jablan (AP), propadanja hrušk (PD) in leptonekroze koščičarjev (ESFY) v Sloveniji. Uvedene rutinske laboratorijske analize zastopanosti fitoplazem sadnega drevja so nujna podlaga za sistematičen fitosanitarni nadzor cepilnega in sadilnega materiala, ki je za zdaj edini način omejevanja širjenja teh karantenskih organizmov.

#### 5. VIRI

- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P., Refatti, E. 1998a. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni* L.- Jour. of Plant Pathology 80(3): 233-239.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., Osler, R. 1998b. Transmission of pear decline by using naturally infected *Cacopsylla pyri* L.- Acta Horticulturae no. 472: 665-668.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues.- Focus (Life Technol. Inc.) 12: 13-15.
- Kirckpatrick, B. C., Fischer, G. A., Fraser, J. D., Purcell, A. H. 1990. Epidemiological and phylogenetic studies on western X-disease mycoplasma-like-organism.- Zentralblatt für Bakteriologie, Suppl. 20: 288-297.
- Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., Osler, R., Chen, T. A. 1998. Apple proliferation detection using monoclonal antibodies.- Proc. 12th Inter. Mycoplasma Conf. Sydney, Jul 22-28, 1998: 73-74 (Abstr.).
- Osler, R., Carraro, L., Loi, N., Musetti, R., Ermacora, P., Refatti, E. 1999. Fruit tree phytoplasma diseases diffused in nature by psyllids.- Zbornik predavanj in referatov s 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin: 337-343.
- Osler, R., Petrovič, N., Ermacora, P., Seljak, G., Brzin, J., Loi, N., Carraro, L., Ferrini, F., Refatti, E. 2001. Control strategies of apple proliferation, a serious disease occurring both in Slovenia and in Italy.- Izvlečki referatov 5. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin: 67-69.
- Seemüller, E., Schneider B., Maeurer R., Ahrens U., Daire X., Kison H., Lorenz K.H., Firrao G., Avinent L., Sears B.B., Stackebrandt E. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal RNA.- Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 440-446.
- Seemüller, E., Kison, H., Lorenz, K.-H., Schneider, B., Marcone, C., Smart, C. D., Kirckpatrick, B. C. 1996. Detection and identification of fruit tree phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA.- Advances in the detection of plant pathogens by polymerase chain reaction (COST 823), Workshop of the nucleic acid-based technology, eds.: Manceau, C., Spak, J., Češke Budejovice, Češka, 20-21 junij 1996, Zbornik: 56-66.
- Seljak, G., Petrovič, N. 2000. Diffusione e stato della ricerca delle malattie da fitoplasmami in Slovenia.- Petria 10: 133-139.