

LABORATORIJSKO DOLOČANJE POČASI RASTOČE BAKTERIJE *Xylophilus ampelinus* NA VINSKI TRTITanja DREO¹, Jaap D. JANSE², Gabrijel SELJAK³, Maja RAVNIKAR⁴^{1,4} Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo² Laboratory for bacteriology, Plant Protection Service³ Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica**IZVLEČEK**

Xylophilus ampelinus (Panagopoulos, 1969) comb nov. (Willems *et al.*, 1987) povzroča bakterijski ožig vinske trte. Laboratorijsko določanje bakterij, ki skuša slediti Kochovim postulatam, je pri tej bakteriji še posebej težavno zaradi njene neenakomerne razporeditve po rastlini ter počasne rasti na gojiščih. Iz vzorca vinske trte (*Vitis vinifera* L.) sorte Rebula odvzetega na področju Primorske v letu 2002, ki je kazal za to bolezen značilne pege na listih, smo izolirali kolonije po morfologiji podobne kolonijam kontrolne bakterije. Z uporabo biokemijskih in nutritivnih testov, profilom maščobnih kislin, imunofluorescenco, vgnezditevno PCR reakcijo, določanjem zaporedja nukleotidov dela gena za 16S rRNA ter testom patogenosti na rastlinah vinske trte gojene v tkivni kulturi smo potrdili, da gre res za *X. ampelinus*. Pojavljanje znamenj boleznin ter učinkovitost diagnostičnih metod smo še nadaljnji dve leti spremljali v okviru posebnega nadzora bakterijskega ožiga vinske trte v koordinaciji Fitosanitarnе uprave Republike Slovenije.

Ključne besede: bakterijski ožig, laboratorijsko določanje, trta, *Xylophilus ampelinus***ABSTRACT****LABORATORY DETECTION OF A SLOW-GROWING BACTERIUM OF GRAPEVINE, *Xylophilus ampelinus***

Bacterium *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos, 1969) comb nov. (Willems *et al.*, 1987) is a causative agent of bacterial blight of grapevine. Laboratory detection following Koch's postulates is particularly demanding with these bacteria due to their uneven distribution in plants and slow growth on artificial media. A sample of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Rebula from a vineyard in Primorska region, exhibiting characteristic angular lesions on leaves was received for testing in 2002. An isolate was obtained and confirmed as *X. ampelinus* using biochemical and nutritional tests, fatty acid analysis, immuno-fluorescence, nested PCR, partial sequencing of the 16S rRNA gene and pathogenicity test. The pathogenicity test was performed on grapevine cv. Rebula grown in tissue culture. Symptom development in the vineyard was followed and monitoring of *X. ampelinus* performed for two subsequent years.

Keywords: bacterial blight, grapevine, laboratory detection, *Xylophilus ampelinus***1. UVOD**

Bakterijski ožig vinske trte so prvič opisali v poznem 19. stoletju v Franciji, kasneje pa so to bolezen opazili v večjem delu Mediterana in tudi v južni Afriki (EPPO/CABI, 1998). Potem ko so skoraj stoletje ugibali o njenih vzrokih, je Panagopoulos v Grčiji izoliral in opisal povzročitelja. Bakterija se je sprva imenovala *Xanthomonas ampelina*, kasneje pa se je preimenovala v *Xylophilus ampelinus* (Willems *et al.*, 1987). Bakterije naj bi večinoma živele

¹univ. dipl. mikrobiol., Večna pot 111, SI-1001 Ljubljana²dr., 15 Gertjesweg, Postbus 9102, NL-6700 HC Wageningen³mag. dipl. inž. kmet., Pri Hrastu 18, SI-5000 Nova Gorica⁴prof. dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1001 Ljubljana

v ksilemu rastlin, združene v skupke ali prilepljene na stene žil (Grall and Manceau, 2003). Na bolnih trtah opazimo razpoke in razjede vzdolž poganjkov, razbarvanje ksilema ter poligonalne madeže na listih. Okuženi poganjki odmirajo, predvsem pri bolj občutljivih sortah pa lahko v nekaj letih odmrejo celi trsi. Pogosta je v prikriti obliki in takšna se uspešno širi s sadilnim materialom. Laboratorijsko določanje bakterij, ki skuša slediti Kochovim postulatam, je pri tej bakteriji posebej težavno. Na umetnih gojiščih izredno počasi raste, hkrati pa so nekateri diagnostični testi, predvsem potrjevanje patogenosti na rastlinah, nezanesljivi. Ob prvi najdbi in potrditvi bakterije *X. ampelinus* v vzorcu vinske trte sorte Rebula, odvzetem na območju Primorske v letu 2002, smo vpeljali in preverili ustreznost metod, ki so na voljo za določanje te bakterije. Ustreznost vpeljanih metod smo še nadaljnji dve leti preverjali ob testiranju večjega števila vzorcev odvzetih v istem vinogradu. Opazovanje znamenj boleznj in odvzem vzorcev je potekalo v okviru posebnega nadzora bakterijskega ožiga vinske trte v koordinaciji Fitosanitarnе uprave Republike Slovenije.

2. MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Vzorci rastlin vinske trte sorte Rebula z znamenji boleznj v letih 2003 in 2004 so bili nabrani v okviru posebnega nadzora bakterije *X. ampelinus*. Vzorceno je bilo 10 (leto 2003) oziroma 7 (leto 2004) trsov. Pred izolacijo bakterij smo vzorce 3 dni hranili pri temperaturi 15°C, kar omogoča obogatitev iskanih bakterij (Serfontein *et al.*, 1997). Vzorec 1-02 je bil odvzet v istem vinogradu leta 2002.

2.2 Izolacija bakterij iz rastlinskega materiala

Različna znamenja boleznj na posameznih trsih smo testirali ločeno (preglednica 1 in 2). Ekstrakt smo pripravili tako, da smo izbrano tkivo razrezali v fosfatnem pufru, vorteksirali in odstranili rastlinski material. Pripravljen ekstrakt smo z dodatkom glicerola (10 vol. %) hranili pri temperaturi -80°C. Rastlinske ekstrakte in njihove redčitve (1:10 in 1:100) smo nanесли na hranilni agar (NA, Bacto Nutrient Agar, Difco) z dodatkom cikloheksimida (100 mg/L). Plošče z gojišči smo inkubirali do 10 dni pri temperaturi 24°C in dnevno pregledovali od šestega dneva naprej. Pred potrditvenimi testi smo značilne rumene kolonije čistili in namnoževali na hranilnem agarju brez dodatka cikloheksimida.

2.3 Izolacija DNA in vgnezditevna reakcija PCR

Za izolacijo DNA iz 250 µL posameznega ekstrakta smo uporabili DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Za vgnezditevno reakcijo PCR (Botha *et al.*, 2001) smo uporabili po 1 µL izolirane DNA in redčitev (1:10 in 1:100). Rezultate smo opazovali po nanosu produktov reakcije PCR na agarozni gel.

2.4 Potrditveni testi

Iz prvega vzorca vinske trte sorte Rebula odvzetega na področju Primorske v letu 2002, ki je kazal za to bolezen značilne madeže na listih, smo izolirane kolonije potrjevali z uporabo biokemijskih in nutritivnih testov, profilom maščobnih kislin, imunofluorescenco, vgnezditevno PCR reakcijo (Botha *et al.*, 2001), določanjem zaporedja nukleotidov dela gena za 16S rRNA ter testom patogenosti na rastlinah vinske trte gojene v tkivni kulturi (Dreo *et al.*, 2005).

Za potrjevanje kasnejših izolatov bakterije smo uporabili molekularne metode pomnoževanja specifičnih delov DNA s PCR (Botha *et al.*, 2001)

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Uporabnost diagnostičnih metod za določanje bakterijskega ožiga vinske trte smo preverjali v letih 2003 in 2004 na vzorcih odvzetih iz okuženega vinograda na Primorskem v okviru posebnega nadzora bakterijskega ožiga vinske trte v koordinaciji Fitosanitarnе uprave Republike Slovenije. Po močnejšem izbruhu bolezni v letu 2002 ko smo pri večini trsov na madežih opazili značilne poligonalne madeže in bakterijo iz odvzetega vzorca prvič izolirali in laboratorijsko potrdili (Dreo *et al.*, 2005), je sledilo leto ko znamenj bolezni skoraj ni bilo. V letu 2004 so bila znamenja spet bolj izražena kar je v skladu z opažanji o sporadičnosti pojavljanja te bolezni. Dejavniki, ki vplivajo na izrazitost pojava bolezenskih znamenj v posameznih rastnih dobah zazdaj niso znani.

Skupno smo testirali 40 podvzorcev iz 17 trt. Znamenja bolezni so vključevala značilne pege na listih, razjede poganjkov s porjavelim ksilemom ter razjede rozg (preglednici 1 in 2). V letu 2003, ko ni bilo značilnih znamenj bolezni, smo preverjali tudi vzorce nekroz listov v obliki »V« ter nakodrane liste, ki jih nekateri viri navajajo kot možna znamenja okužbe.

Preglednica 1: Znamenja bolezni in rezultati presejalnih testov za vzorce vinske trte odvzete v letih 2002, 2003 in 2004

Trta	Znamenja bolezni ¹						Vgnezditvena reakcija PCR	Izolacija na gojiščih
	M	V	KL	RP	RR	Kor		
1-02	.							
	.							
1-03	.						-	-
	.						-	-
2-03	.						-	-
	.					.	d	-
3-03	.						d	-
	.						-	-
4-03	.						-	-
	.						-	-
5-03	.						-	-
	.						-	-
	.						-	-
6-03	.						-	-
	.						-	-
7-03	.						-	-
	.						-	-
8-03	.						-	-
	.						-	-
	.					.	-	-
9-03	.						-	-
	.						-	-
10-03	.						-	-
	.						-	-
	.						-	-

Legenda za P1 in P2: . = bolezensko znamenje je, M = pege na listih, V = nekroze na listih v obliki "V", KL = skodrani listi, RP = razjede poganjkov, RR = razjede na rozgah, Kor = porjavele žile v koreninah, d = dvomljiv rezultat

Za presejalna testa pri določanju povzročitelja bakterijskega ožiga vinske trte, bakterije *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos, 1969) comb nov. (Willems *et al.*, 1987), smo izbrali izolacijo na gojišču ter vgnezditveno reakcijo PCR (Botha *et al.*, 2001).

Izolacija bakterije na gojiščih v čisti kulturi, pri čemer se bakterije iz ekstrakta namnožijo in tvorijo kolonije, je običajna in pogosto uporabljena metoda pri določanju bakterij. Glede na barvo, obliko in hitrost rasti kolonij izberemo takšne, kakršne iščemo. Pravilno izvedena izolacija bakterije je občutljiva metoda, ki naknadno omogoča potrditev lastnosti izoliranih bakterij ter potrditev njihove patogenosti. S tem zadostimo Kochovim postulatom, zlatim pravilom potrjevanja povzročiteljev bolezni. V primeru *X. ampelinus* je izolacija na gojišču izredno težavna, saj bakterija počasi raste in dela zelo drobne kolonije. Mnoge bakterije površja rastlin bolje in hitreje rastejo na gojiščih, zaradi česar iskane bakterije ne opazimo in ne moremo izolirati. Pri testiranju pripravljenih ekstraktov iz leta 2003 in 2004 težav z izolacijo na gojiščih ni bilo, saj je le izjemoma prišlo do preraščanja plošč z drugimi bakterijami. Bakterije smo lahko izolirali, očistili in namnožili za druge teste v 20-30 dneh. Raziskovalci opozarjajo na možnost preraščanja gojišč in inhibicijo rasti *X. ampelinus* na gojiščih z bakterijo *Erwinia herbicola* (Serfontein,), ob testiranju soka vinske trte, zbranega ob rezi. V takšnih primerih je uporaba dodatne metode, ki temelji na drugačnem biološkem principu (serološkem ali molekularnem) nujna. Z molekularnimi metodami, kakršna je tudi vgnezditvena reakcija PCR, rezultat dobimo v nekaj dneh. Podobno kot z drugimi molekularnimi metodami, določamo tudi mrtve bakterije. Pozitivni rezultat molekularne metode torej še ne potrjuje zastopanosti živih bakterij, sposobnih povzročiti bolezen, vendar pa visoka občutljivost, specifičnost ter predvsem hitrost molekularnih metod v rutinski diagnostiki odtehtajo to pomanjkljivost. Pri testiranju vzorcev z vgnezditveno reakcijo PCR smo opazili inhibicijo pomnoževanja zaradi preostalih snovi v izolirani DNA, zaradi česar je priporočljiva uporaba redčitev izolirane DNA. Korelacija med rezultati obeh presejalnih testov je bila pri vzorcih dobra. V letu 2004 smo bakterijo lahko ponovno izolirali iz značilnih madežev na listih ter razjed na poganjkih in rozgah enega trsa (preglednica 2). Iz enega podvzorca vzorca 1-04 bakterije kljub pozitivnemu rezultatu molekularnega testa bakterije nismo uspeli izolirati, kar je najverjetneje posledica suhega rastlinskega tkiva. Sklepamo, da bakterije le krajši čas preživijo propad rastlinskega tkiva zaradi česar posušeni deli za vzorčenje ne ustrezajo. Pri preostalih podvzorcih istega vzorca smo opazili visoko občutljivost izolacije na gojiščih, povsem primerljivo z občutljivostjo uporabljene molekularne metode.

Preglednica 2: Znamenja bolezni in rezultati presejalnih testov za vzorce vinske trte odvzete v letu 2004

Trta	Znamenja bolezni ¹						Vgnezditvena reakcija PCR	Izolacija na gojiščih
	M	V	KL	RP	RR	Kor		
1-04				.			d	+
	.						+	+
	.						+	-
	.						+	+
					.		d	+
2-04				.			-	-
3-04					.		-	-
4-04	.						-	-
	.						-	-
5-04	.						-	-
					.		-	-
					.		-	-
6-04					.		-	-
					.		-	-
7-04					.		-	-

Poskusi potrditve obstoja bakterije z izolacijo in molekularnimi metodami v letu z manj izraženimi znamenji bolezní, so bili neuspešni (preglednica 1). Bakterije, tudi če so bile, so bile pod mejo občutljivosti diagnostičnih metod. Negativni so bili tudi vsi vzorci z znamenji nekroz listov v obliki »V« ter nakodranimi listi, kar kaže na to, da vsaj v tem primeru, ta znamenja verjetno niso bila posledica bakterijskega ožiga vinske trte. Rezultati so potrdili, da je koncentracija bakterij praviloma sorazmerna z izrazitostjo znamenj bolezní. V nekaterih primerih je bila izolacija neuspešna kljub značilnim poligonalnim pegam na listih. Podobne izkušnje imajo tudi drugi raziskovalci, zaradi česar sumijo, da bi lahko ti bili posledica bakterijskega toksina. V tem primeru je bakterija lahko precej daleč stran od znamenj bolezní, medtem ko toksin potuje s tokovi po rastlini in povzroča znamenja bolezní.

Neenakomerno razporeditev bakterije po rastlini smo potrdili že ob analizi prvega vzorca iz leta 2002, ko je bila izolacija bakterije možna le iz enega od 3 podvzorcev, kljub temu, da je šlo za sosednje tkivo (poganjek in iz njega rastoče liste). Neenakomerna razporeditev bakterij po rastlinah je povezana z njihovim preživetjem v žilnem tkivu. V žilah so bakterije lahko proste in z vodo potujejo po rastlini, zlepljene v skupke, najpogosteje pa so prilepljene na površine sten (Grall in Manceau, 2003). Tej neenakomerni razporeditvi je potrebno prilagoditi vzorčenje pri katerem je priporočljivo vključiti tkiva iz različnih delov trsa, tudi takšna, ki ne kažejo znamenj bolezní. Neenakomerna razporeditev bakterij po rastlinah je ena od možnih razlag za relativno velik delež negativnih vzorcev z izraženimi značilnimi znamenji bolezní v letu 2004. V tem letu je bilo vzorčenih tudi večje število razjed v katerih so bakterije lahko tudi mrtve.

Poleg izrazitosti znamenj bolezní ter neenakomerne razporeditve bakterije v rastlini, lahko na uspešnost laboratorijskega potrjevanja vpliva tudi čas vzorčenja. Oba trsa v katerih smo potrdili obstoj *X. ampelinus*, vzorca 1-02 in 1-04, sta bila odvzeta v maju. Vzorci v letu 2003 so bili vzorčeni julija, ki naj bi bil po izkušnjah v Franciji najprimernejši čas vzorčenja. V Španiji se priporoča vzorčenje v avgustu. Za oceno najprimernejšega časa vzorčenja v naših razmerah imamo s to boleznijo še premalo izkušenj, glede na rezultate pa lahko sklepamo, da je izolacija bakterij možna vsaj kadar so znamenja bolezní močno izražena in ne prestara.

Ob upoštevanju neenakomerne razporeditve bakterij po rastlini in času vzorčenja, sta metodi izolacije bakterije na gojiščih in vgnezdítvene reakcije PCR, ustrezni presejalni metodi za določanje bakterijskega ožiga vinske trte v vzorcih listov, poganjkov in rozg. Z vzpostavljenimi metodami za določanje bakterije *X. ampelinus*, lahko pridemo do prvih informacij na osnovi molekularnih testov v nekaj dneh, rezultati izolacije na gojiščih pa so znani v 1 mesecu. Z dodatnim testom patogenosti, ki je nujen kadar gre za najdbo na novem območju, je predviden skupni čas testiranja 17 tednov.

Bakterijskemu ožigu vinske trte podobna znamenja bolezní so v Sloveniji na Primorskem opazovali že v 60-tih letih prejšnjega stoletja na Primorskem (Janežič *et al.*, 1965; Masten *et al.*, 1962). Zaradi obsežnega propadanja trt, predvsem občutljivejših sort kot so Rebula in Pinela, so njihovo gojenje začasno opustili. Iz opisanih znamenj ter vzorca pojavljanja bolezní, močnejših izbruhih v letih 1985 in 2002 z vmesnimi obdobji brez ali z malo znamenji bolezní, ter tudi kasnejše laboratorijske potrditve bakterije *X. ampelinus* na istem območju (Dreo *et al.*, 2005), lahko sklepamo, da je šlo prav za bakterijski ožig vinske trte. Prenos bolezní je najučinkovitejši z okuženim sadilnim materialom, ki je najverjetnejši vzrok tudi za pojav bolezní na Primorskem. V opazovanem vinogradu ocena širjenja bolezní med trtami zaradi kratkega obdobja opazovanja in nihanj v izrazitosti znamenj bolezní v posameznih sezonah ni bila mogoča. Kljub starosti vinograda (posajen je bil leta 1979) ni prišlo do obsežnega propadanja celih trsov, v nasprotju z opazovanji v 60-tih letih prejšnjega stoletja na istem območju. Relativno počasno propadanje trt bi lahko bilo povezano z le redkimi močnejšimi izbruhi bolezní, ki bi slabili trte. Kot je značilno za bakterijske bolezní, fitofarmaceutvska sredstva ter odstranjevanje obolelih poganjkov za zatiranje te bolezní niso bila učinkovita. Zdrave trte nam, vsaj kar zadeva bakterijske bolezní, lahko zagotovi le zdrav sadilni material.

4. SKLEPI

Detekcijski metodi izolacije bakterije na gojiščih ter vgnezditevna reakcija PCR sta ustrezni metodi za ugotavljanje povzročitelja bakterijskega ožiga vinske trte (*X. ampelinus*) v vzorcih listov, poganjkov in rozg.

5. ZAHVALA

Najlepša hvala Kristini Gruden in Nataši Toplak za strokovno pomoč. Zahvaljujemo se Fitosanitarni upravi Republike Slovenije, ki je koordinirala posebni nadzor bakterije *X. ampelinus* v okviru katerega so bili nabrani vzorci v letih 2003 in 2004. Uvajanje in razvijanje metod določanja je deloma potekalo v okviru ciljnega raziskovalnega projekta V4-0872.

6. LITERATURA

- Botha, W.J., Serfontein, S., Greyling, M.M. in Berger, D.K. 2001. Detection of *Xylophilus ampelinus* in grapevine cuttings using a nested polymerase chain reaction. *Plant Pathology* 50, 515-526.
- Dreo, T., Seljak, G., Janse, J.D., van der Beld, I., Tjou-Tam Sin, L., Gorkink-Smits, P. in Ravnikar, M. 2005. First laboratory confirmation of *Xylophilus ampelinus* in Slovenia. *Bull. OEPP*, 2005, vol. 34, str. 1-7, v tisku.
- EPPO/CABI. 1997. *Xylophilus ampelinus*. V: Quarantine Pests for Europe, 2. izdaja, str. 1162-1165., CAB International, Wallingford UK.
- Grall, S. in Manceau, C. 2003. Colonization of *Vitis vinifera* by a green fluorescence protein-labeled, gfp-marked strain of *Xylophilus ampelinus*, the causal agent of bacterial necrosis of grapevine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1904-1912.
- Janežič, F., Masten, V., Leonardi, M. 1965. Proučevanje propadanja vinogradov na Vipavskem. KIS, zaključni elaborat. 103 p.
- Masten, V., Janežič, F., Megušar, F. in Leonardi, M. 1962. Raziskovanje vzrokov odmiranja vinske trte na Vipavskem (I. del), Predhodno poročilo. KIS, 31 p.
- Serfontein, S., Serfontein, J.J., Botha, W.J. in Staphorst, J.L. 1997. The isolation and characterization of *Xylophilus ampelinus*. *Vitis* 36, 209-210.