

BAKTERIOZNA PLAMENJAČA VINOVE LOZE

- *Xylophilus ampelinus* –

Andelka Prokić¹, Tanja Dreo², Aleksa Obradović¹

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun

²Nacionalni Institut za biologiju, Ljubljana, Slovenija

E-mail: andjelka03@gmail.com

Rad primljen: 05.04.2019.

Prihvaćen za štampu: 18.04.2019.

Izvod

Bakteriozna plamenjača vinove loze, koju prouzrokuje fitopatogena bakterija *Xylophilus ampelinus*, je ekonomski značajno oboljenje koje može ugroziti proizvodnju vinove loze umanjujući ukupan prinos i smanjujući dugovečnost zaraženih biljaka. U regionima gde je zabeleženo prisustvo bolesti gubici u proizvodnji, naročito kod osetljivih sorti, mogu dostići i do 80% ukupnog prinosa. Krug domaćina ove bakterije ograničen je samo na vinovu lozu. U zaraženim biljkama patogen se nalazi u sudovnom sistemu (ksilemu) odakle se dalje širi prouzrokujući sistemsku infekciju biljke domaćina. Tokom vegetacije prenosi se u neposrednoj okolini izvora zaraze sa biljke na biljku, a na veću udaljenost zaraženim sadnim materijalom koji predstavlja primarni izvor inokuluma. Ne postoje potpuno otporne sorte ni dovoljno efikasne metode zaštite od ove bolesti. U Srbiji *X. ampelinus* ima karantinski status. Stoga je od najvećeg značaja sprečavanje unošenja patogena kontrolom zdravstvene ispravnosti biljnog materijala za reprodukciju, posebno iz zemalja gde je utvrđeno prisustvo patogena.

Ključne reči: vinova loza, bakteriozna plamenjača, *Xylophilus ampelinus*, dijagnoza, epidemiologija, zaštita

UVOD

Vinova loza predstavlja jednu od najznačajnijih poljoprivrednih kultura u našoj zemlji. Imajući u vidu ekonomski značaj i dugu tradiciju gajenja, od posebnog je značaja sprečavanje pojave i širenja oboljenja vinove loze koja mogu umanjiti prinos i kvalitet grožđa. Među ekonomski značajna oboljenja bakteriozne prirode ubraja se bakteriozna plamenjača vinove loze, koju prouzrokuje fitopatogena bakterija *Xylophilus ampelinus* (Arsenijević, 1997; Peduto Hand, 2015). Ovaj patogen prisutan je pretežno u mediteranskom delu Evrope, a karantinski status u mnogim geografskim područjima širom sveta ukazuje na značaj i rizik od unošenja ili

širenja u nova područja (Anonymous, 2009). Usled povećanog obima međunarodne trgovine i uvoza sadnog materijala iz zemalja gde je utvrđeno prisustvo bakterije, postoji realan rizik od njenog dospevanja i u našu zemlju. Stoga ovaj pregledni rad ima za cilj da ukaže na rasprostranjenost i značaj bakteriozne plamenjače vinove loze, osnovne karakteristike patogena, kao i mere kontrole. Za pravilnu dijagnozu oboljenja, od posebnog značaja je poznavanje simptomatologije i epidemiologije oboljenja, dok je primena visoko osetljivih dijagnostičkih metoda neophodna za pouzdanu detekciju i identifikaciju patogena.

RASPROSTRANJENOST I ZNAČAJ

Bakteriozna plamenjača vinove loze (*Vitis* spp.) koju prouzrokuje Gram-negativna bakterija *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos) Willems *et al.*, predstavlja destruktivno oboljenje koje je prvi put opisano u Italiji i Francuskoj pred kraj 19. veka (Arsenijević, 1997; Peduto Hand, 2015). Skoro čitav vek kasnije, u Grčkoj, na ostrvu Krit, izolovan je i identifikovan pravi prouzrokovatelj oboljenja, nova vrsta fitopatogene bakterije opisana pod nazivom *Xanthomonas ampelina* (Anonymous, 2009; Panagopoulos, 1969). Na osnovu novih taksonomskih proučavanja građe molekula nukleinskih kiselina patogen je svrstan u novi rod *Xylophilus* (Willems *et al.*, 1987), koji sadrži samo jednu fitopatogenu vrstu - *Xylophilus ampelinus* (Anonymous, 2009). Bakteriozna plamenjača vinove loze je sistemsko oboljenje koje prouzrokuje ekonomski značajne gubitke u proizvodnji koji mogu dostići i do 80% (Peduto Hand, 2015). Pored smanjenja prinosa, pojava bolesti utiče i na vitalnost i životni vek obolelih biljaka, dok kod jačih infekcija može prouzrokovati potpuno izumiranje biljke domaćina (Panagopoulos, 1987). Areal rasprostranjenja *X. ampelinus* danas obuhvata Francusku, Grčku, Italiju, Moldaviju, Sloveniju, Španiju, Južnoafričku Republiku (Anonymous, 2009) i Japan (Shinmura *et al.*, 2012). Pojava bolesti u ovim zemljama je sporadična i uglavnom ograničena na nekoliko vinogorja (Anonymous, 2009; Panagopoulos, 1987). Prisutna je pretežno u Mediteranskom delu Evrope dok je za mnoge zemlje u Evropi, kao i van evropskog kontinenta karantinski patogen (Anonymous, 2009). Nalazi se na A2 karantinskoj listi EPPO organizacije (European and Mediterranean Plant Protection Organization), kao i na A1 karantinskoj listi štetnih organizama Republike Srbije. U dosadašnjim proučavanjima bakterioza vinove loze u našoj zemlji, nije zabeležena pojava ovog patogena. U cilju održavanja karantinskog statusa *X. ampelinus* u Srbiji, svake godine sprovode se mere nadzora radi utvrđivanja prisustva ovog patogena, kao i analiza biljnog materijala u prometu preko granice. S obzirom na mogućnost latentne zaraze, u detekciji ove bakterije neophodno je koristiti osetljive, specifične i brze metode.

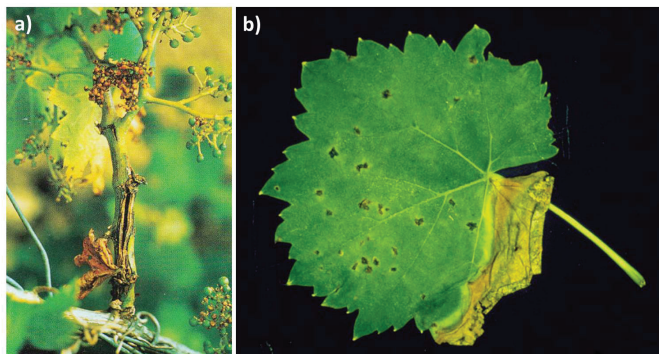
SIMPTOMI BOLESTI

Simptomi bakteriozne plamenjače vinove loze mogu se uočiti na svim nadzemnim organima: listu i lisnoj peteljci, stablu, lastarima, cvetu i plodu. Prvi simptomi bolesti uočavaju se u rano proleće kada se pupoljci na zaraženim delovima čokota ne otvaraju ili je porast lastara iz zaraženih pupoljaka usporen. U isto vreme, na zdravim delovima čokota pupoljci i lastari se normalno razvijaju. Na lastarima, prvi simptomi uočavaju se 2-3 nedelje nakon razvoja. Pri osnovi lastara uočava se pojava eliptičnih pega svetlozelene ili žućkaste boje. Sa razvojem lastara pege se šire uzdužno ka vrhu lastara, potom zahvaćeno tkivo puca usled čega se formiraju pukotine, okružene nekrotičnim tkivom, dužine 2-10 cm i prečnika oko 0,5 cm. Ove pukotine dopiru do srži lastara i izgledom podsećaju na rak-rane, što je karakterističan znak bolesti koja se naziva još i rak ili nekroza vinove loze (Slika 1a).

Ispod površinskog tkiva, duž sprovodnih sudova uočavaju se svetlomrke pruge. Takođe, na poprečnom preseku zaraženog tkiva uočava se promena boje tkiva ksilema u crvenkasto-braon. Rak-rane najčešće zahvataju nekoliko lastara od osnove, dok su u nekim slučajevima oni zahvaćeni celom dužinom. Jače oboleli delovi biljaka zaostaju u porastu, suše se i izumiru. Simptomi u vidu nekroze razvijaju se i na šepurini, peteljci, kao i mladim bobicama grozda. Listovi na zaraženim mladima ispoljavaju nekrozu po obodu lisne ploče (Slika 1b).

U slučaju sekundarnih infekcija koje nastaju krajem proleća i tokom leta, na razvijenim listovima uočava se pojava uglastih, crvenkasto-smeđih, a kasnije nekrotičnih pega prečnika 1-2 mm, obično okruženih hlorotičnim oreolom. Pojava nekroze i rak-rana sa jedne strane lisne drške dovodi do prevremenog otpadanja lišća (Arsenijević, 1997). Pojava i tip simptoma mogu da variraju u zavisnosti od vremena nastanka infekcije, osetljivosti sorte kao i od uslova spoljašnje sredine. Kod nekih sorti ne dolazi do pojave rak-rana ili pukotina na lastarima. Takođe, kod hronično zaraženih biljaka u vinogradu simptomi bolesti mogu biti slabo izraženi.

Zabeleženo je i potpuno povlačenje simptoma koji se zatim ponovo ispoljavaju u vidu akutne infekcije nekoliko godina kasnije, kada nastupe povoljni uslovi za razvoj bolesti. U nekim slučajevima dolazi do ozdravljenja biljaka, verovatno usled uslova spoljašnje sredine koji su nepovoljni za razvoj patogena ili modifikacije u primeni agrotehničkih mera (Peduto Hand, 2015). Opisani simptomi nisu specifični i mogu se lako zameniti sa drugim poremećajima i promenama abiotske ili biotske prirode. Slične promene mogu nastati usled infekcije nekim gljivama kao što su *Phomopsis viticola*, *Elsinoë ampelina* i drugim vaskularnim patogenima ili prouzrokovateljima raka drveta (Anonymous, 2009; Peduto Hand, 2015). Takođe, ozlede slične rak-ranama mogu nastati usled pojave grada. Zbog toga je za postavljanje konačne dijagnoze neophodna izolacija bakterije iz biljnog tkiva, detekcija i identifikacija patogena primenom pouzdanih dijagnostičkih metoda.



Slika 1. Simptomi bakteriozne plamenjače: b) formiranje rak-rane u osnovi mladara, nekroza peteljki lista i grozda; a) pegavost i nekroza oboda lista (izvor: slika 1a - Peduto Hand, F. (2015), slika 1b - C. G. Panagopoulos, Agricultural University, Bugwood.org)

EPIDEMIOLOGIJA

Bakterija *X. ampelinus* održava se i umnožava u sprovodnim tkivima prouzrokujući sistemsku, hroničnu infekciju biljke domaćina. Početkom nove sezone bakterija se širi ksilemom dospevajući do zdravih lastara i izdanaka koji se iz njih razvijaju. Primarne infekcije nastaju na jednogodišnjim i dvogodišnjim lastarima, preko lista, cveta ili bobica. Važan izvor inokuluma tokom proleća predstavlja biljni sok koji curi iz ozleda nastalih pri preseku tkiva tokom rezidbe, u fazi tzv. suženja vinove loze. Mladi lastari koji se razvijaju iz zimskih pupoljaka, veoma su osetljivi i podložni infekciji i mogu biti zaraženi kapima biljnog soka koji kod zaraženih biljaka sadrži visoku koncentraciju bakterija. Pri vlažnom i kišovitom vremenu, na obolelim listovima u okviru pega, pojavljuju se kapi bakterijskog eksudata svetlo žute boje koji takođe predstavlja značajan izvor inokuluma, kao i rak-rane koje nastaju tokom razvoja bolesti (Arsenijević, 1997; Panagopoulos, 1987; Peduto Hand, 2015). Vlažno i vetrovito vreme pogoduju širenju infekcije.

Primarni izvor inokuluma i glavni način prenošenja bakterije na velike udaljenosti predstavljaju zaraženi kalemovi ili vioke koje se koriste kao materijal u procesu kalemljenja (Panagopoulos, 1987; Peduto Hand, 2015). U jako zaraženom vinogradu može biti latentno zaraženo i do 50% čokota. Latentno zaražene matične biljke predstavljaju veliki rizik za širenje patogena sadnim materijalom na velike udaljenosti (Panagopoulos, 1969). Prenosenje patogena tokom vegetacije sa zaraženih na zdrave biljke odvija se pomoću kišnih kapi, vetra, kontaminiranog alata prilikom rezidbe i berbe. Sekundarne infekcije nastaju prodiranjem bakterija u biljno tkivo kroz stome, lisni ožiljak ili različite povrede. Vetar i kiša doprinose širenju inokuluma, a takođe mogu praviti povrede na biljnim organima koje

predstavljaju mesta prodora patogena u biljno tkivo. Do sada nisu poznati drugi vidovi širenja bolesti, kao ni insekti vektori. Distribucija patogena u pojedinim biljnim delovima može da varira u zavisnosti od sorte i doba godine (Bradbury, 1991). U biljnim ostacima u zemljištu patogen održava vitalnost preko 5 godina (Arsenijević, 1997).

DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA PATOGENA

X. ampelinus je monotriha, Gram-negativna, aerobna fitopatogena bakterija štapićastog oblika. Na hranljivim podlogama ima usporen porast. Na podlozi od hranljivog agara formira sjajne, okrugle, blago ispupčene i poluprozirne kolonije svetlo žute boje, veličine 0,2-0,3 mm nakon 5-6 dana inkubacije pri 26°C. Na podlozi sa dodatkom glukoze i kvašćevog ekstrakta (YPGA) kolonije dostižu veličinu oko 2 mm nakon 7-12 dana razvoja. Minimalna temperatura neophodna za razvoj je 6 °C, maksimalna 30 °C, a optimalna 24 °C. *X. ampelinus* koristi ograničen broj ugljenikovih jedinjenja, organskih i aminokiselina za razvoj. Sojevi su oksidaza negativni i katalaza pozitivni, stvaraju ureazu, koriste L-arabinozu, D-galaktozu, citrate, fumarate, malate i DL-tartarate kao izvor ugljenika, a ne i glukozu, saharozu i laktozu (Arsenijević, 1997; Dreo et al., 2005; Panagopoulos, 1987).

Distribucija bakterije u biljnom tkivu nije ujednačena i varira u zavisnosti od perioda vegetacije kao i uslova spoljne sredine. Najpogodniji period za izolaciju patogena iz obolelih organa je tokom vlažnog perioda u proleće, u uslovima povoljnim za nastanak i razvoj infekcije. Pojava latentne infekcije dodatno otežava dijagnozu (Anonimous, 2009; Panagopoulos, 1987). Stoga, utvrđivanje prisustva bakterija u biljnom tkivu nije uvek pouzdano i zahteva primenu visoko osetljivih metoda detekcije. Zato su u literaturi opisani postupci kojima se može povećati koncentracija bakterija u biljnom tkivu radi uspešnije detekcije (Serfontein et al., 1997).

Preporučene metode za detekciju i identifikaciju *X. ampelinus* zasnivaju se na izolaciji patogena, primeni seroloških (IF i ELISA test) i molekularnih metoda zasnovanih na reakciji lančanog umnožavanja fragmenta DNK (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Anonimous, 2009). Do sada su razvijene četiri različite PCR metode: konvencionalni PCR (Manceau i sar., 2005), nested PCR (Botha et al., 2001), real-time PCR (Dreo et al., 2005), digitalni PCR (Dreo et al., 2007, uz modifikaciju mastermiksa). Prednosti digitalne i real-time PCR metode su brzina izvođenja, niska osetljivost na inhibitorne materije iz uzorka, kao i mogućnost apsolutne, odnosno relativne kvantifikacije bakterija u uzorku. Iako cena opreme i hemikalija predstavlja prepreku širem uvođenju ovih metoda u fitopatološke laboratorije kod nas, real-time PCR se preporučuje kao standardna metoda za testiranje uzoraka i dokazivanje prisustva latentne infekcije, naročito u sadnom materijalu poreklom iz uvoza.

MERE ZAŠTITE

U cilju sprečavanja pojave bolesti, njenog širenja u nova područja ili u nove vinograde u područjima gde je bolest sporadično prisutna, mere zaštite se uglavnom zasnivaju na pravovremenoj primeni preventivnih karantinskih i fitosanitarnih mera. One podrazumevaju pre svega upotrebu zdravog sadnog materijala. Prilikom kalemljenja, podloge i vioke moraju biti od zdravih matičnih biljaka iz područja u kojima bolest nije otkrivena (Peduto Hand, 2015). Potrebno je prilikom uvoza kontrolisati zdravstveno stanje biljnog materijala namenjenog za sadnju i reprodukciju, posebno ukoliko vodi poreklo iz zemalja gde je prisustvo ove bakterije već utvrđeno, zatim sprovoditi inspekcijske preglede vinograda i pratiti pojavu simptoma oboljenja. Ukoliko je bolest prisutna u zasadu, širenje infekcije treba svesti na najmanju meru. Za preporuku je uklanjanje i uništavanje obolelih delova i krčenje jače obolelih čokota, rezidba po suvom vremenu, što kasnije u toku vegetacije, dezinfekcija pribora za rezidbu alkoholom, izbegavanje navodnjavanja biljaka orošavanjem. Preporučuje se primena preparata na bazi bakra pred bubrenje pupoljaka i neposredno nakon rezidbe, a potom periodično tokom vegetacije, posebno u vlažnom periodu kada su biljke osetljivije na infekciju. Za preporuku je izbor tolerantnih i manje osetljivih sorti.

Zahvalnica

Ovaj rad je rezultat istraživanja u okviru projekta III46008 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Anonimous (2009): *Xylophilus ampelinus*. Data Sheets on Quarantine Pests PM 7/96(I), Bulletin EPPO/OEPP 39:403-412.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Botha, W. J., Serfontein, S., Greyling, M. M., Berger, D. K. (2001): Detection of *Xylophilus ampelinus* in grapevine cuttings using a nested polymerase chain reaction. Plant Pathology 50, 515–526.
- Bradbury, J. F. (1991): *Xylophilus ampelinus*. IMI descriptions of fungi and bacteria no. 1050. Mycopathologia 115: 63-64.
- Dreo, T., Seljak, G., Janse, J., van der Beld, Tjou-Tam-Sin, L., Gorkink-Smits, P., Ravnikar, M. (2005): First laboratory confirmation of *Xylophilus ampelinus* in Slovenia. OEPP/EPPO Bulletin 35, 149-155.
- Dreo, T., Gruden, K., Manceau, C., Janse, J. D., and Ravnikar, M. (2007): Development of a real-time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. Plant Pathology 56: 9-16.
- Manceau, C., Grall, S., Brin, C., Guillaumes, J., (2005): Bacterial extraction from grapevine and detection of *Xylophilus ampelinus* by a PCR and Microwell plate detection system. EPPO Bulletin 35: 55–60.

- Panagopoulos, C. G. (1969): The disease “Tsilik marasi” of grapevine: its description and identification of the causal agent (*Xanthomonas ampelina* sp. nov). Ann . Inst . Phytopathol. Benaki, N.S., 9: 59-81.
- Panagopoulos, C. G. (1987): Recent research progress on *Xanthomonas ampelina*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 17: 225–230.
- Peduto Hand, F. (2015): Bacterial Blight. In: Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, eds. by: W. F. Wilcox, W. D. Gubler, J. K. Uyemoto. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 94-95.
- Serfontein, S., Serfontein, J. J., Botha, W. J., Staphorst, J. L. (1997): The isolation and characterisation of *Xylophilus ampelinus*. *Vitis* 36: 209–10.
- Shinmura A, Horita H, Inagawa Y. (2012): Occurrence of bacterial blight of grapevine caused by *Xylophilus ampelinus* in Japan (in Japanese). *Jpn J Phytopathol* 78:60.
- Willems, A., Gillis, M., Kersters, K., Van Den Broecke, L., and De Ley, J. (1987): Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov., as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:422-430.

Abstract

BACTERIAL BLIGHT OF GRAPEVINE

- *Xylophilus ampelinus* –

Andelka Prokić¹, Tanja Dreo², Aleksa Obradović¹

¹University of Belgrade, Faculty of agriculture, Zemun

²Nacional Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia

E-mail: andjelka03@gmail.com

Bacterial blight of grapevine, caused by phytopathogenic bacterium *Xylophilus ampelinus*, is economically important disease that can significantly affect grapevine production, leading to the overall yield reduction and reduced vitality of infected grapevines. In regions where disease was recorded, losses in production, especially in susceptible varieties, can reach up to 80% of total yield. The bacterium infects only grapevine. In infected plants, the pathogen is located in the vascular tissues (xylem) from where it spreads further, causing a systemic infection of the host plant. During vegetation it is transmitted from plant to plant to short distance and the main source of inoculum for long distance dissemination are infected cuttings used either as rootstocks or grafting material. There are no completely resistant varieties or effective methods for controlling the disease. In Serbia *X. ampelinus* has a quarantine status. Therefore, it is of utmost importance to prevent introduction of the pathogen by inspecting the health of reproductive plant material, especially of those originating from countries where the pathogen is already present.

Key words: grapevine, bacterial blight, *Xylophilus ampelinus*, diagnosis, epidemiology, control