

NOVA ODKRITJA PRI RAZISKAVAH BOLEZNI RUMENIC, KI JIH PRI VINSKI TRTI (*VITIS VINIFERA* L.) POVZROČAJO FITOPLAZME

Boris KORUZA¹

Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Povzročiteljice rumenic vinske trte (*Vitis vinifera* L.) so fitoplazme. Te povzročajo vinogradništvu velike gospodarske škode. Večina doslej odkritih fitoplazem, ki okužujejo vinsko trto, uvrščajo v dve glavni skupini - skupino rumenic bresta (Elm yellows group) in skupino rumenic "stoibur" (Stolbur yellows group). Detekcija povzročitelja bolezni se lahko opravi s serološkimi (ELISA) ali molekularnimi (PCR) metodami. Slednje omogočajo specifično detekcijo fitoplazem iz različnih skupin ter njihovo razvrščanje v skupine, in to tako pri gostiteljskih rastlinah, kot pri naravnih prenašalcih. Nove detekcijske metode so prispevale k odkritju novih tipov rumenic, naravnih prenašalcev ter različnih povezav med gostiteljskimi rastlinami in vektorji fitoplazem. Možnost okužb trsov prek cepilnega materiala sicer obstaja, vendar je majhna. Mnogo večja je možnost okužb prek naravnih prenašalcev, med katere spadajo predvsem škržati. Reševanje problema otežuje dejstvo, da se večina naravnih prenašalcev rumenic prehranjuje na vinski trti le občasno, pretežno pa živijo na drugih rastlinskih vrstah, od koder prenašajo okužbe na vinsko trto.

Ključne besede: etiologija, fitoplazme, trsne rumenice, vinska trta.

ABSTRACT

NEW FINDINGS IN THE RESEARCH OF YELLOWS DISEASES CAUSED BY PHYTOPLASMAS IN GRAPEVINE (*VITIS VINIFERA* L.)

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) yellows diseases are caused by phytoplasmas which have brought heavy economic damage to viticulture. The majority of phytoplasmas determined until now which attack grapevine are classified in two groups - Elm yellows group and Stolbur yellows subgroup. Detection of disease causal agents could be made using serological (ELISA) or molecular (PCR) methods. The latter allow more specific detection of phytoplasmas from different groups and their classification into groups both in host plants and in natural vectors. New detection methods have contributed to detection of new types of grapevine yellows, natural vectors and various links between vectors and phytoplasmas. The possibility of infecting the vines by means of plant propagation material exists but it is not very frequent. Much greater is the possibility of infections by natural hosts, specially leafhoppers and planthoppers. The solution of the problem is rather difficult due to the fact that the majority of natural phytoplasmas vectors feed on the grapevine only temporarily and they live on other (wild or cultivated) plant species acting as a vector of infections to grapevine.

Key words: etiology, grapevine, grapevine yellows diseases, phytoplasmas.

1 UVOD

Povzročiteljice rumenic vinske trte (*Vitis vinifera* L.) so fitoplazme. To so prokariotski mikroorganizmi brez celičnih sten, ki prek naravnih prenašalcev okužijo celice rastlinskih prevodnih tkiv. Doslej znani naravni prenašalci fitoplazem so nekatere žuželke iz podreda

¹ mag., dipl. ing. kmet., SI-1000 Ljubljana, Hacquetova 17

škržatov (Cicadoidea; red Homoptera), ki se prehranjujejo s sesanjem rastlinskih floemskih sokov. Dokazano je, da se vsi do danes odkriti tipi fitoplazem, ki okužujejo vinsko trto, lahko prenašajo tudi z latentno okuženimi deli rastlin pri vegetativnem razmnoževanju. Trsne rumenice povzročajo v evropskih vinogradih občutne gospodarske škode, zato so odkrivanje, identifikacija povzročiteljev, ugotavljanje naravnih prenašalcev in uvajanje postopkov za preprečevanje širjenja teh bolezni, postali nujen člen v sanitarnem delu selekcije vinske trte in podlag.

Fitoplazem za zdaj še ne znamo gojiti v čistih kulturah (*in vitro*), njihov razvojni krog je še dokaj slabo znan. Zato je bil za napredek pri spoznavanju povzročiteljev trsnih rumenic izrednega pomena razvoj učinkovitih detekcijskih metod. To pa, zaradi nizkih titrov patogena in velike vsebnosti fenolnih snovi v tkivih vinske trte, ki otežujejo izolacijo fitoplazmatske DNK, ni bila lahka naloga. Na podlagi analiz ribosomske DNK so tako šele nedavno odkrili, da fitoplazme, ki jih povezujejo z različnimi tipi trsnih rumenic, dejansko spadajo v najmanj dve različni skupini (Daire *et al.*, 1993; Padovan *et al.*, 1996). Fitoplazma, povzročiteljica zlate trsne rumenice (Flavescence dorée-FD), je bila uvrščena v skupino rumenic bresta (Elm yellows group-EYG). Rumenci tipa "črni les" (Bois noir-BN) in "Vergilbungskrankheit" pa sta bili uvrščeni v skupino rumenic aster (Aster yellows group), ali po novem v njeno podskupino rumenic tipa "stolbur" (Stolbur yellows subgroup-SYG) (Bertaccini *et al.*, 1995). Medtem so v severni Italiji, Avstraliji, Izraelu in v severni Ameriki odkrili še nove tipe fitoplazem, ki povzročajo trsne rumenice, a jih doslej še niso z gotovostjo uvrstili v nobeno od navedenih skupin (Padovan *et al.*, 1996).

V nasprotju s precejšnjo različnostjo fitoplazem, se simptomi rumenic, ki jih le-te povzročajo pri vinski trti, med seboj zelo malo razlikujejo, zato jih za determinacijo povzročitelja ne moremo uporabiti. Kaže, da so razlike v zunanjih znamenjih rumenic bolj odvisne od sorte vinske trte, kot od tipa fitoplazme s katero je trta okužena (Maixner *et al.*, 1997). Dodatno težavo pri širjenju trsnih rumenic na sploh pa predstavljajo trsne podlage, ki ne kažejo zunanjih znamenj bolezni (SO4, Kober 5BB, 5C, 161-49), ali pa so znamenja slabo izražena oziroma netipična (420A, Richter 110, 140 Ruggeri, 1103 Paulsen).

2 METODE ZA DETEKCIJO FITOPLAZEM

2.1 Serološke metode

Metode s katerimi lahko laboratorijsko določimo različne tipe fitoplazem delimo na serološke in molekularne. Med serološkimi je najpomembnejša metoda ELISA, za katero so že uspeli izdelati specifične antiserume in monoklonalna protitelesa za več tipov fitoplazem, med njimi tudi za FD in fitoplazme iz skupine SYG. Vendar težave pri načinu priprave vzorcev, ki se pri posameznih tipih fitoplazem nekoliko razlikujejo, zmanjšujejo specifičnost metode in preprečujejo njeno široko uporabo (kot npr. za detekcijo virusov vinske trte). S to metodo lahko določamo tudi zastopanost fitoplazem v žuželkah prenašalcih (npr. v škržatih), vendar so na ta način, v primerjavi z molekularnimi tehnikami, lahko odkrili le 60 % okužb (Kuszala, 1996).

2.2 Molekularne metode

Mnogo bolj natančne od seroloških so molekularne metode, pri katerih se opravi analiza DNK, bodisi s hibridizacijo bodisi s PCR tehnikami (Polymerase Chain Reaction). Za to je potrebno iz žuželke prenašalke ali iz okuženih rastlinskih tkiv, najprej ekstrahirati fitoplazmatsko DNK. Ekstrakcijo iz listov (listne žile) opravimo v juliju ali avgustu, ko se na rastlinah že vidijo zunanja znamenja rumenic. Kasneje pa fitoplazemsko DNK lahko ekstrahiramo tudi iz floema lesa okuženega trsa. Priprava vzorcev za ekstrakcijo je zazdaj še dokaj zapletena, saj tkiva vinske trte vsebujejo precej polifenolov, ki lahko negativno vplivajo na kasnejše postopke pri hibridizaciji DNK (Daire *et al.*, 1997).

Metoda hibridizacije DNK je nekoliko bolj natančna od seroloških tehnik detekcije fitoplazem. Uporablja se predvsem za hitre preglede večjega števila vzorcev, kar je posebej pomembno pri ugotavljanju okuženosti žuželk prenašalk. Pravi napredek pri detekciji fitoplazem pa je prinesla šele uporaba metode PCR, ki je stokrat občutljivejša od metode hibridizacije. Omogoča specifično detekcijo fitoplazem iz različnih skupin (med njimi tudi iz skupin SYG in EYG) ter njihovo razvrščanje v različne skupine, in to tako pri gostiteljskih rastlinah kot pri žuželkah prenašalkah. Detekcija poteka na podlagi laboratorijske primerjave sekvenc genov ribosomske ali neribosomske DNK z ustreznimi standardnimi vzorci. V začetni fazi raziskav so za te namene uporabljali predvsem 16S rDNK, ki pa je zaradi dokaj majhne stopnje polimorfizma manj primerna za določanje različnih sevov sorodnih fitoplazem, znotraj posameznih skupin. Zato so se v zadnjih nekaj letih posvetili razvoju novih tehnik PCR, kjer za detekcijo fitoplazem uporabljajo neribosomsko DNK (Boudon-Padieu *et al.*, 1997). Posledica uporabe občutljivejših metod detekcije so številna odkritja novih fitoplazem ter spoznanje, da je raznolikost tipov fitoplazem znotraj skupine SYG mnogo manjša kot znotraj skupine EYG. Fitoplazme skupine SYG so mnogo bolj "univerzalne", povzročajo rumenice pri velikem številu divjih ter kulturnih rastlin, ter se prenašajo z žuželkami. Metoda je seveda splošno uporabna tudi v druge namene, na primer za razlikovanje sort in klonov vinske trte, ugotavljanje mutacij, detekcijo virusov itn.

3 REZULTATI NOVEJŠIH RAZISKAV FITOPLAZEM PRI VINSKI TRTI

3.1 Skupina rumenic bresta (Elm yellows group-EYG)

Če rumenice iz skupine SYG lahko najdemo v skoraj vseh vinogradnih regijah Evrope ter njihovi okolici, pa je bila zlata trsna rumenica *stricto sensu* (FD), ki jo uvrščamo v skupino rumenic bresta (EYG), po doslej znanih podatkih odkrita le na območjih južne Francije, severne Španije in severne Italije. Omejena je torej na tista območja, kjer živi tudi njen naravni prenašalec - škržat *Scaphoideus titanus* Ball. (*Cicadellidae* - pravi škržati). V Sloveniji FD še ni bila eksperimentalno dokazana, čeprav se je omenjeni škržat že naselil v primorskih vinogradih (Seljak, 1987). Bolezen se, glede na različno občutljivost sort vinske trte, kaže v spomladanskem zaostajanju rasti, delnem ali popolnem sušenju grozdličev, značilnem zvijanju in nenormalni kovinsko-rumenkasti barvi listov (pri rdečih sortah je barva listov rdečkasto-rumenkasta), nekrozah na listih ter nedozorevanju mladik. Kjer ni naravnega prenašalca se FD lahko prenaša prek latentno okuženega cepilnega materiala, torej s trsnimi cepljenkami. Ena najbolj občutljivejših sort je Chardonnay, ki se uporablja tudi kot indikatorska rastlina za vse tipe trsnih rumenic.

Nov tip fitoplazme podobne FD so na vinski trti odkrili v Nemčiji, kjer pa škržat *S. titanus* ne živi. V tem primeru primarni gostitelj bolezni ni vinska trta, temveč druge rastlinske vrste kot npr. *Alnus glutinosa* Mill. (črna jelša), *Rubus* sp. (robida) in *Prunus* sp. (slive), ki rastejo v bližini vinogradov. Zastopanost nove fitoplazme so dokazali tudi v jelševi bolšici (*Psylla alni*; *Psyllidae*). Ta sicer primarno živi in se prehranjuje na jelšah, v manjšem številu pa so jo našli tudi na vinski trti. Raziskave, s katerimi bi lahko potrdili možnost okužbe vinske trte z novo fitoplazmo prek jelševe bolšice, so še v teku (Reinert, 1997).

3.2 Skupina rumenic tipa "stolbur" (Stolbur yellows subgroup-SYG)

Bolezen "črni les" (Bois noir) je znana že od leta 1980. Najprej je bila odkrita v severno-francoskih vinogradih. Znamenja bolezni so zelo podobna kot pri FD, se ne prenaša s škržatom *S. titanus*, njena etiologija pa je bila do pred kratkim neznana. Šele razvoj tehnik za laboratorijske raziskave DNA (PCR), je omogočil odkritje povzročitelja, ki so ga uvrstili med fitoplazme iz podskupine "stolbur" (SYG) (Daire *et al.*, 1993), podobno kot tudi povzročitelja bolezni "Vergilbungskrankheit" v Nemčiji (Maixner *et al.*, 1995). Bolezni, ki jih povzročajo

fitoplazme iz te podskupine, sta v vzhodni Evropi kot viroze prvič opisala Suhov in Vovk že leta 1946, opazili pa so jih najprej na paradižniku, papriki in tobaku. Kot naravni prenašalec fitoplazem iz te skupine je bil potrjen škržat *Hyalestes obsoletus* Sign. (Cixiidae - svetleči škržati). Kasneje je bila ta povezava potrjena tudi v Franciji pri rastlinah iz družine razhudnikovk (Solanaceae) ter v Franciji in Nemčiji, v primeru bolezni "črni les" ter "Vergilbungskrankheit" pri vinski trti (Maixner, 1994).

Raziskave, ki so jih v Franciji opravili v zadnjih letih so pokazale, da sta potencialna prenašalca rumenic iz skupine SYG, poleg škržata *H. obsoletus*, še najmanj dva druga škržata iz družine Cicadellidae in sicer *Mocycdia crocea* Herrich-Shaefler ter *Euhemiptera lineolatus* Brullé. Prav tako so dokazali, da so z omenjenimi fitoplazmami okužene tudi številne rastlinske vrste, ki rastejo v vinogradih ali njihovi neposredni bližini, kot npr. *Convolvulus arvensis* L. (njivski slak), *Cardaria draba* Desv. (navadni poprovnik - sinonim je *Lepidium draba* L.), *Catharanthus roseus* L. (vrsta zimzelena - sinonim je *Vinca rosea*), *Datura stramonium* L. (kristavec), *Ficus carica* L. (smokva), *Syringa vulgaris* L. (španski bezeg), češnja (*Prunus* sp. L.) in brest (*Ulmus* sp. L.). Analize so pokazale tudi, da so bili odrasli osebki škržata *H. obsoletus* okuženi s fitoplazmo takoj, ko so se pojavili. To navaja na sklep, da so se okužili že v stadiju ličinke v tleh, ko so se hranili na koreninah okuženih gostiteljskih rastlin. Izkazalo se je, da je prav njivski slak ena najpomembnejših gostiteljskih rastlin tega škržata. Potrdili so tudi, da so okuženi tudi škržati na območjih kjer ni vinogradov, in tu predstavljajo potencialni rezervoar za širjenje rumenic (Sforza *et al.*, 1997).

Iz tega izhaja, da bolezn "črni les", kakor tudi drugih rumenic iz podskupine SYG, ne bomo mogli zatreti s standardnimi metodami. Kot učinkovit ukrep, ki zmanjša številčnost populacije škržata *H. obsoletus*, priporočajo vzdrževanje čistih tal v vinogradu, ter zimsko oranje tistih zemljišč v neposredni okolici vinogradov, ki bi lahko bila potencialni rezervoar širjenja bolezni rumenic. Z veliko verjetnostjo domnevajo tudi, da so povzročitelji in naravni prenašaleci bolezni "črni les" in "Vergilbungskrankheit" v obeh primerih isti, da pa nekatere razlike v zunanjih znamenjih bolezni obstajajo predvsem zaradi drugačnega okolja in drugih sort vinske trte, pri katerih so ju opazili (Sforza *et al.*, 1997).

Podobne rezultate so dobili tudi italijanski fitopatologi na območju Ligurije. Okuženost s fitoplazmami iz podskupine SYG, so potrdili pri divjerastočih rastlinskih vrstah *Plantago media* L. (srednji trpotec), *Prunus spinosa* L. (črni trn), *Spartium junceum* L. (navadna žuka), *Linaria* sp. Mill. (madronščica) in *Rubus* sp. (robida). Pogostnost okužb pri vinski trti, je bila tesno povezana z zastopanostjo navedenih rastlinskih vrst v neposredni bližini vinogradov ali v samih vinogradih. Prav tako pa so bili s temi fitoplazmami okuženi osebki vsaj dveh vrst škržatov iz družine Cicadellidae: to sta *Euscelis incisus* Kirschbaum ter *Euscelidius variegatus* Kirschbaum, ki se primarno hranita na drugih rastlinah. občasno pa so ju našli tudi na vinski trti (Conti *et al.*, 1997). Z nadaljnjimi poskusi so dokazali, da rumenice prek naravnih vektorjev krožijo v vseh smereh, od okoliškega rastlinja na vinsko trto in nasprotno.

Vprašanje je, koliko obolelih trsov je prišlo v vinograd že z okuženimi cepljenkami, koliko pa je naknadnih okužb prek žuželk prenašalk. V Italiji je bilo ugotovljeno, da je prenos bolezni prek cepilnega materiala redek (do 1 % okužb), inkubacijski čas v katerem se na trsih pojavijo znamenja bolezni pa je največ 18 mesecev (Osler *et al.*, 1997). Po tem času lahko z gotovostjo trdimo, da se okužba ni razširila prek trsnih cepljenk, temveč prek naravnih prenašalcev. S postavitvijo loncev s testnimi rastlinami v izoliran rastlinjak in v vinograd so ugotovili, da se rastline v rastlinjaku niso okužile. Pač pa je bilo v eni rastni dobi okuženih 68

% testnih trsov, ki so jih v loncih postavili v vinograd, med z rumenicami okužene trse. S tem seveda ne želimo zmanjševati pomena vzgoje zdravih trsnih cepljenk, predvsem na tistih območjih, ki z rumenicami še niso okužena. Poudariti želimo le, da lahko neprimerno večji delež okužb pripišemo naravnim prenašalcem, kot pa okuženemu sadilnemu materialu.

4 SKLEP

Problemi s katerimi se srečujemo pri bolezni rumenic vinske trte so večplastni. Njihovo reševanje zahteva združitev moči in znanja strokovnjakov (vinogradnih tehnologov, fitopatologov in biologov), ki morajo pojav bolezni opredeliti z etiološkega, epidemiološkega in tehnološkega vidika; državne uprave (MKGP), da uveljavi ustrezno regulativo, ki bo vinogradnike v skupnem interesu zavezovala k izvajanju predpisanih ukrepov; ter vinogradnikov, ki so za rešitev tega problema neposredno zainteresirani. Na podlagi dosedanjih ugotovitev raziskav, so strokovnjaki že izdelali priporočila, s katerimi je mogoče zajeziti nastajajočo škodo. V primeru zlate trsne rumenice je to predvsem sajenje zdravih trsnih cepljenk in izvajanje ustreznega programa škropljenja proti škržatu *S. titanus*. V primeru trsnih rumenic in naravnih prenašalcev, katerih primarni gostitelj ni vinska trta, pa priporočajo:

- da se v vinogradih in neposredni okolici ne dopušča razraščanje plevelov;
- da se izrojene vinograde dosledno izkrči in očisti ostankov starega trsja;
- da se izogibamo vsake kombinacije vinske trte z zelnatimi poljščinami v vinogradu ali njegovi bližini;
- da se iz vinogradov sproti odstranjujejo trsi z vidnimi znamenji rumenic;
- ter, da se po opravljeni rezi rožje odstrani iz vinograda in sežge.

Z nekaterimi omenjenimi ukrepi bi ponekod seveda drastično posegli v tehnologijo pridelave grozdja, ekologijo tal in okolja na sploh ter postavili pod vprašaj marsikatero zahtevo integriranega gojenja vinske trte (predvsem načini zastiranja tal, ekološke niše za divje živali ob nasadih, pojavnost predatorskih žuželk, itn.). Sami se bomo morali odločiti, ali in v kolikšni meri bomo omenjene ukrepe izvajali, oziroma ali ne bo cena njihovega izvajanja višja od škode, ki jih v vinogradih povzročajo trsne rumenice.

5 LITERATURA

- Bertaccini, A. / Vibio, M. / Stephani, E. (1995): Detection and molecular characterisation of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy).- *Phytopathologia mediterranea*, 34, 137-141.
- Boudon-Padieu, E. / Daire, X. / Clair, D. / Batle, A. / Reinert, W. / Maixner, M. (1997): Differentiation of grapevine phytoplasmas in the elm yellows and the stolbur group with the use of RFLP of non-ribosomal DNA.- Extended abstracts of the 12th Meeting ICVG, Lisbon 1997, 55-56.
- Conti, M. / Minucci, C. / Territo, V. / Boccardo, G. (1997): Epidemiology of grapevine die-back disease in Liguria, Northern Italy.- Extended abstracts of the 12th Meeting ICVG, Lisbon 1997, 61-62.
- Daire, X. / Clair, D. / Larrue, J. / Boudon-Padieu, E. / Caudwell, A. (1993): Diversity among mycoplasma-like organisms inducing grapevine yellows in France.- *Vitis*, 32, 159-163.
- 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.- *Eur. J. Plant Pathol.*, 103, 260-268.
- Kuszała, C. (1996): Influence du milieu d'extraction sur la détection du Bois noir et de la

- Flavescence dorée de la vigne, par des anticorps poly et monoclonaux dirigés contre les phytoplasmes du stolbur et de la Flavescence dorée.- *Agronomie*, 16, 155-165.
- Maixner, M. (1994): Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalestes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae).- *Vitis*, 33, 103-104.
- Maixner, M. / Ahrens, U. / Seemueller, E. (1995): Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific procedure.- *Eur. J. Plant Pathol.*, 101, 241-250.
- Maixner, M. / Daire, X. / Boudon-Padieu, E. / Lavina, A. / Batlle, A. / Reinert, W. (1997): Phytoplasmas.- Sanitary selection of the grapevine, INRA editions, Paris 1997, 183-195.
- Osler, R. / Vindimian, M. E. / Carraro, L. / Frausin, C. / Refatti E. (1997): On the transmission of grapevine yellows diseases by bench-grafting.- Extended abstracts of the 12th Meeting ICVG, Lisbon 1997, 63-64.
- Padovan, A. / Gibb, K. S. / Daire, X. / Boudon-Padieu, E. (1996): Identification and characterisation of the phytoplasma associated to the Australian Grapevine Yellows. - *Vitis*, 35, 189-194.
- Reinert, W. / Maixner, M. (1997): Epidemiological studies on a new grapevine yellows in Germany.- Extended abstracts of the 12th Meeting ICVG, Lisbon 1997, 55-56.
- Seljak, G. (1987): *Scaphoideus titanus* Ball. (s. *S. littoralis* Ball.) novi štetnik vinove loze u Jugoslaviji.- *Zaštita bilja*, 38, 349-357.
- Sforza, R. / Clair, D. / Daire, X. / Larrue, J. / Boudon-Padieu, E. (1997): Studies of Bois noir epidemiology in France: search and biology of a vector species.- Extended abstracts of the 12th Meeting ICVG, Lisbon 1997, 107-108.