

## UPORABA TOPLOTNE TERAPIJE ZA ZATIRANJE FITOPLAZEMSKÉ POVZRO ITELJICE ZLATE TRSNE RUMENICE IN JAJ EC NJENEGA PRENAŠALCA AMERIŠKEGA ŠKRŽATKA

Jaka RAZINGER<sup>1</sup>, Vojko ŠKERLAVAJ<sup>2</sup>, Nataša MEHLE<sup>3</sup>, Marina DERMASTIA<sup>4</sup>

<sup>1,2</sup>Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

<sup>3,4</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Ljubljana

### IZVLE EK

Povzro iteljica zlate trsne rumenice (Flavescence dorée) - fitoplazma FDp, je v Evropi ena najpomembnejših fitoplazem, ki povzro a propadanje trsov vinske trte. FDp je bila prvi ugotovljena v Franciji, od koder se je razširila v Italijo. Ugotovljena je bila tudi v Španiji, na Portugalskem, v Srbiji, Švici, v Avstriji, na Hrvaškem, Madžarskem in v Sloveniji. FDp je uvrš ena na II.A.II evropski karantenski seznam rastlinam škodljivih organizmov (Council Directive 2000/29/EC). Trenutno je edini u inkovit in predpisan ukrep za prepre evanje širjenja bolezni v vinogradih odstranjevanje okuženih rastlin ter zatiranje prenašalca FDp ameriškega škržatka (*Scaphoideus titanus*). Ker pa so lahko že trsne cepljenke okužene s FDp, smo v okviru CRP projekta V4-1103 'Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja' na slovenskih cepljenkah in cepilnemu materialu testirali metodo toplotne terapije (TT) za obvladovanje FDp in njenega prenašalca. Preizkusili smo, kako uspešno TT uni uje FDp, ali se FDp prenaša s cepljenjem, kako TT vpliva na živost in vitalnost rastlinskega materiala, namenjenega cepljenju ali neposrednemu sajenju, in kako TT vpliva na preživetje jaj ec ameriškega škržatka. TT je uspešno uni ila FDp v rastlinskem materialu in jaj eca ameriškega škržatka, hkrati pa ni negativno vplivala na živost razkuženega rastlinskega materiala. TT se je izkazala kot u inkovito orodje, s katerim bi trsni arska panoga lahko zagotovila višjo kakovost trsov, ob natan nem upoštevanju protokola TT.

**Klju ne besede:** ameriški škržatek, fitoplazma FD, *Scaphoideus titanus*, termoterapija, toplotna obdelava, toplotna terapija, trta, *Vitis vinifera*, zlata trsna rumenica

### ABSTRACT

#### THE USE OF THERMOTHERAPY TO CONTROL PHYTOPLASMA THAT CAUSES GRAPEVINE YELLOWS AND THE EGGS OF ITS VECTOR AMERICAN GRAPEVINE LEAFHOPPER

Phytoplasma FDp is the causal agent of Flavescence dorée and is associated with the main grapevine destruction in Europe. FDp was first reported in France, from where it spread to Italy. It was also discovered in Spain, Portugal, Serbia, Switzerland, Austria, Croatia, Hungary and Slovenia. FDp is listed in Annex II, Part A.II of Council Directive 2000/29/EC. The destruction of diseased plants and control of its vector American grapevine leafhopper (*Scaphoideus titanus*) is mandatory in vineyards. However, FDp can already be present in plant propagating material and young vines ready to be transplanted. Therefore, within a CRP project V4-1103 'Grapevine yellows: methods for their early detection and control' we evaluated thermotherapy (TT) as a method that could be used to control FDp as well as eggs

<sup>1</sup> dr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana, e-mail: jaka.razinger@kis.si

<sup>2</sup> univ. dipl. inž. agr., prav tam

<sup>3</sup> dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>4</sup> prof. dr., prav tam

of its vector. We evaluated how successfully TT destroys FDp, whether or not FDp can be transmitted by grafting, does TT decrease the viability of the planting or grafting plant material, and if TT destroys the eggs of American grapevine leafhopper. TT successfully removed FDp from plant material as well as destroyed the eggs of American grapevine leafhopper, without significant adverse effects to the disinfected plant material. It is a useful tool which could be used by Slovene vine nurseries to ensure a higher quality of grape transplants, provided the protocol is followed precisely.

**Key words:** American grapevine leafhopper, grapevine, grapevine yellows, heat treatment, hot water treatment, phytoplasma FD, *Scaphoideus titanus*, thermotherapy, *Vitis vinifera*

## 1 UVOD

Uporaba toplotne terapije kot fitosanitarne tehnike za ustvarjanje brezvirusnih rastlin je bila uporabljena tudi za zatiranje fitoplazem, že kmalu po prvem pojavu zlate trsne rumenice v Franciji (Caudwell, 1966). Ugotovili so, da potopitev rastlinskega materiala v vodo, ki ima temperaturo med 45 in 55 °C za 10 do 150 minut, u inkovito uni i fitoplazme in tudi druge patogene (Caudwell s sod., 1997) ter žuželke (Panattoni in Triolo, 2010). Toplotna terapija naj ne bi zmanjšala reproduktivnega potenciala ali vitalnosti cepljenk in naj ne bi vplivala na njihovo preživetje (Boudon-Padieu in Grenan, 2002). Kombinacija dolgega asa obdelave (10 ur) pri temperaturi 40 °C ali krajšega asa obdelave (10 min) pri 55 °C u inkovito uni i fitoplazme in jaj eca ameriškega škržatka. Kot najboljša varianta, v smislu doseganja zelenega razkuževanja ob hkratni odsotnosti negativnih vplivov na rastlinski material, se je izkazala srednja pot, to je 45 minutna obdelava pri 50 °C. Tehnologijo rutinsko uporabljajo npr. v Franciji in Avstraliji (Caudwell s sod., 1997); priporo ljava pa je pred cepljenjem ali pred prodajo cepljenk povsod, kjer pridelujejo razmnoževalni material (Panattoni in Triolo, 2010). Do sedaj metoda v slovensko vinogradniško prakso ni bila vpeljana, prav tako še ni bil preizkušen odziv sort v slovenski pridelavi na toplotno obdelavo. Zato smo v okviru CRP projekta V4-1103 'Trsne rumenice: metode zgodnjega odkrivanja in obvladovanja' na slovenskih cepljenkah in cepilnemu materialu testirali metodo toplotne terapije (TT) za obvladovanje FDp in njenega prenašalca. Preskusili smo, kako uspešno TT uni uje FDp ali se FDp prenaša s cepljenjem, kako TT vpliva na živost in vitalnost rastlinskega materiala namenjenega cepljenju ali neposrednemu sajenju, in kako TT vpliva na preživetje jaj ec ameriškega škržatka.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Vpliv toplotne terapije (TT) na fitoplazmo zlate trsne rumenice (FDp)

Postopek TT je bil sestavljen iz potopitve rastlinskega materiala v vodo segreto na 50 °C za 45 minut ob konstantnem mešanju. Toplotno obdelavo smo izvedli v termostatirani kopeli, kjer smo konstantno spremljali temperaturo. Po dodatku trsnega lesa smo dodali ustrezno množino toplejše vode, da smo ohranili konstantno temperaturo 50 °C. V vasi Dane na Primorskem smo nabrali rastlinski material. Skupno smo nabrali 22 vzorcev. V vseh vzorcih smo pred toplotno terapijo ugotavljali zastopanost FDp s PCR v realnem asu (qPCR) (Hren in sod., 2007). Po kon anemu postopku TT smo postopek ugotavljanja prisotnosti FDp s qPCR ponovili.

### 2.2 Prenos FDp s cepljenjem

Nadalje smo preskušali možnost prenosa FDp s cepljenjem. S tem namenom smo ponovno nabrali okužen material iz žariš a v vasi Dane. Z metodo qPCR smo predhodno potrdili

zastopanost FDp v vseh vzorcih vinske trte sorte 'Refošk', ki smo jih predvideli za cepljenje. Cepljenje smo izvedli na kupljenih cepljenkah sorte 'Chardonnay'. Cepljenje smo izvedli s tehniko 'chip-grafting'. Izvedli smo dva poskusa cepljenja: a) jesenski poskus cepljenja (rozge so bile nabrane oktobra 2011, cepljenje je bilo opravljeno novembra 2011) in b) pomladanski poskus cepljenja (rozge so bile nabrane februarja 2012, cepljenje je bilo opravljeno marca 2012).

### 2.3 Vpliv toplotne terapije na živost in vitalnost rastlinskega materiala

Želeli smo preu iti tudi morebitne (negativne) vplive TT na živost in vitalnost rastlinskega materiala, ki smo ga želeli razkužiti s TT. S tem namenom smo maja 2014 izvedli poskus, v katerem smo s TT obdelali ve razli nih sort, cepljenih na razli ne podlage. Izvedli smo TT zdravih cepljenk treh sort ('Modra frankinja', 'Zametna rnina' in 'Rumeni muškati'), ki so bile cepljenje na razli ne podlage (SO4, 5M in 8B M) od proizvajalcev Krajšek in Žugelj. Po toplotni obdelavi smo s TT obdelan rastlinski material posadili v mrežnik na vrtu KIS.

### 2.4 U inkovitost uni evanja jaj ec ameriškega škržatka s toplotno terapijo

V zadnji fazi raziskave smo v seriji poskusov ugotavljali u inkovitost uni evanja jaj ec ameriškega škržatka s TT. Spremljali smo preživetje ameriškega škržatka na enoletnem in dveletnem lesu vinske trte z in brez TT. Toplotno obdelan les smo povezali v snopi e in jih pri vrstili na prej pripravljene cepljenke (chardonnay), ki so služile kot prehrana razvijajo im škržatkom. Skupno smo pripravili 20 vzorcev: 2 tipa lesa (enoletni les, dveletni les) x 2 postopka (TT in brez TT) x 5 ponovitev. Skupna dolžina dveletnega lesa je bila v ponovitvi 3,2 m, skupna dolžina enoletnega lesa pa 5,6 m. Tako pripravljen toplotno obdelan in neobdelan material smo prekrili s fino mrežo, ki je prepre evala gibanje li ink in odraslih škržatkov v okolje (

Slika ). Poskus je potekal od 7.5.2013 do 7.11.2013, ko smo prešteli število odraslih ameriških škržatov, ki so se ujeli na rumene lepljive ploš e. Poskus smo v celoti ponovili v 2014, a se ni v nobenem obravnavanju ulovilo ni škržatkov. Verjetno zaradi uspešne vseslovenske kampanje zatiranja ameriškega škržatka že na izvornem lesu ni bilo dovolj njegovih jaj ec. Zato prikazujemo le rezultate prve ponovitve poskusa.

259



Slika 1: Levo: cepljenke ('Chardonnay') pripravljene za prehrano razvijajo im škržatom. Sredina: snopi i toplotno obdelanega lesa (in neobdelanega), pri vrš eni na trse, namenjene prehrani škržatkom in rumene lepljive ploš e, kamor so se lovili uspešno razviti škržatki. Desno: kon na postavitev lon nega poskusa preverjanja preživetja ameriških škržatkov po toplotni obdelavi.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3.1 Vpliv toplotne terapije (TT) na fitoplazmo zlate trsne rumenice (FDp)

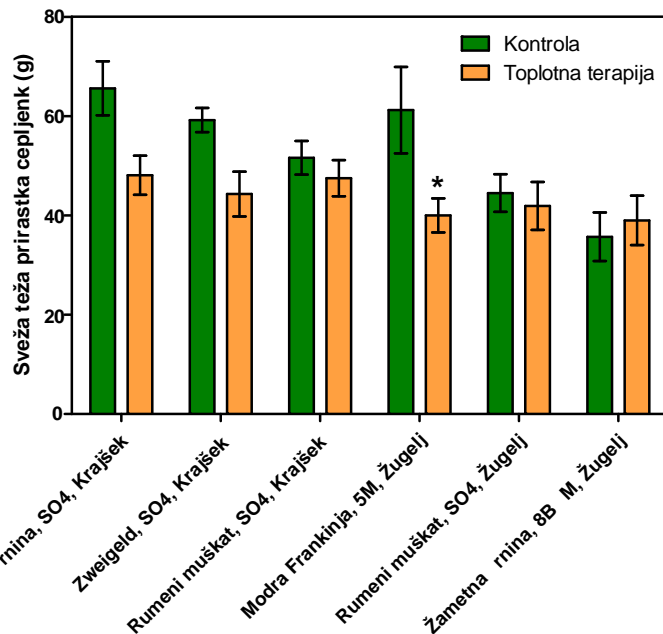
Izsledki qPCR analiz kažejo, da TT uspešno uni i FDp v rozgah, namenjenih cepljenju: rozge z okuženih trsov (N=36), ki so bile obdelane s TT, niso bile pozitivne na FDp. Pozitivnih je bilo 7 vzorcev, ki so bili z okuženih trsov in neobdelani s TT. Rezultati so tako pokazali, da je TT uspešno uni ila FDp v okuženih rozgah.

### 3.2 Prenos FDp s cepljenjem

Od prek 70 cepljenih rastlin smo s qPCR zastopanost FDp potrdili le v eni rastlini, ki je tudi edina izražala bolezenska znamenja okužbe s FDp. To niti ni presenetljivo, saj je znano, da se FDp laboratorijsko zelo težko prenaša z umetnim okuževanjem (Weintraub in Jones, 2010). Rastlina, ki smo jo uspešno okužili s cepljenjem z okuženim materialom, je bila zavrti v rasti in je med rastno dobo izkazovala tipi na znamenja okužbe s FDp. FDp smo uspešno umetno prenesli v okviru pomladnega nabiranja materiala in cepljenja z brstom.

### 3.3 Vpliv toplotne terapije na živost in vitalnost rastlinskega materiala

Rezultati odganjanja in prirastka so pokazali, da TT ne vpliva negativno na živost in le rahlo negativno na prirast tretiranih cepljenk. Vse cepljenke so preživele proces TT. Tretirane cepljenke so odganjale z rahlo zakasnitvijo, vendar razlike v razvoju niso bile vidne s prostim o esom (avgust 2014). Septembra 2014 smo poskus ocenili s tehtanjem prirastka cepljenk. Rezultati dvosmerne analize variance so pokazali, da imata na maso prirastka statisti no zna ilen vpliv faktorja 'toplotna terapija' in pa 'sorta-podlaga' ( $F_{1, 108}=12,0$ ;  $P=0,001$  in  $F_{5, 108}=4,22$ ;  $P=0,002$ ), ne pa tudi njuna interakcija ( $F_{5, 108}=2,1$ ;  $P=0,07$ ). Naknadni Bonferonijevi post-testi so pokazali, da je TT le pri sorti 'Modra frankinja', cepljeni na podlago 5M od proizvajalca Žugelj, statisti no zna ilno zmanjšala prirastek cepljenk podvrženih TT (slika 2).



Slika 2: Rezultati poskusa vpliva TT na živost in vitalnost cepljenk. Cepljenke so bile podvržene TT 22.5.2014. Prirastek je bil ocenjen 4.9.2014. Prikazane so povpre ne vrednosti  $\pm$  standardna napaka (N=10). Zvezdica (\*) ozna uje statisti no zna ilen vpliv TT na težo prirastka.

### 3.4 U inkovitost uni evanja jaj ec ameriškega škržatka s toplotno terapijo

Izmed vseh ponovitev in variant poskusa, se je 13 odraslih škržatkov razvilo le na kontrolnih šparonih, se pravi na dveletnih poganjkih, ki niso bili podvrženi toplotni obdelavi. V obravnavah z enoletnim lesom (rozge), ki je bil bodisi obdelan bodisi neobdelan s TT, se ni škržatkov ni ulovilo na rumene lepljive ploš e. Dodatno se ni ni odraslih škržatkov ujelo na rumene lepljive ploš e, obešene v mrežnikih z dveletnim lesom, ki je bil podvržen TT (Preglednica 1). Tako rezultati poskusa nakazujejo, da TT uspešno uni i jaj eca ameriškega škržatka.

Preglednica 1: Rezultati poskusa zatiranja jaj ec *S. titanus* s toplotno terapijo. Prikazane so povpre ne vrednosti odraslih škržatov, ulovljenih na rumeno lepljivo ploš o ± standardna napaka (N=5). Zvezdica (\*) ozna uje statisti no zna ilen vpliv TT število razvitih odraslih ameriških škržatkov.

	Kontrola		Toplotna obdelava	
	Enoletni les	Dvoletni les	Enoletni les	Dvoletni les
Povpre je ± SN	0,00±0,00	2,60 ± 1,08	0,00±0,00	0,00±0,00*

## 4 SKLEPI

- Toplotna terapija je ustrezna metoda za obdelavo rastlinskega materiala za pripravo cepljenk, saj uspešno uni i FDp v rozgah, namenjenih cepljenju.
- Toplotna terapija ne vpliva bistveno na vitalnost cepljenk vinske trte. Toplotna terapija je le pri sorti 'Modra frankinja', cepljeni na podlago 5M, statisti no zna ilno zmanjšala maso prirastka cepljenk.
- Toplotna terapija ni povzro ila propada nobene toplotno obdelane cepljenke.
- Toplotna terapija je uspešno zavrla razvoj oziroma uni ila jaj eca ameriškega škržatka.
- Ameriški škržatek se je razvil le na dveletnem lesu, ki ni bil podvržen toplotni terapiji.

## 5 LITERATURA

- Boudon-Padieu, E., Grenan, S. 2002. Hot water treatment. INRA, Dijon: 3 str.
- Caudewell, A., Larrue, J., Boudon-Padieu, E., McLean, G. D. 1997. Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water traetment. Australian Journal of Grape and Wine Reserach 3: 21-25.
- Caudewell, A. 1966. L'inhibition in vivo du virus de la FD par la chaleur. Annales des Epiphyties.
- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, P., Gruden, K., Ravnkar, M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasma in grapevine: a comparison with the conventional PCR detection system and their application in diagnostics. Plant Pathology 56: 785-796.
- Panattoni, A., Triolo, E. 2010. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. Scientia Horticulturae, 125: 63-67.
- Weintraub in Jones, 2010, Phytoplasmas, Genomes, Plant Hosts and Vectors. CAB International, ISBN-13: 978 1 84593 530 6, Cambridge, MA 02139 2010: 348 str.