

Statens plantepatologiske Forsøg (Forst. H. Ingv. Petersen)

Virologisk afdeling (H. Rønde Kristensen)

Statens plantepatologiske Forsøg, Virologisk afd., Lyngby

Mykoplasma-lignende organismer (MLO) som plantepatogener i Danmark

Mycoplasma-like organisms (MLO) as pathogens in Denmark

Jens Begtrup

Resumé

Nærværende beretning omtaler undersøgelser, ved hvilke der for første gang i Danmark er påvist mykoplasma-lignende organismer i forbindelse med plantesygdomme. I indsamlet materiale af agertidsel (*Cirsium arvense*), fuglegræs (*Stellaria media*), dueurt (*Epilobium montana*), Helenium (*Helenium hybrida*) og i hvidkløver (*Trifolium repens*) er der konstateret mykoplasma-lignende organismer (i det følgende MLO) i sivævnet hos de undersøgte planter. Tilsvarende organismer er ikke fundet i sundt kontrolmateriale indsamlet i samme områder.

Summary

Mycoplasma-like organisms (MLO) were demonstrated in *Cirsium arvense*, *Stellaria media*, *Epilobium montana*, *Helenium hybrida* and *Trifolium repens* with typical symptoms of »yellows« phyllody etc.

The characters revealed by electronmicroscopy were all the usual for pathogens in the MLO-group.

This report emphasizes the first demonstration of MLO in plants in Denmark – for *Epilobium* and *Helenium* it is supposed to be the first report (in print).

Indledning

Siden Doi et al. i 1967 (6) i Japan som de første påviste MLO (mykoplasma-lignende organismer) i forbindelse med plantesygdommene (mulberry dwarf, potato witches' broom og aster yellows eller Paulownia witches' broom) er en lang række andre arter beskrevet som værter for sygdomme, forårsaget af patogener i gruppen MLO. Disse encellede organismer er pleomorfe (eller amøbeagtige), i størrelsesordenen fra under 100 nm (0,1 μm) til over 1500 nm (1,5 μm), og er dermed de mindste levende, selvstændige organismer, man overhovedet ken-

der. De har ingen fast cellevæg, men en 3-laget membran, som omgiver kernemassen. I denne kernemasse findes ribosomer, som er mindre end de, vi kender fra planternes cytoplasma, kun 12-14 nm store. I de lyse MLO (muligvis degenererede) findes foruden ribosomerne, som ses i randområderne ud i mod membranen (fig. 8) også et netværk af DNA-tråde. Disse findes ikke i de mørke organismer (muligvis aktive), hvor ribosomerne er jævnt fordelt i kernemassen. (fig. 7).

Det er endnu ikke lykkedes at dyrke plante-

patogene MLO på kunstigt næringssubstrat på en så overbevisende måde, at man kan placere disse plantepatogener i den allerede etablerede orden mycoplasmatales, som er kendt inden for human og veterinær medicin. Dette er grunden til, at vi endnu må nøjes med at omtale disse patogener som mykoplasmaagtige organismer.

MLO-gruppen har forklaret problemerne inden for de virussygdomme, som i lang tid blev samlet sammen i gruppen gulsot («yellows»). Det var ikke muligt, i denne gruppe, at påvise viruspartikler hos de syge planter, og symptomerne var ikke de virussyptomer, som man kender hos de øvrige kendte virussygdomme (marmorering, nekroser m.v.). Forklaringen på disse uoverensstemmelser, som i mange år var helt uforståelige, kom med de japanske forskeres ret overraskende opdagelse. Der er med andre ord opdaget en ny gruppe sygdomsvoldere, som vi må have et bedre kendskab til for at kunne sætte ind med forebyggende og bekæmpende foranstaltninger. En del af dette arbejde er en registrering af sygdommens udbredelse, artsmæssig som geografisk, samt omhyggelig iagttagelse af, hvad man andre steder kommer frem til på dette område. Nærværende beretning beskriver symptomer fremkaldt af MLO hos 3 ukrudtsplanter (ud af de ialt 5 omtalte). Heraf fremgår det, at man, med mulighederne for alternative sygdomsværter i vores righoldige ukrudtsflora, i mange tilfælde bør ofre væsentlig større opmærksomhed overfor disse som muligt patogenreservoir end hidtil har været tilfældet i den internationale forskning.

Blandt mere end 100 plantearter registreret som MLO værter er kun syv vilde planter: Af disse er kun 4 ukrudt under danske forhold: mælkebøtte (*Dale* 1972), fuglegræs (*Müller, Kleinhempel* og *Spaar* 1972), tidsel (*Schalber* og *Balsbaugh* 1974) og dueurt (*Begtrup* og *Thomsen* 1975) (under trykning). Dette kan tyde på, at eftersøgningen hidtil for ensidigt har været koncentreret om økonomisk betydningsfulde kulturplanter. De øvrige to omtalte fund er tidligere beskrevet: hvidkløver (*Maillet, Gaurret* og *Hamon* 1968) og *Helenium* (*Leh-*

mann 1973). *Helenium* første gang beskrevet her med snitteknik.

MLO overføres med cikader og er rapporteret i et enkelt tilfælde at kunne overføres med ærtebladlus (*Acyrtosiphon pisum*) (*Hampton, Steven* og *Allen* 1969).

Materialer og metoder

Materialer

Plantemateriale af tidsel, dueurt og fuglegræs blev indsamlet i sensommeren 1974 i et afsnit af en frugtplantage. I den del af plantagen, hvor fundene blev gjort, er samlet træer sammen fra hele Danmark, som er mistænkt for at lide af sygdomme forårsaget af MLO. Imellem trærækkerne fandtes syge ukrudtsplanter i så stort antal, at vi i første omgang anså sprøjteskade for mest sandsynlig. Efterhånden kom så mange tegn på fyllodi og gulsot (yellows) frem, at en elektromikroskopisk undersøgelse af planterne var mest nærliggende.

Denne undersøgelse kunne ikke påvise virus nogetsteds i planterne. Til gengæld fandtes store mængder af MLO i sikarrene hos tidsel og i fuglegræs, mindre mængder i dueurt. *Helenium* og hvidkløver blev indsamlet på andre lokaliteter i sommerens løb (1974). De undersøgte planter og deres symptomer kan beskrives kort på følgende måde:

Agertidsel

(*Cirsium arvense*). Alle blomster karakteristisk unormale med stærkt fyllodi. Bladene tilspidsede, bølgede og partielt gulfarvede. Væksten tæt, sammentrykt (buskagtig) og stærkt reduceret (fig. 1 og 2).

Fuglegræs

(*Stellaria media*). Alle blomster grønne med stærk fyllodi. Bladene gullige eller visne. Disse symptomer sammen med unormal væksthøjde og udstrækning giver planterne et åbent og iøjnefaldende udseende (fig. 3).

Glatbladet dueurt

(*Epilobium montana*). Blomsterne deforme, men ingen fyllodi. Misdannede blomster ses ofte i spidsen af uudviklede og opsvulmede kapsler, længe efter normalt blomsterfald. Bladene antocyanfarvede og gullige. Væksten stærkt reduceret (fig. 4).

Hvidkløver

(*Trifolium repens*). Alle blomsterhoveder med stærk fyllodi. Bladene små og gullige. Væksten stærkt reduceret (fig. 5).

Helenium

(*Helenium hybrida*). Alle blomster deforme med fyllodi, gennemvoksning og trævlekroner. Bladene partielt gulfarvede. Ingen vækstreduktion (fig. 6).

Elektronmikroskopi

Bladstrimler ca. $0,5 \times 10$ mm blev udsåret 5-6 forskellige steder i bladpladen eller i de deforme blomster (løvblade). Materialet blev fikseret 1 time i Karnowsky fixative (glutaraldehyd/formaldehyd). Efterfikseret i osmiumsyre (2 %) i 17 timer ved 4°C. Imprægneret 1 time i mættet uranylacetat. Dehydreret gennem stigende procenter alkohol, og til sidst igennem propylenoxid til indlejringmaterialet Spurr resin. Snittene blev efterfarvet med magnesium uranylacetat og blycitrat. Eksamineringen foretaget i et Philips elektronmikroskop 201 S ved 60 og 80 kV. Optagelser på Kodak release positive film 5302 og efterforstørret efter behov.

Resultater

I alle planter nævnt under symptombeskrivelsen ovenfor fandtes MLO i sivævet hos symptomvisende planter, men ikke i sundt udseende planter fundet i samme område. Gennemgående for bladsymptomerne er den gule farve. Fyllodi er fundet i alle planter undtagen i dueurt. Især hos tidsel er der karakteristisk buskagtig dværkvækst. MLO er udelukkende fundet i sivævvet, men koncentration og udseende har varieret en del for de enkelte arter.

Agertidsel

Udbredt MLO infektion i sivævvet, med en stærk koncentration i de enkelte celler. Størrelsen af MLO varierede fra 60-500 nm. Formen rund til uregelmæssige men også aflange og stærkt forgrenede (fig. 7). Der kan ikke i de her undersøgte planter af *Cirsium* være tale om spiroplasma, som antydtes af *Schalber* og *Balsbough* (1964) i deres publicerede arbejde om MLO i *Cirsium*, da de her fundne MLO ikke viser nogen tegn på spiraldannelse, som er karakteristisk for dette patogen, der i mange henseender minder om MLO (bl.a. fundet i majs og fersken).

Fuglegræs

MLO i stærkt varierende mængde i ret få celler. I de stærkt inficerede celler fandtes lige mange runde og uregelmæssige organismer. Begge former ret små fra 80-300 nm, enkelte dog lidt større. Det elektronmikroskopiske billede kan tyde på fikseringsskade (fig. 8).

Glatbladet dueurt

Meget få MLO i ret få celler i sivævvet. Størrelsen betydelig mindre end f.eks. i tidsel fra 50-150 nm. Formen overvejende rund med kun få uregelmæssige organismer. (fig. 9).

Hvidkløver

Koncentrationen meget stor de steder i sivævvet, hvor MLO er fundet. Størrelsen fra 50-1100 nm hovedsagelig omkring 3-400 nm. Formen rund til aflangt forgrenede (fig. 12).

Helenium

Stor koncentration af MLO i mange celler af sivævvet. Middelstore organismer fra 50-400 nm. Formen rund til ovalt, uregelmæssig (fig. 10).

Diskussion

De påviste MLO er i fuld overensstemmelse med alle tidligere påviste mykoplasma-lignende organismes kendetegnet ved 3-laget membraner stærkt varierende former og 12-14 nm store

ribosomer. De fundne MLO var enten mørke med ribosomer jævnt fordelt i kernemassen og uden DNA-tråde eller lyse oftest større, med DNA-tråde og med ribosomerne lokaliseret langs membranen. I en del celler især hos glatbladet dueurt og hos hvidkløver er fundet en del trådformet materiale (phloem-proteiner) (fig. 11). MLO på vej igennem siporerne er set især hos hvidkløver (*Sinha og Palival 1969*) (*Hibb og Wolansky 1970*) og her hos glatbladet dueurt.

Disse første påvisninger af MLO i Danmark er i og for sig ikke nogen overraskelse, da man igennem mange år har vidst at f.eks. fyllodi hos hvidkløver var forårsaget af MLO.

Der er i udlandet påvist MLO hos en del frugttræer og -buske (*Beakbane and Mishra 1971*) (*Granett og Gilmer 1971*) (*Lemoine 1971*) (*Rakus 1971*). Sygdomme, der skyldes MLO hos disse plantearter, findes også i Danmark, og deres økonomiske betydning må ikke underkendes. Eksempelvis kan nævnes, at der i Tidsskrift for Plantelavl (*Thomsen 1972*) omtales nogle undersøgelser over dværgsyge hos hindbær, hvor patogenet er MLO (*Murant and Roberts 1971*). Det fremgår, at sygdommens skadelige virkning er meget ringe de første 2 år efter smitten har fundet sted, men derefter bliver skaden kraftigere og kraftigere, og efter 3-4 års forløb er planterne værdiløse, og tilmed særdeles smittefarlige for sunde hindbærplanter.

Gummived hos æbletræer, der tidligere blev anset for at være en virussygdom, men som nu har vist sig at være forårsaget af MLO (*Beakbane, Mishra, Posnette og Slater 1971*) er også undersøgt her i landet. I forsøg hos forskellige æblesorter er der påvist overordentlig store udbytterabene (kg frugt over en 6-årig periode) hos James Grieve været 37 og 33 pct. fra træer tiltrukket på henholdsvis vildstammer og M IV. Tilsvarende udbyttereduktioner hos Lord Lambourne var 65 og 78 pct. (*Thomsen 1966*).

Konklusion

Mykoplasma-agtige organismer (MLO) er konstateret hos 3 ukrudsarter i Danmark: tidsel, fuglegræs og glatbladet dueurt. Igeledes er

fundet MLO i prydblanten *Helenium* og i hvidkløver. MLO er fundet i sivvævet hos alle undersøgte syge planter, men ikke i sundt kontrolmateriale indsamlet på samme lokaliteter. Det er første gang, at MLO påvises som plantepatogen i Danmark.

Erkendtlighed

Tak til Bente Skeel og Hanne Frank for tålmodig og dygtig teknisk assistance.

Litteratur

- Beakbane, A. B. and M. L. Mishra* (1971): Mycoplasma-like organism associated with chat fruit and rubbery wood disease of apple, (*Malus domestica* Borkh) compared with those in strawberry with green petal disease. *J. of Gen. Microbiol.* 66, 55-62.
- Begtrup, J. and A. Thomsen* (1975): Mycoplasma-like bodies insieve elements of *Cirsium*, *Stellaria* and *Epilobium*. In print.
- Dale, J. L.* (1972): Yellows in dandelion. *P. Dis. Rept.* 56, 2270-271.
- Doi, Y., M. Ternaka, K. Yora and H. Asuyama* (1967): Mycoplasma- or PLT group-like microorganism found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or Paulownia witches' broom. *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 33, 259-266.
- Granett, A. L. and R. M. Gilmer* (1971): Mycoplasmas associated with X-disease in various *Prunus* species. *Phytopath.* 61, 1036-1037.
- Hamton, R. O., J. O. Stevens and T. C. Allen* (1969): Mechanically transmissible mycoplasma from nature infected peas. *P. Dis. Rept.* 53, 499-503.
- Harrison, B. D. and I. M. Roberts* (1969): Association of mycoplasma-like bodies with potato witches' broom diseases in Scotland. *Ann. Appl. Biol.* 63, 347-349.
- Hibben, C. R. and B. Wolanski* (1971): Dodder transmission of a mycoplasma from ash witches' broom. *Phytopathol.* 61, 151-156.

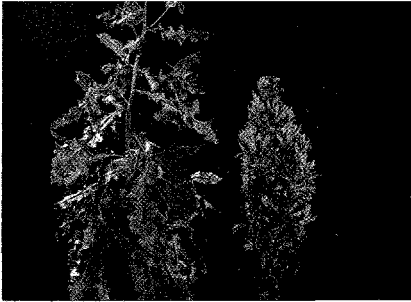


Fig. 1. MLO hos agertidse (Cirsium avense). Sund plante til venstre.



Fig. 2. MLO hos agertidse (Cirsium avense). Sund plante til venstre.

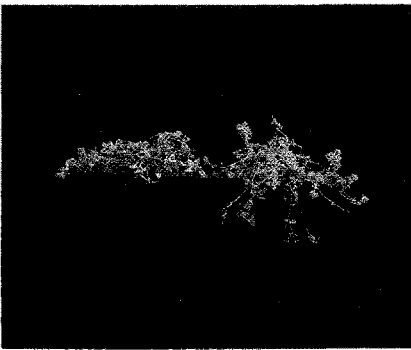


Fig. 3. MLO hos fuglegræs (Stellaria media). Sund plante til venstre.



Fig. 4 MLO angrebet Dueurt (Epilobium montana).

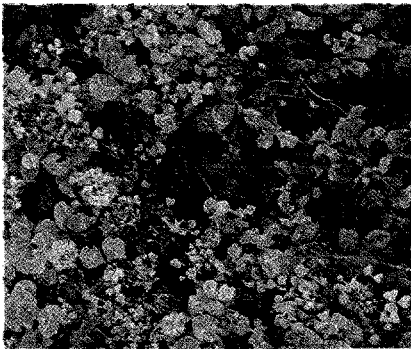


Fig. 5. MLO hos hvidkløver (Trifolium repens). (læg mærke til blomsterfyllodihovederne).



Fig. 6. MLO hos Helenium (Helenium hybridum). Sund afblomstret plante til venstre.

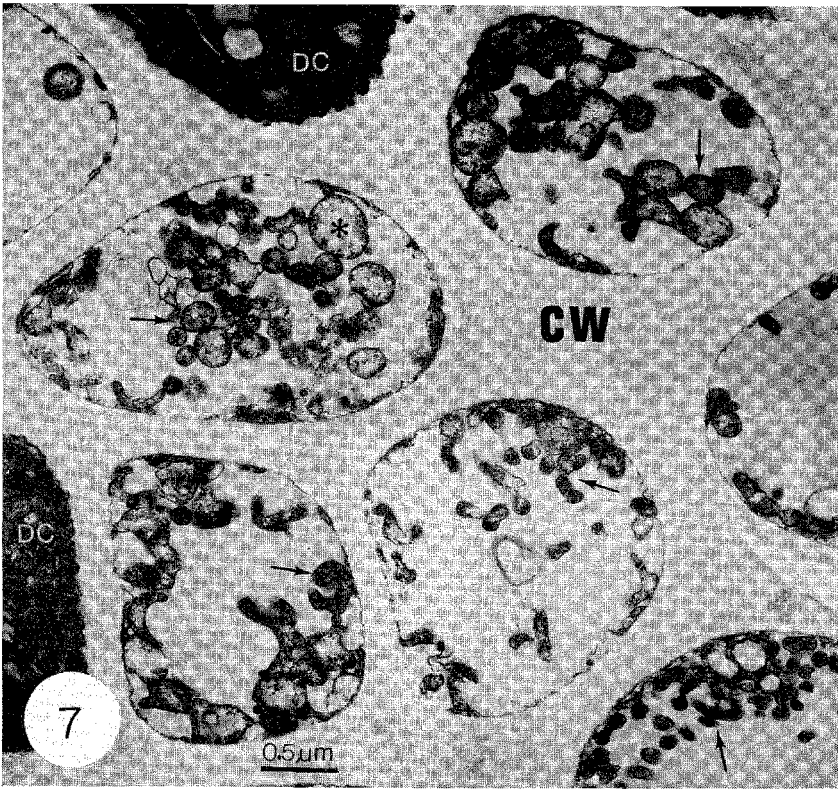


Fig. 7. MLO i sivvævet af agertidsel. (*Circium arvense*). DC: degenereret celle. CW: cellevæg, *degenereret MLO, pile: aktive MLO. x 20.000.

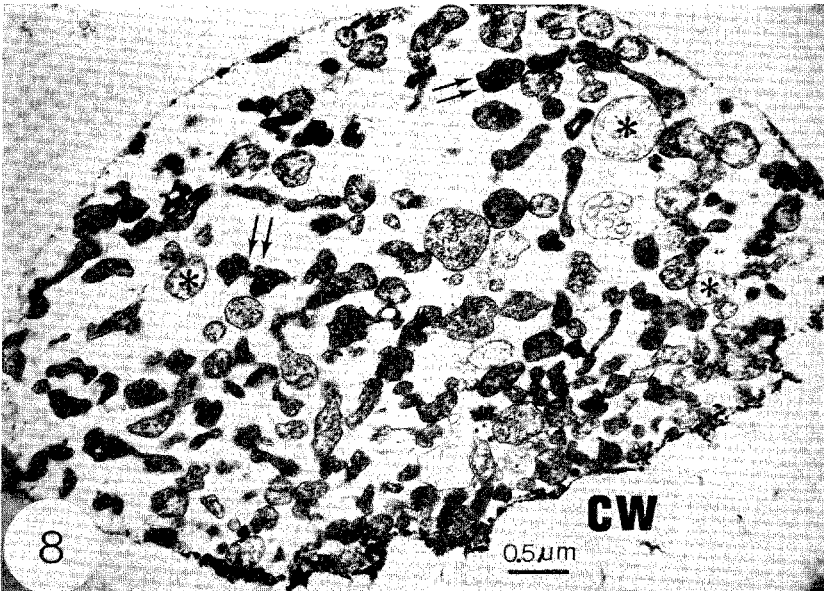


Fig. 8. MLO i sivvævet af fuglegræs (*Stellaria media*). CW: cellevæg, * degenererede MLO, Dobbelpile: Stærkt forgrenede aktive MLO. x 16.000.

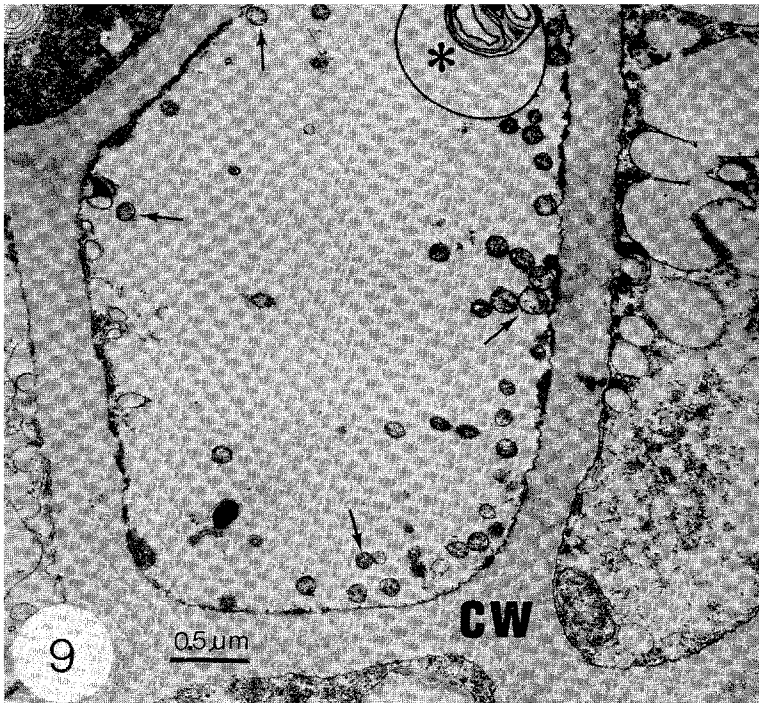


Fig. 9. MLO i sivvævet hos Ducurt (*Epilobium montana*). CW: cellevæg; DC: degenereret celle, * membransystem, pile: MLO. x 20.000.

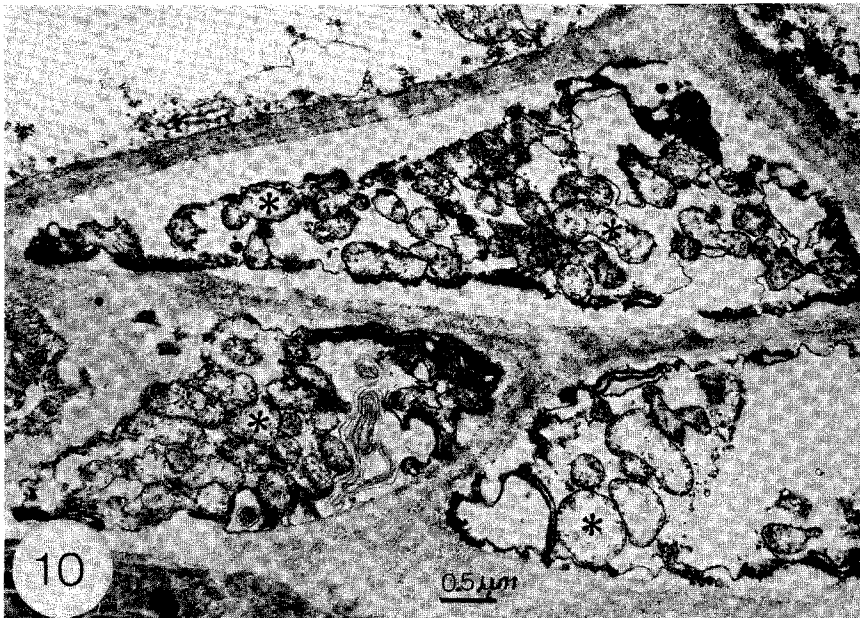


Fig. 10. MLO i sivvævet hos Helenium (*Helenium Hybridum*), * MLO (degenererede),

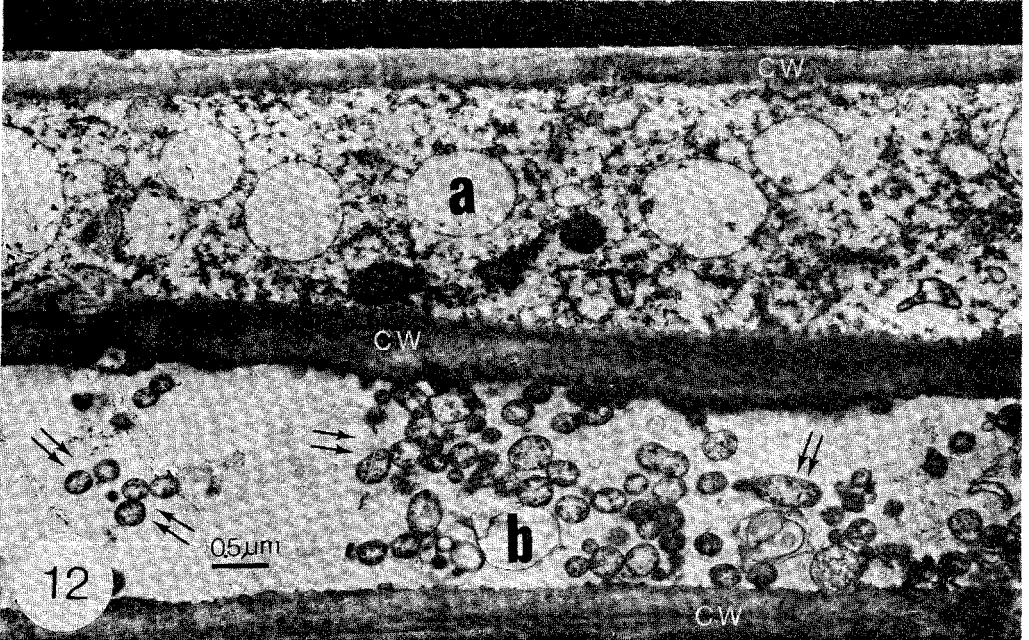
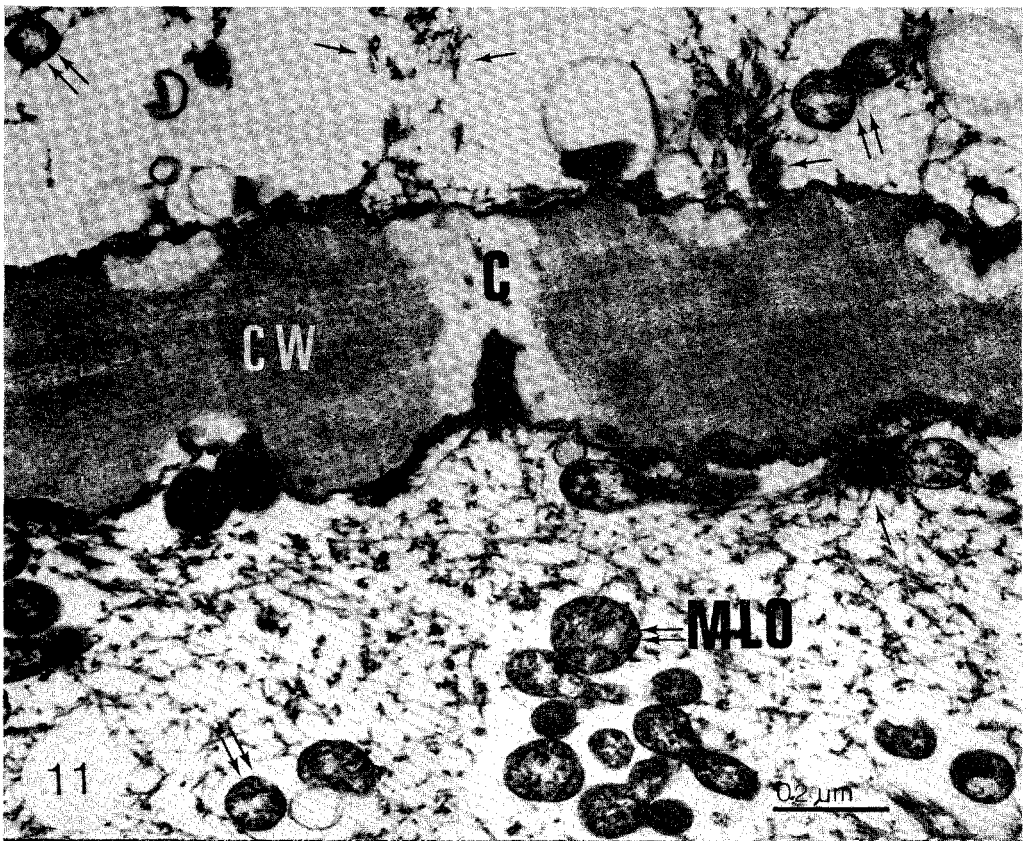


Fig. 11. Nærbillede af MLO i hvidkløver (*Trifolium repens*) sivvæv i længdesnit. CW: Cellevæg C: Kallusprop i spore. Dobbeltpile: aktive MLO. Enkeltpile: phloem-protein materiale $\times 75.000$.
 Fig. 12. MLO i sivvævet hos hvidkløver (*Trifolium repens*). CW: cellevæg. a: Vakuole i endnu ikke inficeret celle. b: Vakuole i MLO-inficeret sivvæv. Dobbeltpile: MLO (næsten alle degenererede). $\times 15.000$.

- Kleinhempel, H., H. M. Müller und D. Spaar* (1972): Mögliche mykoplasmaätiologie von Pflanzenkrankheiten. Nachr.bl.Pflanzensch.dienst DDR. NF 26, 1-3.
- Lemoine, I.* (1971): Abnormal reddish leaves recorded on pear variety Beurre' Hardy and transmitted by grafting. Ann. Phytopath. 3, 87-94.
- Lehmann, W.* (1973): *Euscelis plebajus* (Fallén) und *Macrosteles cristatus* Ribaut als Überträger von Pflanzenkrankheiten von vermuteter Mykoplasma-Aktiologie. Arch.Phytopathol.Pflanzenschutz 9,6, 363-370.
- Maillet, P., I. P. Gaurret et Hamon.* (1969): Sur la présence de particules de type mycoplasma dans le libre de plante atteintes de maladies du »type« Jaunisse. Comp.rend.Acad.Sci. (Paris) 266. (Ser.D). 2309-2311.
- Müller, Hanna M., H. Kleinhempel, D. Spaar und H. J. Müller* (1972): Mykoplasmaähnliche Organismen in Zierpflanzen mit Blütenfergrünungen. Arch.Phytopathol.u.Pflanzenschutz 9, 95-104.
- Sinha, R. C. and Y. C. Paliwal* (1969): Association, development and growth cycle of mycoplasma-like organism in plants affected with clover phyllody. Virology 39, 759-767.
- Rakus, D.* (1971): Nova' choroba cervenejch ribezli. A disease of red currant. Biologia. (Bratislava) 26, 355-358.
- Schaber, B. D. and E. U. Balsbaugh* (1974): Mycoplasma-like bodies in sieve elements of Canadian thistle. Pl.Dis.Rept. 58, 906-908.
- Thomsen, A. og H. Rønde Kristensen* (1966). Gummived hos æbletræer (Rubbery wood of apple trees). Tidskr. f. Pl. 69: 477-493.
- Thomsen, A.* (1972). Dværgsyge hos Hindbær (*Rubus Stunt*). Tidskr. f. Pl. 76: 289-296.

Manuskript modtager 15. februar 1975.