

*Maria Kamińska*

*Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach*

## **Fitoplazmy — ważny problem w ochronie roślin**

**Słowa kluczowe:** fitoplazmy, taksonomia, choroby fitoplazmatyczne

### **Wstęp**

Żółtaczka astra (Aster Yellows, AY), od której wywodzi się nazwa grupy chorób (Aster yellows-type discases), opisana została ponad 70 lat temu w USA [23]. Badacz ten wykazał też, że żółtaczka jest infekcyjna, gdyż jej czynnik sprawczy przenosił się przez skoczka *Macrostelus fascifrons* oraz przez szczepienie [22]. W roślinach z objawami żółtaczki nie stwierdzono obecności grzybów, bakterii czy pierwotniaków, więc uznano, że przyczyną choroby są wirusy. Kilka lat później, w roku 1943, Black [1] stwierdził, że sok roślin porażonych żółtaczką, po przesączeniu przez sączki Berkefelda N i V (nieprzepuszczające bakterii), traci częściowo właściwości infekcyjne. Dalsze próby oczyszczenia sprawcy żółtaczki przeprowadzone przez kilku badaczy potwierdziły wyniki badań Blacka, że cząstki patogena powodującego żółtaczkę są większe od wirusów.

Mimo tych zastrzeżeń, pogląd o wirusowym charakterze żółtaczek trwał do 1967 roku, kiedy badacze Laboratorium Asuyama Uniwersytetu w Tokio [8], na podstawie wyników badań pod mikroskopem elektronicznym ultracienkich skrawków roślin porażonych żółtaczką astra, miotlastością ziemniaka i karłowatością morwy, ustalili przyczynę tych chorób. Badania Japończyków wykazały, że w lyku chorych roślin występują liczne wielokształtne ciała, o średnicy od 80 do 800 nm, podobne do mikoplazm porażających ludzi i zwierzęta. Stwierdzono również, że organizmy mikoplazmopodobne (mycoplasma-like organisms, MLOs), które od 1993 roku nazywają się fitoplazmami, nie mają ścian komórkowej, lecz otoczone są trójwarstwową błoną cytoplazmatyczną, mają zarówno DNA, jak i RNA. W odróżnieniu od spiroplazm i innych bakterii, fitoplazmy nie namnażają się na sztucznej pożywce.

## Charakterystyka i status fitoplazm

---

Fitoplazmy są przyczyną bardzo destrukcyjnych chorób ponad 600 gatunków roślin [36]. Porażają rośliny uprawne i dziko rosnące, zielne i drzewiaste we wszystkich ich rejonach uprawy, a zwłaszcza w ciepłym klimacie. U roślin porażonych przez fitoplazmy obserwuje się zahmowanie wzrostu, chlorozę, a nawet żółknięcie, nekrozę i deformację liści, wybijanie pędów ze śpiących pąków, zaburzenia w rozwoju organów generatywnych i sterility kwiatów, degenerację systemu korzeniowego oraz przedwczesne zamieranie.

Fitoplazmy należą do *Procaryota*, cl. *Mollicutes*. Pierwszym molekularnym wskaźnikiem przynależności fitoplazm do *Mollicutes* było ustalenie zawartości G + C w silnie skoncentrowanym DNA pochodzącym z fitoplazm. Niska wartość (23,0–26,2 mol%) świadczyła o ścisłym pokrewieństwie z mikoplazmami [21]. Więcej informacji uzyskano z ustalenia wielkości genomu. Według Neimark i Kirkpatrick [38], dla *Mollicutes* namnażających się w warunkach *in vitro* wartość ta mieści się w granicach 600–1150 kb. Dowodem pokrewieństwa filogenetycznego i przynależności fitoplazm do *Mollicutes* może być analiza porównawcza sekwencji konserwatywnego genu 16S rRNA, który został zaproponowany jako uniwersalny filogenetyczny marker [48] i służy klasyfikacji głównych grup *Procaryota*. Analiza sekwencji genu 16S rRNA kilkudziesięciu fitoplazm wykazała, że pod względem filogenetycznym stanowią odrębną grupę.

Uwzględniając wyniki tych badań, Międzynarodowy Komitet Systematyki Bakterii (International Committee of Systematic Bacteriology, ICSB) Podkomitet Taksonomii *Mollicutes* (Subcommittee of the Taxonomy of *Mollicutes*; 1993, 1997), wyraził zgodę na zamianę nazwy MLO na fitoplazma.

## Podstawy identyfikacji i klasyfikacji fitoplazm

---

### Zakres i reakcja roślin gospodarzy

Do niedawna identyfikacja, różnicowanie i charakterystyka fitoplazm oparte były na wynikach testu biologicznego, tj. zakresie i reakcji roślin gospodarzy oraz związku choroby z wektorem [4, 9]. Według tego biologicznego kryterium, a także zasięgu występowania choroby wydzielono dwa szczepy żółtaczki astra — wschodni i zachodni, które jednak nie obejmowały wszystkich fitoplazm.

Podstawą różnicowania fitoplazm jest także specyficzność owadzych wektorów. Na przykład dwie fitoplazmozy winorośli *flavescence doree* (FD) i *bois noir* (BN), mimo iż pod względem objawów chorobowych są bardzo podobne, zostały uznane za powodowane przez różne fitoplazmy, ponieważ wektor FD (*Scaphoides titanus*) nie przenosi BN [3]. Podobnie proliferacja jabłoni i choroba zamierania gruszy, mimo iż powodowane są przez genetycznie bardzo podobne fitoplazmy, przenoszone są przez różne gatunki owadów.

## Właściwości serologiczne

Do wykrywania i identyfikacji fitoplazm stosowane są surowice poliklonalne i monoklonalne [15, 27, 29]. Ze względu na duże trudności z uzyskaniem czystych, wolnych od białka roślinnego preparatów fitoplazm, surowice wyprodukowane przy użyciu takich immunogenów mają stosunkowo niskie miano i mogą być stosowane do wykrywania fitoplazm jedynie w roślinach, w których osiągają wysoką koncentrację, np. w barwinku lub innych roślinach zielnych. Mimo tych ograniczeń, ze względu na stosunkowo wysoką specyficzność przeciwciał, testy serologiczne mają zastosowanie do identyfikacji ściśle spokrewnionych szczepów, których na podstawie rDNA nie można różnicować.

## Metody molekularne

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił przełom w dziedzinie badań nad chorobami fitoplazmatycznymi, spowodowany wprowadzeniem nowych metod diagnostycznych opartych na analizie DNA. Największe zastosowanie znalazły tu techniki hybrydyzacji kwasów nukleinowych oraz łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) i analiza oparta na polimorfizmie długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) produktu amplifikacji, poddanego uprzednio działaniu enzymów restrykcyjnych.

### Analiza hybrydyzacji 'dot blot' i Southerna

Do hybrydyzacji techniką 'dot blot' jako sondy molekularne stosowane są fragmenty sklonowanego chromosomalnego DNA fitoplazm [16, 28]. W porównaniu z testami serologicznymi, sondy molekularne wykazują szerszy zasięg wykrywania fitoplazm.

Hybrydyzacja Southerna, a następnie analiza RFLP dostarczają więcej informacji na temat pokrewieństwa genetycznego fitoplazm niż metoda 'dot blot', która jest teraz rzadko używana. Dzięki zastosowaniu odpowiednich sond molekularnych i enzymów restrykcyjnych analiza Southerna umożliwia różnicowanie blisko spokrewnionych szczepów. Metoda ta została zastosowana do różnicowania izolatów żółtaczki astra [25, 30] oraz proliferacji jabłoni [18]. Wadą metody hybrydyzacji Southerna jest ograniczony zasięg hybrydyzacji sond oraz stosunkowo mała czułość.

### Analiza RFLP

Gen 16S rRNA uniwersalny dla *Procarvota* [48], który posiada regiony zarówno konserwatywne, jak i regiony o dużej zmienności, stanowi główną, aczkolwiek nie jedyną podstawę identyfikacji i klasyfikacji fitoplazm. Fitoplazmatyczne DNA może być izolowane zarówno z porażonych roślin, jak i wektorów [16], amplifikowane w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), cięte za pomocą enzymów restrykcyjnych i

sekwencjonowane. Analiza RFLP rDNA uzyskanego w reakcji łańcuchowej polimerazy jest obecnie stosowana jako rutynowa metoda różnicowania i klasyfikowania fitoplazm. Dokładność klasyfikacji uwarunkowana jest liczbą zastosowanych enzymów restrykcyjnych. Celem zróżnicowania badanych fitoplazm Lee i in. [31] zastosowali 15 enzymów.

Analiza RFLP genu 16S rRNA umożliwia ocenę fitoplazm pod względem molekularnym, ale nie odzwierciedla różnic fenotypowych. Oznacza to, że gen ten nie jest dostatecznie zmienny, by zróżnicować fitoplazmy pod kątem rośliny gospodarza czy wektora. Stosunkowo większą zmienność wykazują sekwencje kwasu nukleinowego genów rybosomalnych protein. Stosunkowo mało konserwatywna jest także sekwencja genu kodującego czynnik wydłużania Tu (gen *tuf*). Wykorzystując ten gen dokonano dalszego podziału fitoplazm w ramach grupy AY [43]. Do różnicowania blisko spokrewnionych fitoplazm stosuje się także analizę RFLP fragmentów losowo klonowanego chromosomalnego DNA fitoplazm [6, 10].

Podstawą klasyfikacji może być także analiza innej, stosunkowo konserwatywnej sekwencji regionu znajdującego się między genami 16S a 23S rRNA. W porównaniu z genem 16S rRNA jest on bardziej atrakcyjny, bo krótszy (220–250 bp a 1135 bp) i łatwiejszy do zsekwencjonowania. Na podstawie analizy sekwencji regionu 16S-23S zróżnicowano około 60 fitoplazm [17].

## Różnicowanie i klasyfikacja fitoplazm

Taksonomia fitoplazm i innych organizmów z *Procaryota*, które nie namnażają się na pożywkach, jest bardzo trudna, gdyż nie można stosować kryteriów używanych w taksonomii organizmów namnażających się na pożywce. W klasyfikacji organizmów, których charakterystyka oparta jest na metodach molekularnych, zaproponowano wprowadzenie terminu *Candidatus* [37]. Grupa Robocza Fitoplazm Międzynarodowej Organizacji Mikoplazmologii (IOM), podczas posiedzeń w 1994 i 1997 roku w Bordeaux i Orlando, zaproponowała przyjęcie tej nowej klasyfikacji fitoplazm, opartej na sekwencji genu 16S rRNA, i traktowanie głównych grup fitoplazm jako gatunków kandydackich — *Candidatus Phytoplasma species*. Dotychczas opisano tylko dwa gatunki kandydackie fitoplazm, *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* [49] i *Candidatus P. australiense* [7].

Przeprowadzono wiele prób klasyfikacji fitoplazm [29, 44, 46], z których najbardziej aktualna jest klasyfikacja opracowana przez Seemüllera i in. [45]. Proponuje ona podział dotychczas poznanych 246 fitoplazm na 20 filogenetycznych grup (subclades) (tab. 1 i 2). Podstawą tego podziału są metody oparte na analizie DNA, a czasem także różnice we właściwościach serologicznych.

Fitoplazmy pogrupowano, uwzględniając różnice w homologii sekwencji 16S rDNA; w zależności od grupy różnice te wahają się od 2,3% do 2,5%. Największe gru-

Tabela 1. Główne grupy fitoplazm ustalone na podstawie badań molekularnych wg Seemüllera i innych [45]

Grupa fitoplazm	Nazwa angielska grupy	Liczba zidentyfikowanych fitoplazm	Występowanie
1. Żółtaczkę astra	Aster yellows (AY)	103	Europa, Azja, Ameryka Płn.
2. Australijskiej żółtaczkę winorośli	Australian grapevine yellows (AUSGY)	3	Australia, Nowa Zelandia
3. Włoskiego stolburu powoju	Italian bindweed stolbur (ISB)	1	Włochy
4. Stolburu	Stolbur (STOL)	12	Europa
5. Miotlastości <i>Rhamnus catharticus</i>	Buckthorn witches'-broom (BWB)	1	Niemcy
6. Miotlastości spartium	Spartium witches'-broom (SpaWB)	2	Włochy
7. Proliferacji jabłoni	Apple proliferation (AP)	13	Europa, Ameryka Płn.
8. Choroby X	X-disease (WX)	30	Europa, Ameryka Płn., Japonia
9. Włoskiej miotlastości lucerny	Italian alfalfa witches'-broom (IAWB)	2	Włochy
10. Liściaków bobu	Faba bean phyllody (FBP)	38	Australia, Sudan, Tajlandia
11. Miotlastości niki indyjskiej	Pigeon pea witches'-broom (PPWB)	6	Włochy, Floryda
12. Liściaków ostrożeńca	Cirsium phyllody (CirP)	1	Niemcy
13. Białolistności trzciny cukrowej	Sugarcane white leaf (SCWL)	4	Tajlandia, Japonia, Niemcy
14. Białolistności trawy bermudzkiej	Bermuda grass white leaf (BGWL)	4	Włochy, India, Tajlandia
15. Tanzańskiego zamierania palmy kokosowej	Tanzanian lethal decline (TLD)	3	Tanzania, Kenia, Nigeria
16. Śmiertelnego żółknienia palm	Lethal yellowing (LY)	3	Ameryka Płn. i Płd.
17. Miotlastości luffy	Loofah witches'-broom (LFWB)	1	Tajwan
18. Żółtaczkę jesionu	Ash yellows (AshY)	2	USA
19. Proliferacji koniczyny	Clover proliferation (CP)	7	Kanada, Indie
20. Żółtaczkę wiąz	Elm yellows (EY)	11	Europa, Chiny, USA

Tabela 2. Klasyfikacja fitoplazm z grupy żółtaczkki astra (AY) [45]

Podgrupa	Nazwa polska	Nazwa angielska	Liczba zidentyfikowanych fitoplazm	Występowanie
1. I-A	Fitoplazma dużego pąka pomidora	Tomato big bud phtp. (BB)	9	USA, Kanada
2. I-B	Fitp. żółtaczkki astra Maryland	Maryland aster yellows phtp. (AY1)	64	Europa, USA, Japonia
3. I-C	Fitp. liściaków koniczyny	Clover phyllody phtp. (CpH)	12	Europa, USA
4. I-D	Fitp. miotlastości paulownii	Paulownia witches'-broom phtp. (PaWB)	1	Tajwan
5. I-E	Fitp. borówki	Bluberry stunt phtp. (BBS)	1	USA
6. I-F <sup>2</sup>		AYA (ACLR)	1	Hiszpania
7. I-H	Fitp. żółtaczkki złocienia	Chrysanthemum yellows phtp. (Cy'b)	1	Włochy
8. I-I	Fitp. meksykańskiego zielenienia kwiatów barwinka	Mexican periwinkle virescence phtp. (MPV)	3	Meksyk, Floryda
9. Podgrupa słabo poznana	brak	brak	11	Europa, Azja, Ameryka Płn. i Płd.

py fitoplazm, żółtaczki astra, proliferacji jabłoni i żółtaczki wiązu są stosunkowo homogenne, a różnice w homologii sekwencji ich 16S rDNA wynoszą odpowiednio poniżej 1,7%, 1,6% i 1,2%. Inne grupy fitoplazm są bardziej zróżnicowane. Na przykład w grupie białolistności trzciny cukrowej różnice między poszczególnymi fitoplazmami wahają się od 2,3 do 2,7%.

Największą, bo skupiającą 103 fitoplazmy, jest grupa żółtaczki astra (AY). Wyodróżniono w niej 8 podgrup (od I-A do I-I), z których każda obejmuje od jednej (I-D, I-E, I-F, I-H) do kilku lub kilkunastu szczepów. Najliczniejsza jest podgrupa I-B. Generalnie, fitoplazmy wchodzące w skład tej samej podgrupy są bardzo podobne lub nawet identyczne, zaś fitoplazmy wymienione w ostatniej, dodatkowej podgrupie nie są do końca scharakteryzowane.

Pozostałe (143) poznane fitoplazmy zostały zaklasyfikowane do 19 grup, których nazwy związane są z nazwą powodowanej przez nie choroby, a niekiedy i miejscem występowania. Niektóre grupy obejmują tylko pojedyncze taksony, inne zaś, jak grupa choroby-X — 11 taksonów.

## Zróżnicowanie genetyczne fitoplazm a ich związek z rośliną

Zakres roślin żywicielskich fitoplazm jest bardzo zróżnicowany. Fitoplazmy z podgrupy I-B mają bardzo szeroki zakres gospodarzy i porażają rośliny z wielu rodzajów. Dla odmiany fitoplazmy z podgrupy I-D, I-E, I-F i I-H zidentyfikowano tylko w pojedynczych gatunkach roślin. Podobnie fitoplazmy z grupy proliferacji jabłoni wydają się preferować jednego gospodarza. Wąski zakres roślin żywicielskich posiada także fitoplazma żółtaczki jesionu oraz fitoplazmy z grupy śmiertelnej żółtaczki i tanzańskiej śmiertelnej żółtaczki palmy, porażające tylko palmy. Z drugiej strony fitoplazma stolburu została wykryta w bardzo wielu gatunkach roślin.

Mimo stosunkowo wysokiej homologii, niektóre fitoplazmy należące do tej samej grupy różnią się pod względem zdolności do porażania roślin czy też przenoszenia przez wektory owadzie. Stosowane dotychczas techniki molekularne nie dają podstaw do różnicowania fitoplazm, uwzględniającego ich związek z rośliną i/lub wektorem. Przypuszcza się, że wprowadzenie innych markerów czy technik badawczych mogłoby wykazać większe zróżnicowanie genetyczne fitoplazm oraz związek genotypu z podatnością rośliny. Na podstawie stosunkowo mało zróżnicowanej reakcji roślin *Catharanthus roseus* na porażenie przez fitoplazmy można podejrzewać, że zakres roślin żywicielskich fitoplazm może być uwarunkowany ich związkiem z wektorem.

## Występowanie fitoplazm

Fitoplazmy występują we wszystkich rejonach uprawy roślin, ale są istotne różnice co do zasięgu występowania poszczególnych grup [36, 45]. Dla przykładu fitoplazmy z podgrupy I-A żółtaczki astra występują w Ameryce Płn., fitoplazmy z podgrupy I-B zaś występują powszechnie nie tylko w Ameryce Płn., ale także w Europie i Japonii. Z kolei fitoplazmy stolburu i żółtaczki wiązu zostały zidentyfikowane odpowiednio tylko na terenie Europy i Ameryki Płd., fitoplazmy z grupy liściaków bobu zaś znane są tylko z terenu Azji i Australii. Fitoplazmy zaliczone do grupy proliferacji jabłoni opisano z terenu Europy, z wyjątkiem czynnika żółtaczkowego liściozwoju brzoskwini, którego występowanie stwierdzono w zachodnich stanach USA. Wydaje się, że dalszy rozwój badań może dostarczyć nowych informacji na temat występowania fitoplazm. Brak jest np. wiadomości na temat występowania fitoplazm na terenie byłego Związku Radzieckiego, Afryki i Ameryki Południowej. Uzupełnienie tych informacji może wprowadzić zmiany w naszej wiedzy na temat geograficznego rozmieszczenia fitoplazm. Wskazują na to doniesienia ostatnich lat, które wykazały, że np. fitoplazma białolistności trzciny cukrowej — groźny patogen ryżu i trzciny cukrowej w Azji, występuje także na terenie Niemiec [35].

W ostatnim dziesięcioleciu obserwujemy duże zainteresowanie fitoplazmami, spowodowane nie tylko wprowadzeniem nowych technik diagnostycznych, ale przede wszystkim masowym występowaniem i dużą szkodliwością żółtaczek. W Europie najczęściej publikacji na ten temat ukazało się we Włoszech, Niemczech i Francji, gdzie są bardzo korzystne warunki klimatyczne dla rozwoju fitoplazm i ich wektorów oraz wysoki poziom badań biologicznych.

W przeszłości zdarzało się, że w niektóre lata choroby typu AY występowały w większym nasileniu niż w inne. Na przykład w latach pięćdziesiątych w USA na mieczyku [33], w latach sześćdziesiątych w Holandii na mieczyku i hiacyncie [47] obserwowano szczególnie duże nasilenie żółtaczek. Z obserwacji Kochmana i Stachyry [20] wynika, że w latach pięćdziesiątych objawy żółtaczki występowały dość powszechnie. Od tego czasu, aż do roku 1995, na roślinach zielnych choroby nie obserwowano.

Można przypuszczać, że o masowym występowaniu chorób fitoplazmatycznych w ostatnich latach mogło zdecydować kilka czynników. Nie bez znaczenia jest być może wprowadzenie do środowiska nowych, podatnych odmian, systemów uprawy i monokultur. Jednym z nich jest też zapewne występowanie obfitych źródeł infekcji oraz zaistnienie korzystnych warunków do zimowania i rozmnażania się wektorów fitoplazm. Wydaje się, że poprawa warunków sprzyjających rozwojowi szkodników oraz chorób fitoplazmatycznych może być konsekwencją wzrostu temperatury gleby i atmosfery, prowadzących do zmiany klimatu z powodu hamowania promieniowania ciepła przez Ziemię [32].



## Choroby typu żółtaczki w literaturze polskiej

---

Pierwsze obserwacje nad chorobami typu żółtaczki astra, zwanymi żółciznami, prowadzili w Polsce Kochman i Stachyra [20]. Badania te dotyczyły kilkunastu gatunków roślin zielnych i drzewiastych, zarówno uprawnych, jak i dziko rosnących. W późniejszych latach badania nad żółtaczkami roślin zielnych prowadzili Kochman i Książek [19] oraz Ruszkiewicz i Zielińska [42], roślin sadowniczych zaś — Borecka i Zawadzka [2], Pielka [39] oraz Kamińska i Zawadzka [12]. Aktualnie, w związku z częstym występowaniem i dużą szkodliwością fitoplazm, w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach prowadzone są badania nad ich występowaniem, metodami wykrywania i identyfikacji, w tym metodami molekularnymi, na roślinach sadowniczych [5, 34] oraz ozdobnych [11, 13, 14, 41].

### Podsumowanie

---

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił przełom w dziedzinie badań nad chorobami fitoplazmatycznymi, spowodowany wprowadzeniem nowych metod diagnostycznych opartych na analizie DNA. Największe znaczenie znalazły tu technika łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) produktu amplifikacji poddanego uprzednio działaniu enzymów restrykcyjnych. Gen 16S rRNA stanowi główną, ale nie jedyną podstawę identyfikacji i klasyfikacji fitoplazm, które charakteryzują się ogromnym zróżnicowaniem genetycznym. Mimo stosunkowo wysokiej homologii, fitoplazmy należące do tej samej grupy różnią się pod względem zdolności do porażania roślin czy też przenoszenia przez wektory owadzie, a stosowane dotychczas techniki molekularne nie uwzględniają tego związku. Przypuszcza się, że wprowadzenie innych markerów czy technik badawczych mogłoby wykazać większe zróżnicowanie genetyczne fitoplazm oraz związek genotypu z podatnością rośliny.

### Literatura

---

- [1] Black L.M. 1943. Some properties of aster-yellows virus. *Phytopathology* 33: 2.
- [2] Borecka H., Zawadzka B. 1961. Wstępne obserwacje występujących w Polsce chorób wirusowych truskawek, przeprowadzone w 1959 roku. *Prace ISK* 5: 287–305.
- [3] Caudwell A., Larrue J., Kuszala C., Bachelier J.-C. 1971. Pluralité des jaunisses de la vigne. *Annales de Phytopathologie* 3: 95–105.
- [4] Chiyskowski L.N. 1962. Clover phyllody virus in Canada and its transmission. *Can. J. Bot.* 40: 397–404.

- [5] Cieślińska M., Zawadzka B. 1999. Występowanie i identyfikacja groźnej choroby fitoplazmatycznej truskawki. Materiały z Ogólnopolskiej Konferencji Ochrony Roślin Sadowniczych. Skierniewice 16–17 lutego 1999: 234–235.
- [6] Daire X., Clair D., Reinert W., Boudon-Padieu E. 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European J. Plant Pathol.* 103: 507–514.
- [7] Davis R.E., Dally E.L., Gundersen D.E., Lee I.-M., Habili N. 1997. “*Candidatus Phytoplasma australiense*”, a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 262–269.
- [8] Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H. 1967. Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches’ broom, aster yellows, or paulownia witches’-broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 33: 259–266.
- [9] Freitag J.H. 1964. Interaction and mutual suppression among three strains of aster yellows virus. *Virology* 24: 401–413.
- [10] Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bové J.M. 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2916–2923.
- [11] Kamińska M., Korbin M. 1999. The incidence of Phytoplasma and symptom expression of stunt and flower bud deficiency disease in lilies (*Lilium* sp.) over two years. *Phytopathol. Pol.* 18: 27–36.
- [12] Kamińska M., Zawadzka B. 1970. Badania nad proliferacją (miotlastością) jabłoni w Polsce. II Wyniki badań nad szkodliwością proliferacji jabłoni. *Acta Agrobot.* 23: 341–351.
- [13] Kamińska M., Korbin M., Rudzińska-Langwald A. 1999. Fitoplazmy — nowe zagrożenie w produkcji roślin ozdobnych. Materiały z Sesji Naukowej IOR: *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 39: 132–139.
- [14] Kamińska M., Malinowski T., Komorowska B., Rudzińska-Langwald A. 1997. Etiology of yellows and witches’ broom symptoms in some ornamental plants. *Acta Hort.* 432: 96–106.
- [15] Kirkpatrick B.C. 1991. Mycoplasma-like organisms-plant and invertebrate pathogens. W: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. (red.). *The Prokaryotes*. 3: 4050–4067. Springer, New York.
- [16] Kirkpatrick B.C., Stenger D.C., Morris T.J., Purcell A.H. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238: 197–200.
- [17] Kirkpatrick B., Smart C., Gardner S., Gao J.-L., Ahrens U., Mäurer R., Schneider B., Lorenz K.-H., Seemüller E., Harrison N., Namba S., Daire X. 1994. Phylogenetic relationship of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Letters* 3: 228–229.
- [18] Kison H., Schneider B., Seemüller E. 1994. Restriction fragment length polymorphism within the apple proliferation mycoplasma-like organism. *Journal of Phytopathology* 141: 395–401.

- [19] Kochman J., Książek D. 1964. Badania nad przenoszeniem wirusów żółtaczki astra i żółtej karłowatości cebuli przy udziale skoczaków *Macrosteles laevis* Rob. *Acta Agrobot.* 16: 145–156.
- [20] Kochman J., Stachyra T. 1957. Materiały do poznania chorób wirusowych roślin w Polsce. *Rocz. Nauk Rol seria E.* 77: 297–325.
- [21] Kollar A., Seemüller E. 1989. Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology* 127: 177–186.
- [22] Kunkel L.O. 1924. Insect transmission of aster yellows. *Phytopathology* 14: 54.
- [23] Kunkel L.O. 1926. Studies on aster yellows. *Amer. J. Bot.* 13: 646–705.
- [24] Kuske C.R., Kirkpatrick B.C. 1992. Phylogenetic relationship between the western aster yellows mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 226–233.
- [25] Kuske C.R., Kirkpatrick B.C., Seemüller E. 1991. Differentiation of virescence MLOs using western aster yellows mycoplasma-like organism chromosomal DNA probes and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of General Microbiology* 137: 153–159.
- [26] Lee I.-M., Davis R.E. 1992. Mycoplasmas which infect plants and insects. W: Maniloff J., McElhaney r.n., Finch L.R., Baseman J.B. (red.). *Mycoplasmas — molecular biology and pathogenesis.* American Society for Microbiology, Washington, D.C: 379–390.
- [27] Lee I.-M., Davis R.E. 1993. Differentiation of strains in the aster yellows mycoplasma-like organisms strain cluster by serological assay with monoclonal antibodies. *Plant Disease* 77: 815–817.
- [28] Lee I.-M., Davis R.E., Hiruki C., Hsu H.-T. 1991. Genetic interrelatedness among clover proliferation mycoplasma-like organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction and fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3565–3569.
- [29] Lee I.-M., Davis R.E., Hsu H.-T. 1993. Differentiation of strains in the aster yellows mycoplasma-like organism strain cluster by serological assay with monoclonal antibodies. *Plant Disease* 77: 815–817.
- [30] Lee I.-M., Davis R.E., Chen T.-A., Chiykowski L.N., Fletcher J., Hiruki C., Schaff D. A. 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellow MLO strain cluster. *Phytopathology* 82: 977–986.
- [31] Lee I.-M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834–842.
- [32] Lipa J.J. 1997. Zmiany klimatu Ziemi — konsekwencje dla rolnictwa i ochrony roślin. Materiały z Konferencji IOR: *Progress in Plant Protection/Post. Ochr. Rośl.* 37: 27–35.
- [33] Maggie R.O., Floyd F., Smith F., Brierley P. 1952. Occurrence of western aster yellows virus infection in *Gladiolus* in Eastern United States. *Plant Dis.Reptr.* 36: 468–470.
- [34] Malinowski T., Żandarski J., Komorowska B., Zawadzka B. 1996. Application of DAPI staining and PCR amplification of DNA for identification of pear decline phytoplasma in declining trees in Poland. *Phytopathol. Pol.* 12: 103–110.
- [35] Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E. 1997. Identification and characterization of the phytoplasma associated with elm yellows in southern Italy and its relatedness to other phytoplasmas of the elm yellows group. *European Journal of Forest Pathology* 27: 45–54.

- [36] McCoy R.E., Caudwell A., Chang C.J., Chen T.A., Chiykowski L.N., Cousin M.T., Dale J.L., de Leeuw T.N., Golino D.A., Hackett K.J., Kirkpatrick B.C., Marwitz R., Petzold H., Sinha R.C., Sugiura M., Whitcomb R.F., Yang I.L., Zhu B.M., Seemüller E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. W: R.F. Whitcomb and J.G. Tully (red.). The mollicutes, vol.5. Academic Press.Inc., New York: 545–640.
- [37] Murray R.G.E., Schleifer K.H. 1994. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 174–176.
- [38] Neimark H.C., Kirkpatrick B.C. 1993. Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Molecular Microbiology* 7: 21–28.
- [39] Pielka J. 1960. Wirus czarnej miotlastości jabloni (prolifracja). *Zesz. Nauk. WSR w Krakowie. Rolnictwo* 7: 199–208.
- [40] Ploaie P., Maramorosch K. 1968. Electron microscopic demonstration of particles resembling mycoplasma or psittacosis-lymphogranuloma-trachoma group in plants infected with European yellows-type diseases. *Phytopathology* 59: 536–544.
- [41] Rudzińska-Langwald A., Kamińska M. 1999. Cytopathological evidence for transport of phytoplasma in infected plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 68: 261–266.
- [42] Ruszkiewicz M., Zielińska L. 1981. Mycoplasma-like organisms in onion with aster yellows symptoms. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 224: 127–130.
- [43] Schneider B., Gibb K.S., Seemüller E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381–3389.
- [44] Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B.C., Seemüller E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* 139: 519–527.
- [45] Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A., Göschl M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80: 3–26.
- [46] 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 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 440–446.
- [47] Slogteren van D.H.M., Groen N.P.A., Müller P.J. 1974. Yellows disease of gladiolus and hyacinth in the Netherlands. *Acta Hort.* 36: 303–309.
- [48] Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Review* 51: 221–271.
- [49] Zreik L., Carle P., Bové J.M., Garnier M. 1995. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with wiches' broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, "*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 449–453.

## **Phytoplasmas — an important problem in plant protection**

---

**Key words:** phytoplasmas, taxonomy, phytoplasma diseases

### Summary

Phytoplasmas are unculturable *Mollicutes* associated with aster yellows and witches' broom type diseases (AY) of several hundred plant species. Phytoplasma affected plants exhibited chlorosis, stunted growth, abnormal production of secondary shoots, flower malformation and early plant dieback. The aim of this review was to present the historical records of research and current status of phytoplasma differentiation and classification based on RFLP analysis of the 16S rRNA gene. 246 described phytoplasmas have been classified into 20 major phylogenetic groups or subclasses. Article presents the current knowledge on genetic diversity of phytoplasmas, their geographical distribution and plant association as well as the research on phytoplasmosis in Poland.

*Adres do korespondencji:  
prof.dr hab. Maria Kamińska  
Pracownia Wirusologii  
Zakład Ochrony Roślin Sadowniczych  
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa  
ul. Pomologiczna 18  
96-100 Skierniewice  
e-mail: mkaminsk@insad.isk.skierniewice.pl*