65 години
Аграрен университет - Пловдив, Научни трудове, т. LV, кн. 3, 2010 г.
Юбилейна научна конференция с международно участие
Традиции и предизвикателства пред аграрното образование, наука и бизнес
Agricultural University - Plovdiv, Scientific Works, vol. LV, book 3, 2010
Jubilee Scientific Conference with International Participation
Traditions and Challenges of Agricultural Education, Science and Business

РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ДИАГНОСТИКА НА ФИТОПЛАЗМЕНАТА БОЛЕСТ BOIS NOIR (ЧЕРНА ДЪРВЕСИНА, СТОЛБУР) ПО ЛОЗАТА В БЪЛГАРИЯ

ДИМИТРИЙКА САКАЛИЕВА

SPREAD AND DIAGNOSTICS OF BOIS NOIR PHYTOPLASMAS IN GRAPEVINE IN BULGARIA

DIMITRIYKA SAKALIEVA

Abstract

Surveys were conducted in the period 2005-2010 in Bulgaria. Field inspection in 9 main vine-growing regions, where were seen as young plantations and old vineyards. Events are diagnosed yellowing, staining and related phytoplasmas infections were identified using PCR/RFLP analysis of 16S ribosomal gene, identifying phytoplasmas belonging to 16SrXII-A ribosomal subgroup in both groups investigated plants – grapevines and bindweed, which is common in vineyards in Bulgaria.

Key words: phytoplasma, bois noir, molecular identification

Въведение

Жълтениците по лозата (***GY grapevine yellows***) са широко разпространени в почти всички лозарски райони на света. Като симптоматика и тези от тях, които са свързани с фитоплазмите, са открити и диагностицирани в по-голямата част от страните с развито лозарство. Основно жълтениците се причиняват от фитоплазми, които принадлежат към различни рибозомни групи като например следните: ***aster yellows (16SrI group), X-disease (16SrIII group), elm yellows (16SrV group)*** и ***stolbur (16Sr XII group).*** Няколко фитоплазми, които се различават по своя молекулярен профил, се определят като ***Flavescence doree (FD)*** и ***Bois Noir (BN)*** и те са основните, които се свързват с фитоплазмените болести по европейските лозя (Boudon-Padieu, 2005). Тъй като симптомите на растенията не се различават едни от други, молекулярните анализи за идентифициране трябва да се извършват, когато са налице типични симптоми.

През периода 2005-2010 г. са извършени наблюдения, проучвания и анализи за оценка на присъствието на фитоплазмени болести по лозата в

някои от типичните лозаро-винарски райони на страната. Различни лозя бяха изследвани за наличие на характерни за фитоплазмите симптоми. Заболяването води до ясно изразени смущения в общото развитие на лозата. Наблюдава се промяна в оцветяването на листата, пожълтяване (при белите сортове), антоцианово до тъмночервено оцветяване (при червените сортове), силно изразена характерна деформация на листната петура. Нарушена е лигнификацията и леторастите не узряват добре, често измръзват. Засегната е флоемната тъкан. Характерни са симптомите по гроздовете, по които се наблюдава мумифициране на зърната и впоследствие изсъхване на целите гроздове. Намалено е захарното съдържание, а оттам следва и получаване на некачествена суровина. Добивът е нисък и лозовите насаждения стават нерентабилни. Освен това се създават огнища от заразени растения, които служат за разпространение на фитоплазмените болести.

Материали и методи

Обследванията бяха проведени в 9 района с различни местонахождения на лозовите масиви. Най-добре симптомите се проявяват през август и септември. Насажденията бяха в различен възрастов диапазон от 3 до 30 години, както млади, така и в активно плододаване.

При масовия скрининг беше приложен метода на маршрутните обследвания и визуалната диагностика, а за молекулярната диагностика беше приложен PCR (полимеразна верижна реакция) метода благодарение на любезното съдействие на проф. А. Бертачини и лабораторията по фитоплазмология към Университета в Болоня, Италия.

Общата нуклеинова киселина беше получена от 1 грам свежа растителна маса от нерватурата на листата (флоема) след хлороформ/фенол процедура (Prince et al., 1993). След това се разтваря в Tris-EDTA буфер с pH 8 и се поддържа при температура от 4°C. 20ng/µl нуклеинова киселина бяха използвани за амплифициране с двойката праймери P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995) в пряка реакция, последвано от nested PCR с двойката праймери F1/B6 (Duduk et al., 2004) и на повторно извършена nested PCR с двойката праймери R16F2/R2 (Lee et al., 1995). PCR и nested PCR реакциите бяха извършени в съответствие с приетия протокол (Schaff et al., 1992). Идентифицирането на откритите фитоплазми се извърши, използвайки RFLP анализите на амплифицираните фрагменти на рибозомна ДНК с помощта на рестрикционните ензими TruI, RsaI и TaqI (Fermentas, MBI, Vilnius, Lithuania). Получените рестрикционни профили бяха сравнявани с тези от референтните щамове от колекцията на проф. А. Бертачини, Италия (Bertaccini et al., 2000).

Резултати и обсъждане

Във всички анализирани проби с характерни симптоми на фитоплазмена болест и положителен резултат от PCR анализ беше установена само фитоплазма от групата 16SrXII – A (Bois Noir) след идентифициране с RFLP анализ, проведен с описаните в материали и методи ензими.

Освен това във всички проби от плевелното растение поветица ***Convolvulus arvensis L***.също беше установено наличие на фитоплазма от групата 16SrXII-A.

Таблица 1.

Диагностика и идентифициране на фитоплазмената болест **Bois Noir** в някои основни лозарски райони на България

№	Район	Местонахождение	Сорт	Визуална диагностика	PCR	RFLP
1	Пловдив	Брестник	Букет	Типични симптоми	+	+
		Цалапица	Шардоне	Типични симптоми	+	+
			Каберне	Типични симптоми	+	+
		Хисар	Шардоне	Типични симптоми	+	+
		Първенец	Шардоне	Типични симптоми	+	+
2	Пазарджик		Мерло	Типични симптоми	+	+
3	Свиленград	Младиново	Мерло	Типични симптоми	+	+
4	Карнобат		Сира	Типични симптоми	+	+
			Шардоне	Типични симптоми	+	+
			Каберне Совиньон	Типични симптоми		
			Гаме де буз	Типични симптоми		
			Пино ноар	Типични симптоми		
			Аликант буше	Типични симптоми		
5	Сунгурларе		Шардоне	Типични симптоми	+	+
6	Сливен		Шардоне	Типични симптоми	+	+
			Сира	Типични симптоми	+	+
7	Варна		Шардоне	Типични симптоми	+	+
8	Каварна		Шардоне	Типични симптоми	+	+
9	Лом		Шардоне	Типични симптоми	+	+

Изводи

Първото молекулярно идентифициране на фитоплазми в лозята е съобщено от Сакалиева, Д. (Sakalieva D., Paltrinieri S., Calari A., Bertaccini A., 2007. Molecular identification of Bois Noir phytoplasmas in grapevine in Bulgaria. – Bulletin of Insectology 60 (2), 153-154.).

Наличието на болестта Bois Noir в България за първи път е съобщено от EPPO през 2006 година (EPPO, 2006). Обследването на различни в географски аспект местонахождения с лозя в различна възраст и различни сортове, показва, че разпространението на болестта е повсеместно. Откриването на фитоплазмата и в плевелната растителност – анализ на поветица доказва присъствието на резервоари на инфекция, които играят важна роля за поддържането на популацията на насекомите вектори и в частност цикадата ***Hyalesthes obsoletus Signoret***

Особено силно е засегнат сортът Шардоне, който е силно чувствителен към нападение от фитоплазмени болести. Беше установено, че повечето от обследваните млади лозови насаждения са създадени с вносен посадъчен материал от Франция, Италия, Сърбия, а е известно, че болестта е доста разпространена в посочените страни и трябва много стриктно да се проверяват фитосанитарните сертификати, с които е закупен посадъчния материал и в тях изрично да е упоменато, че лозите са свободни (чисти) от фитоплазмени болести. Най-добре би било да се използва качествен материал от български пепиниери.

През отчетния период беше установено, че с всяка изминала година площите с болни растения се увеличават. Особено тревожно е състоянието на големите масиви, където са изпълнени правилно агротехническите мероприятия, редовно се провеждат растително-защитните мерки за борба с болестите и неприятелите и въпреки това е голям процента на разпространение на фитоплазмените болести.

Фитоплазмените болести са много опасни за територията на България, тъй като за кратки срокове болестта се разпространява в големи мащаби. Изоставени лозя и овощни градини, необработваеми земи, неподдържан горски фонд, наличие на зеленчукови градини в пряка близост до лозови насаждения и други фактори представляват допълнителни огнища за разпространение на фитоплазмените болести.

Литература

1. Alma A., Soldi G.,Tedeschi R., Marzachi C., 2002.- Ruolo di *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Homoptera, Cixiidae) nella transmissione del Legno nero della vite in Italia.- *Petria,* 12(3): 411-412.

2. Bertaccini A., Carraro L., Davies D.,Laimer da Camara Machado M., Martini M., Paltrinieri S., 3.Seemüller E,2000.-Micropropagation of a collection of phytoplasma strains in periwinkle and other host plants. - 13th International Congress of IOM, Fukuoka, Japan, July 14-19, 101.

3. Botti S., Paltrinieri S., Mori N., Milanesi L., Bondavalli R., Bertaccini A., 2005.- Variabilità molecolare di fitoplasmi 16SrXII in vigneti delle province di Modena e Reggio Emilia.- *Petria*, 15(1/2): 121-124.

4. Boudon-Padieu E., 2005.-Phytoplasmes associés aux Jaunisses de la vigne et vecteurs potentiels.- *Bulletin de l'O.I.V.*: 891-892.
5. Deng S., Hiruki C., 1991.- Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasmalike organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction.- *Phytopathology*, 81: 1475-1479.
6. Duduk B.,Botti S.,Ivanović M., Krstić B.,Dukić N., Bertaccini A., 2004.- Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia.- *Journal of Phytopathology*, 152: 575-579.
7. EPPO, 2006.- First report of stolbur phytoplasma causing "Bois noir" on grapevine in Bulgaria. *Reporting Service*, 8: 167.
8. Lee I.-M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D.E., 1995.-Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy.- *Phytopathology*, 85: 728-735.
9. Mori N., Pavan F., Bondavalli R., Reggiani N., Paltrinieri S., Bertaccini A., 2007.- Factors affecting the spread of "Bois Noir" disease in north Italy vineyards.- *Vitis*: (in press).
10. Palermo S., Elekes M., Botti S., Ember I., Alma A., Orosz A., Bertaccini A., Kölber M., 2004.- Presence of Stolbur phytoplasma in Cixiidae from Hungarian grapevine growing areas.- *Vitis*, 43(4): 201-203.
11. Prince J.P., Davis R.E., Wolf T.K., Lee I.-M., Mogen B.D., Dally E.L., Bertaccini A., Credi R., Barba M., 1993.- Molecular detection of diverse mycoplasmalike organisms (MLOs) associated with grapevine yellows MLOs.- *Phytopathology,* 83: 1130-1137.
12. Sakalieva D., Paltrinieri S., Calari A., Bertaccini A., 2007. Molecular identification of Bois Noir phytoplasmas in grapevine in Bulgaria. – Bulletin of Insectology 60 (2), 153-154.).
13. Schaff D.A., Lee I.-M., Davis R.E., 1992.- Sensitive detection and identification of mycoplasmalike organisms by polymerase chain reactions.- *Biochemistry Byophysics Research Communications*, 186: 1503-1509.
14. Schneider B., Seemüller E., Smart C.D., Kirkpatrik B.C., 1995.- Phylogenetic classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas.- In: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology* (Razin S., Tully J.G., Eds.). Academic Press, New York, 2: 369-380.
15. Sforza R., Clair D., Daire X., Larrue J., Boudon-Padieu E., 1998.- The role of Hyalesthes obsoletus (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of bois noir of grapevines in France.- *Journal of Phytopathlogy*, 146: 549-556.
16. Weber A., Maixner M., 1998.- Habitat requirements of *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorryncha: Cixiidae) and approaches to control this plant hopper in vineyards. *IOBC/WPRS Bulletin*, 21(2): 77-78.