Molekularna charakterystyka fitoplazm porażających róże w Polsce

HANNA ŚLIWA¹, TADEUSZ MALINOWSKI, MARIA KAMIŃSKA

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice

¹ e-mail: hśliwa@insad.pl

Śliwa H., Malinowski T., Kamińska M. (Research Institute of Pomology and Floriculture, Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice, Poland). Molecular characterisation of phytoplasmas infecting roses in Poland.

(Otrzymano dn. 14 czerwca 2002)

Summary

Symptoms of shoot dieback and leaf yellowing followed by leaf chlorosis were observed in naturally infected roses 'Frisco' and 'Suela', cultivated in a commercial greenhouse in Poland. The presence of phytoplasma was demonstrated in affected plants by nested polymerase chain reaction (PCR) with R16F1/R0 and P1/P7 primer pairs in the first round followed by a second one with R16F2n/R2, fA/rA, Pc399/P1694, R16(I)F1/R1 and P1/fArev primer pairs. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of PCR products (primed with primers R16F2n/R2) was done using enzymes *AluI*, *MseI*, *RsaI* and *HpaII*. Restriction profiles obtained with these enzymes were identical to those of reference strain AY1 belonging to aster yellows phytoplasma group, subgroup I-B (16SrI-B). Nested PCR products from roses 'Frisco' and 'Suela' were sequenced. Analysis of sequences confirmed that the phytoplasma infecting those roses could be classified to aster yellows phytoplasma group, subgroup B.

Key words: rose yellows and dieback, aster yellows phytoplasma, nested PCR, RFLP

WSTĘP

Objawy proliferacji i zamierania róży opisane zostały po raz pierwszy w Australii (G r i e v e, 1931). Podobne objawy chorobowe stwierdzono na różach na terenie Nowej Zelandii (F r y i H a m m e t t, 1971), Anglii (T h o m a s, 1979), Holandii (B o s i P e r q u i n, 1975), Francji (D e v e r g n e i C o u j o n, 1975) i USA (S l a c k i in., 1976). Mimo intensywnych badań przyczyna chorób nie została poznana. Choroby te są bardzo szkodliwe, gdyż przyczyniają się do obniżenia wartości handlowej kwiatów a czasami powodują zamieranie krzewów.

Choroba degeneracji i zamierania róży została w Polsce stwierdzona po raz pierwszy w roku 1999 w uprawach szklarniowych. Z przeprowadzonych dotychczas badań opartych na testach biologicznych, analizie PCR-RFLP i mikroskopii elektronowej wynika, że występowanie tej choroby ma związek z porażeniem roślin przez fitoplazmy z grupy żółtaczkii astra - 16SrI (K a m i ń s k a i in., 2001; K a m i ń s k a i D z i e k a n o w s k a, 2001).

W latach 1999-2000 na młodych różach w uprawie szklarniowej obserwowano zahamowanie wzrostu krzewów, chlorozę, żółknięcie oraz opadanie liści a następnie zamieranie pędów (K a m i ń s k a i D z i e k a n o w s k a, 2001). Rośliny, które przeżyły wykazywały jedynie chlorozę liści. Celem niniejszej pracy była identyfikacja fitoplazm wyizolowanych z róż odm. Frisco i Suela. Charakterystykę molekularną patogenów przeprowadzono stosując analizę PCR-RFLP oraz sekwencjonowanie uzyskanych produktów amplifikacji.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny. Przedmiotem badań były rośliny róży odmiany Frisco uzyskane przez okulizację siewek *Rosa canina* oraz odmiany Suela otrzymane przez sadzonki zdrewniałe. Kontrolę negatywną stanowiły zdrowe siewki *Catharanthus roseus*, natomiast jako kontrolę pozytywną stosowano barwinki zakażane izolatem wzorcowym AY1 fitoplazmy z grupy żółtaczkii astra (16SrI-A; udostępnione przez dr L e e, Beltsville, USA) oraz izolat AP fitoplazmy z grupy proliferacji jabłoni (16SrX-A, udostępnione przez dr Bertaccini, Bologna, Włochy).

Izolacja i amplifikacja DNA. DNA izolowano ze świeżo pobranego łyka z pędów, nerwów liści lub pąków kwiatowych róż (1.5 g) nie wykazujących objawów chorobowych zmodyfikowaną metodą A h r e n s a i S e e m ü l l e r a (1992).

W pierwszej rundzie PCR stosowano dwie pary starterów uniwersalnych R16F1/R0 (L e e i in., 1994; ~1400 pz) oraz P1/P7 (S c h n e i d e r i in., 1995; ~1800 pz) umożliwiających zamplifikowanie fragmentów genu 16S rRNA fitoplazm. W drugiej rundzie PCR stosowano startery uniwersalne fA/rA, R16F2n/R2 (L e e i in., 1998), Pc399/P1694 (S k r z e c z k o w s k i i in., 2001), P1/fArev (fArev: 5'-TTT GCT CCC CAC GCT TTC GT-3' komplementarny do fA) oraz parę starterów specyficznych dla fitoplazm z grupy żółtaczkii astra - R16(I)F1/R1.

Mieszaniny reakcyjne (50 μ l) zawierały: 2 μ l wyizolowanego DNA, 0.1 μ l 100 μ M roztworu każdego startera, 1.25 μ l 10 mM mieszaniny czterech deoksyrybonukleotydów (dNTP), 5 μ l dziesięciokrotnie stężonego buforu reakcyjnego (Sigma-Aldrich) i jedną jednostkę termostabilnej Taq DNA polimerazy (Sigma-Aldrich). Reakcje przeprowadzano w aparacie Mastercycler 5330 firmy Eppendorf. Amplifikacje dla poszczególnych par starterów przeprowadzane były w następujących warunkach: P1/P7, R16F1/R0 oraz R16F2n/R2 - 35 cykli: 1 min w 94°C, 2 min w 50°C, 3 min w 72°C; R16(I)F1/R1 i P1/fArev - 35 cykli: 45 s w 94°C, 1 min w 55°C, 2 min w 72°C; fA /rA - 25 cykli: 1 min w 95°C, 1 min w 55°C, 1 min w 72°C; Pc399/P1694 - 33 cykli: 30 s w 94°C, 1 min w 60°C, 2 min w 72°C.

Uzyskane po reakcjach PCR produkty rozdzielano w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny i obserwowano w świetle UV.

Analiza RFLP. Do trawienia enzymatycznego wykorzystywano produkty drugiej rundy PCR otrzymane po użyciu starterów R16F2n/R2 (~1200 pz). Produkty amplifikacji trawiono enzymami *AluI*, *RsaI*, *HpaII* i *MseI* (GibcoBRL, Life Technologies) zgodnie z zaleceniami producenta. Uzyskane fragmenty DNA rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym, wybarwiano w roztworze bromku etydyny i fotografowano w świetle UV. Wielkości uzyskanych prążków DNA ustalano na podstawie porównania z markerem molekularnym ϕ X174 DNA/*HinfI* (Promega, Symbios).

Sekwencjonowanie produktów PCR. Produkty PCR uzyskane z prób z róż 'Frisco' i 'Suela' z wykorzystaniem starterów fA/rA, R16(I)F1/R1, P1/fArev i PC399/P1694 rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym a następnie przygotowywano do sekwencjonowania metodą izolacji DNA z żelu agarozowego (G r o m a d k a, 1995). Sekwencje produktów PCR odczytywane były z obu nici DNA przy użyciu tych samych starterów, co w reakcji PCR. Sekwencjonowanie wykonano w Zakładzie Sekwencjonowania DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, w aparacie ABI Prism (Applied Biosystems). Porównanie i analizę uzyskanych sekwencji przeprowadzono przy pomocy programu DNASTAR v. 5.0 (Lasergene, USA)

WYNIKI

Objawy chorobowe. W pierwszym roku obserwacji jednoroczne rośliny odm. Frisco charakteryzowały się zahamowanym wzrostem, chlorozą i zamieraniem niektórych pędów. U roślin, które przetrwały, w drugim i trzecim roku obserwowano jedynie chlorozę liści i zahamowanie wzrostu, a czasem kędzierzawkę liści.

Młode róże odm. Suela, uzyskane z sadzonek, cechowało silne zahamowanie wzrostu, żółknięcie i opadanie liści oraz zamieranie pędów od wierzchołka. Róże te miały słaby system korzeniowy. W kolejnych latach obserwacji rośliny które przeżyły nie wykazywały objawów chorobowych, jednakże słabo plonowały.

Analizy molekularne. DNA wyizolowane z róż oraz roślin kontrolnych używano w reakcji PCR z użyciem starterów amplifikujących fragmenty genu 16S rRNA fitoplazm. Po pierwszej rundzie PCR ze starterami P1/P7 i R16F1/R0 produkty

o oczekiwanej wielkości ~1800 pz i ~1400 pz uzyskano jedynie dla izolatów wzorcowych fitoplazm: AY1 i AP. Po powtórnej amplifikacji prób ze starterami fA/rA, R1R(I)F1/R1, R16F2n/R2 (Fig. 1a,b,c), Pc399/P1694 i P1/fArev specyficzne produkty otrzymano dla 9 z 18 prób pobranych z łyka pędów i 2 z 7 prób z nerwów liści róż odm. Frisco oraz dla 2 z 2 prób z łyka róż odm. Suela a także dla izolatów wzorcowych. W drugiej rundzie PCR nie uzyskano produktów dla próby pobranej z liści róży odm. Suela i dla pąków kwiatowych roślin odm. Frisco oraz kontroli negatywnej -siewki barwinka.

fitoplazm z użyciem starterów: A) fA/rA, B) R16(I)F1/R1, C) R16F2n/R2 dla prób z róży 'Frisco' (R1, R2), róży 'Suela' (R3), izolatu wzorcowego fitoplazm z grupy proliferacji jabłoni (AP), izolatu wzorcowego fitoplazm z grupy żółtaczki astra (AY1) i zdrowego barwinka (H); L- marker molekularny 1kb Ladder (Promega, Symbios).

Fig. 1. Electrophoresis of PCR products obtained after amplification of 16S rDNA phytoplasma fragment with primer pairs: A) fA/rA, B) R16(I)F1/R1, C) R16F2n/R2 from roses 'Frisco' (R1, R2), rose 'Suela' (R3), apple proliferation reference strain (AP), aster yellows reference strain (AY1) and healthy periwinkle plant (H); L - molecular marker -1 kb Ladder (Promega, Symbios).

Specyficzność produktów uzyskanych w drugiej rundzie PCR przy użyciu pary starterów R16F2n/R2 (~1200 pz) potwierdzono po trawieniu enzymami *RsaI* (Fig. 2a), *HpaII* (Fig. 2b), *AluI* (Fig. 2c) i *MseI* (Fig. 2d). Otrzymany wzór restrykcyjny

Ryc. 2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym produktów trawienia prób uzyskanych w drugiej rundzie PCR (ze starterami R16F2n/R2) po użyciu enzymów: A) *RsaI*, B) *HpaII*, C) *AluI*, D) *MseI*; M- marker molekularny δ 174DNA/*HinfI* (Promega, Symbios), AP - izolat wzorcowy fitoplazm z grupy proliferacji jabłoni, AY1 - izolat wzorcowy fitoplazm z grupy żółtaczki astra, nd - próba z róży nie trawiona enzymami, R1, R2 - próby z róż 'Frisco', R3 - próba z róży 'Suela'.

Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of nested PCR products (with R16F2n/R2 primer pair) obtained after digestion with enzymes; A) *RsaI*, B) *HpaII*, C) *AluI*, D) *MseI*. M - molecular marker δ 174DNA/*HinfI* (Promega, Symbios), AP - apple proliferation reference strain, AY1 - aster yellows reference strain, nd - not digested rose, R1, R2 - roses 'Frisco', R3 - rose 'Suela'.

był taki sam dla wszystkich PCR-pozytywnych prób. Wzór ten był identyczny z profilem restrykcyjnym otrzymanym dla izolatu wzorcowego fitoplazmy AY1 z grupy żółtaczki astra, natomiast różnił się od profilu charakterystycznego dla fitoplazmy AP z grupy proliferacji jabłoni.

Po porównaniu sekwencji fragmentów genu 16S rDNA odczytanych dla prób pobranych z róż 'Frisco' i 'Suela' stwierdzono, że są one do siebie podobne w ponad 99% (Fig. 3). Jedyne różnice występowały w przypadku kilku nukleotydów, których nie udało się odczytać jednoznacznie. Porównanie uzyskanych odczytów z sekwencjami dostępnymi w banku genów wykazało ponadto, że sekwencje odczytane dla prób z róż 'Frisco' (acc. no. AF450325) i 'Suela' były w ponad 99% homologiczne do odpowiednich fragmentów sekwencji fitoplazm o numerach AF222063 (S c h n e i d e r i n., 1995), AF335107, U89378, M30790 i D12569 (N a m b a i n., 1993), należących do grupy żółtaczki astra, 16SrI-B.

FRISCO 1 _____ CTTGCGTCAC ATTANTT-AG
 AF2220 1 GACCTAGCAA TAGGTATGCT TAGGGAGGAGG..-..
 SUELA 1 GACCTAGCAA TAGGTATGCT TAGGGAGGAGG..T.R

FRISCO 51 TTGGTGGGGT AAAGGCCTAC CAAGACTATG ATGTGTAKCC GGGCTGAGAG
 AF2220 51AG..
 SUELA 51AG..

FRISCO 101 GTTGAACGGC CACATTGGGA CTGAGACACG GCCCAAACCTC CTACGGGAGG
 AF2220 101
 SUELA 101

FRISCO 151 CAGCAGTAGG GAATTTTCGG CAATGGAGGA AACTCTGACC GAGCAACGCC
 AF2220 151
 SUELA 151N.....

FRISCO 201 GCGTGAACGA TGAAGTATTT CCGTACGTAA AGTTCCTTTA TTAGGGAAGA
 AF2220 201
 SUELA 201K.....

FRISCO 251 ATAAATGATG GAAAAATCAT TCTGACGGTA CCTAATGAAT AAGCCCCGGC
 AF2220 251
 SUELA 251

FRISCO 301 TAACTATGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACA TAGGGGGCAA GCGTTATCCG
 AF2220 301
 SUELA 301

FRISCO 351 GAATTATTGG GCGTAAAGGG TCGTAGGCG GTTAAATAAG TTTATGGTCT
 AF2220 351
 SUELA 351

FRISCO 401 AAGTGCAATG CTCAACATTG TGATGCTATA AAAACTGTTT AGCTAGAGTA
 AF2220 401
 SUELA 401

FRISCO 451 AGATAGAGGC AAGTGAATT CCATGTGTAG TGGTAAATG CGTAAATATA
 AF2220 451
 SUELA 451

FRISCO 501 TGGAGGAACA CCAGTAGCGA AGGCGGCTTG CTGGGTCTTT ACTGACGCTG
 AF2220 501
 SUELA 501

FRISCO 551 AGGCACGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC
 AF2220 551
 SUELA 551

FRISCO 601 GCCGTAAACG ATGAGTACTA AACGTTGGGT AAAACCAGTG TTGAAGTTAA
 AF2220 601
 SUELA 601

FRISCO 651 CACATTAAGT ACTCCGCCTG AGTAGTACGT ACGCAAGTAT GAAACTTAAA
 AF2220 651
 SUELA 651

FRISCO	701	GGAATTGACG GGA	CTCCGCA CAAGCGGTGG ATCATGTTGT TTAATTCGAA
AF2220	701		
SUELA1	701		
FRISCO	751	GGTACCCGAA AAACCTCACC AGGTCTTGAC ATGCTTCTGC AAAGCTGTAG	
AF2220	751		
SUELA	751		
FRISCO	801	AAACACAGTG GAGGTTATCA GTTGACACAGG TGGTGCATGG TTGTCGTCAG	
AF2220	801		
SUELA	801		
FRISCO	851	CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC GCAACGAGCG CAACCCTTAT	
AF2220	851		
SUELA	851		
FRISCO	901	TGTTAGTTAC CAGCACGTAA TGGTGGGGAC TTTAGCAAGA CTGCCAGTGA	
AF2220	901		
SUELA	901		
FRISCO	951	TAAATTGGAG GAAGGTGGGG ACGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAC	
AF2220	951		
SUELA	951		
FRISCO	1001	CTGGGCTACA AACGTGATAC AATGGCTGTT ACAAAGGGTA GCTGAAGCGC	
AF2220	1001		
SUELA	1001		
FRISCO	1051	AAGTTTTTGG CGAATCTCAA AAAAACAGTC TCAGTTCGGA TTGAAGTCTG	
AF2220	1051		
SUELA	1051	 R.....	
FRISCO	1101	CAACTCGACT TC	
AF2220	1101		
SUELA	1101		

Ryc. 3. Porównanie sekwencji fragmentu genu 16S rRNA fitoplazm wyizolowanych z róży odm. Frisco (nr AF450325) i Suela oraz fitoplazmy z grupy żółtaczk astra (izolat Western aster yellows, SAY22; nr AF222063).

Fig. 3. Comparison of nucleotide sequence of fragment of 16S rRNA gene of phytoplasma infecting rose cv. Frisco (GenBank acc. no. AF450325), rose cv. Suela and aster yellows phytoplasma (strain SAY22, Western aster yellows; acc.no. AF222063).

DYSKUSJA

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły obecność fitoplazm w różach odm. Frisco i Suela wykazujących objawy zamierania pędów (K a m i ń s k a i D z i e k a n o w s k a, 2001; Ś l i w a i n., 2001). Charakterystyka wyizolowanych fitoplazm, przeprowadzona na podstawie analizy PCR-RFLP oraz sekwencjonowania fragmentów genu 16S rRNA pozwoliła stwierdzić, że obie odmiany róż porażone

były przez fitoplazmę z grupy żółtaczkii astra, podgrupy B. Fitoplazmy z tej grupy występują powszechnie w Europie i USA i mają szeroki zakres gospodarzy (Davis i Lee, 1993; Lee i in., 1998; Seemüller i in., 1998). Obecność fitoplazm z grupy 16SrI-B stwierdzano wcześniej w Polsce m.in. w różach z objawami proliferacji i degeneracji (Kamińska i in., 2001a), w magnoliach (Kamińska i in., 2001b) oraz jednorocznych i cebulowych roślinach ozdobnych (Kamińska i in., 1999; Kamińska i Korbin, 1999).

Wcześniej badane róże z objawami degeneracji oraz opisane w niniejszej pracy róże odm. Frisco i Suela były porażone przez tą samą fitoplazmę, mimo to wykazywały odmienne objawy chorobowe. Jedynymi cechami wspólnymi dla obu chorób były: zahamowanie wzrostu oraz tendencja do zdrowienia krzewów. Wyniki te pozostają w zgodzie z doniesieniami Lee i in. (1992; 1998), którzy także stwierdzali, że fitoplazmy z tej samej podgrupy mogą powodować różne typów objawów chorobowych.

Wyniki reakcji PCR sugerują, że fitoplazmy porażające róże 'Frisco' i 'Suela' występowały w tkankach roślinnych w bardzo niskiej koncentracji, co uniemożliwiało ich wykrywanie w bezpośrednich reakcjach amplifikacji z wykorzystaniem uniwersalnych starterów. Stwierdzenie obecności fitoplazm w badanych różach możliwe było dopiero po wykonaniu drugiej rundy PCR. Trudności w wykrywaniu fitoplazm spowodowane niską koncentracją patogena w tkankach roślinnych sygnalizowali m.in. Marcione i Ragozzino (1996) podczas testowania drzew eukaliptusa, Kamińska i Korbin (1999) podczas testowania lilii czy Almai i in. (1996) podczas testowania winorośli. Dane te wskazują, iż konieczne jest przeprowadzenie dalszych prac mających na celu konstrukcję starterów pozwalających na identyfikację fitoplazm już w pierwszej rundzie PCR.

Analiza sekwencji fitoplazm róży 'Frisco' i 'Suela' wykazała ich bardzo duże podobieństwo do fitoplazm wyizolowanych z *Rehmannia glutinosa* (nr AF335107) i rzepaku (nr U89378) w Czechach, z *Oenothera hookeri* w Niemczech (nr M30790), cebuli w Japonii (nr D12569) oraz do izolatu SAY22 (nr AF222063) zsekwencjonowanego w USA. Wyniki te dowodzą dużego stopnia homologii pomiędzy sekwencjami genu 16S rRNA fitoplazm z grupy I, co sygnalizowali Gundersen i in. (1996). Ze względu na to, że analiza sekwencji konserwatywnego regionu 16S rRNA nie pozwala na wystarczające zróżnicowanie izolatów fitoplazm wywołujących odmienne typy objawów chorobowych, wskazane jest zastosowanie w badaniach innych, mniej konserwatywnych części genomu fitoplazm, jak np. sekwencji regionu łączącego geny 16S i 23S rRNA i końca 5' genu 23S rRNA (Jomantien i in., 1998), genów białek ryB o somalnych (Gundersen i in., 1996) lub użycie przeciwciał monoklonalnych (Kane i in., 1996).

LITERATURA

- Ahrens U., Seemüller E., 1982. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of that 16SrRNA gene. *Phytopathology* 72: 828-832.

- Alma A., Davis R.E., Danielli A., Bosco D., Arzone A., 1966. Mixed infection of grapevines in Northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. *Plant Dis.* 80 (4): 418-421.
- Bos L.F., Perquin W., 1975. Rose bud proliferation, a disorder of still unknown etiology. *Neth. J. Plant Pathol.* 81: 187-198.
- Davis R.E., Lee I.-M., 1993. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83 (9): 1008-1011.
- Devergne J.C., Coujon C., 1975. Étude d'anomalies de croissance chez le rosier de serre. *Ann. Phytopathol.* 7: 71-79.
- Fry P.R., Hammett K.R.W., 1971. Rose wilt virus in New Zealand. *J. Agric. Res.* 14: 735-743.
- Grieve B.J., 1931. Rose wilt and dieback. A virus disease occurring in Australia. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 8: 107-121.
- Gromadka R., 1995. Szybka izolacja DNA z agarozy. W: *Inżynieria genetyczna i biologia molekularna. Metody. Podręcznik laboratoryjny* IBB PAN, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, 1995: 6-7.
- Gundersen D.E., Lee I.-M., Schaff D.A., Harrison N.A., Chang C.J., Davis R.E., Kingsbury D.T., 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 64-75.
- Jomantiene R., Davis R.E., Maas J., Dally E.L., 1998. Classification of new phytoplasma associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and rDNA somal protein gene operon sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 269-277.
- Kamińska M., Dziekanowska D., 2001. Występowanie, wykrywanie i identyfikacja choroby degeneracji róży. *Rocz. AR Pozn. CCCXXIII, Ogrodn.* 31 (1): 71-77.
- Kamińska M., Dziekanowska D., Rudzińska-Langwald A., 2001. Detection of phytoplasma infection in rose, with degeneration symptoms. *J. Phytopathology* 148: 1-10.
- Kamińska M., Korbin M., 1999. The incidence of phytoplasma and symptom expression of stunt and flower bud deficiency disease in lilies over two years. *Phytopathol. Pol.* 18: 27-36.
- Kamińska M., Korbin M., Rudzińska-Langwald A., 1999. Occurrence and identification of aster yellows related phytoplasma in annual statice in Poland. *Phytopathol. Pol.* 18: 37-45.
- Kamińska M., Śliwa H., Rudzińska-Langwald A., 2001. The association of phytoplasma with stunting, leaf necrosis and witches' broom symptoms in magnolia plants. *J. Phytopathology* 149: 719-724.
- Keane G., Edwards A., Clark M.F., 1996. Differentiation of group 16SrI-B aster yellows phytoplasma with monoclonal antibodies. W: 1996 BCPC Symposium Proceedings. *Diagnostic in crop production* 65: 263-268.
- 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 yellows MLO strain cluster. *Phytopathology* 82 (9): 977-985.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and rDNA somal 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.
- Marcone C., Ragozzino A., 1996. Detection of an elm yellows-related phytoplasma in eucalyptus trees affected by little-leaf disease in Italy. *Plant Dis.* 80 (6): 669-673.
- Namba S., Oyaizu H., Kato S., Iwanami S., Tsuchizaki T., 1993. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (3): 461-467.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. W: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, vol. I: 369-380. San Diego: Academic Press.
- 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.
- Skrzeczowski L.J., Howell W.E., Eastwell K.C., 2001. Bacterial sequences interfering in detection of phytoplasma by PCR using primers derived from the *rib* operon. *Acta Hort.* 550: 417-424.
- Slack S.A., Traylor J.A., Williams H.E., Nyland G., 1976. Rose leaf curl, a distinct component of a disease complex which resembles roes wilt. *Plant. Dis. Repr.* 60: 178-182.
- Śliwa H., Malinowski T., Kamińska M., 2001. Zastosowanie techniki PCR do identyfikacji fitoplazm w różach z objawami kędzierzawki liści w Polsce. *Folia Horticulturae* 13/1A: 161-167.
- Thomas B.J., 1979. Some degeneration and dieback diseases of the rose. *Ann. Report Glasshouse Crops Res. Ins.* 1979: 178-190.

Molekularna charakterystyka fitoplazm porażających róże w Polsce

Streszczenie

Na naturalnie porażonych różach odm. Frisco i Suela w uprawie pod osłonami obserwowano chlorozę a następnie żółknięcie liści oraz zamieranie pędów. Obecność fitoplazm w różach wykazano stosując łańcuchową reakcję polimeryzacji (PCR) z wykorzystaniem starterów R16F1/R0 i P1/P7 w pierwszej rundzie PCR oraz starterów R16F2n/R2, R16(I)F1/R1, fA/rA, Pc399/P1694, P1/fArev w drugiej rundzie PCR. Trawienie enzymatyczne produktów amplifikacji (otrzymanych przy użyciu pary starterów R16F2n/R2) wykonano stosując restryktazy *AluI*, *MseI*, *HpaII* i *RsaI*. Otrzymany wzór restrykcyjny był taki sam dla wszystkich PCR-pozytywnych prób z róż. Wzór ten był identyczny z profilem otrzymanym dla izolatu wzorcowego AY1 - fitoplazmy z grupy żółtaczk astr (16SrI). Produkty drugiej rundy PCR z róż 'Suela' i 'Frisco' sekwencjonowano z obu nici DNA. Analiza otrzymanych sekwencji potwierdziła, że obie odmiany róż porażone były tą samą fitoplazmą, należącą do fitoplazm z pierwszej grupy, podgrupy B.