

РАСПРОСТРАНЕТОСТ НА ФИТОПЛАЗМАТА *BOIS NOIR* (СТОЛБУР) ВО ПОГОЛЕМИТЕ ЛОЗАРСКИ РЕГИОНИ ВО МАКЕДОНИЈА

DISPERSION OF THE DISEASE *BOIS NOIR* IN SOME VINEYARDS IN MACEDONIA

С. Митрев¹, Емилија Костадиновска¹, Ф. Пејчиновски², М. Спасеноски³
S. Mitrev¹, Emilija Kostadinovska¹, F. Pejchinovski², M. Spasenoski³

¹ Универзитет "Гоце Делчев" Штип, Земјоделски факултет, Штип, Р. Македонија

² Универзитет Св. "Кирил и Методиј" Скопје, Факултет за земјоделски науки и храна, Скопје, Р. Македонија

³ Природно-математички факултет, Скопје, Институт за биологија, Скопје, Р. Македонија

¹ University "Goce Delchev" Shtip, Faculty of Agriculture, Shtip, R. Macedonia

² University "Ss Cyril and Methodius" Skopje, Faculty of Agricultural Sciences and Food, Skopje, R. Macedonia

³ University "Ss Cyril and Methodius" Skopje, Faculty of Natural Sciences, Institute of Biology, Skopje, R. Macedonia

Извадок

Фитоплазмата *Bois noir* (BN) долго време е присутна на територијата на Република Македонија, но првиот детален извештај за нејзиното присуство датира од 2003 год. (Šeruga et al. 2003). *Bois noir* е предизвикана од фитоплазмата од столбур 16SrXII-A групата. Оваа група на фитоплазми има широк ареал на распространување низ цела Европа, како кај култивираните растенија, така и кај плевелната вегетација. Во светски рамки, до денес, идентификувани се и постојат три типа на фитоплазмата *Bois noir*, тип I, II и III, (Langer & Maixner, 2004).

Во ова истражување акцентот беше ставен на испитување на распространетоста на фитоплазмата *Bois noir* во поголемите лозарски региони во Македонија (Повардарски/Централен вардарски реон), споредбено во сезоните 2006/07.

Употребата на современите молекуларни методи (PCR/RFLP) го докажаа присуството на *Bois noir* фитоплазмата, којашто беше идентификувана дека

припаѓа на тип II, VKII, широкораспространета во сите испитувани локалитети.

Клучни зборови: *Bois noir*, столбур, PCR/RFLP, VKII.

Summary

Bois noir (BN) has been present in Macedonia for a long time, but its first scientific report dated back to 2003 (Šeruga et al. 2003). BN is caused by phytoplasmas from stolbur group (16SrXII-A). This group of phytoplasma infects a wide range of wild and cultivated plants in Europe. Three phytoplasma isolates associated with BN were identified in grapevine in the world: VKI, VKII and VKIII (Langer & Maixner, 2004).

In this study, the spreading of the phytoplasma isolates associated with *Bois noir* (BN) was investigated on grapevine in the biggest vineyards in Macedonia (Central Vardar region), in the season 2006/07. Using of molecular methods show the presence of *Bois noir* phytoplasma, type II, VKII, spreaded in all investigated regions.

Key words: *Bois noir*, stolbur, PCR/RFLP, VKII.

сорта. При одгледувањето на виновата лоза како проблем се јавува присуството на голем број болести, штетници и плевели што директно влијаат на приносот на грозје.

Виновата лоза е домаќин на над од 32 патогени габи, повеќе од 55 вирусни и 3 бактериски

Вовед

Денес, виновата лоза се одгледува на вкупна површина од 24.584,43 ha (ДЗС, 2007 год.), од кои 21.411,90 ha се вински сорти, а 3.172,53 ha се трпезни

заболувања. Најслабо проучена група на патогени причинители на болести кај виновата лоза е групата на фитоплазмите. Фитоплазмите се причинители на голем број деструктивни болести кај виновата лоза. Тоа се прокариотски организми што живеат во флоемските садови кај растенијата и се предизвикувачи на над 700 различни растителни болести кај овошките, виновата лоза, како и кај некои едногодишни и повеќегодишни растенија. Домаќини на фитоплазмите можат да бидат и голем број на плевелни растителни видови, коишто се најчести извори на зараза (Martelli & Boudon-Padieu, 2006).

Bois noir фитоплазмата, има доста широк ареал на распространување во Европа, а предизвикана е од столбур групата. Освен кај виновата лоза, оваа група на фитоплазми многу често се среќава и кај плевелната вегетација и кај други култивирани растенија (Marcone et al., 1997, Schneider et al., 1997). Векторот кој ја пренесува оваа група на фитоплазми припаѓа на фамилијата *Cicadellidae*, *Hyalestes obsoletus* Signoret 1867, инсект-вектор на BN (Maixner et al., 1995, Sforza et al., 1998). Фитоплазмите се пренесуваат преку инсектите со циклични промени на домаќините од плевелната вегетација на култивирани растенија. Диференцирањето и класификацијата на фитоплазмите е базирана на фенотипските и генотипските карактеристики. Првата класификација на фитоплазмите била направена со RFLP анализа на 16S rRNA генот (Lee et al., 1993, Schneider et al., 1993).

Според најновата класификација на фитоплазмите врз основа на 16S rDNA генот тие се класифицирани во 15 групи, коишто носат тривијално име и шифра од 16SrI до 16SrXV, и над 40 подгрупи (Lee et al., 2000, Montano et al., 2001). Врз основа на податоците за појавата и присуството на фитоплазмите во светот, како и нивното штетно дејство врз приносот на грозје, како и според минималните познавања за присуството на фитоплазмите во лозовите насади во Македонија, беше конструирана целта на нашето истражување.

Целта беше базирана на теренско одредување на присуството на симптоми коишто се карактеристични за фитоплазматските промени како и лабораториска дијагностика и карактеризација на

видот на фитоплазмите со помош на PCR/RFLP анализа.

Со цел да се овозможи контрола и заштита на виновата лоза од фитоплазматските промени беше конструирана база на податоци за одредување на процентот на инфекција на терен.

Материјал и методи

Теренска анализа на растителниот материјал

Во сезоната 2006/07, беше извршено следење и колекционирање на материјал од симптоматични растенија од седум поголеми локалитети под винова лоза, со тринаесет прегледани виногорја, сè со цел потврдување на присуството/отсуството на фитоплазмите (Табела 1).

Нашата теренска анализа покажа присуство на различни симптоми со поголем или помал интензитет кај различни сорти винова лоза. За лабораториска анализа беа испитувани колекционирани примероци од различни сорти винова лоза (fam. *Vitaceae*, *Vitis vinifera* L.), претежно од винските сорти (бидејќи забележавме дека кај трпезните сорти има многу мал процент или воопшто нема инфекција од фитоплазмите).

Амплификацијата на 16S rDNA генот на фитоплазмите со помош на чувствителната PCR метода, обезбедила многу прецизна детекција и идентификација во однос на сите методи кои што порано биле користени. Изборот на олигонуклеотидните прајмери претставува една од специфичностите на овој тест. Прајмерите направени по секвенцата на конвенционалниот 16S rDNA ген, кои се користат за детекција на сите групи на фитоплазми, означени се како *универзални групи на прајмери*. Чувствителноста на детекцијата на фитоплазмите се зголемува со користењето на вториот, вгнездениот PCR (*Nested PCR*), (Jones, 2002). Извршен беше детален преглед на лозовите насади во горенаведените региони, и се утврди застапеност на фитоплазматските заболувања во сите испитани подрачја. Симптомите беа најраспространети кај сортата *шардоне* и *вранец* (Слика 1).



Слика 1. Различни симптоми кај сортите *шардоне* и *вранец* предизвикани од фитоплазми
Figure 1. Different symptoms on variety *shardonnay* and *vranec* caused by phytoplasmas

Табела 1. Локалитети од коишто беше колекциониран материјалот за анализа и симптоми од теренските прегледи

Table 1. Localities where the material for analysis was collected, and symptoms of field observation

Регион Region	Локалитет Locality	Сорта Variety	Присуство на типични симптоми Appearance of typical symptoms	
			2006	2007
Неготино	Ило Виларов	<i>италијански ризлинг</i>	+?	+?
		<i>смедеревка</i>	+	++
		<i>вранец</i>	+++	+++
		<i>белан</i>	+	+
		<i>жславка</i>	+?	*
		<i>траминец бел</i>	*	+?
		<i>мускат отонел</i>	*	++
	Дуброво	<i>'ркцатели</i>	+	+
		<i>траминец бел</i>	+	+
		<i>кратошија</i>	+?	+?
Кавадарци	Р.Е. Љубаш	<i>смедеревка</i>	+?	*
		<i>мускат италија</i>	-	-
		<i>афус али</i>	-/+?	-
		<i>смедеревка</i>	-?	++
		<i>шардоне</i>	+	++
Струмица	Хамзали	<i>белан</i>	+	*
		<i>вранец</i>	+?	++
		<i>'ркцатели</i>	-/+?	*
		<i>викторија</i>	*	+?
Радовиш	Добридол	<i>пловдина</i>	-	*
		<i>смедеревка</i>	+	*
		<i>вранец</i>	++	++
Штип	Каваклија	<i>рајнски ризлинг</i>	?	*
		<i>бургундец ирн</i>	-/+?	-
		<i>вранец</i>	++	++
	Три Чешми	<i>смедеревка</i>	+	++
		<i>рајнски ризлинг</i>	-	*
		<i>бургундец ирн</i>	++	++
Врсаково	<i>вранец</i>	++	++	
Куманово	Табановце	<i>вранец</i>	*	+?
		<i>бургундец ирн</i>	*	+?
	Петрличани	<i>шардоне</i>	*	+
Велес	Сопот	<i>шардоне</i>	+++	+++
		<i>каберне совиньон</i>	+?	-
	Витанци	<i>бургундец ирн</i>	-/+?	*
		<i>каберне совиньон</i>	-	*
		<i>вранец</i>	+?	*

-/+? сомнителни симптоми
 + слабо изразени позитивни симптоми
 ++ зафатен поголем дел од лозанката

+++ целосна инфекција на целата лоза
 - негативни симптоми
 * не е прегледано

Лабораториска анализа на симптоматичниот материјал

Екстракцијата на DNA беше извршена по стандарден СТАВ протокол на работа, (Angelini et al., 2001). Претходно исеченото и смрзнато ткиво (1g лисна нерватура) се хомогенира со течен азот во стерилни порцелански аванчиња и толчници до прав, и веднаш директно се додава пуфер за екстракција (7ml 3% СТАВ+2-меркаптоетанол). Се додава 1ml хлороформ, се промешува и центрифугира на 11.000 грм за време од 10 минути. Внимателно се префрла горната водена фаза во друга епруветка од 2ml и се додава изопропанол. Се центрифугира на 11.000 грм за време од 15 минути. Се отфрла супернатантот и се промива талогот со 70% етанол. На крај, епруветките се сушат на 37°C за време од 30 минути до 1 час (сè

до целосно испарување на етанолот). Исушениот талог (екстрахираната DNA) се раствора со ТЕ пуфер (Tris-EDTA pH 7,4) (20ng/µl).

Од добиената DNA беше направен PCR со амплификација на 16Sr DNA регионот, со употреба на универзална (R16 P1/P7 и R16 M1/B6) и специфична група на прајмери (ftuf1-rtuf1 и ftufAY-rtufAY).

Секоја PCR реакција се изведува во реакциски тотален волумен од 20 µl, со содржина од 100 ng од матичната DNA. Во Табелата 2. се прикажани прајмерите, нивните секвенци и условите на PCR рекациите, кои беа користени во овој тип истражување. За контрола на резултатите при отчитувањето во 1% агарозен гел електрофореза, во PCR-от користевме негативна (дејонизирана вода) и позитивна (AY1) контрола.

Табела 2. Секвенци на прајмерите и PCR услови
Table 2. Primer sequences and PCR conditions

Прајмер Primer	Секвенца (5'-3') Sequences (5'-3')	Иницијална денатур. Initial denaturation	Денатурација Denaturation	Анилирање Anilition	Екстензија Extension
R16 P1	AAGAGTTTGCCTGGCTCAGGATT	94°C 3мин.	94°C 1мин	50°C 2мин	72°C 3мин
R16 P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	94°C 3мин.	94°C 1мин	50°C 2мин	72°C 3мин
M1 (16R758F)	GTC TTT ACT GAC GCT GAG GC	94°C 3мин.	94°C 1мин	50°C 2мин	72°C 3мин
B6 (M23Sr)	TAG TGC CAA GGC ATC CAC TGT G	94°C 3мин.	94°C 1мин	50°C 2мин	72°C 3мин
R16 (I) F1	TAA AAG ACC TAG CAA TAG G	94°C 3мин.	94°C 1мин	50°C 2мин	72°C 3мин
R16 (I) R1	CAA TCC GAA CTG AGA CTG T	94°C 3мин.	94°C 1мин	50°C 2мин	72°C 3мин
ftuf1	CAC ATT GAC CAC GGT AAA AC	94°C 3мин.	94°C 1мин	45°C 2мин	72°C 3мин
rtuf1	CCA CCT TCA CGA TAT GAG AAC	94°C 3мин.	94°C 1мин	45°C 2мин	72°C 3мин
ftufAY	GCT AA AGT AGA GCT TAT GA	94°C 3мин.	94°C 1мин	50°C 2мин	72°C 3мин
rtufAY	CGT TGT CAC CTG GCA TTA CC	94°C 3мин.	94°C 1мин	50°C 2мин	72°C 3мин

После завршениот nested PCR, позитивните примероци се дигестираат со рестрикциски ендонуклеази *TagI*, *Tru9I* и *HpaII* (MBI Fermentas), за дигестија на амплифицираните фрагменти на 16Sr DNA регионот и *tuf* генот, по посебен протокол за секој ензим. Дигестијата се одвиваше 16 часа на 37°C. Бандовите се раздвојуваат со 13% полиакриламидна гел електрофореза, со отстојување на гелот во етидиум бромид и фотодокументирање на резултатите на UV-трансилуминатор.

Резултати и дискусија

Фрагменти со очекуваната големина беа амплифицирани со сите групи прајмери за потврда на изолатите од фитоплазмите.

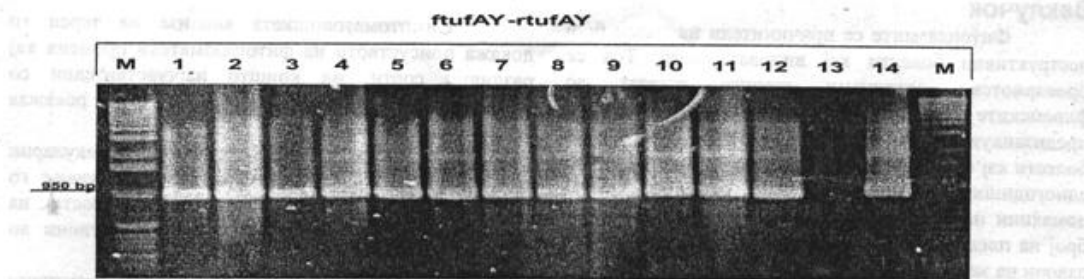
Со употреба на прајмерскиот сет R16 P1/P7 во директниот PCR и на R16 M1/B6 во вгнездениот (nested PCR), добивме амплифицирани продукти со големина од 1050 bp. На овој начин го потврдивме присуството на фитоплазмите но не и на видот. Со цел да се потврди присуството на фитоплазмата *Bois*

noir кај сите позитивни примероци исто така го анализиравме и *tuf* генот (специфичниот ген за BN), со употреба на посебна група на прајмери за овој ген, ftuf1-rtuf1 (директен PCR) и ftufAY-rtufAY (nested PCR), и ги добивме очекуваните амплифицирани продукти со големина од 950 bp, (Слика 2). Со оваа анализа го потврдивме присуството на некарантинската фитопlasма, столбур во сите испитувани локалитети во Македонија.

RFLP анализа

16SrDNA фрагменти амплифицирани во nested PCR-от од фитоплазмите кај виновата лоза беа детерминирани со RFLP анализа, дигестирани со рестрикциски ендонуклеази *TagI*, *Tru9I* и *HpaII*.

Комбинациите на прајмери/ензими кои беа користени при RFLP анализата се: *tufAY/TagI*, *tufAY/HpaII*, *M1B6/Tru9I*. Добиените рестрикциски профили не покажаа полиморфизам, но го докажаа присуството на фитоплазмата *Bois noir* (столбур), тип II (VKII) (Слика 3).

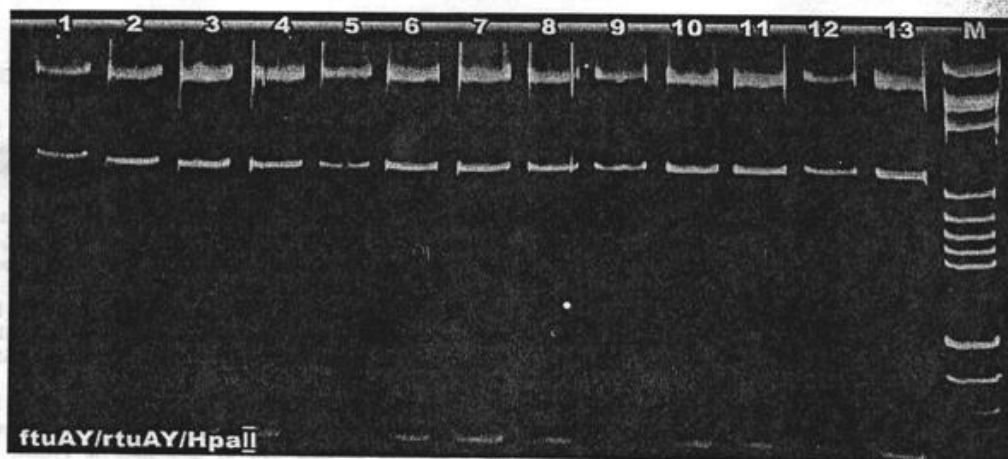


Слика 2. Резултат од 1% агарозен гел електрофореза на PCR амплифицираните продукти на фитоплазматскиот *tuf* ген кај примероци од винова лоза, за умножување беше користен прајмерскиот пар *ftufAY-rtufAY*

1 kb DNA ladder Invitrogen со големина на фрагментите 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp, 12 се позитивните анализирани примероци, 13 е негативна контрола и AY1 е позитивната контрола

Figure 2. Agarose gel electrophoresis (1%) of nested PCR amplicons on 16SrDNA grapevine phytoplasmas amplified with *ftufAY-rtufAY* primer pair specific for *tuf* gene

1 kb DNA ladder Invitrogen with fragment sizes 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp, 12 positive samples, AY1 positive control and B is blank (negative control)



Слика 3. Рестрикциски профили на специфичните *tuf* ампликони, добиени со помош на *HpaII* рестрикцискиот ензим, визуелизирани во 13% полиакриламиден гел. 1-12 примероци на винова лоза, 13 - AY1, референтен изолат (E. Boudon Padieu, Dijon, France) M - pBR322 маркерот е со 15 фрагменти со следнава должина (во bp): 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80.

Figure 3. Restriction profiles of specific *tuf* amplicon, with *HpaII* restriction enzyme, visualization on 13% polyacrilamide gel. 1-12 grapevine samples, 13-AY1 referent strain (E. Boudon Padieu, Dijon, France) M - pBR322 marker with 15 fragments (bp): 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80.

Заклучок

Фитоплазмите се причинители на голем број деструктивни болести кај виновата лоза. Тоа се прокариотски организми коишто живеат во флоемските садови кај растенијата и се предизвикувачи на над 700 различни растителни болести кај овошките, виновата лоза, како и кај некои едногодишни и повеќегодишни растенија. Како домаќини на фитоплазмите можат да бидат и голем број на плевелни растителни видови, кои се најчести извори на зараза (Martelli & Boudon-Padieu, 2006).

Bois noir е предизвикана од фитоплазмата од столбур 16SrXII-A групата. Оваа група на фитоплазми има широк ареал на распространување низ цела Европа, како кај култивираниите растенија, така и кај плевелната вегетација. Во светски рамки, до денес, идентификувани се и постојат три типа *Bois noir*, тип I II и III (Langer and Maixner, 2004).

Во нашава земја, според првите подетални молекуларни испитувања направени во 2003 год., во Скопското и во Велешкото виногорје, докажано е присуството на *Bois noir* фитоплазмата (Šeruga *et al.* 2003).

При реализација на целта на нашето истражување беа вклучени резултати добиени од теренската и лабораториската анализа.

Симптоматолошката анализа на терен го докажа присуството на фитоплазматски промени кај различни сорти, од коишто најчувствителни со најинтензивни и типични симптоми на терен покажаа сортите *шардоне* и *вранец*.

Со употреба на современите молекуларни техники (PCR/RFLP), во ова наше истражување го утврдивме присуството и распространетоста на фитоплазмите во поголемите лозарски региони во Македонија.

Со PCR амплификација добивме позитивни продукти со големина од 1050 bp, кои со специфичната група на прајмери за *tuf* генот, го потврдија присуството на фитоплазмата *Bois noir* (столбур), со големина од 950 bp.

Сите позитивни амплифицирани продукти во комбинациите на прајмери/ензими беа користени при RFLP анализата: *tufAY/TagI*, *tufAY/HpaII*, *M1B6/Tru9I*. Добиените рестрикциски профили не покажаа полиморфизам но го докажаа присуството на фитоплазмата *Bois noir* (столбур), тип II (VKII).

Литература

1. 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 phytoplasma. *Vitis*, 40: 79-86.
2. Langer M., Maixner M. 2004. Molecular characterization of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, 43: 191-199.
3. Државен завод за статистика. 2007. Попис на земјоделството, 2007, Книга II, 1-129.
4. Jones P. 2002. Phytoplasma plant pathogens. Plant Pathologist's Pocketbook 3rd edition. Waler J.M., Lenne J.M., Waller S.J. CABI Publishing UK.
5. Lee I.M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E. 1993. Universal amplification and analyzes of pathogen 16Sr DNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
6. Lee I.M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221-255.
7. Maixner, M., Ahrens, U., Seemüller, E. 1995. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 241-250.
8. Martelli G.P., Boudon-Padieu E. 2006. Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. *Options Méditerranéennes, Série B: N.55*, pp 297.
9. Montano HG, Davis RE, Dally EL, Hogenhout S, Pimentel JP, Brioso PST. 2001. "Candidatus Phytoplasma brasiliense", a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1109-1118.
10. Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B.C., Seemuller E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16Sr DNA. *J. General Microbiol.* 139: 519-527.
11. Sforza R., Clair D., Daire X., Larrue J., Boudon-Padieu E. 1998. The role of *Hyaletes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) on the occurrence of Bois noir of grapevines in France. *J. Phytopathol.* 146: 549-556.
12. Šeruga, M., Škorič, D., Kozina, B. Mitrev, S., Krajačić, M. and Curkovič, P. 2003. Molecular identification of a phytoplasma infecting grapevine in the Republic of Macedonia. *VITIS Band/Volume* 42: 181-185.