

# Fitoplazme ali življenje na genskem minimumu

*Marina Dermastia*

Prvi dokumentirani dokazi o fitoplazmah segajo v čas kitajskih vladarjev iz dinastije Song, ki so vladali od leta 960 do leta 1279 po našem štetju. Ti so bili veliki ljubitelji cvetja, še posebej radi so imeli potonike. Med njimi so najbolj občudovali tiste z nežno zelenimi cvetovi, ne pa tistih bolj pogostih z rdečimi cvetovi. Novejšega datuma so božične zvezde (*Euphorbia pulcherrima*), ki so nepogrešljivi sestavni del božičnih cvetličnih aranžmajev. V času prvih poročil o teh rastlinah - po prihodu Špancev v Mehiko - so jih Azteki pod imenom cuetlaxochitl uporabljali za različne stvari - iz njihovega soka so pripravljali zdravila proti vročini, iz njihovih ovršnih listov pa rdeče barvilo. Rastlino je zadnji azteški kralj Montezuma kot »darilo bogov« gojil na svojih vrtovih, saj je bila v tistih časih prevelika, da bi jo lahko občudoval v lončkih v notranjih prostorih. Današnja podoba, ki se zelo razlikuje od podobe divjih sorodnikov v Mehiki, je poznana od dvajsetih let 20. stoletja dalje.

Takrat so zlahtnitelji rastlin odkrili novo varieteto božične zvezde, ki je imela veliko cvetov in bila dovolj nizka, da so jo lahko postavili na mizo. Težava je bila, da takih rastlin niso znali dalje vzgajati iz semen. Edini način za proizvodnjo nizkih, gostih božičnih zvezd je bilo cepljenje, s cepiči, pridobljenimi iz nizke rastline. Gojitelji so vedeli, da je skrivnost njihove razrasti skrita v floemskem soku cepiča, razložiti pa jo niso znali.

## Zeleno cvetoče potonike in pritlikave božične zvezde so okužene s fitoplazmami

Skrivnost nizko rastočih božičnih zvezd je bila pojasnjena šele v poznih devetdesetih letih prejšnjega stoletja, ko so znanstveniki ugotovili, da so te neobičajno rastoče rastline okužene z zelo posebnimi bakterijami - fitoplazmami. Same fitoplazme pa so bile kot povzročiteljice številnih bolezni rastlin, imenovanih rumenice, prepoznane kakšnih 30 let prej. Glede na podobnost bolezenskih



*Divja božična zvezda.*

Foto: Tom Turk.



Božična zvezda, okužena s fitoplazmami. Foto: Manca Pir.

znamenj in odsotnost tipičnih znamenj bakterijskih ali glivnih okužb so bili do takrat raziskovalci prepričani, da rumenice povzročajo virusi.

Fitoplazme, ki spreminjajo rdeče cvetove potonik v zelene in božične zvezde iz velikih razpotegnjenih grmastih vej z redkimi cvetovi v gosto cvetoče nizke grmičke, pa le redko povzročijo nam všečne spremembe na rastlinah. Večinoma povzročajo hude rastlinske bolezni in grozijo številnim prehranskim in okrasnim rastlinam po vsem svetu. Ker porušijo normalno delovanje rastlinskih rastnih regulatorjev, to vodi do bolezenskih znamenj, kot sta pritlikavost in metlasta razrast, izraženi v božičnih zvezdah. Na različnih rastlinah pa povzročajo tudi razvoj listom podobnih struktur namesto cvetov, propadanje cvetov in posledično odsotnost pridelka, neolesenevanje, zavrto fotosintezo, kopičenje sladkorjev v listih in drugo.

### Mikoplazmam podobni organizmi

Zaradi morfološke podobnosti so ob odkritju fitoplazme poimenovali *mikoplazmam podobni organizmi*. Obe skupini organizmov sta, kot bakterije, pozitivne po Gramu in brez celične stene, uvrščeni v monofiletski razred *Mollicutes*. Za razliko od mikopla-

zem, ki so patogeni na živalih in ljudeh, fitoplazme povzročajo bolezni le na rastlinah. Za zdaj so bili neuspešni vsi poskusi, da jih gojijo v razmerah *in vitro*, kar je eden od glavnih razlogov, da je njihovo raziskovanje zelo težavno in vezano na preučevanje okuženih gostiteljev ter da je posledično naše znanje o teh organizmih zelo omejeno. Njihov skrivnostni položaj med prokarioti smo razrešili šele z razvojem in aplikacijami sodobnih molekularnih tehnologij. To je vodilo tudi do uvedbe trivialnega imena »fitoplazma« in končno do opisa novega taksona kot začasno vrsto ali '*Candidatus Phytoplasma*'. Znotraj *Mollicutes* so fitoplazme najbolj sorodne rodu *Acholeplasma*. Njun skupni prednik naj bi se od ostalih molikotov ločil že zelo zgodaj. Ločitvi naj bi sledili manjšanje genoma in izguba celične stene. Fitoplazme imajo danes eno najmanjših celic, z enim najmanjših znanih genomov, od 530 do 1350 kb. V njem ni genov za sintezo številnih spojin, vključenih v različne presnovne poti. Vse te snovi morajo fitoplazme dobiti od svojih gostiteljev.

### Majhen genom je povezan z gostiteljevim okoljem

Če želimo razumeti prilagoditve fitoplazemskega genoma in njegovo zmanjševanje,

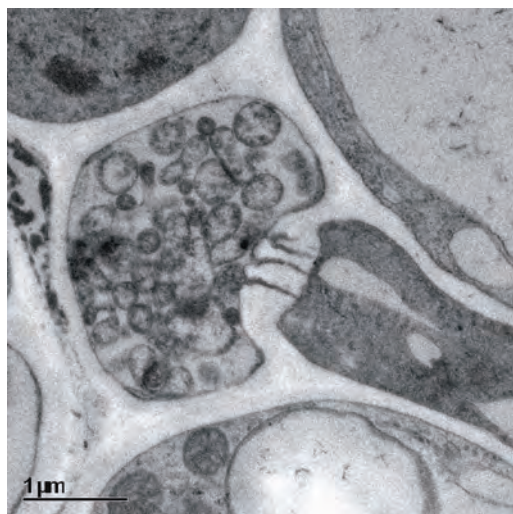
moramo najprej razumeti okolje fitoplazemskega gostitelja. Fitoplazme v rastlinah živijo skoraj izključno v soku floema – sistema za transport proizvodov fotosinteze po rastlinskem telesu. Takšno okolje fitoplazmi nudi odlične razmere za življenje in širjenje po gostiteljski rastlini. Fitoplazme so dovolj majhne, da se lahko premikajo skozi sitaste pore, ki povezujejo posamezne prevodne celice v floemu. Po floemu se premikajo pasivno, skupaj s floemskim sokom. Floemski sok je pod visokim hidrostatskim tlakom in je bogat s hranili. Po sestavi se razlikuje glede na rastlinsko vrsto, a vedno vsebuje velike količine ogljikovih hidratov. Najpogostejša je po navadi saharoza, poleg nje pa so v floemskem soku še glukoza, fruktoza, različni oligosaharidi in sladkorni alkoholi, kot sta manitol in sorbitol. V njem so tudi minerali, beljakovine, aminokisliline, rastlinski rastni regulatorji citokinini, avksini, abscizinska kislina, giberelini, jasmonati in metilsalicilati ter ATP in majhne RNA. Fitoplazme na neokužene rastline prenašajo žuželčji prenašalci, ki se s hranijo s floem-

skim sokom okuženih rastlin, predvsem so to bolšice in škrčatki iz reda Hemiptera. Pri hranjenju sprejmejo iz floemskega soka tudi fitoplazme, ki se nato pomnožujejo v hemolimfi žuželke. Zanimivo je, da je koncentracija organskih snovi v hemolimfi podobno visoka kot v floemskem soku. Glavni sladkor v hemolimfi je trehaloza, katere koncentracija je v korelaciji s količino saharoze v gostiteljski rastlini. Ko se taka žuželka hrani na zdravi rastlini, prenese fitoplazme v njen floemski sok in rastlina tako postane okužena.

Zaradi minimalne velikosti genoma so fitoplazme najenostavnejše znane samopodvajujoče se oblike življenja, nekje na meji med celičnimi organizmi in virusi. Omejitev pri hitrosti njihove evolucije predstavlja dejstvo, da imajo gostitelje v dveh kraljestvih organizmov. Iz štirih fitoplazemskih genomov, katerih nukleotidna zaporedja so znana, sklepamo, da so fitoplazme svoje genske pomanjkljivosti nadomestile s horizontalnim prenosom genov iz drugih kraljestev, preurejanjem DNA in rekombinacijo med kro-

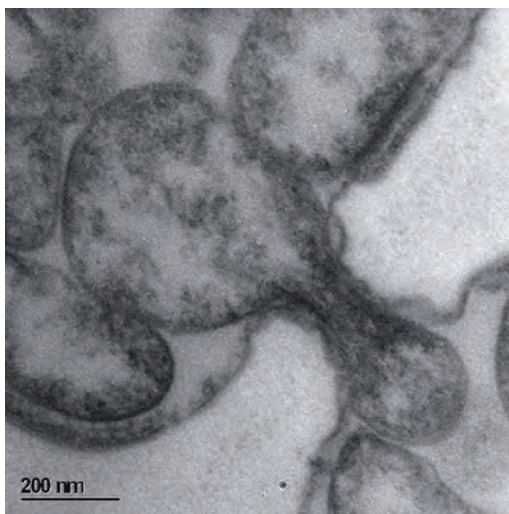
*Fitoplazme v notranjosti celic madagaskarskega zimzelena (Catharanthus roseus). Slika je posneta s transmisijskim elektronskim mikroskopom.*

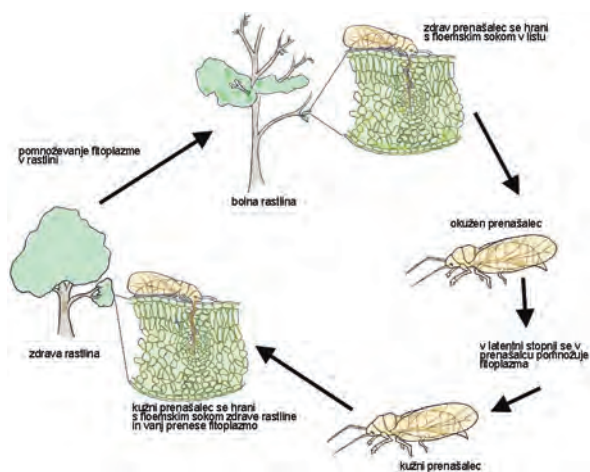
*Foto: Magda Tušek Znidarič.*



*Fitoplazma v sitasti pori med dvema celicama floema madagaskarskega zimzelena (Catharanthus roseus). Slika je posneta s transmisijskim elektronskim mikroskopom.*

*Foto: Magda Tušek Znidarič.*





Okuževalni krog fitoplazme (prirejeno po Christensen s sod., 2005).

mosomom in zunajkromosomskimi elementi – plazmidi. Tako kot pri drugih molikutih je tudi večina znanih genomov fitoplazem organizirana v krožne kromosome. Izjema so fitoplazme is skupine metličavosti jablan, katerih kromosomi so linearni. Od kod ta neobičajna organizacija bakterijskih kromosomov, ni jasno; znanstveniki domnevajo, da naj bi imela virusni izvor. Vključenost različnih virusnih nukleotidnih zaporedij v fitoplazemske genome tudi drugače ni neobičajna. V fitoplazemskih genomih so pogosti plazmidi. Za nekatere seve fitoplazem so že pokazali, da imajo njihovi plazmidi vpliv na prenos s prenašalci. V do sedaj poznanih genomih fitoplazem so našli tudi tako imenovane potencialne mobilne enote, ki imajo velik vpliv na podvojitve posameznih delov gena in naj bi prispevale h genetski variabilnosti fitoplazem. Pred kratkim so odkrili, da te enote lahko oblikujejo tudi zunajkromosomske elemente, ki se pomnožujejo in nato ponovno povežejo v fitoplazemski genom. Pri nekaterih sevih fitoplazem, kot so nekateri sevi '*Ca. P. asteris*', naj bi bilo kar 65 do 70 odstotkov beljakovin kodiranih na teh mobilnih enotah. Na drugi strani je takih genov pri fitoplazmi '*Ca. P. mali*', ki povzročata metličavost jablan, le 4 odstotke. Fitoplazme kot obligatni zajedavci nimajo številnih genov, za katere velja, da so nujni

za celično presnovo in jih imajo prosto živeče bakterije. Nimajo genov za sintezo aminokislin, maščobnih kislin in nukleotidov. Vse te snovi mora fitoplazma sprejeti z membranskimi transportnimi procesi. Za razliko od drugih bakterij, pozitivnih po Gramu, imajo fitoplazme tako zelo veliko pomembnih membranskih transporterjev. Izjemno nenavadna je odsotnost beljakovine, za katero velja, da je nujna za celično delitev. Kako se lahko fitoplazemska celica deli brez te beljakovine, za enkrat še ni pojasnjeno. Fitoplazemski geni kodirajo vse encime, nujne za glikolizo, vendar pa nimajo tistih, ki so nujni za fosforilacijo sladkorjev, ki v glikolizo vstopijo.

### »Za vse naj bi bil kriv ameriški škržatek«

V Sloveniji v zadnjih letih povzročata največjo gospodarsko škodo fitoplazma, ki nima niti še začasnega znanstvenega imena, tako da jo imenujemo kar povzročiteljica zlate trsne rumenice ali v francoskem izvorniku *flavescence dorée* (FDf). FDf je na karantenskem seznamu Evropske unije, kar pomeni, da za njeno zatiranje veljajo posebno stroga pravila. Zlata trsna rumenica se je pojavila v petdesetih letih prejšnjega stoletja v vinogradih zahodne Francije. Bolezen se je pojavila hkrati z ameriškim škržatom (*Scaphoideus titanus* Ball), ki so ga skupaj z divjimi trtami, namenjenimi za nove podlage, nenamerno uvozili v Evropo iz Združenih držav Amerike. Sočasnost dogodkov je raziskave te fitoplazemske bolezni upočasnili kar za 50 let, saj so znanstveniki poskušali pojasniti le povezavo med to žuželko in fitoplazmo, kar pa jih je vodilo v slepo ulico. Ameriški škržatek je monofagna vrsta na

vinski trti, kar pomeni, da se hrani izključno s floemskim sokom te rastline. Hitro širjenje bolezni po južnem delu Evrope in njene posledice so nakazovale, da okuženi škržatki morda le niso edini vir okužbe. K postopnemu razvozlavanju uganke so veliko prispevale tudi molekulske analize sevov fitoplazme, ki se niso povsem ujemale s predvidenim širjenjem prenašalca in pojavom bolezni v različnih državah. Znanstveniki so začeli upravičeno domnevati, da mora obstajati še dodatni vir okužbe. Raziskave je končno pospešilo odkritje, da v Ameriki te fitoplazme ni, kar je bil dokaz, da se je moral ameriški škržatek s FDF okužiti po prihodu v Evropo. Danes imamo kar veliko dokazov, da so najpomembnejši naravni vir te fitoplazme jelše (*Alnus* sp.). Po Evropi, vključno s Slovenijo, je okuženost jelš s FDF več kot 80-odstotna. V jelšah pa je okužba prikrita, tako da drevesa ne kažejo pravnobnih bolezenskih znamenj. Drugi že potrjeni vir okužbe s FDF je navadni srobot

(*Clematis vitalba*). Zanimivo je, da sta obe divji rastlini okuženi z različnimi sevi FDF. In kako naj bi FDF prišla z divjih rastlin na vinsko trto? Ta korak je še nejasen, imamo pa na zalogi nekaj možnih scenarijev. Dokaže zanje dobivamo z odkrivanjem različnih polifagnih žuželk, ki so okužene z različnimi sevi FDF. Te naj bi se hranile z okuženim floemskim sokom jelš ali srobotov, zelo redko in naključno tudi na vinski trti. Ob takih naključnih dogodkih bi lahko prišlo do prenosa fitoplazme na vinsko trto. Če je v bližini rastline ameriški škržatek, se lahko ob hranjenju okuži. Ker se hrani le na vinski trti, lahko fitoplazmo razširi na sosednje rastline v vinogradu. Če je v njem veliko škržatkov, pa je širitev bolezni le še vprašanje časa. Danes vemo, da je ta čas lahko

*Vinograd, zasajen s sorto vinske trte refošk, zelo okužen s FDF. Rdečenje listov je značilno za rdeče sorte, pri belih se pojavlja rumenenje. Foto: Maja Ravnikar.*





Značilna znamenja na vinski trti sorte refošk, okuženi s FDF: rdečenje listov, ki se ukrivljajo navzdol, krhkost listov zaradi kopičenja sladkorjev in odganjanje novih poganjkov pozno v rastni sezoni. Foto: Maja Ravnikar.

#### Vzhodnjaški škržatek (*Orientus ishidae* Matsumura 1902).

Foto: Maja Ravnikar.

do tri leta, saj je koncentracija fitoplazem v rastlini zelo nizka in je potrebno nekaj časa, da se namnožijo do mere, pri kateri se pojavijo bolezenska znamenja.

Nacionalni inštitut za biologijo je s strani Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin pri Ministrstvu za kmetijstvo in okolje pooblaščen za molekularno diagnostiko fitoplazem. V okviru tega pooblastila smo leta 2005 zaznali prvi pojav FDF v vinogradu na Koprskem in od takrat dalje sledimo širitvi bolezni, prav tako pa raziskujemo tudi njene vzroke. Našli smo žuželko – vzhodnjaškega škržatka (*Orientus ishidae* Matsumura 1902), v katerem je delež okužbe zelo velik in bi bil lahko potencialni prenašalec FDF z jelše na trto. Vrsta je novinka v Evropi; prvič so jo opisali v Švici leta 2002, v Sloveniji pa dve leti kasneje. Od takrat je pri nas splošno razširjena.

Poleg vzhodnjaškega škržatka so po Evropi našli še nekaj drugih potencialnih prenašalcev, vendar za nobenega od njih prenos v naravi še ni bil nedvoumno potrjen. Prav tako se povečuje seznam okuženih rastlin, vendar tudi zanje ni dokazano, do so zares novi viri okužbe.



## »Čarovniške metle« niso zdrav okras sadnega drevja

V Sloveniji so kot povzročiteljice bolezni pomembne tudi tri fitoplazme iz skupine metličavosti jablan: '*Ca. P. mali*', ki povzroča metličavost jablan, '*Ca. P. pyri*', ki povzroča propadanje hrušk, in '*Ca. P. prunorum*', ki povzroča leptonekrozo koščičarjev ali ESFY (European stone fruit yellows). Predvsem slednja v veliki meri otežuje pridelavo marelic.

### Pogled v prihodnost

Po dolgih desetletjih tavanja v temi so nam fitoplazme končno začele odkrivati nekatere od svojih skrivnosti, ki nam bodo pomagale varovati naše kmetijske posevke in drevesa pred boleznimi, ki jih povzročajo. Nedvomno se svet segreva, kar med drugim pomeni tudi širjenje območja žuželk prenašalk kot tudi potencialnih gostiteljskih rastlin na območja, kjer jih še pred kratkim ni bilo. Njihovo širjenje je lahko povezano tudi s širjenjem bolezni. Celo če bi o fitoplazmah vedeli kaj več, že danes ugotavljamo, da tradicionalni ukrepi zaščite, kot sta škropljenje proti prenašalcem in uničevanje okuženih poljščin ali okuženih izvornih rastlin, delujejo zelo omejeno. Različni znanstveniki se tako poslužujejo različnih strategij v boju s fitoplazmami. Nekateri poskušajo vzgojiti odporne rastline, drugi take, ki ne bi bile užitne za žuželke prenašalke. Spet tretji poskušajo okuževati rastline z milimi sevi fitoplazem, ki naj bi rastlino varovali pred bolj agresivnimi. Možni pristop vključuje tudi okužbe z nepatogenimi bakterijami, ki naj bi znotraj žuželke tekmovali s fitoplazmami, ali alternativne načine nadzora prenašalcev. Upanje danes vzbujajo tudi tehnologije določanja nukleotidnih zaporedij z novimi, učinkovitejšimi, hitrejšimi in predvsem cenejšimi določanji nukleotidnih zaporedij in z njimi določitev večjega števila fitoplazemskih genomov. Z njimi naj bi odkrili nove ključne interakcije med gostiteljskimi beljakovinami in fitoplazemskimi virulenč-

nimi molekulami. S številnimi projekti se v mednarodno mrežo raziskovalcev fitoplazem uspešno vključujemo tudi raziskovalci Nacionalnega inštituta za biologijo. Prav v mozaik razumevanja delovanja fitoplazem na vinski trti in na sadnem drevju smo prispevali že nekaj pomembnih kamenčkov. Na podlagi novih znanj bomo lahko bolje razumeli te zanimive organizme in tudi oblikovali nove strategije njihovega nadzora.

### Vir:

- Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., Schulz, A., 2005: *Phytoplasmas and their interactions with hosts. Trends in Plant Science*, 10: 526-535.
- Bertaccini, A., Duduk, B., 2009: *Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. Phytopathologia Mediterranea*, 48: 355-378.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., Seemüller, E., 2012: *Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. The Scientific World Journal*: doi:10.1100/2012/185942.
- Mehle, N., Ravnikar, M., Seljak, G., Knapič, V., Dermastia, M., 2011: *The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. Phytopathogenic Mollicutes*, 1 (2): 65-76.
- Mehle, N., Seljak, G., Rupar, M., Ravnikar, M., Dermastia, M., 2010: *The first detection of a phytoplasma from the 16SrV (Elm yellows) group in the mosaic leafhopper Orientus ishidae. New Disease Reports*, 22: doi: 10.5197/j.2044-0588.2010.022.011.
- Nikolić, P., Mehle, N., Gruden, K., Ravnikar, M., Dermastia, M., 2010: *A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. Molecular and Cellular Probes*, 24: 303-309.
- Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnikar, M., Dermastia, M., 2013: *Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. Plant Pathology*, 62 (4): 760-766.