

## DOLOČANJE FITOPLAZME LEPTONEKROZE KOŠČIČARJEV (*European Stone Fruit Yellows, ESFY*) V SLOVENIJI

Jernej BRZIN<sup>1</sup>, Gabrijel SELJAK<sup>2</sup>, Polo ERMACORA<sup>3</sup>, Ruggero OSLER<sup>4</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>5</sup>, Nataša PETROVIČ<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

<sup>2</sup>Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica, Nova Gorica

<sup>3</sup>Dipartimento di Biologia applicata alla Difesa delle Piante, Università degli Studi di Udine, Udine, Italy

### IZVLEČEK

Fitoplazme, mali prokarioti brez celične stene, živijo v sitastih ceveh gostiteljskih rastlin. Prenašajo se z žuželčjimi prenašalci in vegetativnim razmnoževanjem. Leptonekroza koščičarjev je v Evropi nevarno obolenje koščičarjev, ki ga povzroča fitoplazma *European Stone Fruit Yellows* (ESFY) iz skupine metličavosti jablan (*Apple proliferation group, AP, 16SrX*). V zadnjih letih na osnovi vizualnih zdravstvenih pregledov sadovnjakov poročajo o povečani zastopanosti in širjenju teh obolenj v Sloveniji. Na osnovi teh opažanj smo v okviru aplikativno-raziskovalnega projekta, posvečenega uvedbi metodike za detekcijo karantenskih fitoplazem sadnega drevja uvedli tudi občutljive in specifične molekularno biološke teste za določanje ESFY. ESFY fitoplazmo smo nato potrdili z metodami verižne reakcije polimeraze (PCR), *nested* PCR in polimorfizmom dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP) v marelicah, breskvah, nektarinah, mirabolanah in slivah iz različnih predelov Slovenije.

Ključne besede: detekcija, karantena, ESFY, leptonekroza, fitoplazme, koščičarji

### ABSTRACT

#### DETECTION OF EUROPEAN STONE FRUIT YELLOWS PHYTOPLASMA IN SLOVENIA

Phytoplasmas are small wall-less prokaryotes that live exclusively in sieve tubes of their plant hosts and are transmitted by insect vectors and vegetative propagation. In Europe, stone fruits are severely affected by European Stone Fruit Yellows (ESFY) caused by phytoplasmas belonging to Apple proliferation group (16SrX). Recently, progress of ESFY disease in Slovenia was reported based on visual sanitary inspections. Sensitive and specific molecular methods were introduced for the routine detection of ESFY, as part of a research project, applied to develop detection schemes for quarantine fruit tree phytoplasma. The presence of ESFY phytoplasmas was then confirmed by polymerase chain reaction (PCR), nested PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses in apricot, peach, nectarine, myrabolan and plum trees from different regions in Slovenia.

Key words: detection, quarantine, ESFY, European Stone Fruit Yellows, phytoplasma

## 1 UVOD

Fitoplazme, mali prokarioti brez celične stene, povzročajo več sto bolezni rastlin (Seemüller s sod., 2002). Živijo v sitastih ceveh floema in se prenašajo z žuželčjimi prenašalci in vegetativnim razmnoževanjem. V Evropi je leptonekroza koščičarjev nevarno obolenje, ki ga povzroča fitoplazma *European Stone Fruit Yellows* (ESFY) iz skupine

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

<sup>2</sup> mag., Pri hrastu 18, SI-5000 Nova Gorica

<sup>3</sup> dr., via delle Scienze 208, Udine, Italy

<sup>4</sup> dr., prav tam

<sup>5</sup> prof. dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

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

metličavosti jablan (16SrX; *Apple proliferation group*), ki jo EPPO (European plant protection organization) uvršča na A2 listo, v Sloveniji pa jo uvrščamo kot v EU na seznam I.A.II karantenskih škodljivih organizmov. V zadnjih letih na podlagi vizualnih zdravstvenih pregledov sadovnjakov poročajo o povečani zastopanosti in širjenju tega obolenja v Sloveniji (Seljak in Petrovič, 2000). V okviru aplikativno-raziskovalnega projekta, namenjenega razvoju in uvedbi laboratorijskih shem za detekcijo karantenskih fitoplazem sadnega drevja, smo uvedli občutljive in specifične molekularno biološke teste tudi za določanje ESFY. ESFY fitoplazmo smo nato z metodami verižne reakcije polimeraze (PCR), *nested* PCR in polimorfizmom dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP) potrdili v rastlinah marelic, breskev, nektarin, mirabolan, sliv in lovorikovca iz različnih predelov Slovenije, ki so kazali bolezenska znamenja obolenj z ESFY. Uvedene detekcijske tehnike bodo omogočile izvedbo laboratorijskih testiranj večjega števila dreves v okviru posebnega nadzora v letu 2003. Tehnike nudijo tudi možnost nadzora nad latentnimi okužbami, kar v kombinaciji s strategijo sajenja tolerantnih sort omogoča delno obvladovanje leptonekroze.

## 2 MATERIAL IN METODE

Na podlagi znamenj leptonekroze smo v letih 2000, 2001 in 2002 izbrali drevesa sliv, breskev, mirabolane, marelice, češnje in lovorikovca, iz različnih predelov Slovenije (Preglednica 1). Na lokacijah, kjer smo potrdili zastopanost leptonekroze (v Brkinih in v okolici Nove Gorice), smo za analize latentnih okužb izbrali 20 sliv evropskega porekla (Domača češplja, President in Stanley), ki niso kazale značilnih bolezenskih znamenj. Vzorčili smo poganjke iz različnih delov krošnje v času od julija do septembra.

Celokupno DNA smo izolirali iz 1,5 g listnih žil po predhodnem koncentriranju fitoplazem z diferencialnim centrifugiranjem (Ahrens in Seemüller 1992). Izvedli smo verižno reakcijo polimeraze (PCR) z oligonukleotidnimi začetniki f01/r01 specifičnimi za fitoplazme iz skupine metličavosti jablan (skupina 16SrX; Lorenz s sod., 1995). PCR produkte smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (1% agarozna, 100 V, 20 min) in jih pobarvane z etidijevim bromidom ( $2 \times 10^{-4}$  mgml<sup>-1</sup>) opazovali pri UV osvetlitvi. Negativne vzorce smo dodatno analizirali z *nested* PCR: v prvi verižni reakciji s polimerazo smo uporabili univerzalni par oligonukleotidnih začetnikov P1/P7, ki pomnožuje DNA vseh tipov fitoplazem in v drugi reakciji specifične oligonukleotidne začetnike f01/r01 (Seemüller s sod., 1996). Identiteto fitoplazem ESFY smo potrdili z analizo dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP; Seemüller s sod., 1996) po obdelavi PCR produktov z encimom *Bsa*I (Boehringer Mannheim). Restriksijske fragmente smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo (2% agarozna, 75 V, 90 min.) in jih pobarvane z etidijevim bromidom ( $2 \times 10^{-4}$  mgml<sup>-1</sup>) opazovali pri UV osvetlitvi.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Fitoplazmo ESFY smo potrdili v vzorcih koščičarjev iz različnih lokacij na Primorskem kot tudi v vzorcih iz Štajerske in Ljubljane (preglednica 1). Na podlagi teh analiz, vizualnih pregledov (Seljak in Petrovič, 2000), razširjenosti žuželčjega vektorja *Cacopsylla pruni* in potrjeni okužbi vektorja s fitoplazmo ESFY (Brzin s sod., 2001), lahko sklenemo, da je fitoplazma ESFY razširjena na Primorskem. Iz zelo majhnega števila analiz vzorcev od drugod v Sloveniji lahko predvidevamo, da je ESFY razširjena tudi drugod.

Fitoplazmo ESFY smo potrdili v vseh vzorcih dreves, ki so kazala značilna znamenja leptonekroze (preglednica 1). V nekaterih vzorcih dreves, ki so kazala značilna znamenja leptonekroze, smo fitoplazmo ESFY lahko potrdili le z uporabo *nested* PCR (podatki niso prikazani). Razlog je lahko v zelo nizki koncentraciji fitoplazem ali pa zaradi inhibitorjev PCR. Vsekakor je za zanesljivo detekcijo priporočljiva uporaba *nested* PCR tehnike.

Leptonekroza, poleg marelic in breskev različnih sort, okužuje predvsem slive kitajsko japonskega izvora medtem, ko so slive evropskega izvora večinoma tolerantne (Carraro s

sod., 1998). Na latentne okužbe smo testirali 20 sliv evropskega izvora, ki niso kazale značilnih bolezenskih znamenj in smo zastopanost ESFY fitoplazme potrdili v dveh vzorcih koreninskih poganjkov (President in domača češplja). Ti rezultati in dejstvo, da analizirane slive rastejo v okolju, kjer je fitoplazma ESFY razširjena, so v skladu s poročili o toleranci teh sort. V območjih, kjer je fitoplazma ESFY endemična, je zato priporočljivo sajenje tolerantnih sort sliv, hkrati pa je smiselno nadzorovati latentne okužbe korenin sadilnega materiala. Fitoplazme ESFY v dveh vzorcih češnje in enem vzorcu japonske češnje, ki so kazale znamenja podobna letonekrozi, nismo potrdili. Fitoplazmo ESFY smo prvič potrdili tudi v lovorikovcu (*Prunus laurocerasus*). Pri nadzoru leptonekroze je zato smiselno upoštevati tudi žive meje saj lahko predstavljajo rezervoar povzročiteljev te bolezni.

Preglednica 1: Rezultati testiranj koščičarjev z ali brez značilnih znamenj leptonekroze na zastopanost fitoplazme ESFY v letih 2000, 2001 in 2002 z metodami verižne reakcije polimeraze (PCR), *nested* PCR in polimorfizmom dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP).

Drevo	Lokacija	Št. testiranih	Št. simptom.	Št. pozitivnih
sliva	Brkini, N. Gorica	30	8	10
mirabolana	Brkini	2	2	2
breskev	Maribor, Potoče, N. Gorica	10	5	5
marelica	Komen, N. Gorica	6	6	6
češnja	Komen, Maribor	2	2*	0
japonska češnja	Ljubljana	1	1*	0
lovorikovec	Ljubljana	1	1	1

\* znaki oslabljenega transporta po floemu

#### 4 SKLEPI

- Fitoplazma ESFY je na Primorskem že endemična, pojavlja pa se tudi drugod v Sloveniji, kjer pa smo opravili manjše število analiz. Za natančnejše podatke o razširjenosti bi bilo potrebno analizirati večje število obolelih dreves tudi iz drugih območij Slovenije.
- Fitoplazmo ESFY smo z uporabljenimi metodami potrdili v vseh vzorcih dreves, ki so kazala značilna bolezenska znamenja kot tudi dve latentni okužbi. Za zanesljivo detekcijo leptonekroze je priporočljiva uporaba *nested* PCR tehnike.
- Vizualni pregledi in rezultati analiz 20 sliv evropskega porekla, ki rastejo v ESFY endemičnem območju Primorske, potrjujejo poročila o toleranci teh sort na leptonekrozo. Na območjih kjer je bolezen endemična je zato priporočljivo sajenje tolerantnih sort sliv (npr. domače češplje) hkrati pa je zaradi možnosti latentnih okužb korenin smiselno nadzorovati sadilni material teh sort.
- Fitoplazmo ESFY smo prvič potrdili tudi v lovorikovcu (*Prunus laurocerasus*), ki je lahko pomemben rezervoar povzročiteljev te bolezni v urbanih območjih.

#### 5 ZAHVALA

Raziskave so potekale v okviru ciljanega raziskovalnega projekta CRP (Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in Ministrstva za šolstvo, znanost in šport), projekta PHARE (European

Community External Aid), bilateralnega projekta med Slovenijo in Italijo in strokovne naloge Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije.

## 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., Petrovič, N., Seljak, G., Osler, R., Ermacora, P., Loi, N., Carraro, L., Ferrini, F., Reffati E., Ravnihar, M. 2001. First results on laboratory analyses of phytoplasmas in fruit trees. Pages 217-221 in: *Lectures and Papers presented at the 5<sup>th</sup> Slovenian Conference on Plant Protection*. Dobrovoljc, D., Urek, G., Maček, J., eds. Plant Protection Society of Slovenia, Ljubljana, Slovenia.
- 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.
- 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.
- 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 fitoplasmami in Slovenia. *Petria* 10: 133-139.