

Jelena PLAVEC<sup>1</sup>, Ivana KRIZANAC<sup>1</sup>, Željko BUDINŠČAK<sup>1</sup>, Dijana ŠKORIC<sup>2</sup>, Martina ŠERUGA MUSIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zavod za zaštitu bilja, Zagreb

<sup>2</sup>Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek,

Zavod za mikrobiologiju, Zagreb

jelena.plavec@hcphs.hr

## RASPROSTRANJENOST I EPIDEMIOLOGIJA ZLATNE ŽUTICE VINOVE LOZE (*Flavescence dorée*) U HRVATSKOJ

### SAŽETAK

Žutice vinove loze nanose velike štete jer smanjuju prinos i kvalitetu grožđa te naposljetku dovode do potpunog propadanja vinove loze. Uzročnik zlatne žutice vinove loze, fitopatogena bakterija *Flavescence dorée* fitoplazma (FD), u Europi se ubraja u karantenske patogene, a rasprostranjuje se cikadom *Scaphoideus titanus* Ball. U posljednjih desetak godina sustavno se prati prisutnost i proširenost fitoplazmoza vinove loze programom posebnog nadzora, a 2009. prvi je put utvrđena prisutnost fitoplazme FD na nekoliko lokacija. Od tada do 2012. porastao je broj pozitivnih nalaza i broj lokaliteta na kojima je utvrđena fitoplazma FD. S ciljem da se utvrdi izvor i način njezina rasprostranjenja za studiju epidemiologije odabrana su dva lokaliteta: Brckovština (Križevci) i Jagnjić Dol (Samobor). Fitoplazma FD potvrđena je u 8 od 10 prikupljenih uzoraka vinove loze te u 12 od 21 uzoraka vektora *S. titanus*. Molekularnim analizama utvrđeno je da su na tim lokacijama prisutne različite skupine fitoplazme FD: skupina FD-1 u Brckovštini te skupina FD-3 u Jagnjić Dolu.

**Ključne riječi:** žutice vinove loze, *Flavescence dorée* fitoplazma, multigenetska analiza, epidemiologija

### UVOD

Žutice vinove loze (*grapevine yellows*, GY) gospodarski su važne bolesti uzrokovane bakterijama trivijalnog imena fitoplazme, koje mogu pripadati različitim ribosomskim skupinama, odnosno različitim vrstama. Taj naziv obuhvaća niz etiološki različitih no simptomatološki sličnih bolesti. Fitoplazme se još uvijek ne mogu kultivirati na umjetnim hranjivim podlogama te se pri njihovoj detekciji i identifikaciji koriste metode molekularne biologije. Na temelju analize fitoplazmatske DNA mogu se razlikovati skupine i podskupine fitoplazmi vinove loze, koje u ovom slučaju predstavljaju i različite vrste (Angelini i sur., 2001). Najvažniji uzročnici žutice vinove loze u Europi su fitoplazme „zlatne žutice“ (*flavescence dorée*, FD, ribosomska skupina 16SrV) i „crnog drveta“ (*bois noir*, BN; stolbur; ribosomska skupina 16SrXII-A). U Hrvatskoj je na vinovoj lozi osim FD i BN potvrđena i fitoplazma *aster yellows* (AY) (ribosomska skupina 16SrI-B) (Šeruga Musić i sur., 2009).

Simptomi fitoplazmoza na vinovoj lozi pojavljuju se već početkom ljeta, a najizraženiji su u rujnu i listopadu. Prepoznatljivi simptom savijanje je lisne plojke prema dolje, čime list poprima karakterističan trokutasti oblik te žuti (u bijelih sorti) (slika 1.) odnosno crveni (u crnih sorti), osobito uz lisne žile. Također izostaje pravilno odrvenjavanje stabljike te internodiji ostaju skraćeni. Simptomi se očituju i u propadanju cvatova te sušenju čitavih grozdova, čime je uvelike smanjen prinos u vinogradima (Lee i sur., 2000).

Epidemijsko rasprostranjivanje fitoplazme FD u vinogradu uzrokuje, za sada jedini poznati prirodni vektor, američki cvrčak (*S. titanus* Ball.) (slika 2.) koji je hranjenjem prenosi sa zaraženog na zdravi trs.



Slika 1. Simptomi žutice vinove loze na vinovoj lozi (snimila J. Plavec)



Slika 2. Američki cvrčak (*Scaphoideus titanus* Ball.) (snimio Ž. Budinščak)

Temeljem analize fitoplazmatskog gena *map* mogu se razlikovati tri skupine fitoplazme FD: FD-1, FD-2 i FD-3 (Arnaud i sur., 2007). Skupine se razlikuju po geografskoj rasprostranjenosti pa skupinu FD-1 nalazimo u Francuskoj i Italiji, FD-2 u Francuskoj, Italiji i Španjolskoj, a FD-3 u Italiji, Sloveniji i Srbiji. Skupina FD-3 ima i alternativnu domaćinsku biljku – korov *Clematis vitalba* L. (pavitina). Američki cvrčak, koji je svojim životnim ciklusom potpuno vezan za lozu (Constable, 2010), može prenositi svaku od tih skupina. Nalaz ove fitoplazme u pavitini sugerira da postoji još jedan dodatni kukac-vektor, koji se tek povremeno hrani vinovom lozom. Dosadašnja europska istraživanja upućuju na to da bi potencijalni vektor mogla biti cikada *Dictyophara europaea* L., no njezinu ulogu u epidemiologiji fitoplazme FD treba još istražiti (Filippin i sur., 2009).

Cilj ove studije bio je primjenom multigenске analize istražiti gensku varijabilnost izolata fitoplazme FD utvrđene na dvije lokacije da bi se stekao

bolji uvid u kompleksnu epidemiologiju te bolesti i da bi se tako utvrdio način rasprostranjenja te fitoplazmatske vrste u Hrvatskoj.

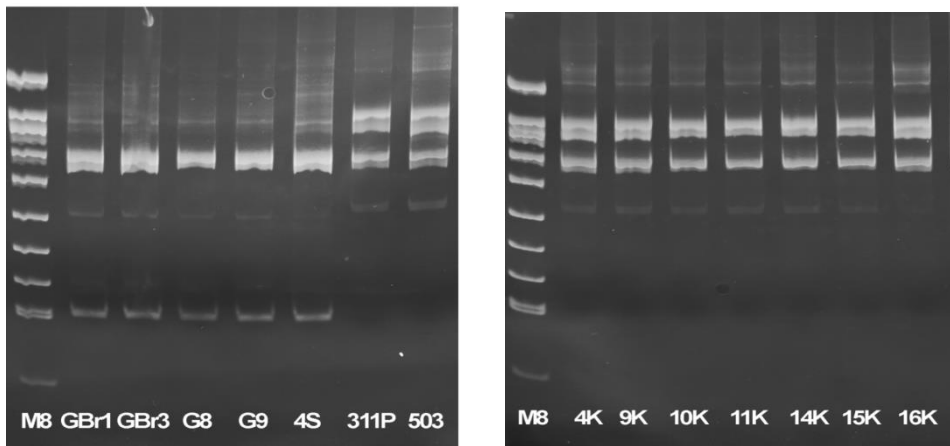
## MATERIJALI I METODE

Uzorci vinove loze s tipičnim simptomima žutice (10), uzorci vektora (*S. titanus*) (21) te korovne biljke *Convolvulus arvensis* L. (slak) (12) prikupljeni su tijekom 2011. godine. Iz prikupljenih uzoraka izolirane su ukupne nukleinske kiseline te su uzorci dalje analizirani metodom *triplex real-time* PCR da bi se istovremeno utvrdila moguća zaraza fitoplazmama FD i BN (Pelletier i sur., 2009). Uzorci u kojima je utvrđeno prisustvo fitoplazme FD podvrgnuti su daljnjoj analizi.

Obilježja izolata fitoplazme FD iz vinove loze i kukaca, primijenjena je metoda multigenske analize. Analizirani su geni *map*, *uvrB-degV* i *vmpA*. Navedene genske regije umnožene su korištenjem specifičnih početnica (direktni i ugniježđeni PCR), a veličina umnoženih fragmenata određena je elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze. Amplikoni gena *map* nadalje su analizirani metodom polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) uporabom restrikcijskih enzima *AluI* i *Eco72I*, a umnoženi fragmenti svih gena poslani su na sekvenciranje te nakon obrade dobivenih sekvenci podvrgnuti filogenetskim analizama.

## REZULTATI

Fitoplazma FD potvrđena je u uzorcima vinove loze (8) te prvi put u vektoru *S. titanus* (12) na obje lokacije. U Brckovštini je također potvrđena i prisutnost fitoplazme BN u jednom uzorku slaka. Restrikcijske analize gena *map* otkrile su da izolati kukaca i vinove loze iz Jagnjić Dola pripadaju skupini FD-3 a da izolati iz Brckovštine pripadaju skupini FD-1 (slika 3.). Te su rezultate potvrdile i filogenetske analize gena *uvrB-degV* koje su pokazale da sekvence izolata uzoraka iz Jagnjić Dola tvore odvojenu filogenetsku skupinu od izolata iz Brckovštine. Analiza amplikona gena *vmpA* pokazala je također da postoji velika varijabilnost analiziranih izolata.



Slika 3. Rezultati RFLP analize gena *map* fitoplazme FD nakon digestije s A) *AluI* i B) *Eco72I*. M8-standard za određivanje molekularne mase (Fermentas, Litva); uzorci vektora - 4K, 9K, 10K, 11K, 14K, 15K, 16K, 503 (Jagnjić Dol) i 4S (Brekovština); uzorci vinove loze - GBr1, GBr3, G8, G9 (Brekovština) i 311P (Jagnjić Dol).

## DISKUSIJA

Programom posebnog nadzora „Fitoplazme vinove loze i vektori“ od 2002. sustavno se prati prisutnost i proširenost fitoplazmoza u Hrvatskoj. Fitoplazma BN široko je rasprostranjena a prisutnost uzročnika zlatne žutice vinove loze, fitoplazme FD prvi je put utvrđena 2009. godine na nekoliko lokacija (Šeruga Musić i sur., 2011). Unatoč poduzetim fitosanitarnim mjerama, broj pozitivnih nalaza fitoplazme FD povećava se te je prijeko potrebno istražiti izvor i način njezina rasprostranjenja (tablica 1.). Rezultati analiza pokazali su da izolati fitoplazmi s lokacije Brekovština pripadaju skupini FD-1 a da izolati iz Jagnjić Dola pripadaju skupini FD-3, odnosno na te dvije geografski odvojene lokacije utvrđena je prisutnost dviju različitih skupina fitoplazme FD. Identifikacija tih dvaju različitih i neovisnih patosistema upućuje na moguće različito podrijetlo zaraze.

Podudarnost rezultata filogenetskih analiza i rezultata RFLP analiza kojima je utvrđena prisutnost dvije skupine fitoplazme FD – FD-1 i FD-2, upućuje također na osjetljivost i vrijednost primjene metode multigeneske analize u diferencijaciji skupina fitoplazme FD. Uzevši u obzir nalaze fitoplazme FD u zemljama regije, u Srbiji i Sloveniji, te veliku populaciju američkog cvrčka u svim vinorodnim područjima Hrvatske, postoji opasnost da se ta bolest počne brže širiti. Stoga je u siječnju ove godine donesena Naredba o poduzimanju mjera za sprječavanje širenja i suzbijanje zlatne žutice vinove loze koju prouzrokuju štetni organizam *Grapevine flavescence dorée* (NN 07/13).

**Tablica 1.** Pregled pozitivnih nalaza FD 2009. – 2012. godine unutar programa posebnog nadzora „Fitoplazme vinove loze i vektori“.

Godina	Broj županija	Broj lokacija	Broj vizualnih pregleda	Uzorci vinove loze	uzorci vektora	FD+ lab. analiza v. loza	FD+ lab. analiza vektori
2009.	5	13	19+44	35	35	1FD	-
2010.	15	27	29+106	54	29	6 FD	-
2011.	14	25	50	54	5	9 FD	3FD
2012.	11	26	50	50	10	11 FD	2FD
<b>Ukupno</b>	<b>45</b>	<b>91</b>	<b>148+150</b>	<b>193</b>	<b>79</b>	<b>27FD</b>	<b>5FD</b>

## ZAKLJUČAK

Multigenetska analiza pokazala je da na svakoj od lokacija sekvence izolata fitoplazmi FD iz vinove loze i kukaca tvore odvojenu filogenetsku skupinu, odnosno da izolati fitoplazmi FD s lokacije Brekovština pripadaju skupini FD-1 a da izolati iz Jagnjić Dola pripadaju skupini FD-3. Budući da se uz svaku od tih skupina veže određena geografska rasprostranjenost, rezultati ovog istraživanja upućuju na odvojen unos fitoplazme FD u zemlju. Interesantan je također nalaz fitoplazme BN u slaku, koji upućuje na koegzistenciju dvaju fitoplazmatskih patosistema – BN i FD na istoj lokaciji.

Da bi se dodatno istražila molekularna varijabilnost te procijenio patogeni potencijal fitoplazme FD u Hrvatskoj, potrebno je provesti daljnje analize i na drugim lokacijama gdje je utvrđena prisutnost tog uzročnika.

Dobiveni rezultati upućuju na varijabilnost fitoplazme FD u Hrvatskoj i omogućuju bolje razumijevanje njihove epidemiologije. To je novi korak prema nalaženju rješenja za sprječavanje širenja te potencijalno epidemijske bolesti te prema pronalaženju mogućnosti njene kontrole.

## SUMMARY

### DISTRIBUTION AND EPIDEMIOLOGY OF FLAVESCENCE DORÉE PHYTOPLASMA IN CROATIA

Grapevine yellows (GY) diseases cause severe economic damage by reducing yields and quality of grape and ultimately lead to overall decline of plants. One of most important GY agents, *Flavescence dorée* (FD) phytoplasma, is a quarantine organism in the Europe due to its *Cicadellidae* vector *Scaphoideus titanus* Ball. which disseminates FD in epidemiological manner. GY diseases have been continuously monitored during the last ten years throughout the official annual survey programme and for the first time in the 2009. the

presence of FD phytoplasma was confirmed at several locations. From the first finding the number of FD infected samples as well as the number of affected locations has increased. With the aim to elucidate FD phytoplasma epidemiology in Croatia and establish source and ways of dissemination, two locations - Brckovština (Križevci) and Jagnjić Dol (Samobor), representing FD phytoplasma foci have been chosen. FD phytoplasma presence was confirmed in 8 out of 10 grapevines and in 12 out of 21 *S. titanus* samples. Molecular analyses clearly showed a presence of distinct isolate at each of the two locations; the isolate FD-1 at Brckovština and FD-3 at Jagnjić Dol.

**Key words:** grapevine yellows, *Flavescence dorée* phytoplasma, molecular analysis, epidemiology

## LITERATURA

**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 relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis* 40(2):79-86.

**Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marccone, C., Boudon-Padieu, E., Foissac, X.** (2007). Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct Flavescence Dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4001-4010.

**Constable, F.E.** (2010). Phytoplasma Epidemiology: Grapevine as a Model. p.188–212. In *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*, Weintraub, P.G & Jones, P. (ed). Wallingford: CABI.

**Filippin, L., Jović, J., Cvrković, T., Forte, V., Clair, D., Toševski, I., Boudon-Padieu, E., Borgo, M., Angelini, E.** (2009). Molecular characteristics of phytoplasmas associated with Flavescence dorée in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology* 58:826–837.

**Lee, I.M., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E.** (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54:221–255.

**Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X., Malembic-Maher, S.** (2009). Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis* 48(2):87–95.

**Šeruga Musić, M., Škorić, D., Budinščak, Ž., Križanac, I., Mikec, I.** (2009). Survey of phytoplasma diversity in heavily grapevine yellows-affected areas of Croatia. *Le Progrès Agricole et Viticole Hors Série* 206-207.

**Šeruga Musić, M., Škorić, D., Haluška, I., Križanac, I., Plavec, J., Mikec, I.** (2011). First report of Flavescence dorée-related phytoplasma affecting grapevines in Croatia. *Plant Disease* 95(3):353.