

## ZAGOTAVLJANJE ZDRAVEGA IZHODIŠČNEGA MATERIALA KOŠČIČARJEV Z VZGOJO MATIČNIH DREVES V MREŽNIKU

Nikita FAJT<sup>1</sup>, Gabrijel SELJAK<sup>2</sup>, Matjaž PRINČIČ<sup>3</sup>, Erika KOMEL<sup>4</sup>, Robert VEBERIČ<sup>5</sup>,  
Nataša MEHLE<sup>6</sup>, Jana BOBEN<sup>7</sup>, Tanja DREO<sup>8</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>9</sup>, Barbara AMBROŽIČ-  
TURK<sup>10</sup>

<sup>1,2,3,4</sup>KGZS, Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica

<sup>5</sup>Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

<sup>6,7,8,9</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,  
Ljubljana

<sup>10</sup>Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za sadjarstvo in vinogradništvo, Ljubljana

### IZVLEČEK

Fitoplazma European stone fruit yellows (ESFY) povzroča pri gojenju koščičastih sadnih vrst veliko gospodarsko škodo. Na gostiteljske rastline iz rodu *Prunus* se prenaša z vektorjem češpljevo bolšico (*Cacopsylla pruni*), širi se tudi z vegetativnim razmnoževanjem. Uporaba zdravega izhodiščnega materiala je bistvenega pomena pri preprečevanju širjenja fitoplazem in drugih povzročiteljev bolezni. Z namenom poskusa vzdrževanja zdravih matičnih rastlin ter ugotavljanja možnosti pridelave kakovostnih cepičev so bile spomladi 2007 na lokaciji Sadjarskega centra v Biljah posajene matične sadike koščičarjev v mrežnik. V prispevku je prikazana entomološka analiza spremljanja prenašalcev ESFY ter rezultati spremljanja zdravstvenega stanja in parametrov razvoja matičnih rastlin v mrežniku ter pri kontrolnih drevesih zunaj mrežnika v letih 2007 in 2008.

**Ključne besede:** koščičaste sadne vrste, matični material, mrežnik, prenašalci, spremljanje bolezni

### ABSTRACT

#### ASSURANCE OF HEALTHY PROPAGATING MATERIAL OF STONE FRUITS BY CULTIVATING MOTHER TREES IN INSECT-PROOF NET-HOUSE

European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasma is associated with a severe disease that affects stone fruit species. In nature ESFY phytoplasma is transmitted from infected plants to the host plants of *Prunus* spp. by its vector *Cacopsylla pruni*. The pathogen can also be introduced to new areas by infected material used for grafting. The use of healthy propagating/planting material is therefore of great importance to prevent the spread of these pathogens. The purpose of this research was to maintain healthy mother plants under the protected environment in an insect-proof net-house and to assess the possibility of

<sup>1</sup> dr., univ. dipl. inž. agr., Pri hrastu 18, SI-5000 Nova Gorica

<sup>2</sup> mag., univ. dipl. inž. agr., prav tam

<sup>3</sup> univ. dipl. inž. agr., prav tam

<sup>4</sup> dipl. inž. agr., prav tam

<sup>5</sup> doc. dr., univ. dipl. inž. agr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

<sup>6</sup> mag., univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>7</sup> dr., univ. dipl. mikrobiol., prav tam

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

<sup>9</sup> prof. dr., univ. dipl. biol., prav tam

<sup>10</sup> mag., univ. dipl. agr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

production of healthy, properly developed budwood in such conditions. Thus the 'virus free' plants of stone fruits were planted in the insect-proof net-house located in the Fruit Growing Centre of Bilje in the spring 2007. Entomological analysis of the vectors of phytoplasma as well as the plant health status and the growth parameters of the trees from the net-house and from the outdoor control trees were followed in the 2007 and 2008. The results are presented in this paper.

**Key words:** disease control, insect-proof net-house, propagating material, stone fruit species, vectors

## 1 UVOD

Vzgoja zdravega razmnoževalnega materiala predstavlja pomemben ukrep pri preprečevanju širjenja škodljivih organizmov. Med njimi je fitoplazma European stone fruit yellows (ESFY; '*Candidatus* Phytoplasma prunorum') (Seemüller in Schneider, 2004) nevaren rastlinski povzročitelj bolezn, ki pri gojenju koščičastih sadnih vrst povzroča veliko gospodarsko škodo. Bolezen je razširjena tako v Evropi, kot tudi pri nas. Predvsem pri marelicah, slivah kitajsko-japonskega izvora ter breskvah in nektarinah povzroča značilna rumenenja in postopna odmiranja dreves, ki so posebej izrazita pri občutljivih sortah (Carraro in Osler, 2003). Z vidika širjenja bolezn so nevarne latentne okužbe različnih vrst sliv (*P. domestica*, *P. spinosa*, *P. cerasifera*), ki ne kažejo bolezenskih znamenj in predstavljajo prikrit vir okužb (Carraro *et al.*, 2004). Fitoplazma ESFY se na gostiteljske rastline iz rodu *Prunus* prenaša z vektorjem češpljevo bolšico (*Cacopsylla pruni* (Scopoli)) (Carraro *et al.*, 1998). Dokazan je tudi prenos fitoplazme ESFY z breskovim škržatkom (*Asymmetrasca decedens* (Paoli)) (Pastore *et al.*, 2004). Bolezen se prenaša tudi z vegetativnim razmnoževanjem. Vzdrževanje zdravih matičnih rastlin v zavarovanih razmerah je bistvenega pomena, predvsem v okoljih z visokim infekcijskim pritiskom patogenih mikroorganizmov, kakršne so razmere tudi pri nas v pridelovalnem območju koščičarjev na Primorskem (Ambrožič Turk *et al.*, 2008). Z zastavljenim poskusom vzgoje matičnih rastlin v zaščiteni razmerah mrežnika želimo poleg zdravstvenega vidika ugotoviti tudi možnost pridelave cepičev ustrezne tehnološke kakovosti v spremenjenih mikroklimatskih razmerah mrežnika, predvsem zaradi zmanjšane osvetlitve ter morebitnega slabšega dozorevanja lesa.

## 2 MATERIAL IN METODE

Spomladi 2007 je bil na lokaciji Sadjarskega centra v Biljah posajen brezvirusni bazni matični material koščičastih sadnih vrst v mrežnik, velikosti 500 m<sup>2</sup>. Posajene so bile različne sorte breskev in nektarin, sliv in marelic, skupno 81 dreves. Spremljanje parametrov rasti in tehnološke kakovosti cepičev je potekalo pri sorti breskve 'Redhaven', na 12 drevesih v mrežniku ter na 12 drevesih iste sorte primerjalno zunaj njega. Spremljali smo zdravstveno stanje matičnih rastlin v mrežniku in kontrolnih dreves zunaj mrežnika z vzorčenjem korenin, listov in poganjkov za analize na zastopanost fitoplazme ESFY, virusa šarke PPV ter bakterioz, predvsem *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, kakor tudi pojav prenašalcev teh bolezn. Za preverjanje zastopanosti fitoplazem ESFY smo po izolaciji celokupne DNA uporabili molekularne metode - PCR, vgnezdni PCR in PCR v realnem času (Schneider *et al.*, 1995; Lorenz *et al.*, 1995; Hren *et al.*, 2007). Za ugotavljanje zastopanosti bakterioz smo uporabljali metode izolacije na gojiščih in serološko metodo indirektno imunofluorescence. Za detekcijo virusa šarke PPV je bila uporabljena serološka metoda DAS-ELISA. Za ugotavljanje zastopanosti potrjenih ter potencialnih prenašalcev karantenskih bolezn, smo v mrežnik in izven njega namestili rumene lepljive plošče velikosti 24,5 x 13,5 cm tipa Terminator. Plošče smo v rastni dobi menjavali vsakih štirinajst dni ter ugotavljali ulov prenašalcev. Za ugotavljanje stanja dozorelosti lesa, ki je bistveno za doseganje dobrega izplena pri cepljenju, so bile poleti 2008 opravljene analize vsebnosti ogljikovih hidratov

(glukoza, fruktoza, sorbitol in saharoza) v vzorcih floema poganjkov v treh terminih rezanja cepičev. Za določitev sladkorjev je bila uporabljena metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) (Dolenc Šturm *et al.*, 1999). Kakovost cepičev iz mrežnika smo ugotavljali tudi s prijemom cepičev pri cepljenju na brezvirusno podlago GF 677, primerjalno s cepiči s kontrolnih dreves. Meritve količine fotosintetsko aktivne svetlobe (photosynthetic photon flux – PPF) so bile opravljene z merilcem 'Sunfleck ceptometer' v razmerah mrežnika ter primerjalno zunaj njega tekom obeh rastnih dob od maja do konca septembra.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

#### 3.1 Spremljanje prenašalcev

Entomološka analiza spremljanja prenašalcev ESFY v letih 2007 in 2008 ni potrdila pojava prenašalca češpljeve bolšice (*Cacopsylla pruni*) tako v mrežniku kot zunaj njega, ugotovljen pa je bil pojav potencialnega prenašalca breskovega škržatka (*Asymmetrasca decedens*) pri kontrolnih drevesih zunaj mrežnika. Prav tako se v obeh opazovanih letih na rumene lepljive plošče v mrežniku ni lovila nobena druga fitofagna žuželka, kar potrjuje učinkovitost mrežnika pri preprečevanju prenosa bolezni koščičarjev z naravnimi prenašalci. Avgusta 2008 je bila zabeležena namnožitev fitofagnih pršic vrste *Tetranychus turkestani* (Ugorov & Nikolski) v mrežniku.

#### 3.2 Spremljanje zdravstvenega stanja matičnih rastlin

V prvih dveh letih spremljanja zdravstvenega stanja matičnih rastlin ni bil ugotovljen pojav karantenskih škodljivih organizmov - fitoplazme ESFY, bakterije *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* ter virusa šarke *Plum pox virus* (PPV) na drevesih v mrežniku, kakor tudi ne na kontrolnih drevesih zunaj njega. Zaradi specifičnih mikroklimatskih razmer v mrežniku je bila pri nekaterih sortah breskve ugotovljena povečana dovzetnost za glivično bolezen - ožig breskove skorje (*Fusicoccum amygdali*), ki je povzročila sušenje posameznih enoletnih šib, kar pa ni vplivalo na nadaljnjo rast in obraščanje dreves.

#### 3.3 Spremljanje parametrov razvoja rastlin ter vsebnosti ogljikovih hidratov v skorji poganjkov

Spremljana drevesa sorte 'Redhaven' so v mrežniku v obeh rastnih dobah dosegla značilno višjo rast v primerjavi s kontrolnimi drevesi na prostem. Podatki parametrov rasti so prikazani v preglednici 1. V prvi rastni dobi 2007 so bili poganjki pri drevesih na prostem, kljub izvajanju varstva s fitofarmaceutskimi pripravki, deloma prizadeti zaradi napada breskovega zavijača (*Cydia molesta*), zaradi česar je bila rast zavrta. To se kaže tudi v zelo majhni količini razpoložljivih brstov za cepljenje. V letu 2008 je bila rast dreves v obeh okoljih zelo dobra, čeprav je bila višina dreves v mrežniku značilno večja kot pri drevesih na prostem, vendar pa ni bilo statistično značilne razlike v številu očes za cepljenje. Že v letu 2007 smo opazili, da so bili listi v mrežniku bistveno večji kot pri kontrolnih drevesih na prostem, kar smo v letu 2008 potrdili z meritvami, saj je bila razlika v velikosti listne ploskve statistično značilna. Z meritvami svetlobe, opravljenimi tekom obeh rastnih dob je bilo ugotovljeno, da je količina fotosintetsko aktivne svetlobe, izmerjene v razmerah mrežnika glede na količino svetlobe izmerjene primerjalno na prostem, v povprečju med 50 % - 60 %, kar ne predstavlja omejevalnega faktorja pri rasti in razvoju rastlin.

Z namenom ugotavljanja fiziološkega stanja poganjkov/cepičev v spremenjenih razmerah v mrežniku, smo v poletnem času v treh terminih vzorčenja spremljali vsebnost asimilatov v poganjkih iz mrežnika ter primerjalno iz kontrolnih dreves na prostem.

Preglednica 1: Parametri razvoja dreves sorte 'Redhaven' v mrežniku in kontroli (zunaj mrežnika) v letih 2007 in 2008.

Table 1: Growth parameters of cv. 'Redhaven' from the net-house trees and from the outdoor control trees in 2007 and 2008.

Parametri razvoja	Leto	Kontrola	Mrežnik	
Višina drevesa (cm)	2007	134	199	*
	2008	263	327	*
Število brstov za cepljenje (št./drevo)	2007	24	115	*
	2008	687	693	ns
Velikost listne ploskve (cm <sup>2</sup> )	2008	42,7	46,6	*

ns – razlika ni statistično značilna

\* – razlika je statistično značilna pri  $\alpha = 0,05$  (t-test)

Rezultati spremljanja so pokazali, da je bila pri prvem terminu vzorčenja vsebnost vseh analiziranih ogljikovih hidratov najvišja, kot posledica največje aktivnosti listov in se je pri kasnejših terminih zmanjšala (Preglednica 2). Izmed ogljikovih hidratov analiziranih v skorji poganjkov sta po vsebnosti izstopala monosaharida fruktoza in glukoza, sledila sta sorbitol ter z najmanjšo vsebnostjo še saharoza, kot transportni obliki ogljikovih hidratov. Med poganjki iz mrežnika in kontrolnimi poganjki izven mrežnika, v prvem in tretjem terminu ni bilo statistično značilnih razlik glede vsebnosti sorbitola in saharoze. V drugem terminu rezanja cepičev pa so bile razlike v vsebnosti značilne v korist poganjkov, odvzetih iz mrežnika. Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da poganjki odvzeti v mrežniku, zaradi zmanjšane osvetlitve, niso bili slabše založeni z transportnimi oblikami ogljikovih hidratov.

Preglednica 2: Vsebnosti ogljikovih hidratov (fruktoza, glukoza, saharoza, sorbitol) v floemu poganjkov sorte 'Redhaven' v mrežniku in kontroli (zunaj mrežnika) v letu 2008 v treh terminih vzorčenja.

Table 2: Carbohydrates content (fructose, glucose, sucrose, sorbitol) in the phloem of cv. 'Redhaven' shoots from the net-house and from outdoor control trees sampled three times during the summer 2008.

Ogljikov hidrat	Termin vzorčenja poganjkov <sup>(1)</sup>	Vsebnost ogljikovih hidratov (g/kg)		
		kontrola	mrežnik	
Fruktoza	1.	12,1	12,7	ns
	2.	8,4	9,0	ns
	3.	8,6	7,5	*
Glukoza	1.	9,8	9,9	ns
	2.	7,0	8,7	*
	3.	8,8	7,3	*
Saharoza	1.	2,5	2,4	ns
	2.	1,9	2,1	*
	3.	2,1	2,2	ns
Sorbitol	1.	8,0	8,3	ns
	2.	5,5	6,6	*
	3.	6,5	6,8	ns

ns – razlika ni statistično značilna

\* – razlika je statistično značilna pri  $\alpha = 0,05$  (t-test)

<sup>(1)</sup> 1. termin: 26. 8. 2008; 2. termin: 9. 9. 2008; 3. termin: 23. 9. 2008.

V sklopu spremljanja fiziološke kakovosti cepičev z ugotavljanjem izplena pri cepljenju so prvi rezultati cepljenja v letu 2007 pokazali enakovreden prijem cepičev iz mrežnika in s

kontrolnih dreves zunaj njega, to je 100 % oziroma 96,7 %. Rezultati cepljenja, opravljenega v treh različnih poletnih terminih v letu 2008, bodo znani ob brstenju spomladi 2009.

#### 4 SKLEPI

Rezultati spremljanja navzočnosti prenašalcev in zdravstvenega stanja matičnih rastlin so pokazali, da v obeh opazovanih letih v mrežniku ni bilo najdenih prenašalcev karantenskih škodljivih organizmov, niti drugih fitofagnih žuželk. Prav tako v letih 2007 in 2008 ni bil ugotovljen pojav karantenskih škodljivih organizmov fitoplazme ESFY, bakterije *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* ter virusa šarke PPV na drevesih v mrežniku in na kontrolnih drevesih. Rezultati spremljanja razvoja rastlin pri sorti 'Redhaven' so pokazali višjo rast dreves v mrežniku z daljšimi poganjki, medtem ko je bilo povprečno število brstov/drevo, ki jih uporabljamo za cepljenje, v letu 2008 podobno na drevesih v mrežniku, kot na tistih zunaj. Iz opravljenih analiz založenosti z ogljikovimi hidrati v skorji poganjkov lahko sklepamo, da je kakovost poganjkov iz dreves, ki so rasla v mrežniku ter na prostem povsem primerljiva.

#### 5 ZAHVALA

Delo, ki ga obravnava prispevek, poteka v okviru Ciljnega raziskovalnega programa, št. V4-0343 in ga finančno podpirata Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije ter Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Za podporo 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.
- 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.
- 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.
- Dolenc Šturm, K., Štampar, F., Usenik, V. 1999. Evaluating of some quality parameters of different apricot cultivars using HPLC method. *Acta Alimentaria*, 28: 297-309.
- 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
- 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.
- 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. In S. Razin and J. G. Tully (ed.), *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.