

## POTRDITEV TRSNE RUMENICE VRSTE 'ČRNI LES' (*GRAPEVINE BOIS NOIR PHYTOPLASMA*) NA PRIMORSKEM

Gabrijel Seljak<sup>1</sup>, Ruggero Osler<sup>2</sup>

### IZVLEČEK

Rumenice vinske trte fitoplazmatskega izvora se v Sloveniji pojavljajo od leta 1983, ko je bil nek tip najprej najden v Goriških Brdih in v Spodnji Vipavski dolini. Hkrati je bil odkrit tudi ameriški škržat (*Scaphoideus titanus* Ball), prenašalec zlate trsne rumenice v ožjem pomenu (FD). Trsne rumenice in ameriški škržat so zdaj v primorskem vinorodnem rajonu splošno razširjene. Pri sorti 'Chardonnay' je okuženih od 1,2 do 34 % trsov, pri drugih pomembnih sortah okužba ne presega 1 % trsov.

Doslej še ni bilo natančneje ugotovljeno, katera od trsnih rumenic je v Sloveniji razširjena. Analiza vzorcev trsov z vidnimi simptomi trsnih rumenic v l. 1995 v vinogradih v Vipavski dolini z "normalnim" in "nested" PCR postopkom je pokazala, da je v Vipavski dolini razširjena trсна rumenica vrste črni les (*Grapevine bois noir phytoplasma*). Ugotovitve pa ne dopuščajo sklepanja, da je povsod v primorskem vinorodnem rajonu razširjena ta bolezen. Ker ni bila ugotovljena FD, je pomen močne populacije ameriškega škržata na tem območju zmanjšan. Zaradi bližine žarišč FD v Venetu (Italija) so potrebni poostreni fitosanitarni ukrepi in sistematično testiranje trsov na celotnem območju.

Ključne besede: vinska trta, črni les, zlata trsna rumenica, fitoplazma, Zahodna Slovenija

### ABSTRACT

#### THE CONFIRMATION OF GRAPE YELLOW TYPE 'BOIS NOIR' (*GRAPEVINE BOIS NOIR PHYTOPLASMA*) IN PRIMORSKA, THE SLOVENIAN MARITIME REGION

The confirmation of grape yellow type 'bois noir' (*Grapevine bois noir phytoplasma*) in Primorska, the Slovenian maritime region. Grapevine yellows are noticed in Slovenia since 1983. In this year we found this disease in Goriška Brda and in Vipava valley. At the same time we ascertained the presence of *Scaphoideus titanus* Ball, the vector of the Flavescence doree s. s. (FD). Both, grapevine yellows and *S. titanus* are now widespread in Primorska (West-Slovenia) wine region. At variety "Chardonnay" 1,2 to 34 % of vines are infected, at other important varieties the infection rate is lower than 1 %.

Until now, we don't know precisely which type of grapevine yellow is widespread in Slovenia. Through analysis of samples of grapes with visible symptoms of grapevine yellows carried in September 1995 in Vipava valley with "normal" and "nested" PCR proceeding it was demonstrated the presence of bois noir (*Grapevine bois noir phytoplasma*). Nevertheless these results don't permit the generalisation of distribution of this disease in whole Primorska wine region. Not having detected the presence of FD at present the importance of large population of *S. titanus* in this area is also reduced. The presence of FD in neighbouring region Veneto (Italy) require appropriate phytosanitary precautions and systematic testing of vine in entire region.

Keywords: Grapevine, bois noir, flavescence doree, phytoplasma, West-Slovenia.

1 Kmetijsko veterinarski zavod, Nova Gorica

2 Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante, Università di Udine, Italija

## 1 UVOD

Pojav trsne rumenice fitoplazmatskega porekla smo v Sloveniji prvič opazili leta 1983 v Kozani v Goriških Brdih in na Gradišču nad Prvačino (Seljak, 1991) in sicer najprej na sorti "chardonnay". Na podlagi bolezenskega sindroma in podatkov v strokovnem slovstvu v sosednji Italiji, smo jo takrat opredelili kot zlato trsno rumenico (*Flavescence dorée*). Bolezen se je k nam skoraj zanesljivo razširila iz Italije. Na kakšen način, pa ni mogoče ugotoviti. Možno je, da je bila zanesena z okuženim sadilnim materialom, ker se je v začetku osemdesetih let promet s trsnimi cepljenkami iz Italije zelo povečal. Prav tako verjeten pa je tudi sukcesivni prehod prek državne meje. V prid tej domnevi govori čas naprave vinograda, v katerem smo bolezen najprej odkrili. Trte so bile posajene že leta 1969, ko te bolezni tudi v sosednji Furlaniji-Juljski krajni še ni bilo.

Po letu 1983 se je število vinogradov s to boleznijo stalno povečevalo. Sedaj je že razširjena v vseh okoliših primorskega vinorodnega rajona. Najbolj je prizadeta sorta "Chardonnay". Zelo malo je vinogradov te sorte starejših od treh let, v katerih ne bi bilo trsov z značilnim bolezenskim sindromom trsne rumenice. Delež okuženih trsov te sorte je zelo različen, od 1,2 do 34,3 % s tem, da se delež trsov s simptomi v istem vinogradu iz leta v leto lahko zelo spreminja (Fornazarič, 1996, Koruza, 1996). V tesni korelaciji s stopnjo okuženosti vinogradov je tudi gospodarska škoda, ki jo bolezen povzroča, saj grozdje takšnih trsov oveni in se nato posuši ali pa vsaj ne dozori.

Pri vinski trti je doslej ugotovljenih več vrst rumenic fitoplazmatskega porekla (Pearson *et al.*, 1986; Caudwell, 1995), a sta v Evropi za zdaj razširjeni in pomembni dve, to sta zlata trsna rumenica v ožjem pomenu (*Grapevine flavescence dorée phytoplasma*, v nadaljevanju **FD**) in črni les (*Grapevine bois noir phytoplasma*, v nadaljevanju **BN**). Na ravni bolezenskega sindroma ju je nemogoče ločevati (Osler *et al.*, 1996), saj so simptomi pri obeh boleznih skoraj enaki in tudi ne povsem specifični. Podobne bolezenske spremembe (zvijanje listnih robov, rdečenje oziroma rumenenje listov) lahko sprožijo tudi nekateri drugi dejavniki, kot npr. poškodbe, ki jih na poganjku povzroči bivolček [*Stictocephala bisonia* (Kopp. & Yonke)] ali abiotični dejavniki, ki prekinejo neovirano funkcioniranje floema (nalomljen poganjek, prevez z žico ali drugim neprožnim vinogradniškim vezivom).

Novejše raziskave kažejo, da se oba tipa rumenic ne razlikujeta samo serološko in epidemiološko, temveč tudi taksonomsko. FD s. s. genetsko spada v skupino brestove rumenice (*Elm Yellow*) (Daire, 1993), medtem ko spada BN v genetsko skupino rumenice aster (*Aster Yellow*), oziroma v podskupino "Stolbur" (Caudwell, 1993).

Pri širjenju obeh vrst rumenic imajo poleg človeka najpomembnejšo vlogo živalski prenašalci. Enotno je stališče, da so to predsem ali kar izključno žuželke iz podreda Auchenorrhyncha - škržati. Za FD je nesporno ugotovljeno, da jo prenaša ameriški škržat (*Scaphoideus titanus* Ball) (Schwester *et al.*, 1961, 1963; Fortusini, *et al.*, 1989), medtem ko rumenice BN s to vrsto še ni uspelo prenesti (Osler *et al.*, 1993). V

Nemčiji so ugotovili, da bolezen "Vergilbungskrankheit", ki je identična z BN, prenaša vrsta *Hyalesthes obsoletus* Sign. (Maixner, 1993).

Hkrati s trsno rumenico je bil v Goriških Brdih odkrit tudi ameriški škržat (Seljak, 1985, 1987). Ta se je doslej razširil po vseh okoliških primorskega vinorodnega rajona. Pomena njegove razmeroma močne populacije pa zaradi nejasnosti glede vrste trsne rumenice v tem prostoru doslej ni bilo mogoče pravilno vrednotiti. Med njegovo populacijo in pojavom rumenic vinske trte doslej na Primorskem nismo opazili vzročne povezave. V Slovenski Istri npr., kjer je njegova populacija na splošno najbolj številčna, je delež trsov s simptomi trsnih rumenic najmanjši (Fornazarič, 1996). Tudi sistematično zatiranje ampelofagnih škržatov v opazovanem vinogradu v Mandriji pri Dornberku v letih 1990 do 1993, ni bistveno vplivalo na dinamiko razvoja in širjenja boleznin v primerjavi z netretiranimi, pač pa je sledila običajni epidemiološki sliki.

Tudi zaradi teh nejasnosti je bilo že vse od prvega pojava boleznin pri nas aktualno vprašanje njenega diagnosticiranja. Čeprav že od začetka ni bilo dvomov o tem, da gre za rumenico vinske trte fitoplazmatskega porekla enake narave kot v Italiji, pa ni bilo nikoli možnosti za zanesljivo potrditev oziroma določitev vrste in vzroka boleznin. To je bil med drugim tudi eden od razlogov, da se je notranja karantena izvajala zgolj na ravni strokovnih pobud in ukrepov posameznikov, čeprav bolezen spada na listo karantenskih boleznin (A2). V primorskem vinorodnem rajonu smo zaradi nje že kmalu po pojavu izločili iz selekcije vse matične vinograde sorte "Chardonnay". Vinograd sorte "Sangiovese" na Purissimi pri Ankaranu je bil v letu 1992 predčasno izkrcen zaradi negospodarnosti nadaljnega vzdrževanja (približno 40 % okuženih trsov), ne pa zaradi karantene.

Skromno število analiz (3) je bilo doslej narejenih na materialu s podravskega vinorodnega rajona, ki so potrdile, da so povzročitelji fitoplazme, glede vrste pa je postavljena le domneva, da gre za črni les (Koruza, 1996). Zato je bila zelo dobrodošla ponujena pomoč Univerze v Vidmu (Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante, Università di Udine), ki je skupaj z vzorci iz severovzhodne Italije poslala v analizo v Francijo tudi 9 vzorcev iz Vipavske doline.

## 2 MATERIAL IN METODA DELA

V septembru 1995 smo nabrali poganjke vinske trte z očitnimi in značilnimi simptomi trsne rumenice v vinogradu v Gradišču pri Vipavi in v Ampelografskem vrtu v Kromberku. Pregled vzorcev je prikazan v preglednici 1. Vzorci poganjkov so bili na mestu odvzema označeni, shranjeni v hladilne torbe in odpeljani v Dijon v Francijo, kjer so napravili test na fitoplazme, natančneje na fitoplazmo, ki povzroča zlato trsno rumenico (FD) in fitoplazmo, ki povzroča črni les (BN).

Pri določanju fitoplazem je bil uporabljen postopek verižne reakcije s polimerazo (Polymeric chain reaction - PCR, Mullis and Faloona, 1987). Pri tem so bili uporabljeni začetni oligonukleotidi (primers) za selektivno pomnožitev gena za ribosomalno RNA (16 S + 16 S-23S IGS). DNA fitoplazme je bila pridobljena iz okuženih listov in potem pomnožena z uporabo parov prej omenjenih začetnih oligonukleotidov (25 ciklov). Produkti pozitivnih pomnožitev so bili po tem očiščeni z restrikcijskim encimom Tru 91. Tako pridobljeni fragmenti DNA so bili ločeni z elektroforezo na poliacilamidnem gelu. Pripadnost mikroorganizmov (FD ali BN) je bila ugotovljena na podlagi primerjave dimenzij fragmentov, ki so bili pridobljeni z encimatsko pretvorbo ("normalni" PCR test).

Ker je bil "normalni" PCR test pri vzorcih iz Slovenije negativen (glej preglednico 1), je bil z istim materialom napravljen še test z notranjimi začetnimi oligonukleotidi ("nested" PCR). Pri vzorcih je bila najprej izvršena pomnožitev s parom začetnih oligonukleotidov P1/P7; na enem delu pomnoženega materiala je bila izvršena še druga PCR reakcija (40 ciklov), pri čemer so bili uporabljeni začetni nukleotidi f5U /rU3 (Ahrens *et al.*, 1994); pridobljeni produkt je bil uporabljen za analizo z restrikcijskimi encimi.

### 3 REZULTATI

Rezultati genetskih analiz so prikazani v preglednici 1. Pri vseh devetih vzorcih iz Slovenije je bila reakcija na "normalni" PCR test negativna.

Z "nested" PCR analizo so pri treh vzorcih ugotovili fitoplazmo, ki povzroča BN (po ena trta sorte "Chardonnay" in "Malvazija" z Gradišča pri Vipavi in ena trta sorte "Chardonnay" z Ampelografskega vrta v Kromberku). Pri treh vzorcih je pomnožitev uspela, a v zelo skromni količini (dve trti sorte "Chardonnay" z Gradišča pri Vipavi in ena trta "Malvazije" z Ampelografskega vrta v Kromberku). Pri nobenem vzorcu ni bila ugotovljena FD s. s.

Preglednica 1: Dobljeni rezultati testiranja trsov z očitnimi simptomi trsnih rumenic po "normalnem" in "nested" PCR postopku

Vzorec Sample	Sorta Variety	Kraj Location	Rezultati - Results (*)	
			PCR	nested PCR
1	Chardonnay	Vipava	-	±
2	Chardonnay	Vipava	-	+
3	Chardonnay	Vipava	-	±
4	Malvazija	Vipava	-	+
5	Modri pinot	Kromberk	-	-
6	Chardonnay	Kromberk	-	+
7	Rebula	Kromberk	-	-
8	Pika	Kromberk	-	-
9	Malvazija	Kromberk	-	±
10	Prosecco (negativna kontrola)	Veneto (I)	-	-
11	Chardonnay (kontrola, okužen trs)	Veneto (I)	+	+
12	Paradižnik s simptomi stolbura (pozitivna kontrola)	Veneto	+	ni naprav. not tested

(\*) - negativna reakcija (negative reaction); + pozitivna reakcija (positive reaction); ± slab izplen pri pomnožitvi (scarcely amplifications rate)

### 4 RAZPRAVA

Negativna reakcija vzorcev pri "normalni" PCR analizi pravzaprav ne preseneča. Znano je namreč, da so fitoplazme v vinski trti razporejene zelo neenakomerno in v nizki koncentraciji. Ferrao - Dipartimento di Biologia Applicata Alla Difesa Delle Piante Università di Udine (osebna komunikacija) je s PCR analizo vzorcev trt iz Furlanije-Juljske krajne, ki jim je dodal kontrolno DNA, prav pred kratkim ugotovil, da so v trti pogosto zastopane tudi snovi, ki lahko inhibirajo aktivnost polimeraze.

Zato niso izključeni tudi "lažni" negativni rezultati. Isti raziskovalec je v letu 1996 analiziral 106 trsov iz Furlanije-Juljske krajine in Veneta. Pri "normalnem" PCR testu je pozitivno reagiralo le 17 vzorcev, z uporabo "nested PCR" pa jih je naknadno pozitivno reagiralo še 33.

V tem okviru si kaže razlagati tudi rezultate pričujočih analiz na vzorcih iz Vipavske doline, ki so jih napravili v Franciji. Rezultati pa vendarle bolj jasno kažejo, da je na Primorskem, tako kot v sosednji Furlaniji-Juljski krajini za zdaj ugotovljena le rumenica vinske trte vrste BN. Število analiziranih vzorcev (9) pa je še vedno veliko premajhno, da bi lahko z gotovostjo trdili, da je na Primorskem razširjena samo ta vrsta rumenice.

Ta ugotovitev za zdaj tudi zmanjšuje pomen ameriškega škržata v primorskih vinogradih, oziroma razlaga njegovo vzročno nepovezanost s pojavom rumenic pri nas. Zatiranje te, sicer čisto ampelofagne vrste, je v povezavi z BN nesmiselno, neposredne škode pa za zdaj tako ne povzroča. Močna in po vseh vinogradih razširjena populacija pa vendarle pomeni potencialno nevarnost, če bi se k nam razširila zlata trsna rumenica v ožjem pomenu besede. Žarišča v Venetu (Sancassani *et al.*, 1997) so razmeroma zelo blizu, skrbi pa tudi živahen uvoz trsnih cepljenk iz Italije, zlasti Furlanije-Juljske krajine.

Epifitocije FD so na splošno hujše kot pri BN (Osler *et al.*, 1996), zato bo redno testiranje večjega števila vzorcev na celotnem območju in ugotavljanje morebitnega pojava te bolezni za primorsko vinogradništvo pomembna naloga, zlasti pri zelo občutljivih sortah kot je 'Chardonnay' in pri domačih sortah. Glede na to, da je pri nas za zdaj najverjetneje razširjena le vrsta BN, tudi ne vemo, kako je z občutljivostjo domačih sort na FD. Za BN vemo, da so sorte 'Rebula', 'Pinela', 'Malvazija', 'Sauvignon', 'Refošk', 'Barbera', 'Cabernet sauvignon' srednje do malo občutljive, in da pri njih, vsaj do zdaj, ni bilo hujših gospodarskih posledic. Delež okuženih trsov v vinogradih omenjenih sort redko presega 1 % trsov (ocena stanja pri obveznem zdravstvenem nadzoru matičnih vinogradov na Primorskem). Za odporne veljajo sorte 'Tokaj', 'Laški rizling', 'Merlot' (?).

Za zdaj ne poznamo posebno učinkovitih načinov zatiranja te bolezni. Ker je razporejenost fitoplazme v trsu običajno zelo neenakomerna, je lahko včasih razmeroma učinkovito "obglavljanje" trsov na višini 50-100 cm. Iz debla večinoma odžene poganjek brez simptomov rumenic (Girolami et Egger, 1993; Pavan *et al.*, 1997). Potrebna je temeljita zdravstvena selekcija in redni zdravstveni nadzor matičnih vinogradov in trsnic. Na območjih, kjer se bolezen pojavlja v epifitotični obliki, tudi ni priporočljivo saditi občutljivih sort.

Da preprečimo, ali čim dlje preprečujemo morebitni vnos FD bolezni k nam, bo potrebno:

- redno letno testiranje trt na širšem območju in hitro ukrepanje v primeru pojava prvih žarišč;
- sistematično zatiranje ameriškega škržata na območjih, kjer bi bila bolezen ugotovljena;
- kolikor je mogoče omejiti uvoz sadilnega materiala iz območij, kjer je razširjena FD.

## 5 SKLEPI

Genetske analize trt iz Vipavske doline potrjujejo okuženost z rumenico vrste BN. Na podlagi teh analiz ter spremljanja širjenja in pojavljanja trsnih rumenic na Primorskem je zelo verjetno, da je tudi drugod v primorskem vinorodnem rajonu razširjena trsna rumenica te vrste. Ta je z epifitotičnega stališča manj nevarna kot FD.

V teh razmerah je razmeroma močna populacija ameriškega škržata v primorskem vinorodnem rajonu malo pomembna, pomeni pa veliko potencialno nevarnost, če se k nam razširi rumenica vrste FD.

Zaradi te nevarnosti je treba povečati obseg in pogostnost testiranja trt v vseh vinorodnih rajonih Slovenije, kjer so na podlagi simptomov ugotovljene trsne rumenice.

## 6 LITERATURA

- Ahrens U., E. Seemuller (1992): Detection of DNA of Plant Pathogenic Mycoplasma-like Organisms by a Polymeric Chain Reaction that Amplifies of the 16S rRNA Gene.- *Phytopathology*, 82, 828-832.
- Ahrens U., E. Seemuller (1994): Detection of mycoplasma-like organisms in declining oaks by polymerase chain reaction.- *Eur. J. For. Path.* 24, 55-63.
- Fornazarič J. (1996): Zdravstvena selekcija vinske trte cv. "Chardonnay" (*Vitis vinifera* cv. "Chardonnay") na zlato trsno rumenico v primorskem vinorodnem rajonu.- Diplomski naloga, BF, Agronomski oddelek, Ljubljana, 56 str.
- Fortusini A., M. Saracchi, G. Belli (1989): Trasmisione sperimentale della flavescenza dorata della vite mediante *Scaphoideus titanus* Ball in Italia.- *Vignevini* 9, 43-46.
- Girolami V., E. Egger (1993): La flavescenza dorata e altri giallumi della vite: Prevenzione e cura.- *Convegno Eurovite*, Gorizia 3. decembra 1993, 49-54.
- Koruzza B. (1996): Rezultati preučevanja razširjenosti rumenic vinske trte v Sloveniji.- *Sodobno kmetijstvo*, 29 (10), 403-406.
- Maixner M., Ahrens U. (1993): Studies on grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) in Germany - Detection of MLOs in grapevines and search for possible vectors.- 11<sup>th</sup> Meeting ICVG, Montreux 6-9. september 1993, 101-102.
- Mullis K. B., F. A. Faloona (1987): Specific synthesis of dna *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction.- *Methods Enzymol.*, 155, 335-350.
- Osler R., A. Arzone, R. Credi, B. Di Terlizzi, P. Del SERRONE (1993): La flavescenza dorata e altri giallumi della vite: Trasmisione sperimentale dell'agente della malattia.- *Convegno Eurovite*, Gorizia 3. decembra 1993, 31-37.
- Osler R., L. Carraro, N. Loi, A. Gregoris, F. Pavan, G. Firrao, R. Musetti, P. Ermacora, A. Loschi, I. Pertot, E. Refatti (1996): Le più importanti malattie da fitoplasmi nel Friuli-Venezia Giulia (Atlante).- *Notiz. ERSA (suppl.)*, IX (4), 80 str.
- Pavan F., L. Carraro, G. Vettorello, E. Pavanetto, V. Girolami, R. Osler (1997): Flavescenza dorata nei vigneti delle colline trevigiane.- *L'Informatore agrario* LIII (10), 73-78.
- Planas R. (1987): Expérience de lutte contre la flavescence dorée dans le vignoble audois.- *Atti del convegno sulla flav. dorata*, Vicenza, Verona, 237-247.

- Sancassani P., G. Posenato, N. Mori (1997): La flavescenza dorata nel Veneto.- L'Informatore agrario LIII (10), 65-71.
- Schvester D., P. Carle, G. Moutous (1961): Sur la transmission de la Flavescence dorée des vignes par un Cicadelle.- C. r. hebd. Séans. Acad. Agric. Fr. 47, 1021-1024.
- Schvester D., P. Carle, G. Moutous (1963): Transmission de la flavescence dorée des vignes par *Scaphoideus littoralis* Ball (*Homoptera, Jassidae*).- Ann. Epiphyt., 14 (3), 175-198.
- Seljak G. (1985): Cikada *Scaphoideus titanus* Ball (= *S. littoralis* Ball) u primorskem vinogradarskom rajonu zapadne Slovenije.- Glasnik zaštite bilja VIII (2), 33-37.
- Seljak G. (1987): *Scaphoideus titanus* Ball (= *S. littoralis* Ball), novi štetnik vinove loze u Jugoslaviji.- Zaštita bilja 38 (4), št. 182, 349-357.
- Seljak G. (1991): Je nova bolezen vinske trte na primorskem zlata trsna rumenica ? SAD, II (4), 16-19.