

## HKRATNO DOLOČANJE FITOPLAZEM IN VIRUSOV NA VZORCIH VINSKE TRTE S SIMPTOMI

Irena MAVRIČ PLEŠKO<sup>1</sup>, Jana BOBEN<sup>2</sup>, Ivan ŽEŽLINA<sup>3</sup>, Mojca VIRŠČEK MARN<sup>4</sup>,  
Maja RAVNIKAR<sup>5</sup>, Nataša MEHLE<sup>6</sup>

<sup>1,4</sup> Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

<sup>2,5,6</sup> Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

<sup>3</sup> KGZS - Zavod Nova Gorica, Nova Gorica

### IZVLEČEK

Okužbe vinske trte z virusi zvijanja listov vinske trte (GLRaV) ali s trsnimi rumenicami pomembno vplivajo na pridelavo vinske trte. To velja predvsem za GLRaV-1 in -3 ter trsne rumenice, zlata trsna rumenica (*Flavescence doree*) pa je tudi na seznamu karantenskih škodljivih organizmov. Bolezenska znamenja GLRaV in trsnih rumenic so precej podobna. Teoretično je tipična bolezenska znamenja možno ločiti med seboj, v praksi pa je ločevanje običajno težje ali celo nemogoče. Mnogokrat znamenja na okuženih trsah niso tipična, ker nanje poleg patogenega mikroba vplivajo tako zunanji dejavniki, kot tudi stanje rastline. Poleg tega pa so problematične tudi mešane okužbe, ko so lahko bolezenska znamenja enega ali več prisotnih patogenih mikrobov prikrita. V okviru CRP projekta V4-0313 smo v letih 2007 in 2008 analizirali 53 vzorcev na zastopanost GLRaV-1, GLRaV-3 in fitoplazem in popisali bolezenska znamenja z namenom ugotoviti, ali lahko okužbe z GLRaV in s trsnimi rumenicami v naših klimatskih razmerah z dovolj veliko zanesljivostjo vizualno ločimo. Pri nekaj vzorcih z bolezenskimi znamenji tipičnimi za fitoplazme, npr. sektorsko rdečenje in neenakomerna olesenelost poganjkov, nismo potrdili okužbe s fitoplazmami. Ravno tako pa tudi pri določenih vzorcih z bolezenskimi znamenji GLRaV prisotnosti obeh iskanih virusov nismo potrdili. Iz rezultatov opravljenih analiz lahko povzamemo, da samo na osnovi opazovanja bolezenskih znamenj na rastlinah ne moremo odločiti, kdo je njihov povzročitelj. Znamenja se lahko pojavljajo zaradi okužbe s fitoplazmami, virusi ali zaradi mešanih okužb, podobna znamenja pa se na vinski trti pojavljajo tudi zaradi drugih dejavnikov. Za potrditev okužbe s posameznim patogenom je potrebna laboratorijska identifikacija.

**Ključne besede:** GLRaV, trsne rumenice, vinska trta, bolezenska znamenja

### ABSTRACT

#### DETECTION OF VIRUSES AND PHYTOPLASMA ON SYMPTOMATIC GRAPEVINE SAMPLES

*Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) infections and infections with phytoplasma greatly influence the grapevine production, especially GLRaV-1, GLRaV-3 and phytoplasma. Typical symptoms induced by these pathogens are different but when they are not typical it is very difficult to differentiate between them. The appearance of symptoms is influenced by

---

<sup>1</sup> dr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

<sup>2</sup> dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, trenutni naslov: Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška 4, SI-1000 Ljubljana

<sup>3</sup> dr., Pri hrastu 18, SI-5000 Nova Gorica

<sup>4</sup> dr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

<sup>5</sup> prof. dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>6</sup> mag., prav tam

pathogen, host plant and environmental factors. In mixed infections the symptoms can be more complex and the presence of one or more pathogens can be masked. In frame of CRP project 53 grapevine samples were visually inspected and analysed for the presence of GLRaV-1, GLRaV-3 and phytoplasma to establish the possibility to differentiate between virus and phytoplasma infection on the basis of visual inspection. In some samples with typical phytoplasma-like symptoms (e.g. sectorial yellowing or reddening, incomplete lignifications of shoots) the phytoplasma infection was not confirmed. Similarly the GLRaV infection was not confirmed in some samples with typical virus-like symptoms. The results of the study show that only on the basis of visual inspection it is not possible to conclude what is the cause of the disease – virus or phytoplasma infection. Laboratory identification is needed for infection confirmation.

**Key words:** GLRaV, grapevine yellows, grapevine, symptoms

## 1 UVOD

Okužbe vinske trte z virusi zvijanja listov vinske trte (GLRaV) ali s trsnimi rumenicami pomembno vplivajo na pridelavo vinske trte. Za GLRaV je znano, da pomembno vplivajo na količino in kvaliteto pridelka, predvsem velja to za GLRaV-1 in GLRaV-3. Zastopanost obeh virusov je obvezno testirati tudi pri pridelavi zdravega sadilnega materiala vinske trte. Tudi okužba trte s trsnimi rumenicami pomembno vpliva na kvaliteto pridelka, povzročiteljica zlate trsne rumenice (*Flavescence dorée*; '*Candidatus Phytoplasma vitis*') pa je tudi na seznamu karantenskih škodljivih organizmov. Bolezenska znamenja GLRaV in trsnih rumenic so precej podobna.

Bolezenska znamenja zlate trsne rumenice se v vinogradih začnejo pojavljati konec junija do konca julija in se proti jeseni vedno bolj stopnjujejo. Na okuženih trtah opazimo najprej bledikavost listov, pri belih sortah listje nato porumeni, pri rdečih pa pordeči. Listni robovi se vihajo navznoter, listi postanejo togi, hitro dozorevajo in predčasno odpadejo. Tkivo slabo oleseneva, zato so rozge povešene, enoletne pa pozimi pogosto pozebejo in odmrejo. Močna znamenja se kažejo tudi na grozdju, saj se okužene trte po cvetenju močno osipajo, preostale oplojene jagode pa venejo, se sušijo in odpadajo. Poškodovana je tudi pecljevina, ki je šibka, tako da odpadajo tudi celi grozdi. Okuženi trsi spomladi pozneje in neenakomerno odganjajo in tudi ne kažejo vsako leto enako močnih znamenj okužbe, z leti pa shirajo in se posušijo.

Kot že omenjeno, sta med virusi zvijanja listov vinske trte gospodarsko pomembna predvsem GLRaV-1 in GLRaV-3. GLRaV, podobno kot fitoplazme naseljujejo večinoma floem okuženih rastlin in s tem vplivajo na pretok hranil. Veliko bolezenskih znamenj, ki jih na okuženih rastlinah opazimo po okužbi z GLRaV, je povezanih z zmanjšanim pretokom hranil po rastlini. Bolezenska znamenja, ki jih najbolj opazimo, so zvijanje listov navzdol ter rdečenje oziroma rumenenje listov pri rdečih oziroma belih sortah (Martelli in Boudon-Padiou, 2006; Goheen, 1988). Na trsih je grozdov manj, pridelek je slabši, lahko tudi za polovico, grozdje kasneje in neenakomerno zori. Pri rdečih sortah je grozdje slabše obarvano in vsebuje manj antocianov, pogosto na rdeče obarvanih listih ostanejo listne žile zelene. Bolezenska znamenja se začnejo pojavljati pri bazi poganjkov. Pri belih sortah sta bolj opazna zvijanje listov in rumenenje. Podobna znamenja lahko opazimo tudi zaradi drugih boleznih in škodljivcev, prehranskih težav in vplivov okolja (Flaherty in Wilson, 1988; Jubb, 1988).

Teoretično je tipična bolezenska znamenja možno ločiti med seboj, v praksi pa je običajno ločevanje težje ali celo nemogoče. Mnogokrat znamenja na okuženih trsih niso tipična, ker nanje poleg patogena vplivajo tako zunanji dejavniki, kot tudi stanje rastline. Poleg tega pa so problematične tudi mešane okužbe, ko so lahko bolezenska znamenja enega ali več patogenov prikrita. Zato smo v okviru CRP projekta z naslovom 'Diagnostika povzročiteljev boleznih vinske trte' analizirali večje število vzorcev na pojav GLRaV in fitoplazem z namenom

ugotoviti, ali lahko okužbe z GLRaV in okužbe s trsnimi rumenicami v naših rastnih razmerah z dovolj veliko zanesljivostjo vizualno ločimo.

## **2 MATERIAL IN METODE**

### **2.1 DETEKCIJA FITOPLAZEM**

Za ekstrakcijo DNA fitoplazem smo uporabili novo metodo, ki olajša način ekstrakcije DNA za nadaljnje analize (Boben in sod., 2007; Pirc in sod., 2009). Za preverjanje zastopanosti fitoplazem smo po izolaciji celokupne DNA uporabili molekularno metodo - PCR v realnem času (Hren in sod., 2007). Analize z 18S rRNA (Applied Biosystems) so predstavljale kontrolo ekstrakcije DNA iz rastlinskega materiala, saj z njo določamo rastlinsko DNA, ki se izolira skupaj z DNA fitoplazem. S specifičnima setoma začetnih oligonukleotidov in sond smo ugotavljali fitoplazmo, povzročiteljico zlate trsne rumenice (Flavescence doree, FD) in počrnelost lesa (Bois noir, BN). Vzorce smo testirali tudi z za fitoplazme univerzalnim setom začetnih oligonukleotidov in sonde, s katerim lahko ugotavljamo tudi druge tipe fitoplazem, ki nastopajo na vinski trti v Evropi.

### **2.2 DETEKCIJA GLRAV**

Za detekcijo GLRaV smo uporabili serološko metodo DAS-ELISA, uporabljali smo protitelesa proizvajalca Bioreba. Testiranja smo izvajali po navodilih proizvajalca. V predhodnih raziskavah smo preverili zanesljivost detekcije GLRaV v različnih obdobjih v rastni sezoni in ugotovili, da je za testiranje manj primeren spomladanski čas, medtem ko je pozno poleti in jeseni detekcija virusa občutno boljša. To nam je omogočilo, da smo za izvedeno raziskavo uporabljali iste vzorce za detekcijo fitoplazem in virusov.

## **3 REZULTATI IN DISKUSIJA**

V obdobju od 2007 do 2008 smo skupno analizirali 53 vzorcev vinske trte na zastopanost fitoplazem in virusov GLRaV (preglednica 1). V letu 2007 smo na fitoplazmo in GLRaV analizirali 17 vzorcev, ki so bili vzorčeni s sumom na okužbo s fitoplazmo. Rezultati testiranja na fitoplazme so bili v vseh primerih negativni, tudi pri vzorcih, ki so kazali tipična znamenja okužbe s fitoplazmami. Pri testiranju na GLRaV pa smo ugotovili okužbo z GLRaV-3 pri 10 vzorcih, med njimi je bilo nekaj vzorcev z bolezenskimi znamenji tipičnimi za fitoplazme.

V letu 2008 smo na GLRaV in fitoplazme analizirali 36 vzorcev vinske trte. Od teh je bilo 16 vzorčeno s sumom na okužbo s fitoplazmami, 20 pa s sumom na okužbo z GLRaV. V petih vzorcih je bila potrjena fitoplazma tipa črni les, v 17 vzorcih pa okužba z GLRaV-3. Pri dveh vzorcih smo potrdili okužbo tako s fitoplazmo črni les, kot tudi okužbo z GLRaV-3, pri 12 vzorcih pa so bili rezultati analiz negativni. Od 16 vzorcev s sumom na okužbo s fitoplazmami je bila le-ta potrjena v 6 vzorcih, od tega pri dveh vzorcih v mešani okužbi z GLRaV-3, 7 vzorcev pa je bilo okuženih z GLRaV-3. Od 20 vzorcev s sumom na okužbo z virusi smo v 10 vzorcih dokazali okužbo z GLRaV-3, v enem vzorcu pa okužbo s fitoplazmo tipa črni les.

Pri analizi teh vzorcev smo ugotovili, da samo na osnovi pojavljanja bolezenskih znamenj na rastlinah ne moremo sklepati, kdo je njihov povzročitelj. Pri nekaj vzorcih, pri katerih smo opazili bolezenska znamenja tipična za fitoplazme, npr. sektorsko redčenje in neenakomerno olesenelost poganjkov, nismo potrdili okužbe s fitoplazmami. Ravno tako pa pri določenih vzorcih z bolezenskimi znamenji GLRaV pojava obeh iskanih virusov nismo potrdili. V 18 vzorcih nismo potrdili niti okužbe z virusi, niti okužbe s fitoplazmami. Znano je, da se podobna znamenja pojavljajo tudi zaradi drugih bolezni in škodljivcev, prehranskih težav in

vplivov okolja, zato je možno, da so bila pri omenjenih vzorcih znamenja posledica delovanja drugih dejavnikov.

Preglednica 1: Seznam analiziranih vzorcev s sumom na okužbo z virusi ali fitoplazmami in rezultati analiz

lokacija	sorta	št. vzorcev	sum na	fitoplazme	virusi
leto 2007					
Ankaran	Malvazija	1	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
Škofije	Refošk	2	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
Metlika	Chardonnay	1	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
Metlika	Chardonnay	1	fitoplazme	negativno	negativno
Metlika	Traminec	1	fitoplazme	negativno	negativno
Sežana	Vitovska Grganja	1	fitoplazme	negativno	negativno
Debeli Rtič	Syrah	1	fitoplazme	negativno	negativno
Debeli Rtič	Syrah	3	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
Škofije	Merlot	3	fitoplazme	negativno	negativno
Škofije	Merlot	2	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
Koper	neznana	1	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
leto 2008					
Ricorvo	Chardonnay	1	fitoplazme	BN (črni les)	negativno
Ankaran	Rumeni Muškat	3	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
Baredi	Chardonnay	2	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
Baredi	Chardonnay	1	fitoplazme	BN (črni les)	GLRaV-3
Gornja Radgona	Sauvignon	1	fitoplazme	BN (črni les)	negativno
Kostanjevica na Krki	Modra Frankinja	1	fitoplazme	BN (črni les)	negativno
Vrenska Gorca	Chardonnay	1	fitoplazme	BN (črni les)	negativno
Kostanjevica	Žametna Črnina	1	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
Šmarje	Malvazija	2	fitoplazme	negativno	negativno
Debeli rtič	Malvazija	1	fitoplazme	negativno	negativno
Labor	Malvazija	1	fitoplazme	negativno	GLRaV-3
Sečovlje	Merlot	9	virusi	negativno	negativno
Sečovlje	Merlot	10	virusi	negativno	GLRaV-3
Sečovlje	Merlot	1	virusi	BN (črni les)	negativno
Sečovlje	neznana	1	fitoplazme	BN (črni les)	GLRaV-3

Na podlagi rezultatov naše raziskave lahko sklepamo, da je vizualno ugotavljanje okužbe s fitoplazmami in/ali GLRaV na terenu zelo težavno in v večini primerov v praksi nezanesljivo. Posebno težavo povzročajo mešane okužbe z obema vrstama patogenov, podobna znamenja pa se lahko pojavljajo kot posledica drugih bolezni in škodljivcev, prehranskih težav ali vplivov okolja. Tako lahko na podlagi bolezenskih znamenj sklepamo na okužbo z omenjenimi patogeni, vendar so za potrditev okužbe potrebne ustrezne laboratorijske analize.

#### 4 ZAHVALA

Raziskava je potekala v okviru CRP projekta V4-0313, ki sta ga financirala Agencija RS za raziskovalno dejavnost in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.

#### 5 VIRI

- Boben J, Mehle N, Ravnikar M. Optimization of extraction procedure can improve phytoplasma diagnostics. *Bulletin of Insectology* 2007, 60 (2): 249-250
- Flaherty DL, Wilson LT. 1988. Mites. V: Pearson RC, Goheen AC (ur.), *Compendium of Grape Diseases*, 1988, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 60-61
- Goheen AC. 1988. Leafroll. V: Pearson RC, Goheen AC (ur.), *Compendium of Grape Diseases*, 1988, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 52
- Hren M, Boben J, Rotter A, Kralj P, Gruden K, Ravnikar M. 2007. Real-time PCR detection systems

- for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasma in grapevine: a comparison with the conventional PCR detection system and their application in diagnostics. *Plant Pathology*, 56: 785-796
- Jubb GL, Jr. 1988. Leafhoppers and Treehoppers. V: Pearson RC, Goheen AC (ur.), *Compendium of Grape Diseases*, 1988, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 62-63
- Martelli GP, Boudon-Padieu E. 2006. Directory of infectious diseases of grapevines. Grapevine leafroll. V: Martelli GP, Boudon-Padieu E. (ur.) *Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004*. Bari: CIHEAM, p. 279, Options Méditerranéennes, Série B: N. 55
- Pirc M, Ravnikar M, Tomlinson J, Dreo T. 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58, 5: 872-881