

DIAGNOSTIKA FITOPLAZEM NA VINSKI TRTI

Nataša PETROVIČ¹

Center Planta, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

IZVLEČEK

Prenašamo, razvijamo in uvajamo nove metode, ki nam bodo omogočile raziskovanje ter pregled nad razširjenostjo in pomenom fitoplazem, povzročiteljev trsnih rumenic (zlate trsne rumenice, *Flavescence dorée* in črnega lesa, *Bois Noir*). Dajemo kratek pregled naštetih povzročiteljev bolezni in novih metod za njihovo določanje ter pomen uvajanja le-teh za potrebe nadzora bolezni in selekcije vinske trte za vinogradništvo v Sloveniji.

Ključne besede: *Bois noir*, detekcija, fitoplazme, *Flavescence dorée*, molekularne metode, vinska trta

ABSTRACT

DIAGNOSTICS OF PHYTOPLASMAS ON GRAPEVINE

We are in the process of transferring, developing, and introducing new molecular-based technologies for detection of phytoplasmas which cause grapevine yellows diseases (*Flavescence dorée* and *Bois noir*). Introduction of new methods should enable us to estimate the impact of each pathogen on grapevine, evaluate its importance, and monitor² its presence and spread, respectively. We present a short review of detection methods and their potential importance for the routine use in phytosanitary control and grapevine clonal selection certification schemes in Slovenia.

Key words: *Bois noir*, detection, *Flavescence dorée*, grapevine, molecular methods, phytoplasmas

UVOD

V Centru Planta Nacionalnega inštituta za biologijo v sodelovanju z Biotehniško fakulteto in Kmetijsko veterinarskim zavodom Nova Gorica, razvijamo in uvajamo nove metode za določanje fitoplazem in nekaterih virusov na vinski trti. Tehnologije detekcije, ki jih uvajamo, temeljijo predvsem na molekularno bioloških metodah. Protokole tehnologij bodisi prenesemo iz priznanih referenčnih laboratorijev v tujini ali pa jih razvijamo skupaj z njimi. Uvajanje metod poteka tudi skladno z različnimi mednarodnimi organizacijami (Mednarodni svet za raziskave virusov in virusom podobnih bolezni na vinski trti, ICVG, Mednarodni urad za trto in vino, OIV) in v okviru akcij/programov (COST, NATO SFS), ki združujejo, obveščajo in usklajujejo raziskovalce iz znanstvenih in strokovnih krogov na tem področju. Končni in glavni namen uvajanja metod je smiselna, koristna in potrebna rutinska uporaba v vinogradniški praksi za potrebe nadzora in vrednotenja določenih povzročiteljev bolezni v vinogradih ter pri pridelavi, selekciji in uvozu sadilnega materiala.

¹ dr. biol. znan., dipl. biol., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

Protokole za tehnologijo detekcije fitoplazem uvajamo s pomočjo Laboratorija za raziskave fitoplazem na vinski trti, na francoskem državnem inštitutu INRA v Dijonu. Omenjeni laboratorij razvija, uvaja in nadzoruje rutinsko detekcijo trsnih rumenic za območje cele države Francije, hkrati pa je mednarodni referenčni laboratorij in najvišja avtoriteta za detekcijo fitoplazem na vinski trti.

ZLATA TRSNA RUMENICA ALI ČRNI LES?

Bolezni zlate trsne rumenice in črnega lesa povzročata fitoplazmi, ki se očitno razlikujeta po svoji biologiji in načinu prenašanja, ne pa tudi po bolezenskih znamenjih, ki jih povzročata na okuženih rastlinah vinske trte. Pogosto obe fitoplazmi nastopata tudi skupaj. Zlata trsna rumenica (*Flavescence dorée*, FD) je že dolgo znana pomembna karantenska bolezen, ki je uvrščena na evropsko in slovensko karantensko A2 listo škodljivih organizmov. Povzroča jo fitoplazma iz skupine brestovih rumenic (angl. Elm yellows), katere biologija in epidemiologija sta že dlje časa dobro znani. Manj znana je biologija in epidemiologija povzročitelja bolezni črni les (*Bois noir*, BN). Najnovejše objave potrjujejo, da bolezen BN povzroča fitoplazma iz skupine Stolbur in da je BN zelo razširjena in nevarna bolezen na vinski trti (Sforza s sod., 1998), ki bo zaradi tega morda prav kmalu tudi uvrščena na listo karantenskih organizmov. Zaradi tega se je pojavila potreba po razlikovanju obeh fitoplazem in po ustreznih (hitrih in zanesljivih) metodah zanj.

Širjenje in razvoj bolezni sta tesno povezana z razvojnim krogom žuželk-prenašalk, v katerih se fitoplazmi tudi razmnožujeta. Naravni prenašalec fitoplazme FD je ampelofagni škržat *Scaphoideus titanus* Ball., ki živi, se hrani in zaključuje svoj razvojni krog izključno na vinski trti. Fitoplazma BN se prenaša z naravnim prenašalcem škržatom *Hyalesthes obsoletus* Signoret (*Hemiptera, Fulgoromorpha, Cixiidae*), ki živi, se hrani in zaključuje svoj razvojni krog na številnih vrstah in celo družinah rastlin, ki rastejo v okolici in v vinogradih (Sforza s sod., 1998). Strategija zatiranja žuželk-prenašalk fitoplazem FD in BN je zaradi povsem drugačne biologije obeh vrst žuželk povsem drugačna, kar znova kaže kako pomemben je podatek s katero fitoplazmo imamo opravka in na pomembno vlogo, ki jo pri tem imajo laboratorijske metode.

O bolezni zlata trsna rumenica govorimo v Sloveniji že nekaj let. Seljak (1987) je prenašalec FD na Primorskem, kar nakazuje veliko možnost zastopanosti te rumenice na tem območju. Seljak in Osler (1997) sta na osnovi analize devetih vzorcev, opravljene v referenčnem laboratoriju INRA v Franciji, potrdila zastopanost rumenice tipa BN v petih rastlinah sort 'chardonnay' in 'malvazija' na Primorskem. Tudi Šaričeva s sodelavci (1997) poroča o zastopanosti fitoplazem skupine astrinih rumenic v dveh od treh analiziranih vzorcih vinske trte sort 'chardonnay' in 'rebuła' v Sloveniji; analize so opravili v laboratoriju Inštituta za rastlinsko patologijo na univerzi v Bologni v Italiji. Obširnejši pregled pojavljanja bolezenskih znamenj trsnih rumenic v Sloveniji je podal Koruza (1996), kjer navaja, da je po evidentiranju bolezni v vinogradih po Sloveniji v letih 1991-1995 bilo najti od 20% do 40% rastlin z bolezenskimi znamenji trsnih rumenic. Prav zaradi pomanjkanja ustreznih laboratorijskih metod pa do sedaj v evidentiranih rastlinah ni bilo mogoče ugotoviti zastopanosti in identitete fitoplazem, povzročiteljic trsnih rumenic.

DIAGNOSTIČNE METODE ZA RAZLIKOVANJE FD IN BN

Fitosanitarni postopek za pregled in določanje zastopanosti FD po EPPO standardu (European Plant protection Organization, EPPO, standard PM 3/57 (1)) opisuje le biološki način določanja FD. Biološki način določanja je indeksiranje z uporabo občutljive indikatorske rastline (zakoreninjene potaknjence hibrida Baco 22 A ali *Vitis vinifera*, kultivarja Chardonnay in Aramon). Isti EPPO standard hkrati za ugotavljanje zastopanosti FD zaradi dolgotrajnosti postopka indeksiranja v okviru potrjevalne sheme za vinsko trto (EPPO, 1994) svetuje le vizualni pregled simptomov. Vendar pa z vizualnimi pregledi ne moremo opaziti prikritih okžub z FD in BN, kar še posebej velja za cepljenke in druge oblike dormantnega lesa, z indeksiranjem pa lahko ugotovimo le zastopanost fitoplazem na splošno in ne moremo razlikovati med fitoplazmami različnih tipov. EPPO je že izdal priporočila, po katerih lahko določamo zastopanost posameznih tipov fitoplazem z laboratorijskimi postopki, ki edini omogočajo razlikovanje med fitoplazmama FD in BN, hkrati pa tudi razlikovanje obeh od drugih fitoplazem, ki se lahko pojavljajo v vinski trti (fitoplazme, ki povzročajo rumenice sredozemskega, severnoameriškega in subtropskega tipa) (EPPO Protocols for the identification of quarantine pathogens, 98/6876 a in b).

Laboratorijsko določanje, ki omogoča razlikovanje med fitoplazmama FD in BN obsega serološki test (ELISA) z uporabo specifičnih protiteles, s katerimi lahko ločeno in specifično zasledujemo membranske beljakovine fitoplazem FD in BN v rastlinah ali v zužekah (Kuszala s sod., 1993). Kot serološki test lahko ob uporabi istih protiteles uporabimo tudi imunsko elektronsko mikroskopijo (Lehrminier s sod., 1990) ali tehniko imunskega pivnika (Seddas s sod., 1996).

Osnova hitri in zanesljivi metodi določanja fitoplazemskega dednega zapisa (DNK), ki ga ekstrahiramo kot celokupno DNK iz listnih žil vinske trte, je analiza s pomočjo verižne reakcije polimeraze (PCR). Pri tem uporabimo univerzalne začetne sintetske oligonukleotide, ki omogočajo pomnoževanje 16S ribosomalne DNK fitoplazem vseh skupin. Za natančnejšo analizo, kateri skupini pripadajo fitoplazme, ki okužujejo naš vzorec, analiziramo produkt PCR reakcije z metodo RFLP (angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). S primerjanjem RFLP kontrolnih fitoplazem iz določenih skupin lahko vidimo, kateri skupini pripada fitoplazma, ki je zastopana v analiziranem rastlinskem vzorcu (Daire s sod., 1992). Alternativna metoda za dodatno potrditev razlikovanja tipov fitoplazem je PCR reakciji, pri kateri lahko z uporabo za FD oziroma BN specifičnega para začetnih sintetskih oligonukleotidov pomnožujemo neribosomalno DNK vsake izmed fitoplazem (Daire s sod., 1997). Produkt te PCR reakcije je specifičen za BN oziroma FD fitoplazmo in omogoča natančno razlikovanje med obema fitoplazmama brez dodatne RFLP analize. Razlikovanje z naštetimi molekularnimi metodami je uspešno tudi kadar obe fitoplazmi nastopata skupaj.

Poudariti velja, da nobena od naštetih metod sama zase ni povsem zanesljiva. Prav zato uporabimo na istem analiziranem vzorcu več molekularnih metod hkrati, če je potrebno pa tudi imunsko elektronsko mikroskopijo in druge serološke metode. Kljub temu so laboratorijske metode v primerjavi z dolgotrajnim indeksiranjem še vedno mnogo hitrejše in cenejše. Z uporabo novih tehnologij rutinske detekcije si ometamo potrditev, razlikovanje in ovrednotenje razširjenosti in pomena posameznih tipov trsnih rumenic v Sloveniji.

Zahvala

Uvajanje molekularnih metod za določanje in identifikacijo fitoplazem na vinski trti je del projekta CRP Zemlja (Kmetijstvo in podeželje) "Evropa I" z naslovom Uporaba rastlinske biotehnologije za varstvo rastlin (Razvoj identifikacijskih metod za rastlinske patogene in ovrednotenje transgenih rastlin), ki ga finančno podpirata Ministrstvo za znanost in tehnologijo in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije.

LITERATURA

- Daire, X. / Boudon-Padieu, E. / Bervill, J. / Schneider, B. / Aoudwell, A. (1992): Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO).- Annual Review of Applied Biology, 121, 95-103.
- Daire, X. / Clair, D. / 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 Journal of Phytopathology 103 (1997), 507-514.
- EPPO (1994): Certification schemes. No. 8. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks.- Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 24, 347-367.
- Koruza, B. (1996): Rezultati preučevanja razširjenosti rumenic vinske trte v Sloveniji.- Sodobno kmetijstvo 29, 10, 403-406.
- Kuszala, C. / Cazelles, O. / Boulud, J. / Credi, R. / Granata, G. / Krief, G. / Magarey, P. / Magnien, C. / Pearson, R. C. / Refatti, E. / Tanne, E. / Caudwell, A. (1993): Contribution a l'etude des jaunisses de la vigne dans le monde. Prospection par le test ELISA spécifique du mycoplasma-like organism (MLO) de la flavescence dorée.- Agronomie, 13, 929-933.
- Lehrmier, J. / Prensier, G. / Boudon-Padieu, E. / Caudwell, A. (1990): Immunolabeling of grapevine *Flavescence dorée* MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study.- The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 38, 1, 79-85.
- Seddas, A. / Meignoz, R. / Daire, X. / Boudon-Padieu, E. (1996): Generation and characterisation of monoclonal antibodies to *Flavescence dorée* phytoplasma: Serological relationship and differences in electroblot immunoassay profiles of *Flavescence dorée* and Elm yellows phytoplasmas.- European Journal of Plant Pathology, 102, 757-764.
- Seljak, G. / Osler, R. (1997): Potrditev trsne rumenice vrste "črni les" (Grapevine bois noir phytoplasma) na Primorskem.- Zbornik predavanj in referatov s 3. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 4.-5. Marec 1997, s. 63-69.
- Seljak, G. (1987): *Scaphoideus titanus* Ball. (= *Sc. littoralis* Ball.), novi štetnik vinove loze u Jugoslaviji.- Zaštita bilja, vol. 38 (4), br. 182: 349-357.
- Sforza, R. / Clair, D. / Daire, X. / Larrue, J. / Boudon-Padieu, E. (1998): The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of bois noir of grapevines in France.- Journal of Phytopathology, 146, 549-556.
- Šarić, A. / Škorić, D. / Bertaccini, A. / Vibio, M. / Murari, E. (1997): Molecular detection of phytoplasmas infecting grapevines in Slovenia and Croatia.- 12th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG), 28th September-2nd October, 1997, Lisbon, Portugal, s. 77-78.