

## ZLATA TRSNA RUMENICA V SLOVENIJI IN NOVE METODE DETEKCIJE

Jana BOBEN<sup>1</sup>, Matjaž HREN<sup>2</sup>, Kristina GRUDEN<sup>3</sup>, Jana FRANK<sup>4</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,5</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,  
Ljubljana

### IZVLEČEK

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo izvajamo diagnostiko trsnih rumenic v okviru posebnega nadzora, ki ga vrši Fitosanitarna uprava RS. Do leta 2006 smo za diagnostiko uporabljali metode PCR (verižna reakcija s polimerazo) in nested PCR, kombinirano z RFLP s katerimi smo leta 2005 prvič določili prisotnost fitoplazem tipa FD (Flavescence dorée). Slednjo smo potrdili tudi z določitvijo nukleotidnega zaporedja in potrditvijo v tujem laboratoriju. Glede na povečano število vzorcev v zadnjih letih smo razvili metodo PCR v realnem času, ki velja za občutljivejšo in bolj specifično, zlasti pa hitrejšo od klasičnih obstoječih molekularnih metod. Razvili smo dva specifična testa – za fitoplazme tipa FD in BN (Bois noir) in univerzalni test, ki v vzorcu pomnožuje fitoplazme na splošno. Novo metodo smo primerjali s klasično na vseh vzorcih (153), ki so na analizo prispeli v letu 2005. S klasičnimi analizami smo določili 9 FD pozitivnih vzorcev, 99 BN pozitivnih vzorcev, 4 vzorce z mešano okužbo in 38 negativnih vzorcev in 3 vzorce pozitivne na fitoplazme, kjer pa tipa nismo uspeli določiti. S PCR v realnem času smo določili 10 FD pozitivnih vzorcev, 110 BN pozitivnih vzorcev 4 vzorce z mešano okužbo, 26 negativnih vzorcev in 3 vzorce pri katerih smo zaznali prisotnost fitoplazem s splošno metodo, nismo pa mogli določiti tipa fitoplazme v vzorcu.. Prednosti nove metode so se pokazale zlasti v povečani občutljivosti saj smo v 14 od 38 vzorcev, negativnih s klasično metodo, določili prisotnost fitoplazem (10 BN pozitivnih in 4 pozitivne na fitoplazme). Prav tako smo v enem od 3 vzorcev, pozitivnih na fitoplazme, ki jim nismo mogli določiti tipa s klasično metodo, določili fitoplazme tipa BN. V letu 2006 smo z novo metodo analizirali 164 vzorcev, od tega jih je bilo 12 FD pozitivnih, 100 BN pozitivnih, 44 negativnih in 8 pozitivnih na prisotnost fitoplazem nedoločljivega tipa. Nova metoda je bila preizkušena na velikem številu BN pozitivnih vzorcev. FD tip fitoplazem je bil v Sloveniji odkrit šele pred kratkim, zato je tudi število preizkušenih vzorcev z novo metodo manjše.

**Ključne besede:** Bois noir, diagnostika, Flavescence dorée, PCR v realnem času, trsne rumenice

### ABSTRACT

#### FLAVESCENCE DORÉE IN SLOVENIA – NEW DETECTION METHODS

At the National Institute of Biology, Grapevine yellows diagnostics is carried out in the frame of a survey, supervised by Slovenian Plant Protection Service. Until 2006 molecular methods PCR and nested PCR in combination with RFLP were used for the detection of phytoplasmas also in case of the first finding of the FD (Flavescence dorée) phytoplasma

<sup>1</sup> dr., univ. dipl. mikrobiol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>2</sup> univ. dipl. biol., prav tam

<sup>3</sup> doc. dr., univ. dipl. biol., prav tam

<sup>4</sup> univ. dipl. inž. zoot., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

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

in Slovenia in 2005. Presence of FD type was confirmed by sequencing the PCR products and by determination in a diagnostic laboratory outside Slovenia. Due to the increased amount of samples in recent years a more sensitive, specific and considerably less time-consuming real-time PCR method was developed. Two specific tests for the detection of FD or BN (Bois noir) types of phytoplasmas and one universal test for detection of phytoplasmas in general were designed. The newly developed method was compared to the normally used PCR on 153 samples in 2005. Using PCR method we could detect, 9 FD positive samples, 99 BN positive samples, 4 samples with mixed infection, 38 negative samples and 3 samples positive for the presence of phytoplasma where we could not determine the specific type. Using real-time PCR method 10 FD positive, 110 BN positive, 4 phytoplasma positive (type of phytoplasma could not be determined), and 26 negative samples were detected along with 3 mixed infected samples. The newly developed method proved to be more sensitive, since 14 out of 38 negative samples (according to PCR results) were shown to be positive for the presence of phytoplasma (10 BN and 4 phytoplasma in general positive). Also 1 out of 3 phytoplasma positive samples after PCR was later shown to be BN positive. In 2006 we analysed 164 samples using real-time PCR: 12 samples tested FD positive, 100 BN positive, 44 samples were negative and 8 were positive for the presence of phytoplasma in general. The real-time PCR method was tested on many BN positive samples but, considering that the FD type was only detected in 2005, on few FD positive samples.

**Key words:** Bois noir, diagnostics, Flavescence dorée, grapevine yellows, real-time PCR

## 1 UVOD

Fitoplazme so bakterije brez celične stene, ki se nahajajo v floemu gostiteljskih rastlin in v žuželčjih prenašalcih (Garnier in sod., 2001; Christensen in sod., 2005). Trsne rumenice je izraz, ki označuje skupino bolezni, ki jih na vinski trti povzročajo različni tipi fitoplazem in ki jih po bolezenskih znamenjih ne moremo medsebojno razlikovati (Martini in sod., 1999; Angelini in sod., 2001; Boudon-Padieu, 2003, Lee in sod., 2004). Med fitoplazmami, ki povzročajo bolezen trsnih rumenic ima največji ekonomski učinek fitoplazma Flavescence dorée (FD), razlog za to pa je dejstvo, da povzroča velike izgube pridelka in da ima velik epidemiološki potencial v evropskih vinogradih zaradi prisotnosti in razširjenosti prenašalca *Scaphoideus titanus* (Boudon-Padieu, 2003), ki se hrani s sokom vinske trte.

Za določanje fitoplazem FD in Bois noir (BN) je bilo razvitih več različnih metod, od serološke metode ELISA (Le Gall in sod., 1998), molekularnih metod kot je PCR, ki vključuje tudi nested PCR in multipleks PCR (Daire in sod., 1997; Clair in sod., 2003), do polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) (Marzachi in sod., 2001).

V zadnjem času se hitro povečuje uporaba PCR v realnem času za diagnostiko različnih mikroorganizmov. Metoda uporablja za detekcijo tarčnih zaporedij različne kemije, TaqMan® ali pa na primer SYBR® Green kemijo. Pri TaqMan® kemiji gre za uporabo sond, označenih s fluorescentnim barvilom. Ena od variacij te metode je z uporabo t.i. TaqMan® MGB sond, ki lahko zaradi posebne molekule, pomnožujejo še krajše odseke tarčnega nukleotidnega zaporedja. Zaradi teh lastnosti ponuja metoda PCR v realnem času, v našem primeru možnosti za bolj specifično in občutljivo detekcijo fitoplazem trsnih rumenic z manjšo možnostjo kontaminacije.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Material

V letu 2005 smo analizirali 153 vzorcev različnih sort (bele in rdeče) vinske trte iz vseh vinorodnih dežel Slovenije (Podravje, Primorje, Posavje), v letu 2006 pa 164 vzorcev vinske trte prav tako različnih sort in iz različnih vinorodnih dežel.

## **2.1 Ekstrakcija DNA**

Za ekstrakcijo DNA smo uporabili rahlo spremenjen protokol, ki ga opisujeta Ahrens in Seemüller (1992), kjer so predhodno izvedli korak koncentriranja fitoplazem. Za ekstrakcijo smo uporabili 1,5 g tkiva iz listnih žil vinske trte. Na koncu smo izolirano DNA resuspendirali v 50 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0). Uspešnost izolacije DNA smo v letu 2005 preverili z agarozno elektroforezo in primerjalno tudi s PCR v realnem času, kjer smo pomnoževali del nukleotidnega zaporedja za rastlinski gen citokrom oksidazo (COX). V letu 2006 smo izolacijo DNA preverjali z uporabo detekcijskega sistema za 18S rRNA (Applied Biosystems, ZDA) prav tako z metodo PCR v realnem času.

## **2.2 Analiza vzorcev**

### **2.2.1 PCR in nested PCR**

V letu 2005 smo vzorce analizirali z do takrat najbolj občutljivim in specifičnim sistemom za detekcijo fitoplazem trsnih rumenic – kombinacijo metod PCR in nested PCR. V vzorcih smo določali prisotnost fitoplazem na splošno kot tudi dveh specifičnih tipov – FD in BN, kot je to opisano v Hren in sod. (2007, sprejeto v objavo).

### **2.2.2 PCR v realnem času**

Razvili smo metodo PCR v realnem času. Vzorci so bili v letu 2005 primerjalno analizirani z metodama PCR (in nested PCR) ter PCR v realnem času, v letu 2006 pa le s PCR v realnem času. Detekcija prisotnosti fitoplazem trsnih rumenic poteka po principu 3 + 1, ki je podrobno opisan v Hren in sod. (2007, sprejeto v objavo). Detekcijski protokol predvideva določanje prisotnosti fitoplazem vseh vrst ter dva specifična testa, ki določata tipa fitoplazem trsnih rumenic – FD in BN. Istočasno se preverja tudi uspešnost ekstrakcijskega postopka DNA v izogob lažno negativnim rezultatom.

## **3 REZULTATI IN RAZPRAVA**

Rezultati obeh uporabljenih metod v letu 2005 so povzeti v preglednici 1.

V letu 2005 smo analizirali 153 vzorcev primerjalno z dvema metodama. PCR v realnem času se je izkazala kot bolj občutljiva, saj smo pri 10 od 38 vzorcev, ki so bili z navadnim PCR (v kombinaciji z nested PCR) negativni, določili fitoplazme tipa BN, v 4 vzorcih (od 38) pa prisotnost fitoplazem, kjer tipa nismo uspeli določiti. V primeru 3 vzorcev, ki so z uporabo navadnega PCR (v kombinaciji z nested PCR) kazali okužbo s fitoplazmami na splošno, smo v 1 uspeli s PCR v realnem času določiti okužbo s tipom BN. 4 vzorci so z navadnim PCR pokazali prisotnost mešane okužbe z BN in FD. V primeru uporabe PCR v realnem času, se je mešana okužba potrdila le v 3 vzorcih, v 1 vzorcu pa smo določili le prisotnost FD tipa. Razlog za to je lahko v tem, da se pri analizi s PCR v realnem času uporablja manjša izhodna količina DNA (2 µl) kot pri navadnem PCR (4 µl). Pomembno pri tem je poudariti, da smo potrdili okužbo s fitoplazmami pri več analiziranih vzorcih kot s klasično metodo. Nova metoda je torej občutljivejša in omogoča hitro, specifično in zanesljivo detekcijo.

Preglednica 1: Primerjava analiz 153 vzorcev z navadnim PCR in PCR v realnem času. NEG: vzorec je negativen, BN+: vzorec je pozitiven na fitoplazme tipa BN, FD+: vzorec je pozitiven na fitoplazme tipa FD, BN+FD+: v vzorcu je prisotna mešana okužba z BN in FD tipom, N. tip: v vzorcu so prisotne fitoplazme.

Table 1: Comparison of PCR and real-time PCR analyses on 153 samples. NEG: sample is negative, BN+: sample is BN positive, FD+: sample is FD positive, BN+FD+: mixed infection with BN and FD types, N. tip: sample is positive for the presence of phytoplasmas.

		Navadni PCR					
		NEG	BN+	FD+	BN+FD+	N. tip.	Skupaj
PCR v realnem času	NEG	24				2	<b>26</b>
	FD+			9	1		<b>10</b>
	BN+	10	99			1	<b>110</b>
	BN+FD+				3		<b>3</b>
	N. tip.	4					<b>4</b>
	Skupaj	<b>38</b>	<b>99</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>153</b>

Zaradi večje specifičnosti in hitrejše izvedbe postopkov analiz smo v letu 2006 pri analizah vzorcev uporabljali le metodo PCR v realnem času. Rezultati testiranja so povzeti v Preglednici 2.

Preglednica 2: Rezultati analiz 164 vzorcev iz leta 2006.

Table 2: Results of analyses of 164 samples from the year 2006.

Rezultat analize	Število vzorcev
NEG	44
FD+	12
BN+	100
N. tip	8
<b>Skupaj</b>	<b>164</b>

Od skupno 164 analiziranih vzorcev različnih sort vinske trte, odvzetih iz različnih vinorodnih pokrajinah Slovenije, smo prisotnost FD tipa potrdili v 7 %, BN tipa pa v 61 % vzorcev. Negativnih je bilo 27 % vzorcev. Razlog višji odstotek negativnih vzorcev v letu 2006 je v načinu vzorčenja in ne v uporabljenih metodah. Prva najdba FD tipa fitoplazem je bila namreč v letu 2005 in zato se je v letu 2006 vršil poostren nadzor, še posebej v žarišču okužbe in v varovalnem pasu. Vzorčili so se trsi, ki niso nujno kazali izrazitih bolezenskih znamenj, kar je bila praksa v prejšnjih sezonah, vse izključno zaradi preventive širjenja okužbe agresivnejšega FD tipa.

#### 4 SKLEPI

- Razvili smo novo metodo PCR v realnem času za določanje fitoplazem trsnih rumenic.
- Detekcija poteka po principu 3 + 1; v vzorcih določamo fitoplazme na splošno ter BN in FD tipa fitoplazme trsnih rumenic. Obenem imamo uveden tudi test za interno kontrolo (COX ali 18S) s katero izločimo lažno negativne rezultate, ki bi bili posledica slabe ekstrakcije DNA in so hkrati tudi kontrola pomnoževanja v PCR reakciji.
- Metoda je bolj občutljiva in občutno hitrejša od prej uveljavljenega PCR v kombinaciji z nested PCR.

- Novo metodo lahko uporabljamo tudi za preverjanje stanja okuženosti drugih gostiteljskih rastlin in žuželčjih prenašalcev.
- Analize vzorcev vinske trte kažejo na nove lokalizirane najdbe okužbe z FD tipom in na okuženost z BN tipom fitopazem po vseh vinorodnih deželah Slovenije.

## 5 ZAHVALA

Delo je bilo delno sofinancirano s strani Agencije Republike Slovenije za raziskovalno dejavnost (ARRS; projekt št.: V4-0872), Fitosanitarni inšpekciji in Fitosanitarni upravi RS (MKGP). Zahvaljujemo se fitosanitarnim inšpektorjem in preglednikom za vzorce vinske trte ter FSI in mag. Gabrijelu Seljaku (KGZ NG) za ogled okuženih vinogradov in delo na terenu.

## 6 LITERATURA

- Ahrens, U., Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.
- Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A., Boudon-Padieu, E. 2001. Flavescence dorée in France and Italy: occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationship to Palatine grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79-86.
- Boudon-Padieu, E. 2003. The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. V: Proceedings of the 14th Meeting of ICVG, 2003. Locorotondo (Bari), Italy, ICVG, 2003: 47-53.
- Christensen, N.M., Axelsen K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A. 2005. Phytoplasmas and their interaction with hosts. *Trends in Plant Science*, 10: 526-535.
- Clair, D., Larrue, J., Aubert, G., Gillet, J., Cloquemin, G., Boudon-Padieu, E. 2003. A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis*, 42: 151-157.
- Daire X., Clair, D., Reinert, W., 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 Plant Pathology*, 103: 507-514.
- Le Gall, F., Bové, J.-M., Garnier, M. 1998. Engineering of a Single-Chain Variable-Fragment (scFv) Antibody Specific for the Stolbur Phytoplasma (Mollicute) and Its Expression in *Escherichia coli* and Tobacco Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4566-4572.
- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, P., Gruden, K., Ravnikar, M. Real-time PCR detection system for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasma in grapevine: a comparison with the conventional PCR detection system and its application in diagnostics. *Phytopathology* (sprejeto v objavo).
- Lee I.-M., Martini, M., Marcone, C., Zhu, S.F. 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus* Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 337-347.
- Martini, M., Murari, E., Mori, N., Bertaccini, A. 1999. Identification and Epidemic Distribution of Two Flavescence Dorée-Related Phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease*, 83: 925-930.
- Marzachi, C., Palermo, S., Boarino, A., Verati, F., D'Aquillo, M., Loria, A., Boccoardo, G. 2001. Optimization of a one-step PCR assay for the diagnosis of Flavescence dorée-related phytoplasmas in field-grown grapevines and vector populations. *Vitis*, 40: 213-217.