

# HIGH INFECTION PRESSURE OF ESFY PHYTOPLASMA THREATENS THE CULTIVATION OF STONE FRUIT SPECIES

## VISOK INFEKCIJSKI PRITISK ESFY FITOPLAZME OGROŽA GOJENJE KOŠČIČARJEV

Barbara AMBROŽIČ TURK<sup>1\*</sup>, Nataša MEHLE<sup>2</sup>, Jernej BRZIN<sup>2</sup>, Vojko ŠKERLAVAJ<sup>1</sup>, Gabrijel SELJAK<sup>3</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Institute of Slovenia, Fruit and Wine growing Department, Hacquetova 17, SI - 1000 Ljubljana, Slovenia;

<sup>2</sup>National Institute of biology, Večna pot 111, SI - 1000 Ljubljana, Slovenia;

<sup>3</sup>Agriculture and Forestry Service Nova Gorica, Pri Hrastu 18, SI - 5000 Nova Gorica, Slovenia;

\* Corresponding author: Tel.:+386 1 2805 140; Fax:+386 1 2805 255; e-mail: barbara.a.turk@kis.si

### ABSTRACT

Stone fruit species are affected by severe disease caused by European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY; 'Candidatus Phytoplasma prunorum'). ESFY phytoplasma is transmitted to the host plants of *Prunus* spp. by the vector *Cacopsylla pruni*. The disease is graft-transmissible as well. The occurrence of ESFY phytoplasma was monitored from 2004 to 2006 in a mother plant orchard of stone fruit species planted with virus free material in 2001 in the Primorska region of Slovenia. The total of 158 samples of mother plants were analysed in this period. The symptomatic and asymptomatic trees were analysed using molecular methods (PCR or nested-PCR). Among 15.7 % of sampled apricot trees (*Prunus armeniaca*) in the orchard, ESFY phytoplasma was detected in 70.0 % of samples. In the case of Japanese plum (*Prunus salicina*) samples were taken from one third of all Japanese plum trees and the presence of ESFY phytoplasma was confirmed in all samples. In the European plum trees (*Prunus domestica*) the incidence of phytoplasma was determined in 51.0 % of sampled trees, where the plants in most cases did not show symptoms. ESFY phytoplasma was also detected in peaches and nectarines (*Prunus persica*) in 13.0 % of sampled trees while no detection of the phytoplasma was confirmed in the samples of cherry trees (*Prunus avium*). With the survey performed in a mother plant orchard it was observed that especially young trees did not show typical symptoms and the infection was latent. In the year 2005, ESFY phytoplasma was detected in all tested samples of the vector *Cacopsylla pruni* captured in the vicinity of the mother plant orchard.

KEY WORDS: stone fruit species, disease control, phytoplasma, ESFY, diagnosis, Slovenia

### IZVLEČEK

European stone fruit yellows fitoplazma (ESFY; 'Candidatus Phytoplasma prunorum') povzroča pri koščičastih sadnih vrstah nevarno bolezen leptonekrozo koščičarjev. ESFY fitoplazma se na gostiteljske rastline iz roda *Prunus* prenaša z vektorjem češpljevo bolšico (*Cacopsylla pruni*), kakor tudi z vegetativnim razmnoževanjem. V nasadu koščičastih sadnih vrst, posajenem leta 2001 z brezvirusnim matičnim materialom, je bilo v letih 2004 – 2006 spremljano stanje glede okuženosti z ESFY fitoplazmo ter skupno odvzetih 158 vzorcev. Pri vseh sadnih vrstah so bila vzorčena tako simptomatična, kot asimptomatična drevesa. Od 15.7 % vzorčenih dreves marelic (*Prunus armeniaca*) v nasadu, je bila prisotnost fitoplazem potrjena pri 70.0 % vzorčenih drevesih. Pri slivah kitajsko- japonskega izvora (*Prunus salicina*) je bilo vzorčenje opravljeno pri tretjini matičnih rastlin, prisotnost ESFY fitoplazme je bila dokazana pri vseh vzorčenih rastlinah. Pri evropski slivi (*Prunus domestica*) je bila okuženost s fitoplazmami potrjena pri 51.0 % vzorčenih rastlin, pri čemer rastline večinoma niso kazale vidnih bolezenskih znamenj. Prisotnost ESFY fitoplazme je bila potrjena tudi pri 13.0 % vzorčenih drevesih breskve (*Prunus persica*). Pri češnji (*Prunus avium*) prisotnost fitoplazme ESFY ni bila potrjena. ESFY fitoplazma je bila v letu 2005 z laboratorijskim testiranjem potrjena tudi v vseh analiziranih vzorcih prenašalca *Cacopsylla pruni*.

KLJUČNE BESEDE: koščičaste sadne vrste, spremljanje bolezni, fitoplazma, ESFY, laboratorijska diagnostika, Slovenija

## DETAILED ABSTRACT

European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY; 'Candidatus Phytoplasma prunorum') belongs to the apple proliferation (AP) group of phytoplasmas [14]. It is associated with a severe disease that affects stone fruit species, which can show different sensitiveness to the infection and different expression of the symptoms. It causes economically important disorders in apricot (*Prunus armeniaca*), Japanese plum (*Prunus salicina*) and peach (*Prunus persica*). European plum (*Prunus domestica*) is susceptible to the infection but generally does not show symptoms, which represents a hidden source of infection [7]. In contrast to that *Prunus avium* demonstrated a high level of resistance to ESFY [8]. ESFY phytoplasma is transmitted to the host plants of *Prunus* spp. by the vector *Cacopsylla pruni*, which enables rapid spread of the disease. The pathogen is also transmitted by grafting. Therefore, it is of great importance to use healthy propagating/ planting material [6].

In the framework of the survey for the presence of ESFY phytoplasma in the mother plant material, the sampling of peaches, nectarines, apricots, Japanese plums, European plums and cherries was done in a mother plant orchard in the years 2004 to 2006. The orchard was planted with virus free material in 2001 in the Primorska region in the south-western part of Slovenia, where stone fruits are mainly cultivated. The symptomatic and asymptomatic trees were sampled. Each sample represented the material of one single mother plant. Four shoots per sample were taken randomly from different parts of the crown in the case of symptomless trees while shoots with symptoms were chosen in the case of symptomatic plants. The roots were taken additionally in 24.0 % of sampled trees in 2004 and 2005 to detect possible latent infections whereas in 2006 only roots were taken in most samples for the same purpose. In 2005, five samples of the vector *Cacopsylla pruni* were tested for the presence of the ESFY phytoplasma. Molecular methods (PCR or nested PCR) were applied for the detection of ESFY phytoplasma both in plants and in insects. In the case of positive results, infected trees were eliminated from the orchard.

In total, 158 samples of mother plants were tested for the presence of ESFY phytoplasma in 2004 – 2006. The share of positive samples was 54.2 % in the case of symptomatic trees and 26.4 % when symptomless trees were tested (Table 1). Among 15.7 % of apricot trees (*Prunus armeniaca*) sampled in the orchard, phytoplasma was detected in 70.0 % of the samples (Table 2). Symptomatic and asymptomatic apricot trees were tested with 78.6 % and 50.0 % positive results respectively (Table 3). Beside high percentage of infected trees confirmed with analyses, a high occurrence of sudden wilting and dieback of apricot

trees (55 %) was observed in the orchard in the spring of 2005 (data not presented in the tables), which could have happened from different reasons. Finally, all apricot trees were removed from the orchard in 2005. In the case of Japanese plum (*Prunus salicina*) samples were taken from one third of all Japanese plum trees in the orchard, from symptomatic as well as symptomless trees (Table 3) and the presence of ESFY phytoplasma was confirmed in all samples (Table 2). In the European plum trees (*Prunus domestica*) the incidence of phytoplasma was detected in 51.0 % of sampled trees that in most cases did not show symptoms (Tables 2, 3), which is in accordance with the reports in the literature [4]. In the case of peaches and nectarines (*Prunus persica*) ESFY phytoplasma was detected in 13.0 % of sampled trees as it is seen from Table 2. Among sampled trees, approximately two thirds were symptomless, of which only 3.6 % resulted positive whereas from symptomatic trees 36.4 % were positive (Table 3). Cherry trees (*Prunus avium*) were checked as well, but no presence of the phytoplasma was confirmed (Table 3). In 4 samples of apricot and European plum trees, the presence of apple proliferation phytoplasma (AP; 'Candidatus Phytoplasma mali') was confirmed using methods of nested PCR and RFLP [10]. Among them, the apple proliferation phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma mali') was confirmed in 3 samples also by DNA sequencing (data not presented in the tables). PCR analyses of *Cacopsylla pruni* samples taken in the vicinity of the orchard detected the presence of ESFY phytoplasma in all tested samples (5 samples).

The results of the survey for the presence of the ESFY phytoplasma in the studied orchard revealed a high occurrence of the disease, particularly in the apricot, Japanese plum and European plum, which indicated a high infection pressure in the area. Despite performing necessary measures the disease has spread considerably. In such conditions, maintenance of mother plants in an insect-proof net-house as a protection against vectors should be a proper and the most efficient step toward producing a healthy propagating/ planting material.

## UVOD

Bolezen klorotičnega zvijanja listov koščičarjev, imenovana leptonekroza koščičarjev, ki jo povzroča European stone fruit yellows fitoplazma (ESFY; 'Candidatus Phytoplasma prunorum') iz skupine fitoplazem metličavosti jablan [14], pridobiva pri koščičastih sadnih vrstah nevarne razsežnosti, tako v Evropi, kot tudi pri nas [3]. Fitoplazme povzročajo neozdravljiva obolenja rastlin. ESFY fitoplazma se na gostiteljske rastline iz roda *Prunus* prenaša z vektorjem

Preglednica 1: Vzorčenje v letih od 2004 do 2006 z rezultati laboratorijskega testiranja na prisotnost fitoplazem v matičnem nasadu koščičarjev

Table 1: Sampling performed in mother plant orchard of stone fruits from 2004 – 2006 with the laboratory results for the presence of phytoplasmas

Termin vzorčenja / period of sampling	Število vzorcev/ no. of samples	Rezultati lab. testiranja / results of lab. analyses					
		negativni vzorci / negative samples		pozitivni vzorci / positive samples		nepotrjen sum / unconfirmed suspicion	
		število / number	%	število / number	%	število / number	%
1. Jesen 2004 <sup>a</sup> / autumn 2004 <sup>a</sup>	3	2	66.7	1	33.3	0	0.0
Jeseni 2004 <sup>b</sup> / autumn 2004 <sup>b</sup>	22	7	31.8	11	50.0	4	18.2
2. Pomlad 2005 <sup>a</sup> / Spring 2005 <sup>a</sup>	37	29	78.4	6	16.2	2	5.4
Pomlad 2005 <sup>b</sup> / spring 2005 <sup>b</sup>	11	4	36.4	7	63.6	0	0.0
3. Jesen 2005 <sup>a</sup> / autumn 2005 <sup>a</sup>	1	1	100.0	0	0.0	0	0.0
Jesen 2005 <sup>b</sup> / autumn 2005 <sup>b</sup>	13	6	46.2	7	53.8	0	0.0
4. 2006 <sup>a</sup>	69	45	65.2	22	31.9	2	2.9
2006 <sup>b</sup>	2	1	50.0	1	50.0	0	0.0
<b>Skupaj<sup>a</sup> / total<sup>a</sup></b>	<b>110</b>	<b>77</b>	<b>70.0</b>	<b>29</b>	<b>26.4</b>	<b>4</b>	<b>3.6</b>
<b>Skupaj<sup>b</sup> / total<sup>b</sup></b>	<b>48</b>	<b>18</b>	<b>37.5</b>	<b>26</b>	<b>54.2</b>	<b>4</b>	<b>8.3</b>
<b>SKUPAJ/ TOTAL</b>	<b>158</b>	<b>95</b>	<b>60.1</b>	<b>55</b>	<b>34.8</b>	<b>8</b>	<b>5.1</b>

<sup>a</sup> vzorci brez opaženih bolezenskih znamenj v času vzorčenja /<sup>a</sup> symptomless samples in the time of sampling<sup>b</sup> vzorci z bolj ali manj izraženimi bolezenskimi znamenji v času vzorčenja /<sup>b</sup> samples with more or less expressed symptoms in the time of sampling

češpljevo boljšico (*Cacopsylla pruni*), s čimer se bolezen naglo širi [5]. Dokazan je tudi že prenos ESFY fitoplazme z breskovim škržatom (*Empoasca decedens*) pri marelici [11]. ESFY fitoplazma se širi tudi z vegetativnim razmnoževanjem. Pri nekaterih koščičastih sadnih vrstah povzroča veliko ekonomsko škodo.

Sadne vrste iz roda *Prunus* kažejo različno dovzetnost na okužbo z ESFY fitoplazmo, kakor tudi različno občutljivost in posledično različno izražanje bolezenskih znamenj. Predvsem marelica (*Prunus armeniaca*), kitajsko-japonska sliva (*Prunus salicina*) in breskev (*Prunus persica*) so za okužbo z ESFY zelo občutljive in kažejo izrazita bolezenska znamenja z zvijanjem ter rumenjenjem listov, ki se nadaljuje z odmiranjem delov in nato cele rastline, zlasti pri občutljivih sortah [6]. Različne vrste sliv *Prunus domestica* (evropska sliva), *Prunus spinosa* (črni trn) in *Prunus cerasifera* (mirabolana) so prav tako zelo dovzete za okužbo, vendar pa ne kažejo bolezenskih znamenj, kar pomeni, da so tolerantne [7]. Z epidemiološkega vidika so zato navedene vrste sliv

problematične, ker predstavljajo prikrit vir za širjenje okužb. Črni trn (*Prunus spinosa*), ki je v naravi splošno razširjen v divjih sestojih, predstavlja pomemben infekcijski potencial ESFY fitoplazme, še zlasti zato, ker je zelo vabljev gostitelj češpljeve boljšice. Nasprotno pa je pri češnji (*Prunus avium*) ugotovljena višja stopnja odpornosti na okužbo z ESFY [8]. V Sloveniji se soočamo z velikim infekcijskim pritiskom. Tudi značilna okoljska in biotična raznovrstnost ter možnost prikritih okužb prispevata k hitremu širjenju okužb.

Zaradi preprečevanja širjenja je pomemben nadzor te bolezni v matičnih nasadih in drevesnicah, kjer se prideluje sadilni material. Zato smo v nasadu koščičastih sadnih vrst na Primorskem, ki je bil posajen z brezvirusnim matičnim materialom leta 2001, spremljali prisotnost ESFY fitoplazme na matičnih rastlinah in izvajali laboratorijska testiranja. V nadaljevanju prispevka so prikazani rezultati spremljanja te bolezni v letih 2004, 2005 in 2006.

## MATERIAL IN METODE

Nasad košičarjev na Primorskem, v Vipavski dolini, je bil posajen leta 2001 z brezvirusnimi matičnimi sadikami breskev in nektarin, marelic, sliv evropskega in kitajsko-japonskega izvora, češenj, višenj in mandlja, s skupno 77 sortami, v skupni količini 841 sadnih sadik. Nekatere naključno izbrane matične rastline so bile ob sajenju testirane na prisotnost ESFY fitoplazme, rezultat testiranja pa je bil negativen.

Vzorčenja matičnih rastlin za testiranje na prisotnost ESFY fitoplazme so bila v letih od 2004 do 2006 opravljena v pomladnem in jesenskem času. Skupno je bilo odvzetih 158 vzorcev marelic, kitajsko-japonskih in evropskih sliv, breskev in nektarin ter češenj. Vzorec je predstavljal material ene matične rastline. Leta 2004 in 2005 so bili vzorčeni enoletni poganjki z listi, dolžine 50 cm. Pri 24.0 % vzorcev so bile poleg poganjkov dodatno vzorčene tudi korenine. Leta 2006 so bile v večini primerov vzorčene samo korenine (69 od 71 vzorcev) z namenom ugotavljanja prikritih okužb. Pri vzorčenju matičnih rastlin brez značilnih znamenj bolezní, ki jih povzroča ESFY fitoplazma, so bili poganjki nabrani iz različnih delov krošnje, 4 poganjki za vzorec. Pri vzorčenju rastlin, kjer so bili opaženi znaki bolezní, so bili vzorčeni poganjki z bolezenskimi znamenji. V primeru potrditve prisotnosti fitoplazem v vzorčenih rastlinah so bile okužene rastline izkrčene. ESFY fitoplazmo smo leta 2005 določali tudi v 5 vzorcih prenašalca češpljeva bolšica (*Cacopsylla pruni*), nabranih v oddaljenosti od 1 km do 6 km od obravnavanega matičnega nasada.

Za molekularno biološke analize smo izolirali celokupno DNA iz listnih žil ali iz prevodnega

tkiva lubja in iz prenašalcev ESFY fitoplazme po predhodnem koncentriranju fitoplazem z diferencialnim centrifugiranjem [1] ter iz prevodnega tkiva korenin po prirejenem postopku kot v Brzin in sod. [2]. DNA fitoplazem sadnega drevja smo analizirali z vgnezdno verižno reakcijo s polimerazo (nested PCR). V prvi PCR reakciji smo uporabili nekoliko modificiran univerzalni par oligonukleotidnih začetnikov P1/P7, ki pomnožuje DNA vseh tipov fitoplazem [13]. Produkta prve reakcije smo 100-krat redčili v vodi in pomnoževali v drugi reakciji z uporabo oligonukleotidnih začetnikov f01/r01, ki so specifični za fitoplazme iz skupine metličavosti jablan [9] ter v primeru negativnega rezultata še z univerzalnimi oligonukleotidnimi začetniki U3/U5 [9]. Identiteto ESFY fitoplazme smo preverili z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) [13] po obdelavi PCR produkta z encimoma BsaAI (New England Biolabs, VB) in Ssp I (Promega, USA) ter po potrebi z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja DNA (sekveniranje PCR ali nested PCR produkta, kloniranega v pGEM-T vektor). V primeru, da smo z univerzalnimi oligonukleotidnimi začetniki dobili pozitiven rezultat, ki pa ga nismo uspeli potrditi s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki, smo vzorec zaključili kot nepotrjen sum.

## REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri izvajanju kontrole zdravstvenega stanja v matičnem nasadu smo z namenom ugotavljanja stanja glede okuženosti z ESFY fitoplazmo opravili vzorčenja v pomladnem in jesenskem obdobju v letih od 2004 do 2006 ter skupno odvzeli 158 vzorcev (preglednica 1). Delež pozitivnih vzorcev, kjer je bila dokazana

Preglednica 2: Število vzorčenih dreves in število okuženih dreves (laboratorijsko potrjena prisotnost fitoplazem) pri vseh terminih vzorčenja v letih od 2004 do 2006 po sadnih vrstah

Table 2: Numbers of sampled and infected trees (positive lab. results) for the samples, obtained in the period 2004 – 2006 for different fruit species

Sadna vrsta / fruit species	Št. dreves v nasadu / no. of trees in the orchard	Št. vzorčenih dreves / no. of sampled trees	% vzorčenih dreves / % of sampled trees	Št. okuženih dreves / no. of infected trees	% okuženih dreves / % of infected trees
<i>P. persica</i>	438	77	17.6	10	13.0
<i>P. armeniaca</i>	127	20	15.7	14	70.0
<i>P. salicina</i>	15	5	33.3	5	100.0
<i>P. domestica</i>	87	51	58.6	26	51.0
<i>P. avium</i>	118	5	4.2	0	0.0
<b>SKUPAJ / TOTAL</b>	<b>785</b>	<b>158</b>	<b>20.1</b>	<b>55</b>	<b>34.8</b>

prisotnost fitoplazme je bil 54.2 % v primeru testiranja 48 vzorcev z bolj ali manj izraženimi bolezenskimi znamenji in 26.4 % v primeru testiranja 110 vzorcev brez opaženih bolezenskih znamenj (preglednica 1). Od dreves z bolezenskimi znamenji so bila poleg dreves s tipičnimi bolezenskimi znamenji, vzorčena tudi drevesa z manj izraženimi znamenji. Znano je, da so fitoplazme v drevesu razporejene neenakomerno in da so pogosto prisotne v majhni koncentraciji.

Prvo vzorčenje na prisotnost ESFY fitoplazme v matičnem nasadu je bilo opravljeno na 4 letnih drevesih jeseni 2004. V tem času so bila značilna vizualna znamenja boleznj, ki jo povzroča ESFY fitoplazma, slabše izražena. Pri mladih drevesih so bolezenska znamenja pogosto težko prepoznavna; v našem primeru smo v tem terminu opazili le rahlo rumenenje in zvijanje listov. Vzorceni so bili poganjki breskev, marelic, evropske in kitajsko-japonske slive. Rezultati laboratorijskega testiranja so potrdili prisotnost ESFY fitoplazme v 12 vzorcih od skupno 25 vzorcev (preglednica 1). Pri nekaterih vzorcih smo z univerzalnimi oligonukleotidnimi začetniki dobili pozitiven rezultat, ki ga nismo uspeli potrditi s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki (nepotrjen sum).

Spomladi, maja 2005 smo pri marelicah zabeležili velik delež propadanja dreves (55 %) z nenadnim venenjem in odmiranjem posameznih vej ali delov dreves (podatki niso prikazani v preglednicah), kar je lahko posledica okuženosti s fitoplazmami, lahko pa je tudi posledica drugih dejavnikov. Pri vzorčenju spomladi 2005 je

bila pri skupno 4 vzorcih marelice in evropske slive potrjena prisotnost fitoplazme metličavosti jablane (AP; apple proliferation; 'Candidatus Phytoplasma mali') z vgnezdno verižno reakcijo s polimerazo ter z analizo dolžin restriksijskih fragmentov (RFLP). Med njimi je bila pri treh vzorcih fitoplazma AP potrjena tudi z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja DNA [10] (podatki niso prikazani v preglednicah).

V preglednici 2 so prikazani podatki o deležu vzorčenih in okuženih (pozitivnih) rastlin v nasadu po sadnih vrstah pri vzorčenjih, opravljenih v obdobju od 2004 do 2006. Pri marelicah (*Prunus armeniaca*) je bilo skupno vzorčenih 15.7 % dreves. Rezultati testiranja so pokazali, da je bila prisotnost fitoplazem potrjena pri 70.0 % vzorčenih drevesih marelic (preglednica 2). Vzorcena so bila tako drevesa marelic z bolezenskimi znamenji oziroma z znaki sušenja, kot tudi drevesa, ki niso kazala bolezenskih znamenj, z 78.6 % oziroma 50.0 % deležem pozitivnih dreves (preglednica 3).

V primeru ugotavljanja zdravstvenega stanja pri slivah kitajsko-japonskega izvora (*Prunus salicina*) je bilo vzorčenje opravljeno pri 5 matičnih rastlinah, kar predstavlja tretjino matičnih rastlin kitajsko-japonske slive v nasadu (preglednica 2). Potrditev prisotnosti ESFY fitoplazme je bila dokazana pri vseh 5 vzorčenih rastlinah, pri čemer so bila vzorčena tako drevesa z znamenji boleznj, kot tudi drevesa, ki so bila vizualno brez bolezenskih znamenj (preglednica 3).

Pri evropskih slivah (*Prunus domestica*) je bilo vzorčenih skupno 58.6 % matičnih dreves evropske slive v nasadu.

Preglednica 3: Ločen prikaz podatkov o številu vzorčenih in številu okuženih dreves (pozitivni laboratorijski rezultati) z, oziroma brez opaženih bolezenskih znamenj v času vzorčenja (2004-2006) po sadnih vrstah  
Table 3: Separate presentation of the numbers of sampled and infected trees (positive lab. results) for symptomatic and asymptomatic trees for the samples, obtained in the period 2004 – 2006 for different fruit species

Sadna vrsta / fruit species	Drevesa z bolezenskimi znamenji / symptomatic trees			Drevesa brez opaženih bolezenskih znamenj / asymptomatic trees		
	Število vzorčenih dreves / no. of sampled trees	Št. okuženih dreves / no. of infected trees	% okuženih dreves / % of infected trees	Število vzorčenih dreves / no. of sampled trees	Št. okuženih dreves / no. of infected trees	% okuženih dreves / % of infected trees
<i>P. persica</i>	22	8	36.4	55	2	3.6
<i>P. armeniaca</i>	14	11	78.6	6	3	50.0
<i>P. salicina</i>	3	3	100.0	2	2	100.0
<i>P. domestica</i>	6	4	66.7	45	22	48.9
<i>P. avium</i>	3	0	0.0	2	0	0.0
<b>SKUPAJ / TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>26</b>	<b>54.2</b>	<b>110</b>	<b>29</b>	<b>26.4</b>

Rezultati laboratorijskih analiz so potrdili prisotnost fitoplazem pri 51.0 % vzorčenih dreves (preglednica 2). Vzorčene rastline evropske slive, kot tudi preostale evropske slive v nasadu, večinoma niso kazale vizualnih znamenj okužbe s fitoplazmami (preglednica 3). Tudi Carraro s sod. [4] navaja potrditev prisotnosti fitoplazme, ki povzroča leptonekrozo pri slivah, pri asimptomatičnih drevesih nekaterih sort evropske slive.

Iz preglednice 2 je razvidno, da je bilo pri breskvah in nektarinah (*Prunus persica*) v letih od 2004 do 2006 skupno vzorčenih 17.6 % dreves, od katerih je bila pri 13.0 % potrjena prisotnost ESFY fitoplazme. Pri breskvah in nektarinah sta bili namreč obsežni vzorčenji opravljeni 2005 in 2006, ko so bila vzorčena večinoma vitalna drevesa, brez vizualnih znamenj bolezni. Sicer je bilo pri breskvah in nektarinah v obdobju 2004 – 2006 med simptomatičnimi rastlinami pozitivnih 36.4 %, med vzorčenimi rastlinami brez bolezenskih znamenj pa je bilo pozitivnih 3.6 % (preglednica 3).

Pri češnjah (*Prunus avium*) je bila ugotovljena visoka stopnja odpornosti na ESFY fitoplazmo, kar potrjujejo tudi navedbe iz literature [8]. Ker smo predhodno našli AP tudi v češnjah [10], smo vzorčili korenine in poganjke 5 matičnih rastlin češnje, tako z znaki rumenjenja in uvijanja listov, kakor tudi brez bolezenskih znamenj. Prisotnost fitoplazem ni bila dokazana v nobeni vzorčeni rastlini češnje (preglednici 2 in 3).

ESFY fitoplazmo smo z laboratorijskimi testi potrdili leta 2005 tudi v 5 od 5 testiranih vzorcev prenašalke češpljeve bolšice (*Cacopsylla pruni*), ki so bili nabrani v okolici obravnavanega nasada, kar kaže na visok infekcijski pritisk v tej regiji Slovenije in napoveduje težave pri pridelavi koščičarjev (podatki v preglednicah niso prikazani). Češpljeva bolšica je na Primorskem, kot tudi sicer v Sloveniji splošno razširjena, kar omogoča naglo širjenje bolezni leptonekroze koščičarjev [15].

## SKLEPI

Rezultati opravljenih vzorčenj in laboratorijskih analiz kažejo na veliko razširjenost ESFY fitoplazme v proučevanem nasadu, predvsem pri marelicah, kitajsko-japonskih in evropskih slivah. V nasadu je bila poleg ESFY, pri nekaterih vzorcih marelice in evropske slive potrjena tudi fitoplazma metličavosti jablane (AP; apple proliferation; 'Candidatus Phytoplasma mali') [10], ki jo enako kot ESFY uvrščamo v skupino fitoplazem metličavosti jablan. Poleg obsežnega pojava odmiranja dreves marelic v nasadu spomladi 2005, je bila pri marelicah z vzorčenji v letu 2004 in 2005 dokazana prisotnost fitoplazem v 70.0 % vzorčenih rastlin, zato so bila vsa drevesa marelice iz nasada izkrčena. Zaradi

visokega odstotka okuženih dreves in nevarnosti širjenja bolezni, so bila izkrčena tudi vsa drevesa kitajsko-japonske in evropske slive. O hitrem napredovanju bolezni v okuženem nasadu pri marelicah, ki jo povzroča ESFY fitoplazma, poročata tudi Ramel in Gugerli [12]. Tudi pri drugih koščičastih sadnih vrstah je nevarnost širjenja ESFY fitoplazme iz okuženih rastlin velika, kljub različni pojavnosti izražanja simptomov pri različnih sadnih vrstah in sortah [6].

Rezultati opravljenih analiz v letih 2004 – 2006 so pokazali, da je bilo po šestih letih pozitivnih skupno več kot tretjina vzorčenih dreves (55/158), od tega več kot polovica (26/48) pri drevesih z bolj ali manj izraženimi bolezenskimi znamenji in več kot četrtina (29/110) pri drevesih brez bolezenskih znamenj. V začetku izvajanja testiranj v letu 2004 so bila na drevesih opažena bolj netipična znamenja, kasneje pa so bila znamenja obolenja že izrazitejša.

Kljub upoštevanju in izvajanju ukrepov za preprečevanje širjenja škodljivih organizmov se je bolezen klorotičnega zvijanja listov koščičarjev, ki jo povzroča ESFY fitoplazma, v sprva zdravem nasadu že v nekaj letih po sajenju zelo razmahnila. Zaradi velikega infekcijskega pritiska na območju Primorske se soočamo s potrebo po vzdrževanju zdravih matičnih rastlin v zaščiteneh razmerah mrežnika, ki bi rastline varoval pred prenašalci in omogočal pridelavo zdravega cepilnega materiala [16].

## ZAHVALA

Za pomoč pri laboratorijskem določanju fitoplazem se zahvaljujemo Jani Frank in Jani Boben (NIB, Slovenija) ter P. Ermacora (Univerza v Udinah, Italija). Zahvaljujemo se tudi vodji nasada Nikiti Fajt ter fitosanitarni inšpektorici Selmi Devetak za vzorčenje v letu 2006. Za financiranje zdravstvenih pregledov in laboratorijskih testov se zahvaljujemo Fitosanitarni upravi RS.

## LITERATURA

- [1] Ahrens U., Seemüller E., Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene, *Phytopathology* (1992) 82: 828-832.
- [2] Brzin J., Seljak G., Ermacora P., Osler R., Ravnikar M., Petrovič N., Določanje fitoplazme leptonekroze koščičarjev (European Stone Fruit Yellows, ESFY) v Sloveniji, in: Lectures and papers presented at the 6<sup>th</sup> Slovenian Conference on Plant Protection, Ljubljana, 2003, pp. 254-257.

- [3] Brzin J., Petrovič N., Boben J., Hren M., Kogovšek P., Mehle N., Žežlina I., Seljak G., Ravnikar M., Fitoplazme na sadnem drevju, in: Lectures and papers presented at the 7<sup>th</sup> Slovenian Conference on Plant Protection, Maribor, 2005, pp. 248-252.
- [4] Carraro L., Loi N., Ermacora P., Osler R., High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis, *European Journal of Plant Pathology* (1998) 104: 141-145.
- [5] Carraro L., Osler R., Loi N., Ermacora P., Refatti E., Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*, *J. Plant Pathol.* (1998) 80: 233-239.
- [6] Carraro L., Osler R., European stone fruit yellows: a destructive disease in the mediterranean basin, in: Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. (Eds.), *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*, CIHEAM, Options Mediterraneennes Serie B (2003) 45: 113-117.
- [7] Carraro L., Ferrini F., Ermacora P., Loi N., Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma to *Prunus* species by using vector and graft transmission, *Acta Hort.* (2004) 657: 449-453.
- [8] Jarausch W., Eyquard J.P., Mazy K., Lansac M., Dosba F., High level of resistance of sweet cherry (*Prunus avium* L.) towards European stone fruit yellows phytoplasmas, *Advances in Horticultural Science* (1999) 13: 108-112.
- [9] Lorenz K.H., Schneider B., Ahrens U., Seemüller E., Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non ribosomal DNA, *Phytopathology* (1995) 85: 771-776.
- [10] Mehle N., Brzin J., Boben J., Hren M., Frank J., Petrovič N., Gruden K., Dreo T., Žežlina I., Seljak G., Ravnikar M., First report of 'Candidatus Phytoplasma mali' in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*, *Plant Pathology* (2007) 56: 721.
- [11] Pastore M., Raffone E., Santonastaso M., Priore R., Paltrinieri S., Bertaccini A., Simeone A.M., Phytoplasma detection in *Empoasca decedens* and *Empoasca* spp. and their possible role as vectors of European stone fruit yellows (16SrX-B) phytoplasma, *Acta Hort.* (2004) 657: 507-511.
- [12] Ramel M.E., Gugerli P., Epidemiological survey of European stone fruit yellows phytoplasma in two orchards in western Switzerland, *Acta Hort.* (2004) 657: 459-463.
- [13] Seemüller E., Kison H., Lorenz K.H., Schneider B., Marcone C., Smart C.D., Kirkpatrick B.C., Detection and Identification of fruit tree Phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA, in: Manceau C., Spak J. (Eds.), *Abstract Book of Workshop of the nucleic acid-based technology; Advances in the detection of plant pathogens by polymerase chain reaction (Cost 823), Part two – PCR detection of Phytoplasma*, Česke Budejovice, 1998, pp. 56 – 66.
- [14] Seemüller E., Schneider B., '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* (2004) 54 (4): 1217-1226.
- [15] Seljak G., An overview of the current knowledge of jumping plant-lice of Slovenia (Hemiptera, Psylloidea), *Acta Entomologica Slovenica* (2006) 14 (1): 11-34.
- [16] Vajs S., Lešnik M., Ekonomičnost vzgoje matičnih drevcev jablan in breskev v mrežnikih v Sloveniji, in: Lectures and papers presented at the 6<sup>th</sup> Slovenian Conference on Plant Protection, Ljubljana, 2003, pp. 318-329.

