Wpływ antybiotyków na występowanie objawów karłowatości magnolii

MARIA KAMIŃSKA, HANNA ŚLIWA

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice
Kamińska M., Śliwa H. (Research Institute of Pomology and Floriculture, 96-100 Skierniewice, Poland;
E-mail: mkaminsk@insad.pl). The influence of antibiotics on the appearance of magnolia
stunting symptoms.

(Otrzymano dn. 14 czerwca 2002)

Summary

Treatment of diseased magnolia plants with oxytetracycline, baytril and tylan did not reduce the number of symptomatic plants. However, the sprays with antibiotics promoted the shoot growth, development of symptomless leaves and flower buds. The most efficient were baytril at the concentration of 500 ppm, tylan 200 ppm and oxytetracycline at the concentration of 500 or 1000 ppm. Lower concentrations of baytril and oxytetracycline were not so much effective; higher concentration of tylan decreased the magnolia shoot growth. The effect of antibiotics lasted one season. All the antibiotic treated and control plants, randomly tested by PCR-RFLP, showed the presence of AY (16SrI) phytoplasma and some of them were affected with phytoplasma related with apple proliferation phytoplasma group (16SrX). The obtained results indicated that 1). magnolia is a natural host plant of phytoplasmas belonging to aster yellows phytoplasma group and apple proliferation group and 2). they support the suggestion that phytoplasmas are the casual agents of magnolia stunting disease.

Key words: magnolia, stunting, aster yellows phytoplasma, apple proliferation phytoplasma, antibiotics, PCR, RFLP

WSTĘP

Rośliny z rodzaju *Magnolia* L. są stosunkowo wolne od chorób, chociaż w niektórych ogrodach i szkółkach występują krzewy z silnymi objawami chorobowymi. Objawy te, to zmiany w zabarwieniu i morfologii liści oraz zaburzenia we wzroście i kwitnieniu. Związek choroby z porażeniem roślin magnolii przez fitoplazmę z grupy żółtaczkii astra (AY, 16SrI) wykazali Kamińska i in. (2001). Mimo stwierdzenia obecności fitoplazm przy pomocy analizy PCR-RFLP oraz ich przeniesienia przy pomocy kianianki z chorych magnolii na siewki *Catharanthus roseus* L.G.Don, w komórkach sitowych magnolii z objawami chorobowymi fitoplazm nie obserwowano. Stwierdzono natomiast zmiany cytologiczne sugerujące występowanie fitoplazm.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu trzech antybiotyków na rozwój roślin *Magnolia liliiflora* odm. 'Nigra' naturalnie porażonych przez fitoplazmy. Tetracyklina znana jest z hamującego działania na rozwój bakterii i fitoplazm (Davis i in., 1968; Freitag i Smith, 1969; Liao i Chen, 1981; Lee, 1987; Bradeli i in., 2000) i można oczekiwać zaniku objawów chorobowych, jeśli przyczyną choroby są fitoplazmy.

MATERIAŁ I METODY

Rośliny i antybiotyki

Rośliny *Magnolia liliiflora* odm. 'Nigra' uzyskano z sadzonek półzdrewniałych latem 1999 w gospodarstwie szkółkarskim. Do czerwca 2000 rosły one w warunkach szklarniowych. Rośliny wykazywały zahamowanie wzrostu i chlorozę, nekrozę i deformację liści. Obecność fitoplazm w losowo wybranych roślinach z symptomami stwierdzono przy pomocy techniki PCR (Kamińska i in., 2001). Rośliny z objawami chorobowymi przewieziono do Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach, i uprawiano w doniczkach plastikowych (18 cm średnicy) w ogrodzie doświadczalnym. Od listopada 2000 do maja 2001 rośliny przechowywano w chłodni w temperaturze ok. +4°C. Wiosną przesadzono je do większych pojemników i uprawiano jak w roku poprzednim, zgodnie z obowiązującymi zaleceniami. Zabiegów ochrony przed chorobami i szkodnikami nie prowadzono.

Rośliny magnolii były traktowane antybiotykami w 2000 r. przez opryskiwanie co 4-5 dni w okresie 12.06-24.07 (11 zabiegów) oraz od 08.08 do 31.08 (osiem zabiegów). Poszczególne grupy roślin opryskiwano trzema antybiotykami w różnym stężeniu: oksytetracykliną (oxytetracycline HCl, Sigma; 200, 500, 1000 ppm) oraz tytanem (tylosin tartrate, Elanco; 200 i 500 ppm) i baytrilem (10% roztwór enrofloxacin, Bayer; 200, 500 ppm), stosowanymi w leczeniu zwierząt. Kontrolę stanowiły rośliny chore opryskiwane wodą.

Wpływ antybiotyków oceniano na podstawie reakcji 30 roślin (na każde stężenie każdego z antybiotyków) rosnących w trzech losowo usytuowanych blokach. Rośliny obserwowano przez dwa okresy wegetacyjne. Ostateczne obserwacje i pomiary

przeprowadzono 26 września 2001. Corocznie, pod koniec wegetacji, mierzono długość wszystkich pędów. Określano też liczbę przyrostów (dłuższych niż 3 cm) oraz liczbę liści bez nekroz bądź deformacji. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Istotność różnic oceniano testem t-Studenta przy poziomie $\alpha=0.05$.

Wykrywanie i identyfikacja fitoplazm

Isolacja i amplifikacja DNA fitoplazm. DNA izolowano z łyka pędów zmodyfikowaną metodą A h r e n s a i S e e m ü l l e r a (1992). Materiał pobierano w październiku 2001 z trzech losowo wybranych roślin magnolii traktowanych antybiotykami oraz kontrolnych. Kontrolę negatywną stanowiły siewki barwinka zdrowego zaś pozytywną - izolaty wzorcowe fitoplazm: żółtaczkii astra (16SrI) - AY1 otrzymany od dr Lee (Beltsville, USA) oraz proliferacji jabłoni (16SrX) - AP, choroby X brzoskwini (16SrIII) - CX i żółtaczkii wiązu (16SrV) - ULW otrzymane od dr A. Bertaccini (Bologna, Włochy).

Łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) prowadzono z użyciem w pierwszej rundzie starterów uniwersalnych dla fitoplazm R16F1/R0 (L e e i in., 1994; ~1400 bp) lub P1/P7 (S c h n e i d e r i in., 1995; ~1800 bp). W drugiej rundzie PCR stosowano startery uniwersalne - R16F2n/R16R2 (L e e i in., 1998; ~1200 bp) oraz specyficzne dla fitoplazm z grupy żółtaczkii astra (16SrI, AY)- R16(I)F1/R1 (L e e i in., 1998; ~1100) i z grupy proliferacji jabłoni (16SrX, AT) - fAT/rAS (K i r k p a t r i c k i in., 1994; ~500 bp). Badania przeprowadzono w sposób opisany w pracy L e e i in. (1994) oraz K a m i Ń s k i e j i in. (2001). Produkt amplifikacji (5 μ l) poddawano elektroforezie w 1-procentowym żelu agarozowym i obserwowano na transiluminatorze w świetle UV.

Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Celem sprawdzenia specyficzności produktów otrzymanych w łańcuchowej reakcji polimerazy wykonano analizę RFLP. Produkt amplifikacji (10 μ l) uzyskany w drugiej rundzie PCR, po zastosowaniu starterów uniwersalnych P1/P7 a następnie R16F2n/R2, trawiono enzymami restrykcyjnymi *Hpa*II i *Mse*I, zgodnie z zaleceniami producenta. Produkty trawienia poddano elektroforezie w 5-procentowym żelu poliakrylamidowym, a następnie obserwowano w świetle UV. Wielkość otrzymanych fragmentów DNA szacowano na podstawie pozycji markerów molekularnych oraz izolatów wzorcowych fitoplazm.

WYNIKI

Ocena wizualna. Dwuletnie obserwacje wykazały, że traktowanie chorych magnolii antybiotykami nie spowodowało ustąpienia symptomów (Fig. 1). Nie zaobserwowano też różnic w liczbie krzewów magnolii wolnych od objawów wśród roślin traktowanych antybiotykami oraz kontrolnych, traktowanych wodą. Stwierdzono jednakże, że antybiotyki miały wpływ na przyrost pędów i liczbę liści bez symptomów w pierwszym roku trwania doświadczenia oraz na liczbę pąków kwiatowych w drugim roku (Fig. 2).

Fig.1. Krzewy *Magnolia liliiflora* odm. Nigra porażone fitoplazmami z objawami karłowatości (D) oraz roślina zdrowa (H)

Fig.1. Phytoplasma-affected *Magnolia liliiflora* cv. Nigra with stunting symptoms (D) and healthy plant (H)

Fig.2. Wpływ antybiotyków na rośliny magnolii naturalnie porażone przez fitoplazmy; A. Liczba liści bez objawów chorobowych, październik 2000; B. Długość pędów (w cm), październik 2000; C. Rośliny z pąkami kwiatowymi (w %), czerwiec 2001

Fig.2. The effect of antibiotics treatment on the phytoplasma-affected magnolias; A. Number of symptomless leaves, October 2000; B. Length of the shoots (cm), October 2000; C. Plants with flower buds (%), June 2001

LSD_($\alpha=0.05$) = 1.9

B.

C.

Statystycznie udowodnione różnice w długości pędów stwierdzono u roślin traktowanych oksytetracykliną w stężeniu 500 i 1000 ppm. Mniejsze (200 ppm) stężenie oksytetracykliny nie miały wpływu na długość pędów. Największy przyrost miały pędy roślin traktowanych baytrilem w stężeniu 500 ppm; mniejsze stężenia tego antybiotyku nie były tak skuteczne. Tylan był skuteczny w stężeniu 200 ppm, podczas gdy wyższe stężenie tego antybiotyku, 500 ppm, hamowało wzrost pędów magnolii.

Ponadto stwierdzono, że magnolie traktowane baytrilem (200 lub 500 ppm) miały największą liczbę liści wolnych od objawów chorobowych (średnio 3.2-3.4 liście na roślinę) (Fig. 2). Magnolie traktowane tyłanem 200 ppm także miały więcej takich liści (3.0), ale rośliny traktowane większymi dawkami antybiotyku miały średnio na roślinę tylko 1.5 liście bez objawów. Oksytetracyklina nie miała wpływu na liczbę liści bez objawów chorobowych.

Obserwacje przeprowadzone wiosną 2001 wykazały, że część roślin magnolii traktowanych tytanem 200 ppm (41.0%) oraz beytrilem 500 ppm (33.3%) miała pąki kwiatowe. Mniej roślin z pąkami kwiatowymi było wśród magnolii traktowanych tytanem 500 ppm (16.6%) i oksytetracykliną 500 ppm (10.0%). Magnolie traktowane oksytetracykliną 1000 ppm i kontrolne, nie traktowane, miały taki sam odsetek roślin (6.6%) z pąkami kwiatowymi. Rośliny traktowane innymi dawkami antybiotyków nie wykazały pąków kwiatowych.

Wykrywanie i identyfikacja fitoplazm. Stosując łańcuchową reakcję polimeryzacji w pierwszej rundzie widoczny prążek uzyskano jedynie dla kontroli pozytywnej, to jest izolatów wzorcowych - AY1, AP, CX i ULW. Po przeprowadzeniu amplifikacji z drugą parą uniwersalnych starterów (R16F2n/R2) produkt o długości ~1200bp uzyskano dla wszystkich ośmiu prób pobranych z magnolii, dla izolatów wzorcowych fitoplazm ale nie dla kontroli negatywnej (Fig. 3A). Po przeprowadzeniu amplifikacji ze starterami specyficznymi dla fitoplazm z grupy AY - produkty o długości 1100 bp uzyskano dla prób ze wszystkich magnolii i izolatu wzorcowego AY1. Dla pozostałych prób izolatów wzorcowych fitoplazm nie uzyskano widocznego produktu (Fig. 3B). Stosując startery specyficzne dla fitoplazm z grupy 16SrX produkt o długości ~500 bp uzyskano dla izolatu wzorcowego (AP) oraz jednej z ośmiu badanych próbek magnolii. Widocznego produktu amplifikacji nie stwierdzono w próbach z pozostałych roślin magnolii, izolatów wzorcowych AY1, ULX i CX ani z barwinka zdrowego (Fig. 3C).

Fig.3. Elektroforeza produktów uzyskanych w drugiej rundzie PCR, przy użyciu starterów P1/P7 a następnie R16F2n/R2 (A), R16(I)F1/R1 (B) i fAt/rAS (C) dla roślin magnolii chorych - M1 i M5 oraz izolatów wzorcowych fitoplazm - AY1, AP, ULW i CX. H - roślina zdrowa; L - marker molekularny (1 kb ladder, Sigma-Aldrich)

Fig.3. Electrophoresis of nested PCR products obtained with primer pairs P1/P7 followed by R16F2n/R2 (A) or R16(I)F1/R1 (B) and fAt/rAs (C). M1, M5 - magnolias; AY1, AP, CX, ULW - phytoplasma reference strains; H - healthy plant, M - molecular weight marker (1 kb ladder, Sigma-Aldrich)

Produkty amplifikacji uzyskane w drugiej rundzie PCR ze starterami P1/P7 a następnie R16F2n/R2, trawione enzymami restrykcyjnymi *Hpa*II i *Mse*I, dawały dwa typy profili restrykcyjnych (Fig. 4). Dla wszystkich magnolii i izolatu wzorcowego AY1 były one takie same, charakterystyczne dla fitoplazm z grupy żółtaczki astra (AY), zaś w jednej z ośmiu badanych magnolii obserwowano także prążki charakterystyczne dla fitoplazm z grupy proliferacji jabłoni (AP). Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że wszystkie badane magnolie porażone były fitoplazmą z grupy AY, zaś jedna - fitoplazmą z grupy AY oraz fitoplazmą z grupy AP.

Fig.4. Profile restrykcyjne produktów uzyskanych w drugiej rundzie PCR, ze starterami P1/P7 a następnie R16F2n/R2, po trawieniu enzymami *HpaII* i *MseI*. Oznaczenia skrótów jak dla Fig. 3. L - marker molekularny (nX174/*HinfI* Promega Symbios)

Fig.4. Restriction profiles after *HpaII* and *MseI* digestion of the nested PCR (using P1/P7 followed by R16F2n/R2 primer pairs) products. The legends for lanes are the same as for Fig. 3. M - molecular weight marker (nX174/*HinfI* Promega Symbios)

DYSKUSJA

Stwierdzenie obecności fitoplazm w porażonych roślinach nie dowodzi, że są one sprawcami choroby i konieczne są inne dowody, jak na przykład znajomość reakcji chorych roślin na antybiotyki z grupy tetracykliny. Wyniki niniejszej pracy wskazują, że antybiotyki promowały wzrost pędów oraz rozwój liści i pąków kwiatowych chorych magnolii i potwierdzają przypuszczenie, że choroba magnolii - karłowatość, proliferacja pędów oraz nekroza i deformacja liści, powodowana jest przez fitoplazmy. Hamujący wpływ antybiotyków na występowanie objawów chorobowych na magnolii był krótkotrwały. Z badań M c C o ya (1982) wynika, że tetracyklinę można stwierdzić w traktowanej roślinie w 1 do 4 miesięcy po zaprzestaniu podawania, a remisja objawów chorobowych trwa 6 miesięcy do 4 lat. Traktowanie magnolii tytanem, baytrilem i oksytetracykliną w stężeniu ponad 200 ppm ograniczało objawy karłowatości tylko w pierwszym roku obserwacji. W drugim roku nekroza i deformacja liści oraz zahamowanie wzrostu występowały na wszystkich roślinach niezależnie od kombinacji, a obecność fitoplazm stwierdzono przy pomocy analizy PCR-RFLP zarówno w roślinach traktowanych antybiotykami jak i nie traktowanych.

Wyniki doświadczenia wskazują, że reakcja roślin magnolii zależała od rodzaju i koncentracji antybiotyku. Przypuszczamy też, że niskie miano fitoplazm a dodatkowo okresowe wahania w poziomie fitoplazm spowodowane prawdopodobnie spadkiem miana (K a m i ń s k a i in., 2001), mogły być ważną przeszkodą w reakcji na działanie antybiotyków. Krótki czas trwania remisji choroby w roślinach z bardzo silnymi symptomami mógł być także spowodowany trudnościami w transporcie antybiotyków, wynikającymi z poważnego uszkodzenia systemu przewodzącego stwierdzonego w trakcie badań elektronmikroskopowych (K a m i ń s k a i in., 2001).

Wyniki niniejszych badań są zgodne z oceną działania antybiotyków na rozwój objawów chorobowych innych roślin porażonych przez fitoplazmy. Tetracyklina hamowała na pewien czas rozwój symptomów żółtaczkii astra (D o i i in., 1967), białolistności trzciny cukrowej (S h i k a t a i in., 1969), choroby Zachodniej-X (A m i n i J e n s e n, 1971), choroby zamierania gruszy (N y l a n d i M o l l e r, 1973) i proliferacji jabłoni (Z a w a d z k a i K a m i ń s k a, 1975). Nowsze badania wykazały, że antybiotyki ograniczały krzewienie się poinsekcji zakażonej fitoplazmą krzewienia poinsekcji (B r a d e l i in., 2000) a czasem zamieranie dracen porażonych fitoplazmą nagłego zamierania (A n d e r s e n i in., 2001).

Wyniki naszych badań które wykazały, że objawy chorobowe karłowatości magnolii traktowanych roztworami antybiotyków uległy okresowemu zahamowaniu potwierdzają pogląd, że karłowatość magnolii powodowana jest przez fitoplazmy. Równocześnie niniejsze badania potwierdziły wyniki wcześniejszych analiz (K a m i ń s k a i in.), że rośliny z rodzaju *Magnolia* są porażone przez fitoplazmę żółtaczkii astra. Ponadto po raz pierwszy wykazano, że magnolia jest naturalnym gospodarzem fitoplazmy z grupy proliferacji jabłoni. Tym samym zakres naturalnych roślin żywicielskich fitoplazm z tej grupy uległ poszerzeniu. Dotychczas zakres ten obejmowały rośliny z rodzaju *Malus*, *Pyrus*, *Prunus* spp., *Corylus*, *Convolvulus* (S e e m ü l l e r i in., 1998) oraz *Spartium* (M a r c o n e i in., 1997).

LITERATURA

- A h r e n s U., S e e m ü l l e r E., 1992. Detection of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- A m i n P.W., J e n s e n D.D., 1971. Effects of tetracycline on the transmission and pathogenicity of the Western X-disease agent in insect and plant hosts. *Phytopathology* 61: 696-702.
- A n d e r s e n M.T., B e e v e r R.E., S u t h e r l a n d P.W., F o r s t e r R.L., 2001. Association of "*Candidatus* Phytoplasma australiense" with sudden decline of cabbage tree in New Zealand. *Plant Dis.* 85: 462-469.
- B r a d e l B.G., P r e i l W., J e s k e H., 2000. Remission of the free-branching pattern of *Euphorbia pulcherrima* by tetracycline treatment. *J. Phytopathol.* 148: 587-590.
- D a v i e s R.E., W h i t c o m b R.F., S t e e r e R.L., 1968. Remission of aster yellows disease by antibiotics. *Science* 161: 793-794.

- 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.
- Freitag J.H., Smith S.H., 1969. Effects of tetracyclines on symptom expression and leafhopper transmission of aster yellows. Phytopathology 59: 1820-1823.
- Hopkins D., Martensen J.A., 1971. Suppression of Pierce's disease symptoms by tetracycline antibiotics. Plant Dis. Repr. 55: 610-614.
- Kamińska M., Śliwa H., Rudzińska-Langwald A., 2001. The association of phytoplasma with stunting, leaf necrosis and witches, broom symptoms in magnolia plants. J. Phytopathol. 149: 719-724.
- Kirkpatrick B., Smart C., Blomquist C., Guerra L., Harrison N., Ahrens U., Lorenz K.H., Schneider B., Seemüller E., 1994. Identification of MLO strain-specific primers obtained from 16/23S spacer sequences. Int. Org. Mycoplasmol. Lett. 3: 261-262.
- Lee I.-M., Gundersen D.E., Davis R.E., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1153-1169.
- Lee I.-M., Gundersen D.E., Hammond R.W., Davis R.E., 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. Phytopathology 84: 559-566.
- Lee R.F., 1987. Chemotherapy of cherry buckskin and peach yellow leafroll disease: an evaluation of two tetracycline formulations and methods of application. Plant Dis. 71: 119-121.
- Liao C.H., Chen T.A., 1981. *In vitro* susceptibility and resistance of two spiroplasmas to antibiotics. Phytopathology 71: 442-445.
- Marccone C., Ragozzino, Seemüller E., 1997. Witches' broom of *Sarothamnus scoparius*: a new disease associated with a phytoplasma related to the spartium witches' broom agent. J. Phytopathol. 145: 159-161.
- McCoy R.E., 1982. Antibiotic treatment for control of tree diseases associated with mycoplasma-like organisms. Rev. Infect. Dis. 4: 157-161.
- Nyland G., Moller W., 1973. Control of pear decline with a tetracycline. Plant Dis. Repr. 57: 634-637.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. W: Razin S. and Tully J.G. (eds.) Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma, vol. I: 369-380. Academic Press, San Diego.
- Seemüller E., Marccone C., Lauer U., Ragozzino A., Göschl M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. J. Plant Pathol. 80: 3-26.
- Shikata E., Teng W., Matsumoto T., 1969. Mycoplasma or PLT like microorganisms detected in leaves of sugarcane plants infected with white-leaf disease and the suppression of the disease symptoms the antibiotics of tetracycline group. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., Sapporo. 56: 79-90.
- Zawadzka B., Kamińska M., 1975. The influence of oxytetracycline on the appearance of apple proliferation symptoms. Acta Hort. 44: 19-22.

Wpływ antybiotyków na występowanie objawów karłowatości magnolii**Streszczenie**

Traktowanie chorych magnolii roztworami oksytetracykliny, baytrilu i tytanu miało dodatni wpływ na wzrost pędów, liczbę liści bez symptomów oraz zawiązywanie pąków kwiatowych. Największy wpływ miały baytril w stężeniu 500 lub 1000 ppm, tytan 200 ppm i oksytetracyklina 500 lub 1000 ppm. Niższe stężenia baytrilu i oksytetracykliny nie były tak efektywne, zaś wyższa dawka tytanu hamowała rozwój pędów. Pozytywny wpływ antybiotyków obserwowano tylko w pierwszym roku ich stosowania. Wszystkie losowo wybrane i testowane przy pomocy analizy PCR-RFLP magnolie, zarówno traktowane antybiotykami jak i kontrolne, wykazały obecność fitoplazm z grupy żółtaczki astra (16SrI). Niektóre krzewy były porażone także fitoplazmą z grupy proliferacji jabłoni (16SrX). Wyniki niniejszych badań wykazały więc, że 1). magnolia jest naturalnym gospodarzem fitoplazm z grup żółtaczki astra i proliferacji jabłoni, oraz 2). potwierdzają przypuszczenie, że fitoplazmy są przyczyną choroby karłowatości magnolii.