

10. STRESZCZENIE

Fitoplazmy są małymi bakteriami fitopatogenicznymi, które namnażają się w łyku roślin oraz hemolimfie owadów będących ich wektorami, głównie skoczków z podrzędu Auchenorrhyncha (Weintraub i Beanland, 2006). Choć choroby powodowane przez fitoplazmy mogą być przyczyną poważnych strat w plonach roślin rolniczych, występowanie tych patogenów w Polsce było dotąd poznane w niewielkim stopniu. Doniesienia o nasileniu występowania chorób fitoplazmatycznych w Europie południowej i zachodniej oraz przypadki infekcji obserwowane na grochu i rzepaku w Polsce, były przesłanką do podjęcia badań nad rozpowszechnieniem fitoplazm w polskim środowisku rolniczym, z uwzględnieniem naturalnych rezerwuarów (chwastów), a także nad ich zróżnicowaniem oraz przynależnością taksonomiczną.

Materiał badawczy stanowiły rośliny rolnicze z objawami wskazującymi na infekcję fitoplazmatyczną, takimi jak: fyllodia, staśmienia, żółknięcie, czerwienienie, zahamowanie wzrostu, miotłastość i zwarty pokrój z gęstym ulistnieniem, a także rośliny dziko rosnące w okolicy pól rzepaku ozimego, z objawami lub bez widocznych objawów chorobowych, zebrane podczas obserwacji polowych. Materiał roślinny zbierano również z uprawy pszenicy oraz marchwi bez objawów porażenia fitoplazmami. Identyfikację i charakterystykę fitoplazm przeprowadzono przy pomocy metod molekularnych. Zastosowano izolację całkowitego DNA roślin, namnażanie DNA fitoplazmatycznego z zastosowaniem specyficznych starterów, a następnie sekwencjonowanie uzyskanych fragmentów i porównanie otrzymanych sekwencji z sekwencjami dostępnymi w Banku Genów. Przynależność do grup rybosomalnych fitoplazm określono na podstawie analizy restrykcyjnej genu kodującego 16S rRNA. Dodatkową charakterystykę izolatów z rzepaku przeprowadzono w oparciu o gen kodujący białko homologiczne do białek efektorowych SAP54 i PHYLL1, odpowiedzialnych za objaw fyllodiów. Natomiast uzupełniającą identyfikację izolatów z pozostałych roślin rolniczych przeprowadzono namnażając gen *tuf* kodujący czynnik elongacji Tu.

W wyniku lustracji 79 upraw rzepaku ozimego przeprowadzonej w zachodniej Polsce wykazano, że nasilenie występowania fyllodiozy na rzepaku wynosi średnio około 0,1%. Czynnikiem sprawczym choroby są najczęściej fitoplazmy należące do gatunku '*Ca. Phytoplasma asteris*', podgrupy 16SrI-B. Notowano również porażenia szczepem 16SrI-(B/L)L, wcześniej nie opisywanym jako patogen tej uprawy. Fitoplazmy występujące na rzepaku wywoływały charakterystycznie objawy, tzw. fyllodia tj. przekształcenia kwiatostanów w liściaste twory, które przyjmowały zróżnicowane formy (tzw. warianty

fenotypowe). Obserwowano również objawy staśmionych pędów, ale nie zawsze wykrywano fitoplazmy w tak zmienionych roślinach.

Analiza sekwencji genu kodującego 16S rRNA izolatów fitoplazm z rzepaku, wykazała obecność zmiennych nukleotydów w pozycjach 948, 969 i 1176 fragmentu P1/P7, ale nie zauważono korelacji pomiędzy tymi substytucjami, a zróżnicowaniem typów fyllodiów.

W wyniku reakcji PCR z zaprojektowanymi starterami własnymi, w genomie fitoplazmy fyllodiozy rzepaku (RP, izolat RzW14) zidentyfikowano gen SAP54_RP kodujący białko homologiczne do efektorów SAP54 i PHYLL1. Obecność genu o identycznej sekwencji potwierdzono również w chromosomie fitoplazmy pochodzącej z marchwi (38-1), aksamitki (F053) i skoczka sześciorka (125 02 ML).

Genotypowanie kolekcji izolatów z rzepaku ozimego z objawami fyllodiów ze starterami komplementarnymi do rejonów oskrzydających gen SAP54_RP wykazało, że rośliny pochodzące z różnych rejonów Wielkopolski porażone były zawsze przez fitoplazmę posiadającą ten gen, niezależnie od typu wywoływanych fyllodiów. Natomiast fitoplazmy zasiedlające rzepak bezobjawowo nie posiadały genu SAP54_RP. W genomach izolatów fitoplazm z rzepaku z niespecyficznymi objawami typu staśmien nie zawsze wykrywano gen SAP54_RP. Przedstawiono również, że sekwencja białka SAP54_RP jest identyczna u szczepów fitoplazm niezależnie od wywoływanego typu fyllodiów i miejsca zbioru roślin.

Sekwencja nukleotydów SAP54_RP była w 100% zgodna z homologiczną sekwencją efektoru szczepu AY2192 z Niemiec (AB862480) oraz podobna w 99,73% do sekwencji szczepów: AYMary (DQ837760) i GlaWB (AB862483). Sekwencja aminokwasów SAP54_RP wydzielanej części peptydu była identyczna z sekwencją białek szczepów 'Ca. Phytoplasma asteris' (AY2192, AYMary, GlaWB, RV oraz ChY), a także różniła się jednym aminokwasem w przypadku szczepu 'Ca. Phytoplasma pruni' (SpS) lub dwoma aminokwasami w przypadku szczepu 'Ca. Phytoplasma phoenicium' (PEY) czy fitoplazmy 'Ca. Phytoplasma asteris' infekującej rzepak w Kanadzie (RP TW1).

Analiza topologii drzewa filogenetycznego wykazała rozejście ewolucyjne homologicznych białek spokrewnionych szczepów grupy 16SrI do pięciu różnych klastrow. Uzyskane wyniki wskazują, że grupowanie homologów SAP54/PHYLL1 jest niezależne od grupy rybosomalnej do jakiej przynależą dane szczepy fitoplazm.

Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły skuteczność zaprojektowanych starterów w powielaniu genu białka SAP54_RP, pozwalając na stwierdzenie obecności domniemanego genu wirulencji w izolatach fitoplazm. Opracowane startery umożliwiają odróżnienie patogenicznych od niepatogenicznych dla rzepaku szczepów fitoplazm.

Wyniki doświadczenia polowego wskazują, że porażenie fitoplazmami upraw rzepaku może sięgać 0,28 % w systemie bezorkowym. Zaobserwowano, że uprawa rzepaku ozimego w systemie orkowym z poplonem gorczycy i włączeniem roślin strączkowych do zmianowania, w istotny sposób obniżała wystąpienie fitoplazm.

W ramach badań, po raz pierwszy na świecie, zidentyfikowano fitoplazmę '*Ca. Phytoplasma asteris*', podgrupy 16SrI-B na kalafiorze, gorczycy, grochu i łubinie oraz fitoplazmę '*Ca. Phytoplasma asteris*', podgrupy 16SrI-L na buraku cukrowym, grochu i kukurydzy.

Badania wykazały również, że uprawy pszenicy i marchwi w Polsce mogą być bezobjawowo zasiedlane przez fitoplazmy. Po raz pierwszy w Polsce wykryto fitoplazmę '*Ca. Phytoplasma asteris*' 16SrI-B na pszenicy.

Fitoplazmy należące do gatunku '*Ca. Phytoplasma asteris*', wykryto także w roślinach ozdobnych – aksamitce rozpierzchłej (podgrupa 16SrI-(B/L)L) i jałowcu (16SrI-B), mogących stanowić rezerwuuar patogenu.

Analiza zróżnicowania genetycznego sekwencji genu 16S rRNA ujawniła, że fitoplazmy infekujące niektóre rośliny rolnicze (burak, marchew, łubin) oraz aksamitkę miały dwuznaczne nukleotydy w trzech pozycjach (177, 267, 1259) fragmentu ograniczonego starterami P1/P7. Zgodnie z analizą restrykcyjną zaklasyfikowano je do heterogenicznej grupy rybosomalnej 16SrI-(B/L)L. Analiza wariantów genetycznych 16S rDNA fitoplazm infekujących marchew i buraka cukrowego wykazała zmienność pomiędzy dwoma operonami rybosomalnymi w badanych izolatach. Zarówno izolat z marchwi, jak i buraka posiadał cztery warianty genu 16S rRNA, co wskazuje na mieszaną infekcję fitoplazm posiadających heterogeniczne operony rRNA.

Na podstawie analizy porównawczej fragmentu genu *tuf*, który jest mniej zachowawczy niż gen 16S rRNA stwierdzono, że zarówno fitoplazmy z podgrupy 16SrI-B, jak i podgrup 16SrI-L i 16SrI-(B/L)L, mają identyczne sekwencje genu *tuf*, a ponadto są identyczne pomimo heterogeniczności operonów rybosomalnych i grupują się na drzewie filogenetycznym razem z szczepami referencyjnymi 16SrI-B.

Badania wykazały, że na utrwalenie populacji fitoplazm w agrocenozie rzepaku mogą wpływać chwasty zasiedlające okolice upraw. Fitoplazmy podgrup 16SrI-B i 16SrI-(B/L)L, które występują na rzepaku ozimym zidentyfikowano w dziesięciu gatunkach chwastów: chwastnicy jednostronnej, życicy trwałej, rdeście ptasim, stuliszu lekarskim, fiołku polnym, marunie bezwonnej, rumianku bezłodygowym, powoju polnym, gwiazdnicy pospolitej oraz maku polnym.

Analizy molekularne wykazały, że fitoplazmy były obecne w około 22% testowanych roślin dziko rosnących. Ponad 35% chwastów było nosicielami fitoplazmy, pomimo braku widocznych objawów infekcji fitoplazmatycznej. Na chwastach wykryto fitoplazmy należące do trzech blisko spokrewnionych podgrup: 16SrI-B, 16SrI-L, 16SrI-(B/L)L oraz fitoplazmy z podgrup 16SrI-C i 16SrXII-H.

W ramach badań, po raz pierwszy w Polsce, zidentyfikowano fitoplazmę na takich roślinach dziko rosnących jak: rdest ptasi, stulisz lekarski, powój polny, chwastnica jednostronna, kupkówka pospolita, miotła zbożowa, perz właściwy, wiechlina roczna, życica trwała, fiołek polny, bodziszek drobny, chaber bławatek, gwiazdnica pospolita, maruna bezwonna, mak polny oraz rumianek bezłodygowy.

Analiza podobieństwa sekwencji 16S rDNA izolatów fitoplazm 16SrI-B, 16SrI-L i 16SrI-(B/L)L z chwastów, wykazała istnienie miejsc polimorficznych w pozycjach 267 i 1259 fragmentu P1/P7. Oprócz zmian nukleotydowych w tych miejscach, które są prawdopodobnie wynikiem zróżnicowania dwóch operonów rybosomalnych wewnątrz genomu, opisano również, towarzyszące mutacje punktowe w pozycjach 227, 771, 817, 880, 1024, które wystąpiły jedynie w próbkach z trzech gatunków chwastów (wiechliny rocznej, stuliska lekarskiego i rdestu ptasiego). Wskazuje to na różnicowanie się szczepów fitoplazm do nowych linii ewolucyjnych w wybranych gospodarzach roślinnych.

Na kupkówce zwyczajnej wykryto nową podgrupę rybosomalną fitoplazm w obrębie taksonu '*Ca. Phytoplasma asteris*', różniącą się profilem restrykcyjnym (powyżej 9% zróżnicowania) od wszystkich innych dotychczas ustanowionych podgrup 16SrI.

Stwierdzenie bezobjawowych infekcji rzepaku, marchwi, pszenicy oraz licznych gatunków chwastów pokazuje, że fitoplazmy są znacznie bardziej rozpowszechnione środowisku rolniczym w Polsce niż dotychczas uważano. Istnieje wiele gatunków roślin będących naturalnym rezerwuarem tych patogenów w ekosystemie.

Potencjał przenoszenia patogenu na uprawy rzepaku ozimego jest wysoki, ze względu na dostępność fitoplazm w roślinach dziko rosnących. Ograniczone nasilenie choroby jest prawdopodobnie wynikiem zasiedlania upraw przez mniej wirulentny szczep fitoplazm pozbawiony genu SAP54_RP, który powoduje porażenia bezobjawowe.

Można też sądzić, że ograniczone występowanie chorób fitoplazmatycznych na uprawach w Polsce jest spowodowane chłodnymi warunkami klimatycznymi, przy czym stan ten może ulec zmianie wraz z ociepleniem klimatu oraz wieloletnim stosowaniem uproszczonego płodozmianu.