

**Agrovoc descriptors:** phytoplasmas, laboratory diagnosis, disease control, disease surveys, data collection

**Agris category code:** H20

COBISS koda 1.01

## **Laboratorijsko testiranje trsnih rumenic v Sloveniji kaže na splošno prisotnost rumenice tipa počrnelosti lesa**

Nataša PETROVIČ<sup>1</sup>, Jana BOBEN<sup>2</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>3</sup>

Delo je prispelo 30. maja 2004; sprejeto 10. oktobra 2004.

Received: May 30, 2004; accepted October 10, 2004.

### **IZVLEČEK**

Trsne rumenice povzročajo fitoplazme različnih tipov, od katerih sta najpomembnejša zlata trsna rumenica (Flavescence doree, FD) in rumenica tipa počrnelosti lesa (Bois noir, BN). Za nadzor nad trsnimi rumenicami je nujno poznavanje tipa fitoplazme, ki daje osnovne smernice za strategijo zatiranja. Tip fitoplazme je mogoče določiti le z laboratorijskim testiranjem. V testiranje so bili zajeti trsi z bolj ali manj izraženimi bolezenskimi znamenji trsnih rumenic. V večini na fitoplazme pozitivnih trsah smo uspeli določiti tudi tip fitoplazme. Rezultati laboratorijskih testiranj v letih 2002 in 2003 kažejo na splošno prisotnost fitoplazme BN v vseh vinorodnih deželah v Sloveniji.

**Ključne besede:** trsne rumenice, fitoplazme, pregled stanja, Slovenija

### **ABSTRACT**

#### **LABORATORY TESTING OF GRAPEVINE YELLOWS IN SLOVENIA INDICATES A WIDESPREAD PRESENCE OF BOIS NOIR**

Grapevine yellows are dangerous diseases caused by different types of phytoplasma. The two most important types are Flavescence doree (FD) and Bois noir (BN). Infected grapevine express exactly same type of symptoms regardless of the type of the phytoplasma. In order to control the grapevine yellows it is essential to know the phytoplasma type, which provides basic information for choosing proper and efficient control measures. Only the laboratory testing methods provide tools for the determination of the phytoplasma type. The testing included the vines expressing more or less typical disease symptoms. In majority of vines which tested positively, we were able to determine the phytoplasma type. The results showed the widespread presence of the BN phytoplasma in all wine growing regions of Slovenia.

**Keywords:** grapevine yellows, phytoplasma, survey, Slovenia

<sup>1</sup> Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija, dr., univ. dipl. biol., e- pošta: natasa.petrovic@nib.si

<sup>2</sup> Isti naslov kot <sup>1</sup>, univ. dipl. mikrobiol.

<sup>3</sup> Isti naslov kot <sup>1</sup>, prof. dr., univ. dipl. biol.

## 1 UVOD

Trsne rumenice je skupno ime za več fitoplazmatskih boleznih vinske trte, ki so si simptomatsko zelo podobne in jih po bolezenskih znamenjih ni mogoče razlikovati. Povzročajo jih fitoplazme (*Phytoplasma*, *Mollicutes*, *Bacteria*), bakterije brez celične stene, ki živijo izključno v celicah sitastega prevodnega sistema okuženih rastlin in jih razvrščamo v taksonomske skupine glede na njihovo zaporedje v 16S ribosomalni DNA (Lee in sod., 1998). Fitoplazem ni mogoče gojiti na umetnih gojiščih. Kljub temu, da se po bolezenskih znamenjih na vinski trti med seboj ne razlikujejo, pa imajo povsem različno biologijo. Vsaka fitoplazma ima zase značilnega žuželčjega prenašalca, v katerem se razmnožuje. V Evropi so na vinski trti ugotovljene fitoplazme, ki pripadajo trem genetskim skupinam. V prvo skupino fitoplazem brestovih rumenic (Elm yellows, EY, skupina 16SrV), spada fitoplazma, ki povzroča zlato trsno rumenico (Flavescence dorée, FD). V obliki izolata FD92 (oziroma FD-D) je razširjena v Franciji, severni Italiji in severni Španiji, v obliki izolata FD-C pa v Italiji (Martini in sod., 2002) in Srbiji (Duduk in sod., 2003). Njen prenašalec je ameriški škržatek (*Scaphoideus titanus* Ball), ki se hrani izključno na vinski trti *Vitis* sp. FD je edina fitoplazma trsnih rumenic, ki je uvrščena na IIAII listo karantenskih škodljivih organizmov Evropske skupnosti. V isto skupino kot FD spada tudi rumenica tipa Palatinate (Palatinate grapevine yellows, PGY), ki je razširjena v nemški pokrajini z istim imenom. Rumeno tipa PGY prenaša škržatek *Oncopsis alni* (Maixner s sod., 2000), ki se hrani predvsem na jelši (*Alnus glutinosa* L.). V stolbur skupino fitoplazem (STOL, skupina 16SrXII-A) spada fitoplazma povzročiteljica rumenice tipa počrnelosti lesa (Bois noir, BN, Vergilbungskrankheit, Legno nero), ki je razširjena že v številnih evropskih državah, med drugim tudi pri nas v Sloveniji (Seljak in Osler, 1997; Petrovič in sod., 2000 in 2003a). Fitoplazma BN se prenaša s sklenokrilim škržatkom *Hyalesthes obsoletus* Sign (Sforza in sod., 1998), katerega glavne gostiteljske rastline so njivski slak (*Convolvulus arvensis* L.), kopriva (*Urtica dioica* L.) ter rastline iz rodov *Ranunculus*, *Solanum* in *Lavandula* (Sforza in sod., 1998). Tretjo skupino predstavljajo fitoplazme rumenic aster (Aster yellows, AY, oziroma skupina 16SrI-A). Rumeno tipa AY je bila ugotovljena na vinski trti v Italiji, na Hrvaškem (Škorić in sod., 1998, Refatti in sod., 1999) in v Sloveniji, kjer so jo potrdili le na enem trsu na Goriškem (Šarič in sod., 1997). Sindrom trsnih rumenic je v slovenskem strokovnem slovstvu zadovoljivo opisan (Maček, 1986, Seljak, 1991). Izraženost in oblika bolezenskih znamenj je v veliki meri odvisna od občutljivosti sorte, deloma tudi od fiziološkega stanja rastlin in vremenskih razmer.

Bolezni tipa trsnih rumenic smo v Sloveniji prvič opazili leta 1983 v vasi Kozana v Goriških Brdih (Maček, 1986, Seljak, 1991). Bolezen se je najverjetneje k nam razširila iz Furlanije Julijske krajine ali pa smo jo zanesli z okuženimi cepljenkami s tega območja, saj je bil uvoz sadilnega materiala iz Italije od konca sedemdesetih let naprej zelo sproščen. Sočasno je bila v zahodni Sloveniji ugotovljena tudi navzočnost in že kar precej splošna razširjenost ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus* Ball) (Seljak, 1985, 1987 in 1993).

Po prvem odkritju so se trsne rumenice postopno razširile skoraj po vsej vinorodni deželi Primorske. Delež trsov z bolezenskimi znamenji trsnih rumenic je na Primorskem zelo različen: pri najbolj občutljivi sorti 'Chardonnay' od 2,5 do 37,5 % (Škerlavaj in sod., 1997), pri sorti 'Sangiovese' celo do 40 % (opažanja v Ankaranu

leta 1992), pri sorti 'Rebula' pa do 1% trsov (Seljak in Petrovič, 2001). Bolezenska znamenja trsnih rumenic smo doslej našli še pri naslednjih sortah: 'Malvazija', 'Sauvignon', 'Pinela', 'Beli pinot', 'Sivi pinot', 'Modri pinot', 'Barbera', 'Refošk', 'Kabernet Sauvignon', 'Pika', 'Merlot'. Pri teh sortah se bolezen pojavlja bolj sporadično in vsaj za zdaj brez omembe vrednih gospodarskih posledic. Trenutno je stanje okuženosti vinogradov na Primorskem razmeroma stabilno, čeprav se delež trsov z bolezenskimi znamenji rumenic lahko iz leta v leto nekoliko spreminja. Napredovanje je opaziti le v nekaterih novih vinogradih občutljivih sort in na območjih, kjer trsnih rumenic doslej še ni bilo. Pri občutljivih sortah je škoda lahko zelo velika, saj je izpad pridelka premo sorazmeren z deležem okuženih trsov (Seljak in Petrovič, 2001).

V vzhodni Sloveniji so se trsne rumenice pojavile konec osemdesetih let, ponovno predvsem na sorti 'Chardonnay' ter na lokalni sorti 'Modra frankinja', deloma pa tudi na sortah 'Limberger' (Koruza, 1996), 'Kerner', 'Renski rizling' in 'Sauvignon'. V letu 2003 smo pokazali prisotnost trsnih rumenic še na sortah 'Šipon' in 'Zweigelt'. Delež trsov z bolezenskimi znamenji rumenic je bil v okuženih vinogradih podoben kot v primorskih vinogradih, vendar pa so v začetku bila okužena območja manjša. Izvora bolezni na teh območjih ni mogoče zanesljivo ugotoviti. V letih 2001 in 2002 so se v nekaterih vinogradih sorte 'Chardonnay' v podravski vinorodni deželi trsne rumenice pojavile v epifitotičnih razsežnostih. V posameznih vinogradih v Halozah (Turški vrh) je bilo v l. 2002 okuženih do 80 % (od 30 do 80 %) trsov sorte 'Chardonnay', v Ljutomersko-ormoškem vinorodnem okolišu pa celo do 90 % (od 10 do 90 %) trsov (Seljak in Matis, 2002). Dosedanje laboratorijske analize trsov z izraženimi bolezenskimi znamenji so pokazale, da je na tem območju, kakor tudi drugod v Sloveniji najbolj razširjena trsna rumenica počrnlosti lesa (Petrovič in sod., 2003a).

Prve laboratorijske analize fitoplazem trsnih rumenic so bile izvedene v drugi polovici devetdesetih (Seljak in Osler, 1997, Šarić in sod., 1997, Refatti in sod., 1999) in so na zelo skromnem številu vzorcev vinske trte iz Zahodne Slovenije pokazale, da sta v tem delu Slovenije prisotni rumenici tipov BN in AY. Prve malo obsežnejše analize so bile izvedene med leti 1999 in 2001 ob uvajanju laboratorijskih metod za analizo fitoplazem trsnih rumenic na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani. Pokazale so na prisotnost rumenice tipa BN v vseh delih Slovenije (Petrovič in sod., 2001). Za stvarnejšo oceno stanja je Fitosanitarna uprava pri MKGP organizirala v letih 2002 in 2003 posebni nadzor nad trsnimi rumenicami, v katerega je bilo zajetih približno po 100 trsov z bolj ali manj značilnimi bolezenskimi znamenji iz vseh vinorodnih okolišev v Sloveniji. Analize smo izvajali na Nacionalnem inštitutu za biologijo po standardnih delovnih protokolih uvedenih za množično testiranje vinske trte na prisotnost fitoplazem trsnih rumenic.

## 2 METODE DELA

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo smo v letih 2002 in 2003 v okviru posebnega nadzora nad trsnimi rumenicami, ki ga vrši uradna služba za varstvo rastlin, prvič izvedli obširnejše laboratorijsko testiranje trsnih rumenic v Sloveniji.

Vzorčenje trsov je potekalo v vinogradih po vseh vinorodnih deželah v Sloveniji v mesecih od julija do oktobra 2002 in 2003 in je zajemalo vse pomembne sorte vinske trte. V letu 2003 smo analizirali tudi vzorec njivskega slaka.

Iz 1,5 g homogeniziranega tkiva listnih žil vsakega vzorca smo izolirali celokupno DNA. Fitoplazme smo pred izolacijo DNA dodatno koncentrirali iz homogenata z diferencialnim centrifugiranjem (Ahrens in Seemüller, 1992). Na izolirani DNA smo izvedli verižno reakcijo s polimerazo (PCR), kjer smo uporabili univerzalne oligonukleotidne začetnike P1 in P7, ki potrjujejo prisotnost fitoplazem vseh obstoječih tipov (Daire in sod., 1997). Izolirano DNA smo hkrati analizirali z začetniki, ki specifično določajo fitoplazme skupine brestovih rumenic FD9R1/FD9F1 (ta analiza zajame fitoplazmi tipov FD in PGY) ter z začetniki, ki specifično določajo fitoplazme skupine Stolbur STOL11R1/STOL11F2 (ta analiza zajame fitoplazmo tipa BN) (Daire in sod., 1997). PCR produkte smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (1% agaroz, 100 V, etidijev bromid  $2 \times 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ , 30 min) in jih opazovali pri UV osvetlitvi. Velikost fragmentov po PCR reakcijah smo določili s pomočjo označevalca velikosti (100 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas). Negativne vzorce smo nato dodatno analizirali z nested PCR: P1/P7 produkt iz prve PCR reakcije smo redčili 1:100 in v drugi reakciji uporabili par univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov U3/U5 za ojačanje signala (Daire in sod., 1997). Identiteto fitoplazem v pozitivnih vzorcih po izvedeni nested PCR reakciji smo ugotovili z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) po obdelavi U3/U5 PCR produktov z encimom *Tru9* (Boehringer Mannheim) (Daire in sod., 1997). Restrikcijske fragmente smo ločili s poliakrilno gelsko elektroforezo (10% poliakrilamidni gel, 100 V, 3 ure.) in jih pobarvane z etidijevim bromidom ( $2 \times 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ ) opazovali pri UV osvetlitvi.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultati testiranja v letih 2002 in 2003 so prikazani v tabeli 1. V okviru testiranja 2002 je bila večina vzorcev nabranih konec julija in le malo število kasneje v rastni sezoni, avgusta in oktobra. Od skupno 79 nabranih vzorcev vinske trte jih je bilo 73 (93%) pozitivnih in 6 (7%) negativnih na prisotnost fitoplazem. V 59 vzorcih, oziroma v 75% vseh trsov, smo nedvomno potrdili tip fitoplazme BN in izključili prisotnost tipa FD. Raziskovalni izziv predstavlja 14 vzorcev, oziroma 18% vseh vzorcev, kjer smo zasledili le prisotnost fitoplazem, nismo pa mogli ugotoviti njihove identitete. Slednji skupaj z negativnimi vzorci predstavljajo 25% trsov, kjer prisotnosti znanih fitoplazem nismo mogli potrditi kljub temu, da so vsi trsi kazali bolj ali manj izražena bolezenska znamenja.

V okviru testiranja 2003 je vzorčenje potekalo konec julija, manjši del pa avgusta in septembra. V primerjavi z letom 2002 je bil večji delež trsov vzorčen v jesenskem obdobju. Od skupno 117 analiziranih trsov vinske trte jih je bilo 94 (80%) pozitivnih in 23 (20%) negativnih na prisotnost fitoplazem. V 81 vzorcih (69% vseh trsov) smo nedvomno potrdili tip fitoplazme BN in izključili prisotnost tipa FD. Ponovno se je pojavilo določeno število trsov (13 oziroma 11%), kjer smo zasledili prisotnost fitoplazem, nismo pa mogli ugotoviti njihove identitete. V letu 2003 se je povečal delež negativnih vzorcev na celih 20%, kar je za 13% več kot v prejšnjem letu. Delež trsov, kjer znanih fitoplazem nismo mogli potrditi (negativni trsi in trsi z nedoločljivim tipom fitoplazem) je v letu 2003 močno narasel (s 25% na 31%) v primerjavi s prejšnjim letom.

Tabela 1: Rezultati testiranja vzorcev vinske trte na prisotnost fitoplazem trsnih rumenic v letih 2002 in 2003.

Table 1: Results of grapevine yellows testing in 2002 and 2003.

	Skupno št. vzorcev	BN pozitivni (%)	Negativni (%)	Nedoločljiv tip (%)
2002	79	59 (75%)	6 (7%)	14 (18%)
2003	117	81 (69%)	23 (20%)	13 (11%)

Analize v okviru posebnega nadzora nad trsnimi rumenicami so pokazale splošno prisotnost in razširjenost fitoplazme tipa BN v vseh vinorodnih deželah v Sloveniji. Hkrati je bila ugotovljena močna prisotnost sklenokrilega škržatka *Hyalosthys obsoletus* Signoret, prenašalca BN. Inventarizacija škržatkov v treh izbranih vinogradih v podravski vinorodni deželi je razkrila močno zastopanost te vektorske vrste v letu 2003 (Seljak in sod., 2003). Podatek o tem je zaskrbljujoč predvsem zaradi hkratne močne navzočnosti rumenice tipa BN v podravski vinorodni deželi in njenega bliskovitega širjenja (Petrovič in sod., 2003b). V treh vinogradih, kjer so bile izvedene favnistične analize, so v podrasti obilno zastopane tudi najpomembnejše gostiteljske rastline te vrste škržatka – njivski slak in velika kopriva. Opaziti je pozitivno korelacijo med navzočnostjo teh gostiteljskih rastlin in populacijo sklenokrilega škržatka (Seljak in sod., 2003). Laboratorijske analize so pokazale prisotnost fitoplazme tipa BN v populaciji sklenokrilih škržatkov in v analiziranih plevelih iz okuženih podravske vinograde (Petrovič in sod., 2003b). Seljak in sodelavci (2003) poročajo tudi o navzočnosti drugih vrst žuželk, ki bi bile lahko prenašalci fitoplazme tipa BN med zelnatimi rastlinami, s čimer se povečuje infekcijski potencial v vinogradu in njegovi okolici. Favnistični pregledi prizadetih vinogradov v Podravju pa še ne dajejo končnega odgovora na vprašanje o morebitni vzročni povezanosti med populacijo sklenokrilega škržatka in epifitotičnim pojavom trsnih rumenic na tem območju (Seljak in sod., 2003).

Zanimiv rezultat predstavlja delež trsov, ki so se kljub bolj ali manj izraženim bolezenskim znamenjem trsnih rumenic izkazali za negativne na prisotnost fitoplazem (7% v letu 2002 in 20% v letu 2003) ali pa smo v njih fitoplazme določili, nismo pa mogli določiti njihove taksonomske pripadnosti določenemu tipu (18% v letu 2002 in 11% v letu 2003). Prisotnost nedoločljivega tipa fitoplazem smo ugotovili na različnih sortah in na različnih lokacijah v Sloveniji (podatki niso posebej prikazani). Večina negativnih trsov in trsov z nedoločljivim tipom fitoplazem je bila vzorčena v avgustu, septembru in oktobru. Večji odstotek negativnih vzorcev v letu 2003 v primerjavi z letom 2002 je morda posledica večjega števila vzorčenj v jesenskem obdobju (vzorčenih 44 trsov, oziroma 37%) v primerjavi z letom 2002 (vzorčeni 4 trsi, oziroma 5 %). Rezultati kažejo, da je velika večina analiziranih trsov okužena s fitoplazmo tipa BN (75% v letu 2002 in 69% v letu 2003). Naše prejšnje raziskave na trsah, okuženih s fitoplazmo BN iz dveh vinorodnih dežel v Sloveniji (več lokacij v Podravju v letu 2000 in na Primorskem v letih 1998-2001) so pokazale, da fitoplazmo tipa BN v slovenskih razmerah bolj zanesljivo dokažemo v trsah z izraženimi bolezenskimi znamenji v obdobju od konca maja do začetka avgusta, medtem ko je kasneje v ravnem obdobju ne moremo več dokazati (Petrovič in Seljak, 2002). Podobne izkušnje s fitoplazmo BN imajo tudi sodelavci iz univerze Udine v Italiji (Giuseppe Firrao, osebna komunikacija). Vzroka za neuspešno analizo fitoplazme BN v trsah, vzorčenih v jesenskem obdobju sta lahko nizek titer fitoplazem v vzorcih in prisotnost inhibitornih snovi (polifenoli), ki otežujejo ekstrakcijo fitoplazemske DNA in zavirajo PCR reakcijo. To domnevo potrjujejo podatki, da fitoplazme v teh vzorcih zaznamo izključno šele po uporabi nested PCR, ki ojača signal šibkega produkta (nizkega titra fitoplazem) iz prve PCR reakcije, hkrati pa v nested PCR uporabljamo močno razredčen vzorec, kjer je zmanjšan tudi vpliv močno razredčenih inhibitorjev.

Kljub temu, da so bili negativni trsi in trsi z nedoločljivim tipom fitoplazme nabrani na istih lokacijah in izmed istih sort vinske trte ter kazali bolj ali manj očitna

bolezenska znamenja trsnih rumenic kot trsi, ki so se po opravljeni analizi izkazali za BN pozitivne, pa ne moremo izključiti možnosti, da gre pri njih za okužbo s fitoplazmami drugega tipa kot BN .

Dosedanje analize z molekularnimi tehnikami niso potrdile prisotnosti zlate trsne rumenice, FD v Sloveniji. Zaradi splošne razširjenosti in pogostnosti vektorja, ameriškega škržatka, *Scaphoideus titanus* Ball v primorskih vinogradih (Seljak, 1985, 1987 in 1993, Berčon in sod., 1997) ter bližine žarišč te bolezni v Venetu in Furlaniji v Italiji (Reffati in sod., 1999, Carraro in sod., 2000), je nevarnost, da se FD razširi tudi v zahodno Slovenijo velika. FD je po dosedanjih raziskavah veliko bolj nagnjena k epifitotičnemu pojavljanju kot ostale vrste trsnih rumenic in povzroča posledično tudi veliko večjo škodo. V letu 2003 je bil tudi v Podravju prvič najden ameriški škržatek (Gabrijel Seljak, osebna komunikacija). Francoske izkušnje kažejo, da je fitoplazmo tipa FD najlažje dokazati v avgustu in septembru (Boudon-Padieu in Clair, 2003, osebna komunikacija), kadar so hkrati najbolj izražena tudi bolezenska znamenja trsnih rumenic. Na te izkušnje je navezano tudi njihovo vzorčenje in testiranje vinske trte za analizo trsnih rumenic.

Glede na rezultate laboratorijskih testiranj v okviru posebnega nadzora v letih 2002 in 2003 se je v vseh vinorodnih deželah v Sloveniji pojavljal določen odstotek z rumenicami prizadetih trsov, v katerih smo fitoplazme določili, nismo pa mogli potrditi njihovega tipa z obstoječimi metodami za določanje. Ni izključeno, da gre v teh primerih za neko novo obliko znanih tipov fitoplazem, ali pa za fitoplazme, ki se na trti običajno ne pojavljajo, vendar pa so se zaradi uporabljene specifične agronomske prakse in splošne situacije na njej vseeno naselile. Iz Izraela in ZDA poročajo o nenavadnem pojavu fitoplazme iz skupine Western X (16SrIII) na vinski trti (Boudon-Padieu, 2003). Za fitoplazme skupine rumenic aster, AY (16SrI) je do nedavnega veljalo, da se na trti razen redkih izjem ne pojavljajo. Nove metode laboratorijskega določanja in izpopolnjeno znanje o taksonomiji in biologiji fitoplazem omogočajo vedno natančnejše in tudi obširnejše analize fitoplazem. Fitoplazme skupine AY so na vinski trti zasledili v Italiji in v Izraelu, ponekod tudi v obliki dvojnih okužb z drugimi fitoplazmami, hkrati pa pri njih niso opazili epidemičnega širjenja (Boudon-Padieu, 2003). V Sloveniji so rumenico tipa AY zasledili v enem trsu v vinogradu na Goriškem (Šarić in sod., 1997), določena pa je bila tudi v s fitoplazmo BN okuženih trsah po njihovem prenosu v tkivno kulturo. Ta najdba v nadaljevanju ni bila potrjena, nakazuje pa možnost, da so fitoplazme prisotne v mešanih okužbah (Petrovič in sod., 2000 in 2001). Pregled prisotnosti fitoplazem v Čilu je pokazal veliko pestrost, pri čemer je bila fitoplazma AY skupine (16SrI – podskupina C) najbolj zastopana (Gajardo in sod., 2003). Skupina fitoplazem AY je najbolj številčna (Lee in sod., 1998, Seemuller in sod., 1998) in po svetu najbolj razširjena ter s številnimi naravnimi prenašalci (Boudon-Padieu, 2003). Študij potencialnih prenašalcev fitoplazme AY je pokazal, da jo v kontroliranih pogojih na vinsko trto prenašajo kar štiri vrste žuželk (Alma in sod., 2001), med temi vrstami žuželk je tudi ameriški škržatek, ki je zelo pogosta vrsta tudi pri nas. Poudariti je potrebno, da v naravi še niso potrdili okuženosti ameriškega škržatka s fitoplazmo AY, kar je nujno za njen uspešen naravni prenos na trto (Boudon-Padieu, 2003). Zaradi tega obstaja velika verjetnost, da se fitoplazme te skupine prenesejo na trto, ni pa nujno, da povzročijo pomembno škodo v obliki patoloških in epidemioloških pojavov (Boudon-Padieu, 2003). Po drugi strani pa je za fitoplazme te skupine, kakor tudi za druge fitoplazme možno, da se pod določenimi pogoji ti

pojavi spremenijo. Zaradi tega je pomembno tudi te skupine fitoplazem vključevati v preglede stanja in jih skrbno slediti z laboratorijskimi analizami poleg nevarnih tipov fitoplazem FD in BN. V primeru okužb, kjer tipa fitoplazme v trsih v Sloveniji nismo mogli določiti je zelo pomembno, da v prihodnje ugotovimo, za katere fitoplazme gre in kakšen je njihov epidemiološki pomen.

Pregled stanja, ki se bo nadaljeval tudi v prihodnjih letih, je nujna podlaga za načrtovanje pravih ukrepov za zatiranje, ki so vezani na posamezno fitoplazmo. Ukrepi za preprečevanje oziroma omejevanje širjenja trsnih rumenic temeljijo trenutno predvsem na poostreni vizualni zdravstveni selekciji izhodiščnega materiala (matičnih vinogradov in matičnjakov) ter sistematični zdravstveni kontroli matičnih vinogradov dvakrat v rastni dobi. Kazalo bi preučiti možnosti za uvajanje alternativnih načinov preprečevanja širjenja boleznih trsne rumenice tipa BN, ki se že preizkušajo v nekaterih drugih državah, predvsem v Nemčiji (Maixner, osebna komunikacija, Maixner in sod., 2002). V nekaterih državah so se odločili tudi za obvezno toplotno tretiranje sadilnega materiala (Boudon-Padieu in Grenan, 2002). Pri tem je vredno tudi omeniti najnovejše podatke o različnih fitoplazme tipa BN, ki so vezani na obstoj v različnih zelnatih gostiteljih in so lahko zelo pomembni pri oblikovanju metode za zatiranje te fitoplazme (Langer in sod., 2003).

#### 4 ZAHVALA

Zahvaljujemo se mag. Gabrijelu Seljaku iz KGZ Nova Gorica za vsestransko pomoč in diskusije ter vsem preglednikom iz strokovnih inštitucij in fitosanitarnim inšpektorjem, ki so v letih 2002 in 2003 izvajali vzorčenje rastlin vinske trte. Zahvaljujemo se tudi Fitosanitarni upravi Republike Slovenije za koordinacijo in financiranje celotne akcije posebnega nadzora nad trsnimi rumenicami v letih 2002-2003.

#### 5 VIRI

- 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.
- Alma, A., Palermo, S., Boccardo, G., Conti, M. 2001. Transmission of *Chrysanthemum yellows*, a subgroup 16SrI – B phytoplasma, to grapevine by four leafhopper species. *J. Plant Pathol.* 83 (3): 181-187.
- Berčon M., Seljak, G., Milevoj, L. 1997. Razširjenost škrtatov (Hom., Auchenorrhyncha) v izbranih vinogradih. Zbornik. 3. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 1997: 85-89.
- Boudon-Padieu, E. 2003. The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. 14th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the grapevine, Extended abstracts, September 12-17, 2003, Locorotondo, Bari, Italija, 47-53.
- Boudon-Padieu, E., Grenan, S. 2002. Hot water treatment. In *Methods*, ICVG Home page: <http://www.icvg.ch>.
- Carraro, L., Osler, R., Reffati, E. 2000. Storia dei giallumi della vite nei Friuli-Venezia Giulia (History of grapevine yellows in Friuli-Venezia Giulia). V: *Flavescenza dorata e*

- legno nero della vite in Friuli-Venezia Giulia. Atti del Convegno, Gorizia 5 Novembre 1999. Udine, Italija, 23-27.
- Daire, X., Clair, D., 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 Phytopathology* 103 (1997), 507-514.
- Duduk, B., Ivanović, M., Dukić, N., Botti, S., Bertaccini, A. 2003. First report of an Elm yellows subgroup 16SrV-C phytoplasma infecting grapevine in Serbia. *Plant Disease* 87: 559.
- Gajardo, A., Botti, S., Monteallegre, J., Fiore, N., Bertaccini, A. 2003. Survey on phytoplasmas identified in Chilean grapevines. 14th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the grapevine, Extended abstracts, September 12-17, 2003, Locorotondo, Bari, Italija, 85 – 86.
- Koruza, B. 1996. Rezultati preučevanja razširjenosti trsnih rumenic v Sloveniji. *Sodobno kmetijstvo*, 29 (10), 403-406.
- Langer, M., Darimont, H., Maixner, M. 2003. Characterization of isolates of Vergilbungskrankheit phytoplasma by RFLP analysis and their association with grapevine, herbaceous hosts and vectors. 14th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the grapevine, Extended abstracts, September 12-17, 2003, Locorotondo, Bari, Italija, 66 – 67.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of Phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153-1169.
- Maček, J. 1986. Posebna fitopatologija: Patologija sadnega drevja in vinske trte. Univerza v Ljubljani, 276.
- Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casati, P., Bianco, P.A., Bertaccini, A. 2002. Genetic variability among Flavescence doree phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Mol. Cell. Probes* 16: 197-208.
- Maixner, M., Reinert, W., Darimont, H. 2000. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis* 39 (2):83-84.
- Maixner, M., Luers, J., Darimont, H. 2002. Prognose der Fugaktivitat von *Hyalesthes obsoletus* und Einfluss Klimatorisches Faktoren auf die Phanologie des reben. In: 53. Deutsche Pflanzenschutztagung in Bonn, 16-19 September 2002. Mitteilungen aus des Biologisches Bundesanstalt 390: 228-229.
- Petrovič, N., Jeraj, N., Ravnikar, M. 2000. The use of tissue culture for improved detection of phytoplasma in grapevines. V: 13th Meeting of the International Council for the Study Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), march 12-18, 2000, University of Adelaide, Australia : extended abstracts. Adelaide: University of Adelaide, 2000, str. 119-120.
- Petrovič, N., Jeraj, N., Ravnikar, M. 2001. Uporaba tkivnih kultur za izboljšanje detekcije fitoplazem v vinski trti = The use of tissue for improved detection of phytoplasma in grapevines. V: DOBROVOLJC, Danica (ur.), UREK, Gregor (ur.). *Zbornik predavanj in referatov 5. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin v Čatežu ob Savi od 6. do 8. marca 2001*. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2001, str. 489 – 491.
- Petrovič, N., Seljak, G. 2002. Laboratorijsko določanje rumenic na vinski trti = Laboratory methods for the detection of grapevine yellow disease. V: Puconja, Mateja (ur.). *Vinogradi in vina za tretje tisočletje? : [vinogradništvo, vinarstvo, ekonomika in*



trženje : zbornik referatov]. Ljubljana: Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Ljutomer: Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Celje: Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije, 2002, str. 199-202.

- Petrovič, N.; Boben, J.; Ravnikar, M. 2003a. Prvo obsežnejše laboratorijsko testiranje trsnih rumenic v Sloveniji kaže na splošno zastopanost rumenica tipa počrnelosti lesa. Izvlečki referatov 6. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Zreče 2003; 70-71.
- Petrovič, N., Seljak, G., Matis, G., Miklavc, J., Beber, K., Boben, J., Ravnikar, M. 2003b. The presence of grapevine yellows and their potential natural vectors in winegrowing regions in Slovenia, 14th meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the grapevine, Extended abstracts, September 12-17, 2003, Locorotondo, Bari, Italija, 97 – 98.
- Refatti, E., Carraro, L., Osler, R. 1999. I giallumi della vite. Atti del convegno, Gorizia 5 Novembre 1999, 13-21.
- Seemuller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Goschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. J. Plant Pathol. 80 (1): 3-26.
- 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), 182: 349-357.
- Seljak, G. 1991. Je nova bolezen vinske trte na Primorskem zlata trsna rumenica? SAD, II(4), 16-19.
- Seljak, G. 1993. Škodljivi škržati vinske trte; ameriški škržat (*Scaphoideus titanus* Ball.): SAD IV (5), 12-13.
- Seljak, G., Osler, R. 1997. Potrditev trsne rumenice vrste 'Črni les' (*Stolbur*) na Primorskem. Zbornik. 3. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 1997, 71-78.
- Seljak, G., Petrovič, N. 2001. Pregled razširjenosti in stanje raziskanosti fitoplazmatskih bolezni vinske trte in sadnega drevja v Sloveniji. *Sodobno kmetijstvo*, 2001, letn. 34, št. 11-12, str. 465-528.
- Seljak, G.; Matis, G. (2002): Poročilo o opravljenem delu na nalogi identifikacije potencialnih prenašalcev trsnih rumenic na vinski trti v vinogradih podravske vinorodne dežele.
- Seljak, G., Matis, G., Miklavc, J., Beber, K. 2003. Identifikacija potencialnih naravnih prenašalcev trsnih rumenic v podrski vinorodni deželi, Zbornik 6. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Zreče 2003.
- Sforza, R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J., Boudon-Padieu, E. 1998. The Role of *Hyalestes obsoletus* (Homoptera: Cixiidae) in the Occurens of Bois noir of Grapevines in France. Journal of Phytopathology 146, 549-556.
- Šarić, A., Škorić, D., Bertaccini, A., Vibio, M., Murari, E. 1997. Molecular detection of Phytoplasmas infecting grapevines in Slovenia and Croatia. 12<sup>th</sup> ICVG meeting, Lisbon, 1997: 77-78.
- Škorić, D., Šarić, A., Vibio, M., Murari, E., Krajačić, M., Bertaccini, A. 1998. Molecular identification and seasonal monitoring of phytoplasmas infecting Croatian grapevines. Vitis 37 (4): 171-175.
- Škerlavaj, V., Koruza, B., Matis, G., Urek, G. 1997. Razširjenost zlate trsne rumenice (*Flavescence dorée*) v Sloveniji. Zbornik. 3. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 1997: 71-78.