

IZKUŠNJE V PRVIH LETIH UPORABE MREŽNIKA ZA ZAGOTAVLJANJE CEPILNEGA MATERIALA PRI KOŠČIČASTIH SADNIH VRSTAH

Barbara AMBROŽIČ-TURK¹, Nikita FAJT², Gabrijel SELJAK³, Nataša MEHLE⁴,
Maja RAVNIKAR⁵

¹Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana
^{2,3}KGZS, Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica
^{4,5}Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

IZVLEČEK

Gojenje zdravih matičnih rastlin in uporaba zdravega cepilnega materiala pri vegetativnem razmnoževanju je pomemben preventivni ukrep pri preprečevanju širjenja bolezni pri sadnih rastlinah. Pri koščičastih sadnih vrstah iz roda *Prunus* je vzdrževanje zdravih matičnih rastlin na prostem precej težavno, predvsem v okoljih z velikim infekcijskim pritiskom, zaradi razširjenosti gostiteljskih rastlin in zastopanosti prenašalcev bolezni. Nevarni karantenski bolezni, kot sta klorotično zvijanje listov koščičarjev, ki jo povzroča fitoplazma European stone fruit yellows (ESFY) in šarka, ki jo povzroča virus *Plum pox potyvirus* (PPV) se na gostiteljske rastline iz roda *Prunus* širita z žuželčjimi prenašalci in predstavljata v naših pridelovalnih območjih koščičarjev stalno nevarnost okužb matičnih rastlin. V prispevku so prikazane ugotovitve spremljanja zdravstvenega stanja matičnih rastlin ter spremljanja prenašalcev, kakor tudi rezultati spremljanja parametrov razvoja rastlin v razmerah mrežnika, primerjalno s kontrolnimi rastlinami na prostem, v prvih letih uporabe mrežnika. Rezultati potrjujejo učinkovitost mrežnika pri preprečevanju prenosa bolezni koščičarjev s prenašalci ter možnost zagotavljanja cepičev ustrezne tehnološke kakovosti.

Ključne besede: karantenske bolezni, koščičarji, matične rastline, mrežnik, prenašalci

ABSTRACT

FIRST EXPERIENCES WITH THE USE OF INSECT-PROOF NET-HOUSE IN ASSURING THE PROPAGATING MATERIAL OF STONE FRUITS

The cultivation of healthy mother plants and the use of healthy propagating material is an important preventive measure to control the spread of the diseases in fruit plants. In stone fruits, the maintenance of healthy mother plants in open field is quite difficult, particularly in the areas with high infection pressure due to the widespread of host plants and the presence of vectors. The quarantine pathogens phytoplasma responsible for the European stone fruit yellows (ESFY) and the *Plum pox virus* (PPV) are transmitted to the host plants of the genus *Prunus* by vectors; in Slovenia, in several areas where stone fruits are cultivated, they present continuous risk for infection of mother plants. Some findings on vector monitoring and disease control as well as some growth parameters of mother trees grown in an insect-proof net-house, compared to the control trees growing outside are reported in this paper. The results suggest good opportunities and importance of *Prunus* mother plant cultivation in

¹ mag., univ. dipl. agr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

² dr., univ. dipl. agr., Pri hrastu 18, SI-5000 Nova Gorica

³ mag., univ. dipl. agr., prav tam

⁴ mag., univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

⁵ prof. dr., univ. dipl. biol., prav tam

protected environment for the production of healthy, well developed bud wood for nursery needs

Key words: disease control, mother plants, net-house cultivation, stone fruits, vectors

1 UVOD

Sadne vrste iz roda *Prunus* so gostiteljske rastline mnogim škodljivim organizmom. Med njimi sta bolezn klorotično zvijanje listov koščičarjev, ki jo povzroča fitoplazma European stone fruit yellows (ESFY) in šarka, ki jo povzroča virus *Plum pox potyvirus* (PPV) nevarni karantenski bolezn (Direktiva Sveta 2000/29/ES), ki na rastlinah lahko povzročata občutno škodo, obolelih rastlin pa ni mogoče zdraviti. Širita se z žuželčimi prenašalci (bolšice, uši) in z vegetativnim razmnoževanjem. Fitoplazma ESFY se na gostiteljske rastline iz roda *Prunus* prenaša s češpljevo bolšico (*Cacopsylla pruni* (Scopoli)) (Carraro in sod., 1998), v poskusnih razmerah pa je bil ugotovljen tudi prenos z breskovim škržatkom (*Asymmetrasca decedens* (Paoli)), (Pastore in sod., 2004). Fitoplazma ESFY ('*Candidatus* Phytoplasma prunorum') sodi v skupino fitoplazem metličavosti jablan (Seemüller in Schneider, 2004), ki lahko pri občutljivih vrstah (marelice, kitajsko-japonske slive, breskve, nektarine) povzroči značilno rumenenje in postopno odmiranje dreves (Carraro in Osler, 2003). V Sloveniji je spremljanje te bolezn potrdilo njeno zastopanost na območjih, kjer se gojijo koščičaste sadne vrste (Mehle in sod., 2007; Mehle in sod., 2010). Znano je, da so gostiteljske rastline ESFY tudi divje vrste iz roda *Prunus* (Carraro in Osler, 2003), ki so v našem okolju precej razširjene.

Gojenje zdravih matičnih rastlin in uporaba zdravega cepilnega materiala pri vegetativnem razmnoževanju je pomemben preventivni ukrep pri preprečevanju širjenja bolezn pri sadnih rastlinah. Izkušnje z matičnim nasadom koščičastih sadnih vrst na Primorskem (Vogrsko), ki je bil posajen z brezvirusnim matičnim materialom kažejo, da je pritisk okužb iz okolice velik, saj so večletni rezultati spremljanja potrdili hitro širjenje fitoplazme ESFY v nasadu, kljub izvajanju ustreznih fitosanitarnih ukrepov (Ambrožič Turk in sod., 2008). Zato je v takšnih okoljih vzdrževanje ustreznega zdravstvenega stanja matičnih dreves mogoče le v zavarovanih razmerah mrežnika (Fajt in sod., 2009). V prispevku želimo prikazati pomen vzgoje matičnih dreves v mrežniku in izkušnje v prvih letih njegove uporabe za zagotavljanje zdravega cepilnega materiala ustrezne tehnološke kakovosti.

2 MATERIAL IN METODE

V Sadjarskem centru Bilje je bil spomladi 2007 v mrežnik, velikosti 500 m², posajen brezvirusni bazni matični material različnih sort breskev, nektarin, sliv in marelic, skupno 81 sadik. Mrežnik z ustreznim predprostorom ima protiinsektno mrežo z velikostjo luknjic 1,5 mm x 1,5 mm, deklarirana življenska doba trajanja mreže je 7 let. Sadike so bile posajene na razdaljo 1,8 m v vrsti in 3,5 m med vrstami ter so vzgajane v obliki vretenastega grma. Spremljanje parametrov rasti in razvoja ter kakovosti cepičev je potekalo pri sorti breskve 'Redhaven' na 12 drevesih v mrežniku ter primerjalno na 12 drevesih iste sorte zunaj mrežnika. Oskrba rastlin v mrežniku ter kontrolnih rastlin zunaj njega je bila intenzivna, v skladu s tehnologijo oskrbe matičnih dreves za rez cepičev. V letih 2007 do 2009 smo spremljali višino dreves in količino brstov, ki ustrezajo za cepljenje (brstov na osnovi in v vrhu poganjkov nismo upoštevali, kakor tudi ne brstov na predrobnih poganjkih). Kakovost cepičev iz mrežnika smo ugotavljali s prijemom cepičev pri cepljenju v treh različnih terminih, v presledkih 14 dni (26.8.2008, 9.9.2008 ter 23.9.2008) na brezvirusno podlago GF 677 (*P. amygdalus* x *P. persica*), primerjalno s cepiči s kontrolnih dreves. Poskus cepljenja je bil zasnovan tako, da smo cepiče odvzeli pri vsakem terminu iz različnih dreves (3 obravnavanja), dodatno smo za četrto obravnavanje jemali cepiče iz istega drevesa pri vseh treh terminih. Navedena štiri obravnavanja so bila v treh ponovitvah (3 drevesa), pri čemer je

bilo iz vsakega drevesa odvzetih po 10 oces (brstov). Cepili smo po en brst na podlago ter spomladi 2009 ugotavljali prijem oziroma izplen cepljenja. Rezultate smo statistično obdelali. Tekom rastne dobe 2008 so bile z merilcem 'Sunfleck ceptometer' opravljene meritve količine fotosintetsko aktivne svetlobe (photosynthetic photon flux – PPF) v mrežniku ter primerjalno zunaj njega.

V letih 2007 do 2009 smo med rastno dobo spremljali nalet morebitnih prenašalcev karantenskih boleznih s pomočjo rumenih lepljivih plošč tipa Terminator (Biotech d.o.o., Ljubljana) velikosti 24,5 x 13,5 cm, ki so bile izobešene na 4 drevesih znotraj mrežnika in na dveh kontrolnih drevesih zunaj njega. Plošče so bile postavljene v začetku marca in nato zamenjane v 2-3 tedenskih presledkih. V laboratoriju so bile pregledane na navzočnost znanih prenašalcev (češpljeva bolšica - *Cacopsylla pruni*) in potencialnih prenašalcev ESFY fitoplazme (breskov škržatek - *Asymmetrasca decedens*) ter drugih fitofagnih žuželk.

V letih 2007 do 2009 je potekalo spremljanje zdravstvenega stanja matičnih rastlin v mrežniku in kontrolnih dreves zunaj mrežnika z vzorčenjem korenin oziroma listov za analize na zastopanost fitoplazme ESFY oziroma virusa šarke. Za preverjanje navzočnosti fitoplazme ESFY so bile po izolaciji celokupne DNA uporabljene molekularne metode - PCR, vgnezdni PCR in PCR v realnem času (Schneider in sod., 1995; Hren in sod., 2007). Za detekcijo virusa PPV je bila uporabljena serološka metoda DAS-ELISA, v primeru nejasnih rezultatov je bila uporabljena molekularna metoda PCR. Od leta 2009 se spremljanje zdravstvenega stanja nadaljuje, saj je matični nasad koščičarjev v mrežniku vključen v nadzor v postopku uradnega potrjevanja za pridobivanje certificiranih cepičev.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Spremljanje parametrov razvoja rastlin ter kakovosti cepičev

Da bi ugotovili možnost pridelave kakovostnega razmnoževalnega materiala v spremenjenih mikroklimatskih razmerah mrežnika, predvsem zaradi zmanjšane osvetlitve ter morebitnega slabšega dozorevanja lesa, so bili v letih 2007 do 2009 pri vzgoji v mrežniku spremljani nekateri parametri razvoja rastlin in kakovosti cepičev. Rezultati spremljanja so v vseh proučevanih letih pokazali statistično značilno višjo rast dreves v mrežniku z daljšimi poganjki, v primerjavi s kontrolnimi drevesi na prostem (preglednica 1). Zelo dober vegetativni razvoj dreves v mrežniku se je pokazal tudi v količini brstov (očes), ustreznih za cepljenje, saj so drevesa v mrežniku imela večje število oces kot kontrolna drevesa (preglednica 1). Tudi velikost listne ploskve je bila pri drevesih v mrežniku večja kot pri drevesih na prostem. Pri ugotavljanju kakovosti cepičev se je na podlagi rezultatov cepljenja pokazalo, da ni statistično značilne razlike v prijemu med cepiči iz obeh okolij, čeprav je bil prijem cepičev iz kontrolnih dreves nekoliko višji (84,4 %), iz mrežnika pa 79,4 %. Pri primerjavi prijema cepičev med različnimi termini cepljenja (26.8.2008 - 1. termin, 9.9.2008 - 2. termin in 23.9.2008 - 3.termin) je bilo ugotovljeno, da termin cepljenja ne vpliva statistično značilno, če so bili cepiči odvzeti iz različnih dreves pri posameznih terminih. V primeru, da so bili cepiči odvzeti iz istega drevesa pri vsakem od navedenih terminov, pa je bila razlika v prijemu cepičev statistično značilna (podatki niso prikazani).

Z meritvami svetlobe, opravljenimi med rastno dobo od maja do konca septembra 2008 je bilo ugotovljeno, da je v jasnem vremenu količina fotosintetsko aktivne svetlobe, izmerjene v razmerah mrežnika glede na količino svetlobe izmerjene primerjalno na prostem, v povprečju med 50 % - 65 %, kar ne predstavlja omejevalnega faktorja pri rasti in razvoju rastlin. V navedenem obdobju je količina svetlobe izmerjena okrog 13:00 na prostem v jasnem vremenu znašala med 1900 – 2200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Preglednica 1: Parametri razvoja dreves sorte 'Redhaven' v mrežniku in kontroli (zunaj mrežnika) v letih 2007 do 2009.

Table 1: Tree growth parameters of net-house growing trees in comparison with outdoor control trees of peach 'Redhaven' in the years 2007 to 2009.

Leto	Višina dreves (cm)		Količina brstov za cepljenje (št./drevo)	
	Kontrola	Mrežnik	Kontrola	Mrežnik
2007	134 a	199 b	24 a	115 b
2008	263 a	327 b	687 a	693 a
2009	314 a	456 b	650 a	881 b

Povprečji označeni z isto črko znotraj vrstic se med seboj ne razlikujeta statistično značilno s t-testom pri $P = 0,05$. (Primerjava povprečij znotraj posameznega leta).

Means with the same letter in the row are not significantly different using t-test at $P = 0.05$. (Means have to be compared within years but not between years).

3.2 Entomološka analiza

Entomološka analiza spremljanja prenašalcev v letih 2007 do 2009 v mrežniku ni potrdila nobenega prenašalca ESFY (češpljeva bolšica, breskov škržatek) ali virusnih bolezni koščičastega sadja (listne uši). Prav tako se v opazovanih letih na rumene lepljive plošče v mrežniku ni lovila nobena druga fitofagna žuželka. Na ploščah znotraj mrežnika so se deloma lovile le nekatere saprofagne žuželke iz reda dvokrilcev (Diptera) – v glavnem muhe žalovalke (Sciaridae) in proti koncu poletja tudi škržatki vrste *Laodelphax striatellus*, ki živi na različnih plevelnih travah.

V kontroli izven mrežnika se je v opazovanih letih na rumene lepljive plošče ulovil en primerek češpljeve bolšice (*C. pruni*) samo v letu 2009, v prvi polovici aprila. Rezultati spremljanja so sicer nakazali, da je bil ulov te vrste v opazovanem obdobju na proučevani kontrolni vrsti dreves ob mrežniku minimalen. V vseh opazovanih letih pa je bil na kontrolnih drevesih zunaj mrežnika ugotovljen ulov breskovega škržatka (*A. decedens*), ki se je zlasti povečal v poletnem času. Ta bi lahko predstavljal veliko večjo nevarnost za prenos fitoplazme kot češpljeva bolšica.

3.3 Spremljanje zdravstvenega stanja matičnih rastlin

V letih 2007 do 2009 je na drevesih v mrežniku ter na kontrolnih drevesih zunaj mrežnika potekalo obsežno preverjanje zdravstvenega stanja glede povzročiteljev karantenskih bolezni, prenosljivih z žuželčjimi prenašalci. Ob sajenju spomladi 2007 so bile vse rastline, ki so bile posajene v mrežnik ter 12 kontrolnih rastlin, posajenih izven mrežnika, testirane na fitoplazmo ESFY in virus PPV. V naslednjih dveh letih je bilo na navedena škodljiva organizma letno testiranih povprečno 15 % rastlin v mrežniku, medtem ko so bila zunaj testirana vsa kontrolna drevesa. Za preverjanje zastopanosti fitoplazme ESFY je bilo skupno analiziranih 137 vzorcev korenin. Za analizo vzorcev, brez vidnih znamenj bolezni, so korenine najprimernejše tkivo. Znano je namreč, da se v primeru latentnih okužb fitoplazme nahajajo praviloma le v koreninah (Brzin in sod., 2005). Z laboratorijskimi metodami v proučevanem obdobju niso bile dokazane fitoplazme v analiziranih vzorcih, tako iz mrežnika, kakor tudi ne na prostem.

V primeru ugotavljanja PPV je bilo v letih 2007 do 2009 analiziranih skupno 162 vzorcev iz obeh okolij. V mrežniku so bili rezultati testiranja v vseh letih negativni, medtem ko je

laboratorijska analiza potrdila PPV pri enem drevesu v kontroli v letu 2009. Okuženo drevo je bilo izkrčeno.

V letu 2010 se je nadzor zdravstvenega stanja matičnih rastlin v mrežniku nadaljeval, potekal je v okviru postopka uradnega potrjevanja (certifikacije) za pridobivanje certificiranih cepičev. Na rastlinah iz mrežnika tudi v letu 2010 niso bili ugotovljeni škodljivi organizmi, medtem ko je bil na rastlinah v bližini mrežnika potrjen PPV na enem vzorcu breskve ter ESFY na enem vzorcu marelice. Okužena drevesa so bila odstranjena. Potrditev fitoplazme ESFY in PPV v okolici kaže na možnost nadaljnega širjenja ter stalno nevarnost okužb s karantenskimi škodljivimi organizmi. Hkrati potrjuje pomen in upravičenost vzdrževanja matičnih rastlin v zaščitnih razmerah mrežnika, saj v tovrstnih razmerah pritiska okužb matični material ni mogoče ohraniti zdrav.

4 SKLEPI

Rezultati spremljanja razvoja rastlin so pokazali zelo dobro vegetativno rast dreves v mrežniku s kakovostnimi brsti za potrebe drevesničarstva, saj je bilo na podlagi rezultatov cepljenja ugotovljeno, da je bil prijem cepičev iz mrežnika primerljiv s prijmom cepičev iz kontrolnih dreves. Praktični rezultati uspešne vzgoje matičnih dreves se potrjujejo tudi v vsakoletni povečani količini narezanih cepičev iz mrežnika.

Rezultati spremljanja zastopanosti prenašalcev so pokazali, da v opazovanem obdobju v mrežniku ni bilo najdenih prenašalcev karantenskih škodljivih organizmov, niti drugih fitofagnih žuželk, kar potrjuje učinkovitost mrežnika pri preprečevanju prenosa bolezni koščičarjev z žuželčjimi prenašalci. Kljub neznatnemu ulovu prenašalca češpljeve bolšice (*C. pruni*) v opazovanem obdobju na kontrolnih drevesih na prostem pa je bil ugotovljen precejšen ulov potencialnega prenašalca breskovega škržatka (*A. decedens*), kar lahko predstavlja nevarnost pri prenosu fitoplazme ESFY.

Glede spremljanja zdravstvenega stanja lahko sklenemo, da na drevesih v mrežniku niso bili ugotovljeni karantenski škodljivi organizmi, medtem ko je bila v zadnjih letih spremljanja potrjena zastopanost virusa šarke in fitoplazme ESFY v neposredni bližini mrežnika. To potrjuje veliko nevarnost širjenja okužb iz okolice na matične rastline gojene na prostem in pomen vzdrževanja ustreznega zdravstvenega stanja matičnega materiala v zavarovanih razmerah.

5 ZAHVALA

Delo, ki ga obravnava prispevek v obdobju 2007 do 2009 je potekalo v okviru Ciljnega raziskovalnega programa, št. V4-0343 s finančno podporo Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije ter Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, za kar se iskreno zahvaljujemo.

6 LITERATURA

- Ambrožič Turk, B., Mehle, N., Brzin, J., Škerlavaj, V., Seljak, G., Ravnikar, M. 2008. High infection pressure of ESFY phytoplasma threatens the cultivation of stone fruit species. *Journal of Central European Agriculture*, 9, 4: 795-802.
- Brzin, J., Petrovič, N., Boben, J., Hren, M., Kogovšek, P., Mehle, N., Žežlina, I., Seljak, G., Ravnikar, M. 2005. Fitoplazme na sadnem drevju. V: Zbornik predavanj in referatov 7. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Zreče, 8.-10. marec 2005, 248-252.
- 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, 45: 113-117.

- Direktiva sveta 2000/29/ES z dne 8. maja 2000 o varstvenih ukrepih proti vnosu organizmov, škodljivih za rastline ali rastlinske proizvode, v Skupnost in proti njihovemu širjenju v Skupnost (UL L 169/1,10/07/2000). Seznam I.A.II in Seznam II.A.II.
- Fajt, N., Seljak, G., Prinčič, M., Komel, E., Veberič, R., Mehle, N., Boben, J., Dreo, T., Ravnikar, M., Ambrožič Turk, B. 2009. Zagotavljanje zdravega izhodiščnega materiala koščičarjev z vzgojo matičnih dreves v mrežniku. V: Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Nova Gorica, 4.-5. marec 2009, 243-247.
- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj Novak, P., Gruden, K., Ravnikar, M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathol.*, vol. 56: 785-796.
- Mehle, N., Brzin, J., Boben, J., Hren, M., Frank, J., Petrovič, N., Gruden, K., Dreo, T., Žežlina, I., Seljak, G., Ravnikar, M. 2007. Pregled rezultatov določanja fitoplazem na koščičarjih v letih 2000-2006 v Sloveniji. V: Zbornik predavanj in referatov 8. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Radenci, 6.-7. marec 2007, 139-143.
- Mehle, N., Ambrožič Turk, B., Brzin, J., Nikolić, P., Dermastia, M., Boben, J., Ravnikar, M. 2010. Diagnostics of fruit trees phytoplasmas - the importance of latent infection. V: 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Neustadt, Germany, July 5 - 10, 2009 (Julius Kühn Archiv, No. 427). Julius Kühn-Institut: Berlin, 412-414.
- 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.
- Schneider, B., E. Seemüller, C. D. Smart, and B. C. Kirkpatrick. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas, p. 369-380. V: S. Razin and J. G. Tully (ur.), *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, vol. 1. Academic Press, San Diego, Calif.
- 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.