

## Diagnostyka<sup>1</sup> Diagnostic

### *Candidatus* Phytoplasma pyri

#### Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline phytoplasma - fitoplazma zamierania gruszy).

#### Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony we wrześniu 2005 roku.

#### Wprowadzenie

*Candidatus Phytoplasma pyri* jest organizmem szeroko rozpowszechnionym na terenie Europy. Intensywność objawów chorobowych zależy od wielu czynników, włącznie z odmianą, rodzajem podkładki oraz wiekiem drzew. Choroba rozprzestrzeniana jest przez miodówkę gruszoną żółtą (*Cacopsylla pyricola*) (Davies i wsp., 1992). Jest wielce prawdopodobne, że gatunki *C. pyri* oraz *C. pyrisuga* mogą również odgrywać rolę wektorów.

#### Tożsamość

**Nazwa:** *Candidatus* Phytoplasma pyri.

**Synonimy:** Pear decline phytoplasma.

**Stanowisko taksonomiczne:** *Bacteria*, *Firmicutes*, *Mollicutes*, *Acholeplasmatales*, *Acholeplasmataceae*. *P. pyri* należy do grupy fitoplazm 16SrX. Seemüller & Schneider zaproponowali, by nadać im status ‘*Candidatus*’ (2004).

**Kod EPPO:** PHYPPY.

**Kategoria fitosanitarna:** EPPO - lista A2, nr 95; UE - Załącznik I/A2.

#### Wykrywanie

#### Objawy choroby

---

<sup>1</sup> Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Fig.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO

[www.eppo.org](http://www.eppo.org).

Najłatwiejsze do rozpoznania objawy choroby pojawiają się późnym latem. Wówczas to pojawia się przedwczesne, jesienne przebarwienie koloru liści na porażonych drzewach. W przypadku większości odmian obserwuje się przedwczesne czerwienienie (Web Figs. 1 i 2), ale niektóre mogą wykazywać pojawienie się barwy żółtej. Może dochodzić do wywijania się w górę krawędzi blaszki liściowej lub zwijania liści i zazwyczaj obserwuje się przedwczesne ich opadanie. Wiosną, kolejnego roku porażone drzewa wykazują słaby wzrost oraz nieliczne, jasne ulistnienie. Intensywność wiosennych objawów może być mocno zróżnicowana, od braku widocznych zmian, aż po śmierć rośliny. Może występować pasmo nekrotycznej tkanki w korze, w miejscu zrostu, pomiędzy zrazem a podkładką.

Wystąpienie przedwczesnego jesienno przebarwienia liści jakie obserwujemy w przypadku porażenia fitoplazmą zamierania gruszy może mieć również kilka innych przyczyn. Podmakanie, zniszczenie systemu korzeniowego, obrączkowanie powodowane żerowaniem zwierząt, niektóre raki bakteryjne, niezgodność podkładki i odmiany, wszystkie powyższe zjawiska mogą dać objawy przypominające te, powodowane przez infekcję fitoplazmatyczną.

*P. pyri* bytuje w dojrzałych rurkach sitowych floemu porażonych drzew, ale można ją wykryć tylko późnym latem, jesienią oraz wczesną zimą (Schaper & Seemüller, 1982). Zazwyczaj fitoplazma nie jest obecna w tych tkankach wiosną, ale o każdej porze roku może być wykryta z korzeni drzew porażonych, rosnących na własnych korzeniach lub szczepionych na podkładkach *Pyrus*. Jeśli drzewa szczepione były na bardziej rozpowszechnionych podkładkach pigwy, detekcja z korzeni jest niewiarygodna. Możliwość nierównomiernego rozmieszczenia patogenu w obrębie drzewa powoduje konieczność przebadania materiału pochodzącego z kilku różnych jego części. Zaleca się przebadanie kory pochodzącej z 2 do 3-letnich gałęzi, z trzech różnych części drzewa razem z jedną próbką pochodzącą z pnia (EPPO, 1996).

## **Identyfikacja**

### **Barwienie DAPI**

Cienkie skrawki młodych tkanek (ogonki młodych liści lub tkanka floemu pochodząca z pędów, gałęzi i korzeni), barwione są roztworem DAPI (4'6 diamidino-2-phenylindole) o stężeniu 1 µg/ml. Skrawki te obserwowane są w mikroskopie fluorescencyjnym. Obecność niebieskawej fluorescencji (w 460 nm) w rurkach sitowych wskazuje na obecność fitoplazm (Seemüller, 1976). Metoda była początkowo jedyną dostępną. Wymaga dużego doświadczenia osoby obserwującej skrawki i nie zawsze jest wystarczająco czuła. Zaletami jej są szybkość i niski koszt, nie jest to jednak metoda specyficzna.

### **Badanie PCR**

Obecnie dostępne są techniki molekularne, które łączą w sobie czułość i specyficzność. DNA jest izolowane z użyciem metody Ahrens & Seemüller (1992). Badanie przeprowadzane może być w ciągu całego roku, przy użyciu różnych części rośliny. Najlepsze rezultaty otrzymuje się, gdy DNA izolowane jest z użytkowania liści bądź ogonków zebranych w okresie od późnej wiosny do końca lata (czerwiec – koniec września). Jeżeli istnieje konieczność wykonania badań w okresie zimowym, do izolacji DNA można użyć korzeni. Pod koniec okresu wzrostu *P. pyri* przemieszcza się z wierzchołkowej części rośliny do korzeni, gdzie zimuje.

Dostępne są różne typy uniwersalnych starterów do amplifikacji fitoplazmatycznego DNA wyizolowanego z floemu. Najczęściej używanymi są te, opisane przez Lorenz i wsp. (1995) oraz Lee i wsp. (1998). Obie pary zdolne są do amplifikacji produktu w reakcji PCR ze wszystkich fitoplazm, włączając *P. pyri*. Produkt amplifikacji powinien być poddany działaniu enzymów restrykcyjnych *AluI* oraz *RsaI* w celu zapewnienia, iż fitoplazma należy do grupy AP, jak opisał Seemüller i wsp.

(1998), lub do grupy X, według klasyfikacji Lee i wsp. (1998).

Dostępne są również startery specyficzne, a otrzymany produkt amplifikacji może zostać pocięty przez enzymy restrykcyjne *SspI* i *SfeI* w celu poprawnego rozróżnienia izolatów AP od PD (Lorenz i wsp., 1995). Więcej informacji odnośnie badań molekularnych dostępnych jest w Standardzie EPPO PM 7/62(1).

Obecność objawów nie daje wystarczających dowodów umożliwiających identyfikację. Znaczącym jest przeprowadzenie laboratoryjnego badania PCR. Następnym etapem identyfikacji może być analiza RFLP lub PCR z użyciem innej pary starterów, jeśli wymagane jest potwierdzenie. Jeżeli istnieje taka konieczność jest możliwość przeprowadzenia testu na roślinach wskaźnikowych (Standard EPPO PM 4/27(1)) (np. na wypadek sporów prawnych).

## Raport i dokumentacja z badań

Wytyczne odnośnie raportów i dokumentacji z badań zawarte są w Standardzie EPPO PM7/– (w przygotowaniu).

## Dodatkowe informacje

Dodatkowe informacje dotyczące tego organizmu można uzyskać od:

- E. Seemüller, Biologische Bundesanstalt für Land- Und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Schwabenheimer Str. 101, D-69221 Dossenheim (Germany)
- W. Jarausch, Institut für molekulare und angewandte Pflanzenforschung Rheinland-Pfalz, RLP AgroScience GmbH, Breitenweg 71, D-67435 Neustadt-an-den-Weingasse (Germany)
- L. Giunchedi, DISTA-Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Bologna, Viale Fanin 50-5 Piano Ala Est –40127 Bologna (Italy).
- J. Kummert, Unité de phytopathologie, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Passage de Deportés, 2, 5030 Gembloux (Belgium).

## Podziękowania

W oryginale protokół ten został napisany dla EPPO przez D.L.Davies, Horticulture Research International, East Malling (UK).

## Materiały źródłowe<sup>2</sup>

- 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 RNA gene. *Phytopathology* **82**, 828–832.
- Davies DL, Guise CM, Clark MF & Adams AN (1992) Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathology* **41**, 195–203.
- EPPO/CABI (1996) Pear decline phytoplasma. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn. CAB International, Wallingford (GB).
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE & Bartoszyk IM (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein

<sup>2</sup> Została zachowana oryginalna pisownia (przyp. tłum.)

- gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 1153–1169.
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U & Seemüller E (1995) Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification ribosomal and non-ribosomal DNA. *Phytopathology* **85**, 771–776.
- OEPP/EPPO (1999) EPPO Standards PM 4/27 (1) Pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **29**, 239–252.
- OEPP/EPPO (2006) EPPO Standards PM 7/62 (1) Candidatus *Phytoplasma mali*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**, 121–126.
- Schaper U & Seemüller E (1982) Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology* **72**, 736–742.
- Seemüller E (1976) Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Horticulturae* **67**, 109–111.
- Seemüller E, Marcone C, Lauer U, Ragazzino A & Goschl M (1998) Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* **80**, 3–26.
- 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 and Evolutionary Microbiology* **54**, 1217–1226.

<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Justyna Moszczyńska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
28.05.2010	