

## **OBSEG PRENOSA FITOPLAZME AP (*CANDIDATUS PHYTOPLASMA MALI*) V ODVISNOSTI OD NAČINA CEPLJENJA**

Mojca LEŠNIK<sup>1</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>2</sup>, Nataša MEHLE<sup>3</sup>, Jernej BRZIN<sup>4</sup>, Mario LEŠNIK<sup>5</sup>

<sup>1</sup> KGP RS, Inšpektorat RS za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano, Fitosanitarna inšpekcija  
Maribor

<sup>2,3,4</sup> Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

<sup>5</sup> Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Maribor

### **IZVLEČEK**

Pri jablanah sedmih sort ('Zlati delišes', 'Idared', 'Braeburn', 'Fuji', 'Gala', 'Elstar' in 'Jonagold') smo preučevali obseg prenosa fitoplazme AP (*Candidatus phytoplasma mali*) z okuženih matičnih dreves na sadike v odvisnosti od načina cepljenja. Sadike gojene v mrežniku, ki je preprečeval dostop žuželk prenašalk AP, smo več let zapored pridobili s cepljenjem na živo oko, izvedenem v februarju, in s postopkom ploščicaste okulacije v začetku avgusta. Skozi vsa obdobja smo sadike natančno opazovali in beležili pojavljanje znamenj okužbe z AP in opravljali laboratorijska testiranja za dokazovanje okuženosti z AP (ELISA in PCR). Povprečni delež okuženih sadik, ugotovljen z uporabo laboratorijskih metod, je bil pri okuliranih sadikah (enoletne 27-46 %, dvoletne 44-51 % in triletne 59 %) podoben kot pri kopuliranih sadikah (enoletne 16–36 %, dvoletne 43-48 % in triletne 52 %). Obseg prenosa AP fitoplazme v zimskem času ni bil statistično značilno različen od obsega pri poletnih cepljenih.

**Ključne besede:** drevesnica, fitoplazma metličavost jablan "*Candidatus phytoplasma mali*", jablana, prenos bolezni, razmnoževanje

### **ABSTRACT**

#### **TRANSMISSION OF AP PHYTOPLASMA (*CANDIDATUS PHYTOPLASMA MALI*) IN RELATION TO THE METHOD OF PROPAGATION**

The transmission rate of Apple proliferation phytoplasma – "*Candidatus phytoplasma mali*" (AP) from infected mother trees to apple tree stocks of seven cultivars ('Golden delicious', 'Idared', 'Braeburn', 'Fuji', 'Gala', 'Elstar' and 'Jonagold') was studied in relation to the methods of propagation. Healthy rootstocks were top-grafted in February or budded in August with different apple cultivars infected with AP phytoplasma and were maintained under greenhouse conditions for four years. During the experiment the infected stocks were identified by laboratory testing of AP phytoplasma, using ELISA and PCR methods, and were monitored for presence of disease symptoms. The average portion of infected stocks detected by laboratory testing in budded stocks (27 - 46% one-year old, 44 - 51% two-year old, 59% three-year old stocks) was similar to the one of grafted stocks (16 – 36% one-year old, 43-48% two-year old, 52% three-year old stocks). The transmission rate obtained by

<sup>1</sup> mag. agr. znan., Vodovodna 34, SI-2000 Maribor

<sup>2</sup> izr. prof., dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1001 Ljubljana

<sup>3</sup> mag. mikrobiol. znan., prav tam

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

<sup>5</sup> izr. prof., dr. agr. znan., Vrbanska 30, SI-2000 Maribor

grafting in dormant season did not statistically significantly differ from transmission rate obtained by summer budding.

**Key words:** Apple, apple nursery stock, Apple proliferation phytoplasma, disease transmission rate, plant propagation

## 1 UVOD

Metličavost jablan je gospodarsko pomembna bolezen jablan, ki jo povzroča fitoplazma Apple proliferation (AP), (danes *Candidatus* Phytoplasma mali - Seemuller in Schneider, 2004) in je uvrščena na seznam škodljivih organizmov, katerih vnos in širjenje v državah članicah EU sta prepovedana (seznam I.A.II iz priloge I, del A Direktive Sveta št. 2000/29/ES) in na listo karantenskih škodljivih organizmov organizacije EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Na širšem območju Evrope je kljub temu trajno zastopana. Njeno pojavljanje in širjenje je pod uradno predpisanim nadzorom, kar zlasti velja za drevesnice in matične nasade. V mnogih deželah Evrope je najpomembnejša bolezen jablan (Seemuller s sod., 2003).

V zadnjem desetletju se je obseg okužb s to fitoplazmo v naših nasadih jablan povečal (Seljak in Petrovič, 2001; Petrovič s sod., 2001). Povečal se je tudi obseg okužb v mladih sadovnjakih. Podobno poročajo tudi iz jugozahodne Nemčije (Fried, 2003a, 2003b) in Južne Tirolske (Fried, 2003a; Vindimian s sod., 2003). V preteklosti nismo izvajali sistematično testiranj dreves za dokazovanje okuženosti z AP. Podatki o pojavljanju so bili zbrani le na podlagi vizualnega opazovanja. Postavlja se vprašanje ali se obseg okužb dejansko povečuje ali se je povečal le obseg pojavljanja znamenj na sicer latentno okuženih drevesih. V drevesnicah pred nekaj desetletji nismo opažali velikega števila sadik z dobro izraženimi znamenji okužb, strokovnjaki v starejši literaturi navajajo, da se znamenja le redko pojavijo, medtem, ko v novejši literaturi poročajo, da se bolezen pojavlja tudi v drevesnicah (Petruschke in Rissler, 2003). V zadnjem desetletju se je spremenila tudi intenzivnost pridelovanja sadik jablane (obilno gnojenje z dušičnimi gnojili, obilno in pogosto namakanje, uporaba rastnih regulatorjev, poletno odstranjevanje mladih lističev ob vršičkih...). Tak način pridelovanja lahko izzove pojav znakov okužbe z AP že v drevesnici. V zadnjem času se vse bolj uveljavlja spomladansko cepljenje s kopulacijo na živo oko. Med strokovnjaki prevladuje mnenje, da so možnosti za prenos fitoplazme pri cepljenju na živo oko (kopulacija; odvzem cepičev v januarju ali februarju) manjše kot pri cepljenju na speče oko poleti (okulacija; odvzem očesa v avgustu). Še danes lahko v literaturi zasledimo nasprotujoče si ugotovitve glede obsega prenosa AP fitoplazme pri postopkih pridelave sadilnega materiala. Zato bi bilo potrebno proučiti, kakšen vpliv ima tehnologija vzgoje sadik na obseg prenosa bolezni v naših pridelovalnih razmerah. V obdobju po letu 2000 smo izvedli številne domače poskuse, katerih rezultati še niso bili temeljito predstavljeni in primerjani z rezultati raziskav iz tujine.

## 2 MATERIAL IN METODE DE LA

Z namenom, da bi proučili vpliv različnih načinov cepljenja (na speče in živo oko) pri vzgoji jablanovih sadik na stopnjo prenosa fitoplazme metličavosti jablan – AP na sadike jablan smo leta 2001 zasnovali poskusno drevesnico. Kot vir cepičev in očes, iz katerih smo vzgajali okužene in zdrave sadike, smo izbrali 14 zdravih in 14 s fitoplazmo metličavosti jablan okuženih matičnih dreves, katera so bila večkrat preverjena glede okužbe z AP z laboratorijskimi metodami (ELISA in PCR) (Brzin in sod., 2003). Proučevali smo sorte: 'Jonagold', 'Zlati delišes', 'Braeburn', 'Elstar', 'Gala', 'Fuji' in 'Idared'. Cepili smo na enoletne VF certificirane podlage EMLA M9, ki so bile brez AP fitoplazme. Zarodni grmi iz katerih so bile odvzete podlage so bili prav tako testirani na AP fitoplazmo.

Pri vsakem od različnih načinov cepljenja (okulaciji, kopulaciji) smo vsako od treh poskusnih let vzgojili veliko število sadik (najmanj 8 pri vsaki od 7 preučevanih sort), ki smo jih nato opazovali in testirali.

Zdrave in okužene sadike smo vzgajali po enaki tehnologiji in jih tri leta vzdrževali v enakih razmerah v poskusni drevesnici. Drevesnica se je nahajala v mrežniku in sadike so bile popolnoma zaščitene pred žuželkami s fino mrežo (luknje 1,5 x 1,5 mm). Sadike smo najmanj šestkrat letno tretirali z insekticidi, z namenom, da smo dodatno preprečili prenos fitoplazme s prenašalci. Poskušali smo čim bolj simulirati pridelavo sadik, kot je običajna v drevesnicah.

Vzorci za izvedbo laboratorijskega testiranja smo tri leta zapored (2001, 2002, 2003) odvzeli v jesenskem obdobju leta (oktober, november). Z vsake sadike smo odvzeli dva ali tri poganjke z vsaj 8 dobro razvitimi listi. Če smo na sadikah opazili kakršna koli znamenja okužbe z metličavostjo, smo v vzorec vključili poganjek z znamenji. V primeru, ko znamenj nismo opazili, smo odvzeli v vzorec prvi terminalni in en ali dva stranska poganjka. Ista sadika je bila testirana večkrat v različni starosti.

Postopki laboratorijskega testiranja, ki so bil uporabljeni, so opisani in objavljeni v članku Brzin in sod. (2003).

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Iz preglednice 1 je razvidno, da ni bilo velikih razlik med končnim obsegom prenosa fitoplazme pri zimskih ali poletnih cepljenjih in da ugotovljena stopnja prenosa fitoplazme narašča s starostjo sadik. To pomeni, da z metodami laboratorijskega testiranja nekatere sadike v prvem letu starosti niso bile spoznane za okužene, pozneje, ko je koncentracija fitoplazme v njih narasla, pa smo okuženost z laboratorijskim testiranjem lahko dokazali.

Preglednica 1: Prikaz obsega prenosa AP fitoplazme, ugotovljenega z metodo laboratorijskega testiranja (ELISA in/ ali PCR) v odvisnosti od starosti sadike v času testiranja

Vrsta sadike* in leto cepljenja:	Starost sadike v času testiranja (mesece):	Ugotovljen obseg prenosa fitoplazme s cepljenjem v (%). Vsak podatek je pridobljen na podlagi testiranja 56 sadik.
<b>Oku 2000</b>	15	26,7 %
<b>Oku 2000</b>	27	51,7 %
<b>Oku 2000</b>	39	58,9 %
Kop 2001	9	16,1 %
Kop 2001	21	42,8 %
Kop 2001	33	51,8 %
<b>Oku 2001</b>	15	41,1 %
<b>Oku 2001</b>	27	44,7 %
Kop 2002	9	26,8 %
Kop 2002	21	48,2 %
<b>Oku 2002</b>	15	46,4 %
Kop 2003	9	35,7 %

\*Oku - sadike pridobljene s postopkom okulacije; Kop - sadike pridobljene s postopkom kopulacije

Če primerjamo zgolj podatke za končni obseg prenosa (obseg pri najvišji starosti sadik) ugotovimo, da med obema načinoma cepljenja, glede obsega prenosa fitoplazme, ni bilo izrazito velikih razlik. To spoznanje je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji, da bo obseg prenosa pri zimskih cepljenjih značilno manjši, kot pri poletnih cepljenjih. V zimskem obdobju naj bi bila populacija živih fitoplazem v nadzemnem delu rastlin izredno majhna

(Schaper in Seemüller, 1982; Seemüller s sod., 1984; Karte in Seemüller, 1988). V poskusih izvedenih v obdobju več kot enega desetletja ali dveh pri postopku kopulacije v času zimskega mirovanja, večinoma sploh niso uspeli prenesti fitoplazme, ali pa je bil prenos majhen, le nekaj odstotkov. Pogosto so bili rezultati večletnih raziskav izredno variabilni. Naši rezultati potrjujejo opazovanja Vindimiana s sodelavci (2003) in Lindnerja (2003), ki sta poročala o visoki stopnji prenosa pri cepljenju v času mirovanja, v primerjavi z obdobjem aktivne rasti rastlin. V novejšem obdobju je Petruschke (2003) izvajal zimsko cepljenja pri sortah 'Idared' in 'Zlati delišes', v okolici mesta Karlsruhe-Augustenberg v enakem obdobju, kot mi. Ugotovili so, da je bil prenos v mili zimi 2000/2001 večji kot v ostri zimi 2001/2002, ko prenosa sploh niso potrdili. Mi smo v enakem obdobju, pri približno primerljivih zimah, dobili bistveno večji prenos pri enakih sortah. Tudi v njihovem poskusu so testiranje sadik po letu dni ponovili, vendar se rezultati pri testiranju v prvem in drugem letu, niso bistveno razlikovali. Tudi ta rezultat se ne ujema z našim, saj smo mi pri laboratorijskem testiranju dveletnih sadik, dokazali večji delež okuženih sadik v primerjavi z enoletnimi. To pomeni, da je koncentracija fitoplazem v letu dni razvoja sadik očitno narasla. Pri enoletni sadiki je bila še pod mejo detekcije, pri dvoletni pa že nad njo. Upoštevati moramo, da smo testirali zgolj listne žile in ne tudi korenin, kjer so koncentracije fitoplazem skozi vse leto bolj izenačene. Po Petruschkejevih ugotovitvah (2003), je mesec marec najbolj varen za odvzem cepičev, kajti takrat so možnosti za prenos fitoplazme najmanjše, še vedno pa niso izključene. Podobne raziskave v zvezi s prenosom fitoplazme s cepljenjem sta delala tudi Pedrazzoli in Filippi (2008). Njune raziskave potrjujejo najnižjo stopnjo prenosa v času jemanja cepičev od marca do maja, nasprotno obseg prenosa AP fitoplazme v naših raziskavah v zimskem času ni bil statistično značilno različen od obsega pri poletnih cepljenjih. Upoštevati moramo, da rezultati različnih raziskav niso vedno neposredno primerljivi med sabo. V naši raziskavi smo pri laboratorijskih testiranjih uporabljali tudi bolj občutljivo PCR metodo, medtem ko sta Pedrazzoli in Filippi (2008) uporabljala le ELISA. Prav tako je bila starost sadik v času testiranja različna, kar bistveno vpliva na rezultat testiranja pojava okužbe. Mi smo testirali starejše sadike.

V preteklosti so na splošno v poskusnih cepljenjih v zimskem času ugotavljali bistveno manjši obseg prenosa fitoplazme, kot to ugotavljamo v obdobju zadnjega desetletja. Mislimo, da sta za to dva osnovna vzroka. Prvi so klimatske spremembe (toplo vreme pozno v jesenske mesece in mile zime), ki povzročajo spremembo fizioloških razmer v floemih dreves v smeri, ki omogoča bistveno večjo stopnjo preživetja fitoplazem. Drugi vzrok lahko iščemo v sistemu izvajanja poskusov v preteklosti in v občutljivosti detekcijskih metod. V mnogih poskusih so sadike pridobljene pri poskusnih cepljenjih opazovali le eno rastno dobo in iz tega skleпали, da niso okužene. Zelo verjetno je v njih bilo le manjše število fitoplazem, ki pa jih niso uspeli detektirati zaradi premalo občutljivih testov. Predvidevamo, da ima na uspeh prenosa AP vpliv izhodiščna koncentracija fitoplazme v cepiču. V našem poskusu smo cepiče jemali na opazno okuženih drevesih na vejah, kjer so bila opazna znamenja in na vejah, kjer znamenj ni bilo mogoče opaziti. Prikazani rezultati prenosa so povprečje obojih razmer. V pridelavi lahko prihaja do tega, da jemljemo cepiče iz latentno okuženih dreves, kjer ni nobenih vidnih znamenj okužbe in je zaradi tega predvidena stopnja prenosa nižja kot v našem poskusu. Pri tovrstnih poskusih je težava tudi v tem, ker nimamo primerljivih koncentracij fitoplazem v floemih dreves oz. cepičev, ki so bili uporabljeni v različnih poskusih. Različno okužen poskusni material (koncentracija fitoplazem v cepiču) lahko vpliva na rezultate poskusov. Po drugi strani pa je pomemben tudi vpliv fizioloških razmer v sadiki glede floemskih razmer za uspešno razmnoževanje fitoplazem. Za uspešno medsebojno primerjanje tovrstnih poskusov bi morali razpolagati s podatki o koncentracijah fitoplazem v izhodiščnem materialu in sadike testirati z enakimi laboratorijskimi metodami.

#### 4 SKLEPI

Na osnovi opravljene raziskave lahko sklepamo:

- V povprečju lahko pri cepljenjih med zimskim mirovanjem (odvzem cepičev konec januarja ali v začetku februarja) v povprečnih slovenskih razmerah, pričakujemo vsaj 52 % prenos AP fitoplazme, pri cepljenih na speče oko (odvzem očes konec julija ali v začetku avgusta) pa 59 % prenos.
- Zgoraj navedeni podatki veljajo za razmere, ki so podobne razmeram v našem poskusu. Pri jemanju cepičev in očes z latentno okuženih dreves je verjetno obseg prenosa AP fitoplazme nekaj manjši.
- Strategija pridelave neokuženih sadik mora temeljiti na uporabi kakovostnega certificiranega razmnoževalnega materiala, na temeljitem večkratnem zatiranju vektorjev, pogosti vizualni kontroli pojava znamenj in laboratorijskem testiranju. Pri jemanju cepičev z matičnih jablanovih dreves v zimskem času se ne moremo zanašati na to, da je obseg prenosa fitoplazme v tistem času majhen.

#### 5 ZAHVALA

Raziskave so potekale v okviru aplikativnega projekta Z4-3290, ki sta ga financirali Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano RS in Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo RS.

#### 6 LITERATURA

- Brzin, J., Ermacora, P., Osler, R., Loi, N., Ravnikar, M., Petrovič, N. 2003. Detection of apple proliferation phytoplasma by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees. *Journal of Plant Disease and Protection*, 110(5):476-483.
- Fried, A. 2003a. Internationale Arbeitsgruppe Apfeltriebsucht. *Obstbau*, (4): 194-195.
- Fried, A. 2003b. Die Apfeltriebsucht in Nordbaden. *Obstbau Weinbau*, (11): 312-313.
- Karte, S., Seemüller, E. 1988. Variable response within genus *Malus* to the apple proliferation disease. *Zeit. für Pflanzen. und Pflanzenschutz*, 95 (1): 25-34.
- Lindner, L. 2003. Diagnostische Untersuchungen am Baummaterial in Südtirol. *Obstbau Weinbau*, (11): 300-301.
- Schaper, U. in Seemüller, E. 1982. Conditions of the phloem and the persistence of Mycoplasma-like Organisms Associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology*, 72: 736-742.
- Seemüller, E., Schaper, U., Zimbelmann, F. 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzen und Pflanzenschutz*, 91 (4): 371-382.
- Seemüller, E., Berwarth, C., Dicker, E. 2003. Die Apfeltriebsucht wird durch Blattsauger übertragen. *Obstbau*, 4: 212-214.
- 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 Systemic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1217-1226.
- Seljak, G. in Petrovič, N. 2001. Pregled razširjenosti in stanje raziskanosti fitoplazmatskih bolezni vinske trte in sadnega drevja v Sloveniji. *Sodobno kmetijstvo*, 34 (11-12): 466-471.
- Pedrazzoli, F. in Filippi, M. 2008. Apple Proliferation Transmission by Grafting in Different Periods of the Year. *Acta Hort.*, 781: 489-493.
- Petrovič, N., Osler, R., Seljak, G., Brzin, J., Ermacora, P., Loi, N., Carraro, L., Ferrini, F., Reffati, E., Firrao, G., Clair, D., Boudon-Padieu, E., Ravnikar, M. 2001. Prvi rezultati laboratorijskih analiz zastopenosti fitoplazem na sadnem drevju in vinski trti. V: Zbornik predavanj in referatov 5. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, 6-8 marec, 2001, Čatež: 62-63.
- Petruschke, M. 2003. Apfeltriebsucht – Übertragung durch Pfropfungen im Winter. *Obstbau*, (4): 201-202.
- Petruschke, M. in Risser, D. 2003. Apfeltriebsucht – Monitoring in Baumschulen und Erwerbsanlagen Südwestdeutschlands (2001 bis 2002). *Obstbau*, 4: 214-215.

Vindimian, E., Forno, F., Mattedi, L. 2003. Untersuchungen zur Bedeutung der Blattsauger bei der Übertragung der Apfeltriebsucht. *Obstbau*, 4: 207-208.