

## FITOPLAZMATSKÉ BOLESTI ŠUMSKOG DRVEĆA

### PHYTOPLASMA DISEASES OF FOREST TREES

Nikola JURETIĆ\*, Martina ŠERUGA\*, Dijana ŠKORIĆ\*

**SAŽETAK:** Od 1967. godine poznati su novi prokariotski mikroorganizmi koji uzrokuju biljne bolesti. To su fitoplazme – mikroorganizmi koji su ranije bili poznati pod nazivom "mikoplazmama slični organizmi" (*mycoplasma like organisms, MLOs*). Ti mikroorganizmi uzrokuju bolesti na mnogim biljnim vrstama. Fitoplazme se razlikuju od bakterija u prvom redu po tome što nemaju staničnu stijenku, i što se ne mogu kultivirati *in vitro*. U prirodi se fitoplazme prenose insektima, a domaćini su im i zeljaste i drvenaste biljke. Nađene su i na šumskim drvenastim vrstama na kojima uzrokuju karakteristične bolesti. U članku su prikazane osnovne osobine fitoplazmâ te metode s pomoću kojih se one detektiraju i identificiraju. Uz pregled fitoplazmatskih bolesti šumskog drveća u svijetu, u članku je riječ i o dosadašnjem istraživanju fitoplazmâ u Hrvatskoj. Spomenuta je mogućnost zaraze šumskog drveća spiroplazmama – prokariotskim mikroorganizmima koji jako sliče fitoplazmama, a koji su zasad nađeni samo u zeljastim biljkama.

**Ključne riječi:** fitoplazme, šumsko drveće, spiroplazme, bolest, vodno tkivo

### UVOD – Introduction

Opće je poznato da je i šumsko drveće podložno različitim bolestima. Uz viruse, a vjerojatno i viroide, šumske drvenaste biljke napadaju i brojni različiti mikroorganizmi. Među tim mikroorganizmima su i prokariotski organizmi koji sliče *mikoplazmama* – organizmima za koje se već dugo zna da napadaju kralješnjake. Ti prokariotski biljni patogeni zbog velike sličnosti s mikoplazmama donedavno su bili poznati pod nazivom *mikoplazmama slični organizmi* te su se označavali kraticom MLOs (od engl. *mycoplasma like organisms*). Godine 1994. MLOs – organizmi su dobili naziv *fitoplazme* (Sears i Kirkpatrick 1994).

Fitoplazmatske bolesti istražuju u svijetu mnogi fitopatolozi. Za razliku od toga, istraživanje tih bolesti u nas tek je sporadično: najviše su dosad u Hrvatskoj is-

traživane fitoplazmatske bolesti zeljastih biljaka te one koje napadaju vinovu lozu i neke voćke (Panjan 1948; Miličić 1964; Grbelja i Ljubešić 1975). Što se tiče istraživanja fitoplazmatskih bolesti šumskog drveća u nas, može se reći da su učinjeni tek prvi koraci, i to zahvaljujući članovima Virološkog laboratorija Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, koji su nedavno detektirali fitoplazme i u nekim drvenastim šumskim vrstama. Povezano s tim, u ovom ćemo članku dati kratak pregled činjenica do kojih se dosad došlo u sveukupnom istraživanju fitoplazma i fitoplazmatskih bolesti, posebice onih koje se odnose na fitoplazme otkrivene u šumskom drveću. Ukazujući na važnost fitoplazmatskih bolesti šumskog drveća, namjera nam je potaknuti naše fitopatologe da više pozornosti, nego što je to bio slučaj do sada, posvete tim biljnim bolestima. Istraživanja fitoplazmâ zasigurno su danas opravdana jer je nesumnjivo da i fitoplazmatske bolesti, zajedno s drugim stresnim čimbenicima, pridonose današnjem propadanju šuma. U ovom ćemo članku spomenuti i *spiroplazme*, najuže srodnike fitoplazmâ, kao moguće uzročnike bolesti šumskog drveća.

\* Prof. dr. sc. Nikola Juretić,

\* Martina Šeruga, dipl. ing.,

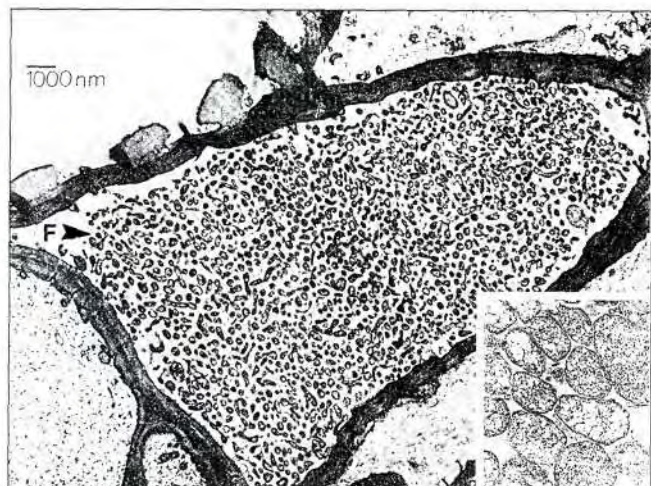
\* Dr. sc. Dijana Škorić, Biološki odsjek PMF-a, Marulićev trg 20/II, 10 000 Zagreb.



## OSNOVNI PODACI O FITOPLAZMAMA

## Basic data on phytoplasmas

Fitoplazme su, kako je naprijed rečeno, mikroorganizmi koji jako sličje *mikoplazmama* – prokariotskim organizmima za koje se od 1898. godine zna da napadaju animalne organizme: mikoplazme napadaju čovjeka i druge kralješnjake na kojima najčešće uzrokuju ozbiljne upale pluća (pneumonije). Dugo se nije znalo postoje li slični organizmi koji bi napadali biljke. No, odavno su biljni patolozi, osobito virolozi, istražujući virusne bolesti biljaka, zapazili neke posebne biljne bolesti za koje su držali, unatoč tomu što su se razlikovale od tipičnih virusnih bolesti, da ih uzrokuju neki nepoznati virusi. Međutim, nikako im nije polazilo za rukom identificirati te “virsuse”. Teškoća je bila u tome što iz takvih bolesnih biljaka nisu uspijevali izolirati virusne čestice. Ne sumnjajući u virusnu etiologiju tih bolesti, smatrali su da su ti virusi jako nepostojani pa da se stoga pri izoliranju raspadaju. Najznačajnija je takva bolest *žucenje listova* (žutice) ili pozelenjavanje cvjetnih dijelova te sterilnost cvjetova (bolest stolbur). Godinama su biljni virolozi istraživali te bolesti i govorili o tzv. virusima žutica odnosno virusu stolbura. To je trajalo sve do 1967. godine, dok japanski istraživač Y. Do i sa suradnicima nije otkrio da se u takvim bolesnim biljkama nalazi mnoštvo jednostaničnih mikroorganizama (sl. 1) koji gotovo začepje provodne dijelove žila (sitaste cijevi) preko kojih biljka opskrbljuje svoja tkiva hranivima stvorenim fotosintezom (Do i sur. 1967). Eksperimentalno je potvrđeno da ti mikroorganizmi, a ne virusi, uzrokuju na biljkama žutice i bolest stolbur. Ti su mikroorganizmi po svemu jako nalikovali mikoplazmama, pa su im zbog toga i dali ime organizmi slični *mikoplazmama*. Kako je već spomenuto, danas te prokariotske organizme znamo pod nazivom *fitoplazme*.



Sl. 1. Elektronskomikroskopska snimka fitoplazma (F) u sitastoj cijevi vrste *Vinca rosea* (poprečni presjek); manja slika desno dolje – fitoplazme povećano.

Fig. 1. Electron micrograph of phytoplasmas (F) in phloem cell (cross section) of *Vinca rosea*; inset, phytoplasmas enlarged.

Prema suvremenoj klasifikaciji organizama, prema kojoj su organizmi podijeljeni u tri carstva (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucaria*), fitoplazme pripadaju carstvu *Bacteria* (pravi prokarioti) čiji su tipični predstavnici prave bakterije (*Eubacteria*). Među više razreda unutar *Eubacteria* nalazi se i razred *Mollicutes*, koji obuhvaća više prokariotskih rodova među kojima i rod *Mycoplasma* (mikoplazme), čiji predstavnici napadaju animalne organizme, ali i rod *Phytoplasmae* (fitoplazme), čiji predstavnici napadaju biljke. Dakle, fitoplazme o kojima je u ovom članku riječ pripadaju istom razredu organizama kojemu i mikoplazme.

Svi pripadnici razreda *Mollicutes* predstavljaju najmanje poznate žive stanice koje danas znamo, što znači da su manje i od najsitnijih tipičnih bakterija (Gibbs i Harrison 1976; Gundersen i sur. 1994) i jednostavnije su građe od pravih bakterija. Za razliku od bakterija, ti organizmi nemaju staničnu stijenku. Na površini njihove stanice nalazi se samo troslojna lipoproteinska membrana debela oko 10 nm. Stanice mikoplazma i fitoplazma promjenljiva su oblika, ali su ipak najčešće okruglaste (sl. 1). Promjer im se kreće od 200 do 1100 nm. To su organizmi koji se građom najviše približavaju bakterijama tipa *Clostridium*. Karakteristično je za njih da ne mogu sintetizirati peptidoglikan (spoj izgrađen od N-acetilglukozamina i N-acetil-muraminske kiseline, čijom polimerizacijom nastaje mukopeptid koji je bitni sastojak bakterijske stanične stijenke). Mikoplazme imaju ribosome bakterijskog tipa te obje nukleinske kiseline – DNA i RNA. Njihova DNA ima oblik dvolančane prstenaste molekule, čija je molekulska masa oko  $5 \times 10^5$ , što je gotovo upola manje od genoma većine bakterija. Mikoplazme i fitoplazme otporne su na penicilin (jer nemaju staničnu stijenku), ali ne i na tetraciklinske antibiotike. Zanimljivo je spomenuti da se u razmatranjima koja se bave molekularnom evolucijom organizama navodi da je moguće da su pripadnici razreda *Mollicutes* vjerojatno oni organizmi kod kojih je prvi put nasljedna tvar umjesto molekule RNA postala molekula DNA. Naime, molekularna evolucija drži da su u prapovijesti života prvi organizmi za nasljednu tvar imali molekulu RNA, koja je kasnije, u tijeku evolucije, svoju ulogu nasljedne tvari prepustila molekuli DNA. Neki su mišljenja da se ta “primopredaja” nasljedne funkcije zbilja upravo kod pripadnika razreda *Mollicutes*.

Unatoč velikim sličnostima koje u pogledu građe postoje između mikoplazma i fitoplazma, među tim organizmima postoje značajne fiziološke razlike. Na primjer, mikoplazme ne mogu zaraziti biljke, a fitoplazme ne mogu zaraziti kralješnjake. Razlika među nji-



ma je i u tome što biljne fitoplazme dolaze unutar stanice domaćina (intracelularno), dok mikoplazme dolaze izvan stanica domaćina (ekstracelularno). Razlika je i u načinu prijenosa u prirodi: dok se mikoplazme prenose probavnim traktom, fitoplazme se rasprostranjuju u prirodi različitim vrstama člankonožaca, u prvom redu nekim kukcima koji se hrane biljnim sokom (Tsai 1979). Značajna je razlika između miko-

plazma i fitoplazma i u tome što se mikoplazme mogu, a fitoplazme ne mogu kultivirati *in vitro*, npr. na agar-sknoj podlozi, pa otuda i velike teškoće u istraživanju fitoplazmâ.

Fitoplazme uzrokuju različite bolesti i na zeljastim i na drvenastim biljkama. Najčešće u biljkama ti mikroorganizmi okupiraju provodne elemente, osobito floem.

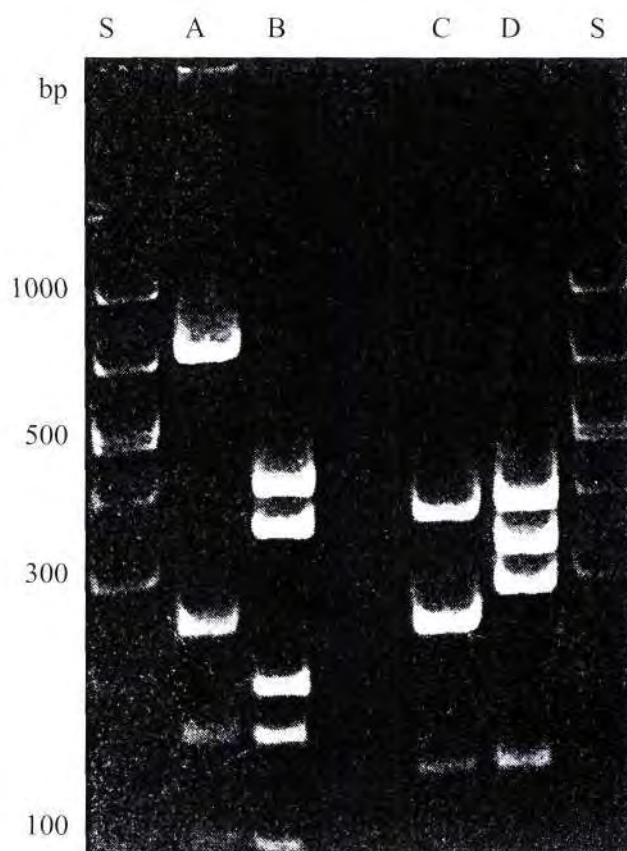
## KAKO SE FITOPLAZME OTKRIVAJU U BILJKAMA?

### Methods in phytoplasma detection

Razvijeni su različiti postupci kojima se fitoplazme detektiraju. Ti se izuzetno sitni mikroorganizmi mogu u biljci otkriti elektronskomikroskopskom analizom ultratankih presjeka floemskog tkiva (sl. 1). Fitoplazmatsku zarazu moguće je utvrditi i fluorescentnim mikroskopom: presjeci floemskog tkiva obrađuju se fluorescentnim bojama koje se vežu na fitoplazmatsku DNA; pod utjecajem UV-zraka te boje fluoresciraju prepoznatljivom svjetlošću. U tu svrhu najčešće se koristi tzv. DAPI-test, u kojem se kao boja koristi 4', 6-diamidin-2-fenilindol 2 HCl. Pod utjecajem UV-zraka obojena fitoplazmatska DNA se u sitastim cijevima vidi u obliku plavobijelih nakupina (Sincclair i sur. 1996).

Razlikovanje pojedinih fitoplazmâ i njihova klasifikacija osnivala se ranije na specifičnom prijenosu vektorima, krugu domaćina i na osnovi karakterističnih simptoma na nekim domaćinskim biljkama. No, prije desetak godina u detekciju i identifikaciju fitoplazmatskih bolesti uvedene su molekularne tehnike. Načelno, tim se tehnikama otkrivaju i uspoređuju geni koji su zajednički različitim fitoplazmama (konzervirani geni). Najčešće se otkriva i uspoređuje fitoplazmatski gen koji kodira 16 S ribosomsku RNA. Taj gen imaju sve fitoplazme, ali što je važno nemaju ga biljke (Seemüller i sur. 1994; Lee i sur. 1993). Najprije se lančanom reakcijom polimeraze (metoda PCR) uz korištenje specifičnih početnica umnožava (amplificira) nukleotidni slijed koji kodira 16 S ribosomsku RNA. Kad se dobije u zadovoljavajućim količinama, nukleotidni slijed (gen) analizira se tako, da se specifičnom endonukleazom cijepa na manje segmente. Karakteristično je da će se gen jedne fitoplazme pod utjecajem određene endonukleaze cijepati na posve određeni broj segmenata koji će biti različitih, ali posve određenih duljina. Nakon cijepanja endonukleazom, dobiveni nukleotidni segmenti se separiraju gel-elektroforezom te se analizira njihov *polimorfizam* (tzv. metoda RFLP). Ako se u elektroforezi usporede nukleotidni segmenti npr. dviju fitoplazmâ koje pripadaju dvjema različitim fitoplazmatskim skupinama, vi-

djet će se da one imaju različite RFLP-profile, tj. razlikovat će se po elektroforetskim vrpčama (sl. 2).



Sl. 2. Razlikovanje (identifikacija) fitoplazma pomoću elektroforeze, i to na osnovi utvrđivanja različitih dužina fragmenta gena za 16S rRNA koji su dobiveni cijepanjem istim restriksijskim enzimom. (S - kontrola, A, B, C, D - istraživani uzorci, bp - parovi baza).

Fig. 2. Differentiation of phytoplasmas based on restriction fragment length polymorphisms of the 16S ribosomal RNA gene; this gene (DNA) was amplified by polymerase chain reaction (using specific primers) and digested by restriction endonucleases. DNA bands were separated by acrylamid gel electrophoresis. (S - control phytoplasma, A, B, C, D - samples of investigated phytoplasmas, bp - base pairs).



## OPĆENITO O FITOPLAZMATSKIM BOLESTIMA Generally on phytoplasma diseases

Od 1967. godine kad su fitoplazme prvi put otkrivene (Doi i sur. 1967), ti su patogeni nađeni u mnogim zeljastim i drvenastim biljkama. Prema Marwitzu (1990) fitoplazme su otkrivene u preko 400 biljnih vrsta, iz otprilike 100 različitih botaničkih porodica. No, prema najnovijim podacima ti su biljni patogeni otkriveni u preko 600 biljnih porodica. Osobito je velik broj fitoplazmatskih bolesti opisan na zeljastim biljkama. U novije se vrijeme sve više tih bolesti otkriva i u drvenastim biljkama.

Fitoplazme uzrokuju nekoliko karakterističnih biljnih bolesti. Moguće je da pod utjecajem fitoplazma listovi požute, pa se te bolesti nazivaju žuticama (sl. 3). U nekim slučajevima biljke izrazito *zakržljaju*. Kod nekih biljaka fitoplazme uzrokuju *pozelenjavanje latica* (virescencija) tako da se one transformiraju u obične listiće (filodije). Takvi cvjetovi postaju sterilni (sl. 4). Nerijetko glavni simptom fitoplazmatske bolesti jest tzv. *sindrom vještice metle*; taj je simptom dobio naziv po tome što se na stablu bolesnih biljaka vide guste nakupine bočnih izbojaka koje sličje metličastim tvorbama (sl. 5; 6 E, D; 7). Do takvog nakupljanja izbojaka dolazi zbog izrazito jake proliferacije bočnih grančica na stabljici (stablu). Na drvenastim biljkama fitoplazme mogu uzrokovati, osim žutica i sindroma vještice metle, i *prozirnost krošnje* (sl. 8) te ranije otpadanje lišća (sl. 6 B, C). Istraživanja su pokazala da fitoplazmatske infekcije mogu kod nekih drvenastih vrsta znatno smanjiti prirast drvene mase. To je opaženo npr. kod zaraženih primjeraka bijelog i zelenog jasena (sl. 9) iako



Sl. 3. Dvije grančice vrste *Fraxinus americana* čiji su listovi žuti i smanjeni: zbog proliferacije bočnih grančica stvorene su metličaste tvorbe, bolest poznatu pod nazivom sindrom vještice metle; lijevo gore zdravi list radi usporedbe.

Fig. 3. Ash witches' broom: *Fraxinus americana* showing chlorosis, diminished leaf size and branch proliferation; background left, healthy leaf.



Sl. 4. Pod utjecajem fitoplazme cvjetni dijelovi vrste *Gossypium* sp. (pamuk) pozelenjavaju i poprimaju oblik lista (filodiji) te tvore čuperke lisnih izbojaka (desno zdrava biljka).

Fig. 4. *Gossypium* sp. with "cotton virescence" caused by phytoplasma: note greening and phyllody of floral parts, and elongation and development of flowers into leafy sprouts (right, a normal flower).



Sl. 5. Metličaste tvorbe na stablu vrste *Carya pecan* koje je inficirano fitoplazmom.

Fig. 5. Witches' broom in *Carya pecan* infected by phytoplasma



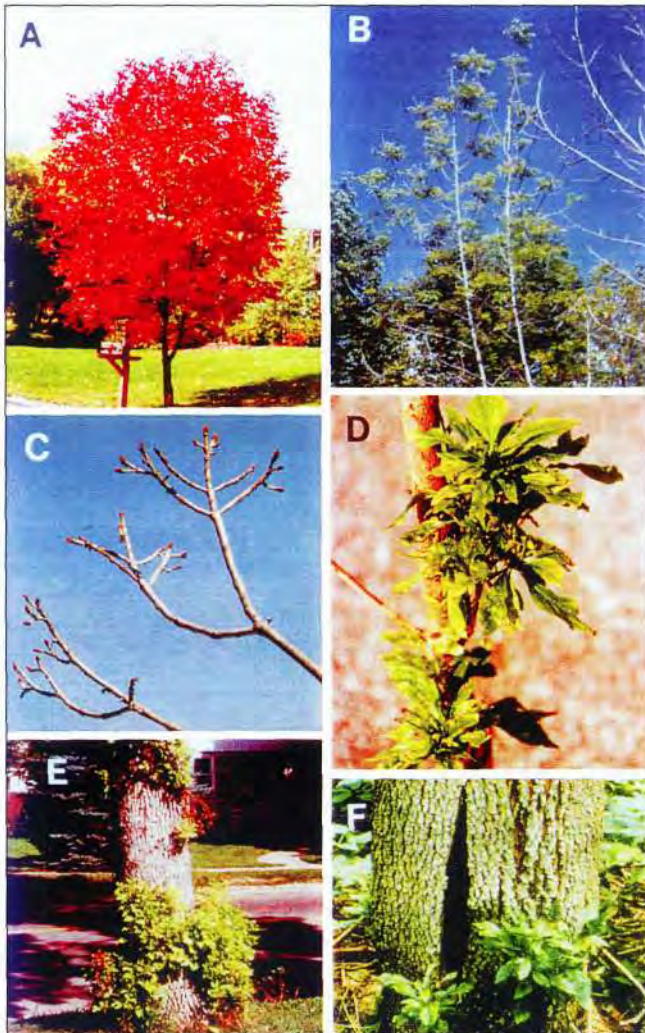
je osjetljivost pojedinih stabala iste vrste na fitoplazmatsku infekciju varirala (Sinclair i sur. 1993).

Simptomi koje uzrokuju fitoplazme posljedica su djelovanja fitoplazmatskih toksina i hormonalnih poremećaja u biljci. Osim toga, fitoplazme se mogu u biljnoj stanici toliko razmnožiti da ih je u sitastim cjevima toliko da spriječe protok hranjivih tvari pa je neminovna posljedica žućenje listova. Fitoplazme se u inficiranoj biljci ne šire u sva tkiva: gotovo da isključivo

dolaze u provodnom tkivu, i to najviše u floemu (sitaste cijevi) i floemskom parenhimu (sl. 1).

Već je spomenuto da se fitoplazme u prirodi prenose raznim člankonošcima, u prvom redu insektima koji se hrane biljnim sokom (neke cikade, stjenice i lisne buhe). Može ih prenositi i parazitska biljka vilina kosa (*Cuscuta* spp.). Osim toga fitoplazme je moguće preneti i cijepljenjem.

Što se tiče zaštitnih mjera u suzbijanju fitoplazmatskih bolesti, najvažnije su preventivne mjere: selekcija zdravog sadnog materijala, suzbijanje prenositelja (vektora) i stvaranje na njih otpornih biljnih kultivara. Moguće su (uz uvjet isplativosti) i terapijske mjere: upotreba tetraciklinskih antibiotika te držanje zaraženih biljaka duže vrijeme na 40 °C (fitoplazme su razmjerno termolabilni organizmi).



Sl. 6. Simptomi bolesti koje na jasenu uzrokuju fitoplazme: A - zdravo stablo bijelog jasena u jesenskim bojama; B, C, D, F - simptomi koje na bijelom jasenu uzrokuju fitoplazme: B - čuperci lišća na usporeno rastućim granama, C - poremećeni rast grana, D - tipične metličaste tvorbe u kojima se umjesto normalnih složenih listova pojavljuju jednostavni listovi, E - metličaste tvorbe na stablu zelenog jasena, F - metličaste tvorbe uzrokovane fitoplazmatskom zarazom i pucanje kore koje je posljedica oštećenja kambija nastalog zbog niskih temperatura.

Fig. 6. A - Healthy white ash in autumn color; B, C, D, E, F - symptoms of ash yellows; B - tufted foliage on slowly growing twigs of white ash, C - deliquescent branching on white ash, D - witches'-brooms with simple leaves on white ash sapling, E - witches'-brooms on green ash, F - witches'-brooms and split bark caused by frost damage to the cambium of a white ash.



Sl. 7. Metličaste tvorbe na jorgovanu koje uzrokuju fitoplazme: A - čuperci lišća i sušenje grana, B - metličaste tvorbe koje čine grane u blizini vrata korijena.

Fig. 7. Lilac witches'-broom on lilac: A - tufted foliage and dieback, B - dense brooms near the root collar.



## ŠUMSKO DRVEĆE NA KOJEMU SU DO SADA U SVIJETU NAĐENE FITOPLAZME

### Phytoplasmas found in forest trees of the world

Do sada su fitoplazme nađene u šumskom drveću koje pripada u 16 biljnih porodica, odnosno u 25 biljnih rodova (Mitterpergher i sur. 2000; vidi tablicu). Što se tiče izražajnosti fitoplazmatskih bolesti na šumskom drveću, može se reći da su najčešće te bolesti

blage i da one rijetko same uzrokuju propadanje drveća (Hibben i Franzen 1989; Griffiths i sur. 1994). No, fitoplazmatske infekcije oslabljuju biljke koje zbog toga postaju znatno osjetljivije na druge biotičke i abiotičke stresove.

Tablica 1. Šumsko drveće u kojem su otkrivene fitoplazme \*

Table 1 Forest trees in which phytoplasmas have been detected \*

Porodica	Vrsta	Geografsko područje	Autori
<i>Fagaceae</i>	<i>Quercus</i> spp.	Europa	1987, Ploaie i sur.; 1994, Ahrens i Seemüller
	<i>Castanea</i> spp.	Japan	1974, Okuda i sur.
	<i>Fagus sylvatica</i>	Europa	1988, Parameswaran i Liese
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus</i> spp.	Europa	1986, Sharma i sur.; 1997, Berges i sur.
	<i>Salix</i> spp.	Italija	1972, Holmes i sur.; 1989, Seemüller
<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus</i> spp.	Europa	1991, Lederer i sur.; 1994, Marcone i sur.
<i>Oleaceae</i>	<i>Fraxinus</i> spp.	Sj. Amerika	1971, Hibben i Wolanski
	<i>Ligustrum</i> spp.	Daleki istok	1989, Chae i Kim
	<i>Syringa</i> spp.	Sj. Amerika	1986, Hibben i sur.
<i>Ulmaceae</i>	<i>Ulmus</i> spp.	SAD, Europa	1981, Sinclair; 1981, Pisi i sur.
	<i>Celtis</i> spp.	Europa	1996, Bertaccini i sur.
<i>Juglandaceae</i>	<i>Juglans</i> spp.	SAD	1976, Seliskar
	<i>Carya illinoensis</i>	SAD	1974, Seliskar i sur.
<i>Leguminosae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	SAD, Italija	1973, Seliskar i sur.; 1989, Seemüller
	<i>Cercis siliquastrum</i>	Italija	1999, Del Serrone i Pilotti
<i>Myrtaceae</i>	<i>Eucalyptus</i> spp.	Indija, Italija Srednji istok	1980, Ragozzino i Cristinzio 1987, Ali i sur.; 1996, Marcone i sur.
<i>Caprifoliaceae</i>	<i>Sambucus</i> spp.	Europa	1992, Lederer i Seemüller
<i>Bignoniaceae</i>	<i>Paulownia</i> spp.	Daleki istok	1967, Doi i sur.
<i>Moraceae</i>	<i>Morus</i> spp.	Daleki istok	1967, Doi i sur.
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Zizyphus jujuba</i>	Koreja, Indija	1979, La i Chang
<i>Meliaceae</i>	<i>Melia azedarach</i>	J. Amerik	1989, Brune
<i>Santalaceae</i>	<i>Santalum album</i>	Indija	1989, Hull i sur.
<i>Pinaceae</i>	<i>Pinus</i> spp.	Španjolska, Afrika	1988, Castro i sur.; 1989, Gopo i sur.
	<i>Larix decidua</i>	Europa	1976, Nienhaus i sur.
<i>Cupressaceae</i>	<i>Chamaecyparis</i> spp.	Kina	1990, Ding i Chen
	<i>Callitris</i> spp.	Kina, Afrika	1989, Gopo i sur.

\* Prema Mitterpergher i sur. (2000)

## ISTRAŽIVANJA FITOPLAZMÂ U HRVATSKOJ

### Investigations of phytoplasmas in Croatia

Istraživanja fitoplazmâ u Hrvatskoj započela su četrdesetih a intenzivirala se šezdesetih godina prošlog stoljeća. Počelo se s istraživanjima fitoplazmâ zeljastih biljaka, i to istraživanjem fitoplazmatske bolesti duhana poznate pod nazivom *stolbur* (Panjan 1948). Nakon toga uslijedila su istraživanja fitoplazmatskih bolesti nekih drugih biljaka (Miličić 1964; Plavšić-Banjac 1967). Detaljno su istraživane fitoplazmatske bolesti djeteline (Grbelja i Ljubešić 1975) i rajčice (Panjan i sur. 1970). Sedamdesetih i osamdesetih

godina istražuju se mikoplazme vinove loze i voćaka (Šarić 1977), posebno jabuke i kruške (Šarić i Cvjetković 1985). U najnovije vrijeme pojačano se u našoj zemlji istražuju fitoplazme vinove loze, koje na toj važnoj kulturi uzrokuju izrazito žućenje lista (žutica vinove loze; Šeruga i sur. 2000). Cilj tih istraživanja je utvrditi geografsko rasprostranjenje fitoplazmatskih bolesti na vinovoj lozi u nas, te na osnovi molekularno-bioloških osobina klasificirati nađene fitoplazme u postojeće klasifikacijske skupine (Sinclair i sur. 1996;



Gundersen i sur. 1994). U Virološkom laboratoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu počela su nedavno i istraživanja, čiji je cilj utvrditi u kojoj su mjeri fitoplazme rasprostranjene u

našem šumskom drveću. Preliminarni detekcijski postupci pokazali su da su fitoplazme u nas prisutne i u nekim šumskim drvenastim biljkama. Rezultati tih istraživanja u pripremi su za tisak.

## SPIROPLAZME KAO MOGUĆI UZROČNICI BOLESTI ŠUMSKOG DRVEĆA Spiroplasma as possible pathogens of forest trees

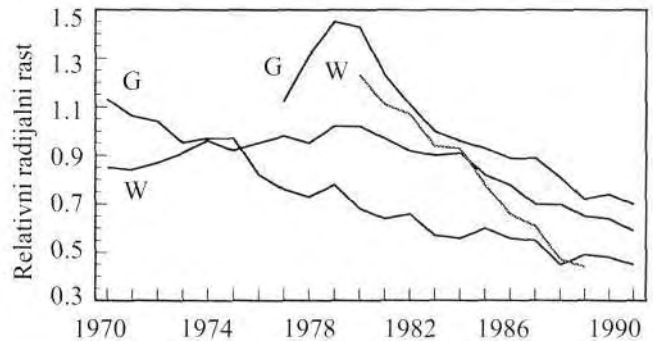
Kad se govori o fitoplazmama i fitoplazmatskim bolestima, obično se spominju i *spiroplazme* koje također napadaju biljke. Spiroplazme na biljkama uzrokuju bolesti koje jako slične onima fitoplazmatske etiologije. Ti su mikropatogeni otkriveni 1972. godine, kada je jedna skupina američkih istraživača, koja je istraživala fitoplazme, otkrila u oboljelim primjercima naranče i kukuruza naročite prokariotske mikroorganizme, koji su imali oblik dugačkih spiralnih niti: izgledali su poput neke izdužene opruge (sl. 10 A, B, C). Zbog takvog izgleda dali su im ime *spiroplazme*. Zapaženo je da se ti mikroorganizmi odlikuju zanimljivom osobinom – pokretljive su. Ako se nađu u tekućem mediju, zmijoliko se i brzo kreću. Unatoč nekim specifičnostima, spiroplazme imaju mnogo zajedničkog s mikoplazmama. U taksonomskom pogledu spiroplazme se danas zajedno s mikoplazmama i fitoplazmama svrstavaju u poseban rod razreda *Mollicutes*.

Evo nekih osnovnih karakteristika pripadnika roda *Spiroplasma*. Svim je članovima tog roda svojstveno da su spiralna oblika. U tom se pogledu razlikuju od svih drugih rodova razreda *Mollicutes*. No, spiralan oblik poprimaju spiroplazme samo ako se drže u tekućem mediju. U drugim okolnostima one nemaju taj oblik; u polukrutom mediju, npr. u agarском gelu, one su uglavnom izdužene, ali bez spiralne građe. U krutom mediju one poprimaju okruglast oblik i po tome nalikuju mikoplazmama i fitoplazmama. Spiroplazme su duge od 200-3000 nm, a širina im se kreće od 50-400 nm.



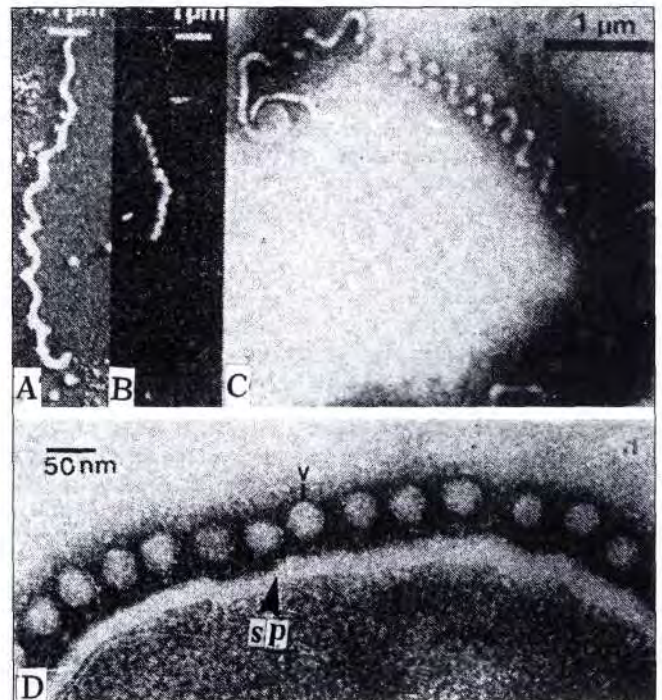
Sl. 8. Šumarak bijelog jasena u kojem se vide stabla sa svjetlijim (žutim) lišćem i prorijedenim krošnjama (strelica) - simptomima koje su uzrokovale fitoplazme.

Fig. 8. White ash with ash yellows on an old-field site: diseased trees display dieback or thin crowns with light green foliage.



Sl. 9. Pad prosječnog prirasta drvene mase stabala jasena koja su bila inficirana fitoplazmama (W - bijeli jaseen, G - zeleni jaseen) u SAD-u. Praćen je radijalni rast u odnosu na zdrava stabla u istoj populaciji; nepoznata je godina kad su stabla početno inficirana (prema Sinclairu i sur. 1996).

Fig. 9. Decline in relative radial growth of phytoplasma-infected ash trees in USA (W - white ash, G - green ash). Average growth rates of infected trees are plotted as proportions of the average growth rates of healthy trees in the same population. The year when each tree became infected is unknown.



Sl. 10. Elektronskomikroskopska snimka spiroplazma: A-C spiroplazme različito kontrastirane; D - spiroplazma (sp) s adsorbiranim virusnim česticama (v) koje imaju oblik bakteriofaga.

Fig. 10. Electron microscope photographs of spiroplasma; D - spiroplasm (sp) with adsorbed virus particles (v) which are similar to phage particles.



Sve spiroplazme zahtijevaju u svom rastu sterole. Njihov je genom nešto veći od genoma fitoplazma. Spiroplazme se mogu, poput bakterija i mikoplazma, kultivirati na umjetnim podlogama. Međutim, do danas nije pronađen medij na kojem bi rasle sve spiroplazme. To je velika prepreka u nastojanjima da se one detaljnije istraže. Do danas je uspjelo detaljno analizirati samo jednu spiroplazmu. To je vrsta *Spiroplasma citri* nađena u oboljelim jedinkama naranče (Fletcher 1983). Ona se serološki razlikuje od svih fitoplazmâ, ali je serološki usko srodna sa spiroplazmom izoliranom iz kukuruza. Zanimljivo je da spiroplazme kao i fitoplazme napadaju virusi (sl. 9 D).

Bolesti koje na biljkama uzrokuju spiroplazme teško je razlikovati od onih koje uzrokuju fitoplazme. Na koje sve načine spiroplazme negativno utječu na biljni organizam, još uvijek nije poznato. U svakom slučaju, one kao i fitoplazme narušavaju hormonalnu ravnotežu

koja kontrolira rast i razvoj biljke. Obično se na bolesnim biljkama opaža žućenje listova, skraćenje stabljike, zastoj u rastu, prekid normalne faze mirovanja biljke te pojava dodatnih izbojaka na stabljici i korijenu. Najvjerojatnije je da spiroplazme mijenjaju metabolizam giberelina. Ako se biljci kukuruza, koja pokazuje simptome spiroplazmatske bolesti (zastoj u rastu, žućenje) doda giberelinska kiselina, biljke će početi normalno rasti. Međutim, biljke ipak nisu izliječene, jer se i nadalje na njima opažaju drugi simptomi zaraze po kojima se vidi da je spiroplazma i ostala u biljci. Je li zastoj u rastu kukuruza, koji uzrokuje spiroplazma, posljedica razgradnje giberelina u biljci ili je to možda posljedica smanjivanja biosinteze hormona rasta, to još uvijek ostaje zagonetkom. Zasad spiroplazme nisu nađene na šumskom drveću, ali je vjerojatnost da i na njima parazitiraju vrlo velika. Upravo zbog toga šumarski fitopatolozi trebaju i o tome voditi računa.

### ZAKLJUČAK – Conclusion

Fitopatologija je u fitoplazmama dobila novo izazovno područje. Ti najjednostavniji mikroorganizmi napadaju i zeljaste i drvenaste biljke. Nađene su i na mnogim šumskim drvenstim vrstama na kojima uzrokuju dosta karakteristične bolesti.

Istraživanja fitoplazma započela su u nas još prije 50 godina, ali su ona bila uglavnom sporadična i više fundamentalnog a ne primijenjenog karaktera. Danas se u nas najviše istražuju fitoplazme vinove loze, a u

najnovije vrijeme fitoplazme su otkrivene i u našim šumskim drvenstim vrstama.

Iako većina fitoplazmatskih bolesti ne uzrokuje uginuće zaraženih biljaka, inficirane biljke su mnogo osjetljivije na učinke drugih stresova. Kad je riječ o suvremenom "umiranju" šuma, vjerojatno da i fitoplazme mogu biti sastavni dio kompleksa čimbenika koji dovode do te pojave.

### LITERATURA – References

- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. 1967: Mycoplasma - or PLT group-like microorganisms found in phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 33, 259-266.
- Fletcher, J. 1983: Brittle root of horseradish in Illinois and the distribution of *Spiroplasma citri* in the United States. Phytopatology 73, 354-357.
- Grbelja, J., Ljubešić, N. 1975: Clover phyllody disease in Yugoslavia. Acta. Bot. Croat. 34, 25-31.
- Gibbs, A., Harrison, B. 1976: Plant virology. Edward Arnold, London.
- Griffiths, H. M., Sinclair, W. A., Davis, R. E., Lee, I.-M., Dally, E.L., Guo, Y.-H., Chen, T. A., Hibben, C. R. 1994: Characterization of mycoplasma-like organisms from *Fraxinus*, *Syringa*, and associated plants from geographically diverse sites. Phytopatology 84, 119-126.
- Gundersen, D. E., Lee, I.-M., Rehner, S. A., Davis, R. E., Kingsbury, D. T. 1994: Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): A basis for their classification. J. Bacteriol. 176, 5244-5254.
- Hibben, C. R., Franzen, L. M. 1989: Susceptibility of lilacs to mycoplasma-like organisms. J. Environ. Hortic. 7, 163-167.
- Lee, I.-M., Hammond, R., Davis, R. E., Gundersen, D. E. 1993: Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. Phytopatology 83, 834-842.
- Marwitz, R. 1990: Diversity of yellows disease agents in plant infections. Zentralbl. bakteriol. 20, 431-434.
- Miličić, D. 1964: Anomalije cvijeta stolburskog duhana. Acta Bot. Croat. 23, 27-50.
- Mittempergher, L., Tegli, S., Bertolli, E., Sfalanga, A., Bertaccini, A., Surico, G. 2000: I fitoplasmî negli alberi forestali con particolare riferimento all'olmo. Petria 10, 157-160.



- Panjan, M. 1948: Stolbur. Biljna proizvodnja 1, 143-148.
- Plavšić-Banjac, B. 1967: Anatomske karakteristike biljaka inficiranih stolburom. Rad JAZU 345, 237-270.
- Sears, B. B., Kirkpatrick, B. C. 1994: Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. ASM News 60, 307-312.
- Seemüller, E., Schneider, B., Mäurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K. - H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B. B., Stackebrandt, E. 1994: Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16 S ribosomal DNA. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 440-446.
- Sinclair, W. A., Griffiths, H. M., Davis, R. E. 1996: Ash yellows and lilac witches'-broom: phytoplasmal diseases of concern in forestry and horticulture. Plant Disease 80, 468-475.
- Sinclair, W. A., Griffiths, H. M., Treshow, I. 1993: Impact of ash yellows micoplasmalike organisms on radial growth of naturally infected green, white, and velvet ash. Can. J. Res. 23, 2467-2472.
- Šarić, A. 1977: Neke mikoplazmoze voćaka i vinove loze. Zaštita bilja. 6, 235-256.
- Šarić, A., Cvjetković, B. 1985: Nalaz mikoplazmama sličnih organizama u jabuci sa simptomima proliferacije i kruški sa simptomima propadanja. Poljoprivredna znanstvena smotra 68, 61-67.
- Šeruga, M., Čurković Perica, M., Škorić, D., Kozina, B., Mirošević, N., Šarić, A., Bertaccini, A., Krajačić, M. 2000: Geographical distribution of Bois Noir phytoplasmas infecting grape-vines in Croatia. J. Phytopathology 148, 239-242.
- Tsai, J. H. 1979: Vector transmission of mycoplasma agents of plant diseases. Pages 265-307 in: The Mycoplasmas. Vol. III. Plant and Insect Mycoplasmas. R.F. Whitcomb and J. G. Tully, eds. Academic Press, New York.

*SUMMARY: Phytoplasmas, formerly called mycoplasma-like organisms (MLOs) have been known to be the causal agents of plant diseases since 1967 (Doi i sur. 1967). So far phytoplasmas have been isolated from more than 600 plant species. Phytoplasmas, mycoplasmas and spiroplasmas are similar organisms which represent the smallest free-living procaryotes. These three microorganisms lack a rigid cell wall and are bound only by a triple-layer unit membrane. They are very pleomorphic. Phytoplasmas and spiroplasmas occur mostly in the phloem tissue of plants. Syndromes of phytoplasmas and spiroplasmas are phyllody, virescence and dwarfing. Phytoplasmas have been detected in forest trees belonging to at least 25 genera. Most of the trees are only slightly affected and tolerate the infection until other interacting stress factors cause loss of vigour and dieback. Earlier phytoplasma detection and identification were based on electron and fluorescence microscopy. However, nowadays detection and identification are possible by several DNA-based techniques, among which those involving the polymerase chain reaction (PCR) have become very popular because of high sensitivity.*

*Key words: phytoplasmas, forest trees, spiroplasmas.*