

PRISUSTVO FITOPLAZMOZA VINOVE LOZE U NAJZNAČAJNIJIM VINOGORJIMA SRBIJE

SLOBODAN KUZMANOVIĆ¹, DRAGANA JOŠIĆ², MIRA STAROVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹,
NENAD TRKULJA¹, NENAD DOLOVAC¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹

1 Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

2 Institut za zemljište, Beograd

Dat je prikaz rasprostranjenosti fitoplazmoza na vinovoj lozi u Srbiji za period od 2003. do 2005. godine. Ukupno je pregledano 505 vinograda u 25 vinogorja. Rezultati pokazuju raširenost fitoplazmoza po vinogorjima Srbije, zatim zaraženost najznačajnijih sorata vinove loze, kao i vrste patogena koji su identifikovani.

Prisustvo fitoplazmoza dokazano je u 22 od 25 vinogorja, odnosno u 354 od 505 osmatrana vinograda. Pojava fitoplazmoznih oboljenja registrovana je na čokotima svih sorata obuhvaćenih u ovom radu, ali u nejednakom intezitetu.

Visok stepen zaraze (pojedini slučajevi preko 50%) utvrđen je u Sićevačkom, Župskom, Trsteničkom i Negotinskom vinogorju. S druge strane, fitoplazmozna oboljenja na vinovoj lozi nisu nađena, odnosno dokazana u Pocerskom, Prokupačkom i Ražanjskom vinogorju.

Jak stepen zaraze utvrđen je na sortama Plovdina (90%) i Šardone (67%), srednji na Župskom bojadiseru (34%), Frankovki (29%) i Smederevki (27%), osetna zaraza dokazana je na Crnom burgundcu (20%), Rajnskom (18%) i Italijanskom rizlingu (9%) a zaraza u tragovima otkrivena je na sorti Prokupac (4%).

Prisustvo fitoplazmi u čokotima sa simptomima fitoplazmoznih oboljenja dokazana je molekularnobiološkim metodama (PCR). Utvrđeno je prisustvo dve fitoplazme i to »*Candidatus Phytoplasma vitis*« prouzrokovatelj zlatastog žutila (Flavescence dorée - FD) i »*Candidatus Phytoplasma solani*« prouzrokovatelj crnila drveta (Bois noir - BN). »*Candidatus Phytoplasma vitis*« dokazana na vinovoj lozi u nas pripada 16SrV-C soju.

Ključne reči: vinova loza, fitoplazmoze, identifikacija, FD, BN, rasprostranjenost, vinogorja Srbije.

UVOD

Fitoplazmozna oboljenja vinove loze, zadnjih decenija, privukle su pažnju kako proizvođača tako stručne i naučne javnosti. Krajem sedamdesetih godina 20. veka Babović i Perišić (1977) opisali su pojavu žutila lišća na sortama Italijanski rizling i Muskat hamburg u nekim vinogorjima severoistočne Srbije. Desetak godina kasnije, slične simptome na sorti Šardone zapazio je Kuzmanović (1986), u Župskom vinogorju. To žutilo lišća na čokotima pomenutih sorti podseća, po svojim osnovnim karakteristikama, na »zlatasto žutilo« (Flavescence dorée) – već dobro poznatu fitoplazmozu vinove loze (Levadoux, 1955. loc.cit. Bovey and Martelli, 1992., Boudin-Padieu, 2003., 2005.). I druge patološke promene karakteristične za navedenu fitoplazmozu vinove loze zapažene su i opisane u vinogorjima Srbije. Tako su, Pešić (1997), a zatim i Milosavljević (1999), na čokotima nekih obojenih sorata vinove loze, u Župskom vinogorju, zapazili pojavu crvenila lišća. Ivanović i Ivanović (2000) su, pored žutila i crvenila na vinovoj lozi u nas, opisali i pojavu skraćenosti internodija, sušenja cvasti i grozdova, kao i uginjavanje čitavih čokota, istakavši da takve patološke promene izazivaju patogeni iz grupe fitoplazmi. Isto stanovište zauzeo je i Osler (2004) posle posete Župskom vinogorju 1998. godine.

Istraživanja obavljena u nas u preteklu periodu pokazala su da napred pomenute simptome na vinovoj lozi izazivaju fitoplazme (Kuzmanović i sar., 2002, Duduk i sar., 2003a, 2003b, Kuzmanović, 2007, Kuzmanović et al., 2008b). Detaljnijim ispitivanjima utvrđeno je da su od ovih patogena u Srbiji na vinovoj lozi prisutne »*Candidatus* Phytoplasma vitis« (prouzrokovatelj zlatastog žutila – Flavescence dorée - FD), »*Candidatus* Phytoplasma solani« (prouzrokovatelj crnila drveta – Bois noir - BN) i »*Candidatus* Phytoplasma prunorum« (prouzrokovatelj evropskog žutila koštičavih voćaka - ESFY) (Duduk et al., 2004a; 2004b; Kuzmanović et al., 2004; Duduk, 2005; Jošić et al., 2005, 2006a, 2006b, Kuzmanović, 2007, Kuzmanović i sar., 2008a). Pomenute fitoplazme, registrovane su u skoro svim vinogorjima Srbije i na svim ispitivanim sortama (Jevremović i Paunović, 2005; Duduk et al., 2006b; Kuzmanović i sar., 2006a, 2006b, 2007, 2008a, Kuzmanović, 2007).

Cilj ovih naših istraživanja bio je da utvrdimo raširenost fitoplazmoznih oboljenja vinove loze u najznačajnijim vinogorjima Srbije. Na taj način dobila bi se jedna potpunija slika o značaju tih bolesti vinove loze u nas.

MATERIJAL I METODE

Ova istraživanja obuhvatila su pregled i utvrđivanje broja vinograda sa simptomima fitoplazmoznih oboljenja, zatim prikupljanje uzoraka i proveravanje prisustva patogena.

Pregled terena i utvrđivanje raširenosti fitoplazmoza u vinogorjima Srbije

Pregledano je ukupno 505 vinograda u 25 vinogorja Srbije. Osmatranja su obavljena u vinogradima zasađenim sa sledećim sortama: Plovdina, Crni burgundac, Italijanski rizling, Rajnski rizling, Smederevka, Župljanka, Prokupac, Župski bojadisler, Šardone i Frankovka.

Obavljena su dva pregleda, prvi u junu a drugi krajem septembra. Ovaj drugi pregled podešen je periodu vegetacije kada se na čokotima obolelim od fitoplazmoza mogu videti karakteristični simptomi, koji čine tzv. „sindrom fitoplazmoza vinove loze“ (Levadoux, 1955, loc. cit. Bovey and Martelli, 1992, Boudon-Padieu, 1999, Kuzmanović i sar., 2002, Duduk i Ivanović, 2004c, 2006a, Martelli and Boudon-Padieu, 2006). Kao kontrolni, osmatrani su čokoti iste sorte bez simptoma fitoplazmoznih oboljenja.

Oboleli čokoti, koji su ispoljavali karakteristične simptome, obeleženi su i evidentirani radi daljeg i detaljnijeg osmatranja. Od mnogih, od tako obeleženih čokota, prikupljeni su uzorci za etiološka ispitivanja, odnosno za proveravanje prisustva patogena iz grupe fitoplazmi infektivnih za vinovu lozu.

Proveravanje prisustva i identifikacija patogena

Prisustvo fitoplazmi u kolekcionisanim uzorcima vinove loze, kao i identifikacija patogena, obavljeno je tzv. „metodom lančane reakcije polimeraze“ (PCR), kao i „izvedenom PCR metodom“ (nested PCR). Ukupne nukleinske kiseline ekstrahovane su iz biljnog materijala prema proceduri Ahrens and Seemüller (1992), koju su modifikovali Malisano et al. (1996). U cilju utvrđivanja prisustva fitoplazmi u uzorcima prikupljenim u periodu od 2003. do 2005. godine, korišćen je par prajmera P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995) univerzalnih za detekciju prisustva fitoplazmi pri čemu je umnožena sekvenca 16S-23S ribozomalnog gena DNK molekula fitoplazme veličine od oko 1800 bp (Angelini et al., 2004). Dobijeni fragment od 1800 bp je obrađen nested PCR metodom korišćenjem R16F2n/R16R2 prajmera (Lee et al., 2003) i dobijen je fragment 16S-23S ribozomalnog gena DNK molekula fitoplazme veličine od oko 1200 bp

(Angelini et al., 2004). Kao pozitivne kontrole korišćeni su identifikovani izolati fitoplazmi iz inficirane vinove loze: Elm yellows, EY1 (16SrV-A) i Stolbur, P-TV (Stol) (16SrXII-A) (Martini et al., 2002), dok je sterilna destilovana voda imala ulogu negativne kontrole.

Sekvence DNK molekula koje su umnožene PCR reakcijama podvrgnute su digestiji specifičnih restrikcionih enzima u cilju identifikacije detektovanih fitoplazmi. Restrikcioni enzimi koji su primenjeni u analizi polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) su *TaqI* (na P1/P7 amplifikatu) i *TruI* (na amplifikatima nested – PCR reakcija), (Fermentas, Vilnius, Lithuania). U gelovima su korišćeni sledeći markeri: ϕ X174 digestiran sa *HAEIII* (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania); 1Kb DNA (Ladder Amersham Biosciences); 1Kb plus (Gibco BRL); 1Kb (Gibco BRL); Gene Ruler DNA (Ladder Mix, Fermentas, Vilnius, Lithuania). Gelovi su bojeni 1% etidum bromidom 10 minuta, a zatim su posmatrani na UV transiluminatoru. Kao pozitivne kontrole u RFLP analizi korišćeni su identifikovani izolati fitoplazmi iz inficirane vinove loze: Elm yellows EY1 (16SrV-A) i Stolbur, P-TV (Stol) (16SrXII-A) (Martini et al., 2002).

REZULTATI I DISKUSIJA

Raširenost fitoplazmoza u vinogorjima Srbije

U pregledanim vinogradima, na čokotima napred pomenutih sorti, konstatovana je pojava dva osnovna simptoma, žutilo kod tz. belih sorti (sl. 1) i crvenilo lišća kod obojenih sorti (sl. 2). Brojnost vinograda sa takvim simptomima po lokalitetima i vinogorjima prikazana je u tabeli 1, kao i rezultati koji se odnose na prisustvo fitoplazmoza u pregledanim vinogradima i učestalost zaraze.

Od ukupno pregledanih 505 vinograda fitoplazmozna zaraza utvrđena je u 354 (tabela 1). Jak stepen zaraze (preko 50%) utvrđen je u Sićevačkom, Župskom, Trsteničkom i Negotinskom vinogorju (Plovdina, 90% i Šardone, 67%). Srednji stepen zaraženosti (20-50%) bio je prisutan u Fruškogorskom (Šardone, 43%), Vršaćkom (Frankovka, 34%), Belocrkvanskom (Šardone, 30%) i Vinaračkom vinogorju (Šardone, 20%). Osetna zaraza (5-20%) utvrđena je vinogorju Deliblatske peščare (Župljanka, 20%), Rajačkom (Frankovka i Šardone, 20%), Levačkom (Šardone, 20%), Kutinskom (Šardone, 12%), Vlasinskom (Plovdina, 10%), Džervinskom (Šardone, 10%) i Oreovačkom vinogorju (Rajnski rizling, 10%). Fitoplazmozna zaraza u tragovina (do 5%) utvrđena je u Pirotskom (Plovdina, 4%), Paličkom (Rajnski rizling, 3%), Belopalanačkom (Rajnski rizling, 2%), Mihajlovačkom i Vrbičkom vinogorju (Plovdina, 2%). Prisustvo fitoplazmoza vinove loze nije otkriveno u Pocerskom, Prokupačkom i Ražanjskom vinogorju.



Sl. 1 - Fitoplazmozni simptomi na sorti Župljanka
Fig. 1 - Phytoplasma symptoms on cv. Župljanka



Sl. 2 - Fitoplazmozni simptomi na sorti Frankovka
Fig. 2 - Phytoplasma symptoms on cv. Frankovka

Tabela 1 - Prisustvo fitoplazmoza u pregledanim vinogorjima i intenzitet zaraze nekih sorata u Srbiji u periodu 2003-2005

Table 1 - Incidence of phytoplasmas in viewed vineyards and intensity of infection (in %) of some cultivars in Serbia during 2003-2005

Vinogorje ¹ Areal of vineyard	Mesto Locality	Broj vinog. No of vine- yards	Sorte – C u l t i v a r s									
			Plovdina	Crni Burgundac	Italijanski Rizling	Rajnski Rizling	Smederevka	Zupljanka	Prokupac	Zupski Bojadiser	Sardone	Frankovka
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.	Tuleš	15/15	12-70	11-20	9	18	6-27	-	3-4	27-34	-	29
			(6/6) ³ FD ⁴	(3/2) FD	(3/2) FD	(2/2) BN	(3/2) FD		(2/1) FD	(6/6) FD		(2/2) BN,FD
	D.Omašnica	15/11	20-30	-	-	-	6-10	-	-	-	3	-
	Rudenice	10/9	30-50	-	-	-	-	11-20	4	-	-	-
	G. Rataje	17/14	50-71	-	-	-	6-10	-	-	-	-	-
	Drenča	13/12	30-50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vitkovo	19/18	30-52	-	-	-	6-10	11-20	-	-	-	-
	Stubal	15/12	30-59	-	-	11-20	-	-	-	-	-	6-10
	Šljivovo	31/25	20-67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	Poljna	6/5	4	-	-	-	6-10	-	-	-	-	-
			(1/1) FD									
	Ruišnik	5/2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	Medveda	17/14	21-56	-	-	-	11-20	-	1	-	-	6-10
			(1/1) FD									
	Bogdanje	3/3	3-61	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			(1/1) FD									
	Ljubava	9/5	6-20	-	-	-	-	-	3	-	-	-
3.	Matejevac	11/8	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	Kutina	2/0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-

Nastavak - Continue

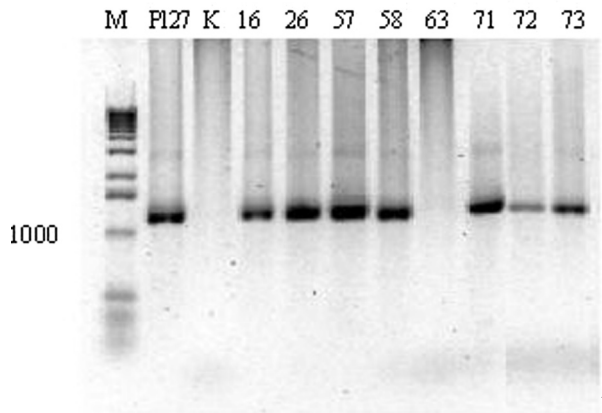
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Slatina	5/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
18.	Čubra	1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	67	-
19.	Šipina	6/5	-	-	-	-	-	-	-	-	(1/1) BN	-
	Minićevo	3/3	3	-	-	-	-	-	-	-	6-10	-
			(1/1) FD									
20.	Glogovac	5/3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			(1/1) FD									
21.	Viteževo	3/3	3	-	-	6-10	-	-	-	-	-	-
			(1/1) FD									
22.	Rekovac	7/3	-	-	-	-	-	-	-	-	11-20	-
											(1/1) BN	
23.	Jagodina	3/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19
24.	Krušedol	1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	43	-
											(1/1) BN	
	Vrdnik	1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-
											(1/1) BN	
	Rivica	11/8	6-10	-	-	-	3	-	-	-	11-20	-
			(1/1) FD									
	Grigurevci	5/5	18	-	-	-	-	3	-	-	6-10	-
			(1/1) FD									
25.	Grušić	12/0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P.Metković	8/0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rumska	6/0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 1 Vinogorje – Vineyard areal: 1=Župsko, 2=Trsteničko, 3=Matejevačko, 4=Kutinsko, 5=Pirotsko, 6=Razanjisko, 7=Prokupačko, 8=Vlasotinačko, 9=Vinaračko, 10=Stičevačko, 11=Vršačko, 12=Belocerkvansko, 13=Deliblatska peščara, 14=Banatsko-potisko, 15=Palicko, 16=Rajačko, 17=Mihallovačko, 18=Negotinsko, 19=Džervinsko, 20=Vrbičko, 21=Oreovačko, 22=Levačko, 23=Jovačko, 24=Fruiškogorsko, 25=Pocersko
- 2 Broj pregledanih vinograda / broj vinograda sa simptomima – No of reviewed vineyards/No of vineyards with symptoms
- 3 Broj testiranih čokota / broj pozitivnih uzoraka – No of tested vine plants/No of positive samples
- 4 Tip fitoplazme (FD i/ili BN) – Type of phytoplasmas (FD and/or BN)

Jak stepen zaraze (preko 50%) utvrđen je na sortama Plovdina (90%) i Šardone (67%), srednji stepen zaraženosti (20-50%) na Župskom bojadiseru (34%), Frankovki (29%) i Smederevki (27%), osetna zaraza (5-20%) na Crnom burgundcu (20%), Rajnskom (18%) i Italijanskom rizlingu (9%), a zaraza u travovima na Prokupcu (4%).

Identifikacija patogena prouzrokača fitoplazmoza vinove loze u Srbiji

Dokazivanje prisustva fitoplazmi u vinovoj lozi sa simptomima fitoplazmoznih oboljenja obavljeno je metodom lančane reakcije polimeraze (PCR). Kombinovan je direktan i izvedeni (nested) postupak. Za direktan postupak primenjen je par prajmera P1/P7, koji je univerzalan za fitoplazme (sl. 3). Za izvedeni (nested)

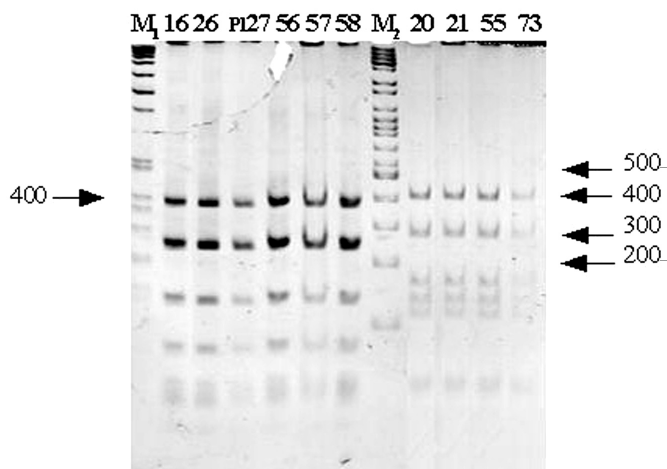


Sl. 3 - 1% agarozna gel elektroforeza nested-PCR produkata umnoženih parom prajmera P1/P7 zatim parom prajmera R16F2n/R16R2, iz uzoraka poreklom iz različitih vinograda u Srbiji i referentni soj fitoplazme FD-C PI 27. H₂O - negativna kontrola; M - Marker, 1kb DNA Ladder (Amersham Biosciences).

Fig. 3 - Electrophoresis on 1% agarose gel of nested-PCR products amplified by P1/P7 primers, according R16F2n/R16R2 primers of grapevine samples from different vineyards in Serbia and reference strain of FD-C PI 27. H₂O - negativ control; M - Marker, 1kb DNA Ladder (Amersham Biosciences).

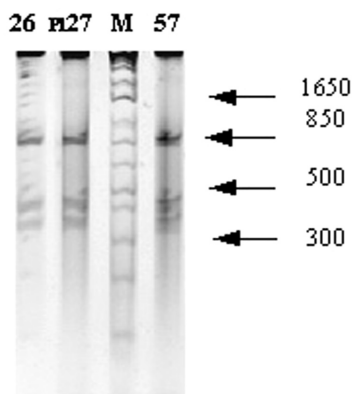
postupak, koji je izvođen po završetku direktne PCR, korišćen je par prajmera R16F2n/R16R2. Primenjenim postupcima dobijen je umnoženi produkt DNK fitoplazme od oko 1200 bp. Taj karakteristični produkt utvrđen je kod većine ispitivanih uzoraka, odnosno čokota vinove loze sa simptomima proučavanih oboljenja, kao i kod kontrolnih uzoraka – standarda. Fragmenti dobijeni nested

PCR-om su obrađeni restrikcionim enzimom *Tru*II (sl. 4). P1/P7 amplifikati pozitivnih uzoraka na FD su obrađivani restrikcionim enzimom *Taq* I, radi utvrđivanja tipa fitoplazme (sl. 5).



Sl. 4 - RFLP analiza nested-PCR produkata umnoženih parom prajmera P1/P7 zatim parom prajmera R16F2n/R16R2, iz uzoraka poreklom iz vinograda u Srbiji. PCR produkti su obrađeni *Tru*II enzimom i razdvojeni elektroforezom na 5% poliakrilamidnom gelu. M₁ – Marker 1Kb Ladder Gibco BRL; M₂ – Marker GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania. P1 27 – Plovdina, pozitivna kontrola.

Fig. 4 - RFLP analysis of nested-PCR products amplified by P1/P7 following by R16F2n/R16R2 of grapevine samples from different vineyards in Serbia. PCR products digested with *Tru*II and separated by electrophoresis through 5% polyacrylamid gel. M₁ – 1Kb Ladder Gibco BRL; M₂ – MarkerGeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania. P1 27 – Plovdina, positiv control.



Sl. 5 - *Taq*I RFLP analiza PCR produkata umnoženih P1/P7 parom prajmera iz uzoraka vinove loze iz Srbije razdvojenih na 5% poliakrilamidnom gelu. M - Marker 1kb plus Gibco BRL ; P1 27 – Plovdina, pozitivna kontrola.

Fig. 5 - *Taq*I RFLP analysis of P1/P7 amplicon of FD detected grapevine samples from Serbia separated on 5% agarose gel. M- Marker 1 kb plus Gibco BRL; P1 27– Plovdina, positiv control.

Upoređivanjem restrikcionog profila umnoženih P1/P7 produkata, dobijenog korišćenjem *TaqI* restrikcionog enzima sa FD-C i FD-D (sl. 5), utvrđeno je da svi naši izolati pripadaju fitoplazmi 16SrV-C soja.

Analiza zaraženosti sorti vrstom fitoplazme, upućuje na činjenicu da u našim uslovima nije dokazano prisustvo fitoplazme BN na sorti Plovidna, kao ni FD na sorti Šardone.

Rezultati naših ispitivanja, obavljenih u periodu od 2003. do 2005. godine, pokazuju da su fitoplazmozna oboljenja na vinovoj lozi prisutna u 22 do 25 istraživanih vinogorja u Srbiji. Duduk i saradnici (2004a, 2006b) su dokazali prisustvo fitoplazmoza na vinovoj lozi u 15 vinogorja Srbije a Krnjajić i saradnici. (2006) otkrili su prisustvo *Scaphoideus titanus* – vektora FD u svim vinogorjima Srbije pa čak i u onim rejonima u kojima nije otkrivena pojava FD, kao što je Vršачko vinogorje. Podatak koji pokazuje da je *S. titanus* prisutan u svim vinogorjima Srbije ukazuje na mogućnost da je fitoplazmoza vinove loze, koju izaziva FD, prisutna u svim vinogorjima u nas.

Naša istraživanja pokazala su, takođe, da je sorta vinove loze Plovdina izuzetno osetljiva prema fitoplazmoznim oboljenjima, na šta je i ranije ukazivano (Kuzmanović i sar., 2003., 2006a). Visoku do srednju osetljivost prema ovim oboljenjima ispoljile su sorte Šardone, Crni burgundac i Frankovka a srednju osetljivost Župljanka, Smederevka i Italijanski rizling. Najmanju osetljivost prema fitoplazmoznim oboljenjima tokom ovih naših istraživanja ispoljila je sorta Prokupac. Slične rezultate navode i Boudon-Padieu (2005), Martelli and Boudon-Padieu (2006), koji su posebno ukazali na izraženu osetljivost sorti Šardone i Crni burgundac na bolesti tipa žutila.

Naša istraživanja pokazuju da su fitoplazmoze vinove loze opšte raširene u nas. Ta oboljenja izazivaju značajne patološke promene na vinovoj lozi, koje za posledicu imaju velike štete u vinogradarskoj proizvodnji, kako su to pokazali drugi istraživači (Martelli and Boudon-Padieu, 2006; Morone et al., 2007; Zahavi et al., 2009). Ta problematika, odnosno štetnost fitoplazmoza vinove loze u nas, biće predmet naših budućih istraživanja.

Rezultati naših istraživanja ukazuju i na izvor i širenje fitoplazmoznih oboljenja na vinovoj lozi u nas. To se veoma dobro vidi na primerima sorata Šardone i Plovdina. Zasadi sorte Šardone podizani su, uglavnom, uveženim sadnim materijalom. U tim zasadima, koji su novijeg datuma, utvrđeno je prisustvo fitoplazmoze poznate pod imenom BN. U starijim vinogradima i vinogradima podignutim sa sadnim materijalom proizvedenim u nas fitoplazmoza BN nije nađena, odnosno nije se u njima proširila. S druge strane, u zasadima sorte Plovdina, koji su podignuti kalemovima proizvedenim u nas (Trsteničko vinogorje), utvrđeno je prisustvo fitoplazmoze poznate pod imenom Flavescence dorée. Ovi podaci upućuju na zaključak da su fitoplazme patogeni vinove loze uneti u našu zemlju

sadnim materijalom i da se, takođe, šire u nas na taj način. Stoga je potrebno da se zdravstvenom stanju kalemova vinove loze posveti posebna pažnja.

LITERATURA

- 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.
- Angelini, A., Squizzato, F., Gianluca, L., Borgo, M. (2004): Detection of a *Phytoplasma* Associated with Grapevine Flavescence dorée in *Clematis vitalba*. *European Journal of Plant Pathology*, 110 (2): 193-201.
- Babović, M., Perišić, M. (1977): Zapažanja o pojavi viroza na vinovoj lozi u nekim vinogorjima Srbije. Savjetovanje o eskoriozi i virusnim bolestima vinove loze, 16-18. novembar, Mostar, 107-115.
- Boudon-Padieu, E. (1999): Grapevine phytoplasmas. First Internet conference on phytopathogenic mollicutes, <http://www.Uniud.it/phytoplasma/pap/boud8290.-html>.
- Boudon-Padieu, E. (2003): The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. Extended Abstracts of 14th Meeting of ICVG, 12-17, September 2003. Locorotondo (Bary), Italy, pp. 47-53.
- Boudon-Padieu, E. (2005): Phytoplasmas associated to Grapevine yellows and potential vectors. *Bulletin O.I.V.*, 2005, vol.78, n° 891-892, pp.311-320.
- Bovey, R., Martelli, G.P. (1992): Directory of major virus and virus-like diseases of grapevine. Description, historical review and bibliography. MFCIC/ICVG, Tunis, 111 pp.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J. Microbial. Meth.* 14:53-61.
- Duduk, B., Ivanović, M., Dukić, N., Botti, S., Bertaccini, A. (2003a): First report of an Elm Yellows, Subgroup 16 Sr V-C *Phytoplasma* Infecting Grapevine in Serbia. *Plant Disease*, 87 (5):599.
- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Dukić, N., Bertaccini, A. (2003b): Molecular characterization of a Flavescence dorée phytoplasma infecting grapevine in Serbia, pp. 91-92. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy).
- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Krstić, B., Dukić, N., Bertaccini, A. (2004a): Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia. *J. Phytopathology* 152, 575-579.

- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Bertaccini, A. (2004b): Stolbur (Bois noir) i European stone fruit yellows fitoplazme na vinovoj lozi u Srbiji. V Congress of Plant Protection, 22-26 November 2004, Zlatibor, Serbia. pp. 134-135.
- Duduk, B., Ivanović, M. (2004c): Fitoplazmoze – žutilo i crvenilo vinove loze. Biljni lekar, (2), 161.
- Duduk, B. (2005): Fitoplazme – patogeni vinove loze u Srbiji. Magistarska teza. 1-57.
- Duduk, B., Ivanović, M. (2006a): Fitoplazme vinove loze. Biljni lekar, (2), 105-111.
- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Bertaccini, A. (2006b): Status of grapevine yellows in Serbia. Extended Abstracts of the 15th Meeting of ICVG, 3-7 April 2006, Stellenbosch, South Africa, pp.193-194.
- Ivanović, M., Ivanović, D. (2000): Pojava simptoma sličnih fitoplazmozama na vinovoj lozi u Kruševačkom vinogorju. XI jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 4-9. decembar 2000. godine, Zbornik rezimea: 42.
- Jevremović, D., Paunović, S. (2005): Rezultati praćenja *Flavescence dorée* u matičnim zasadima vinove loze. VII savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar 2005, Zbornik rezimea: 91.
- Jošić, D., Kuzmanović, S., Stajković, O., Stojanović, S., Aleksić, G., Starović, M. (2005): PCR detection of *Grapevine Phytoplasma* in Serbia. 4th Balkan Conference of Microbiology, Microbiologia Balkanica, Abstracts, O7.2, Bucharest, Romania, 2005., 23-26.
- Jošić, D., Kuzmanović, S., Stojanović, S., Aleksić, G., Starović, M. (2006): Grapevine yellows of *Vitis vinifera* cv. Plovdina from various vineyards in Serbia. 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, 4-8 July, 2006, Madrid, Spain, Abstracts book, 291.
- Krnjajić, S., Mitrović, M., Cvrković, T., Milićević, J., Toševski, I. (2006): Rasprostranjenje *Scaphoideus titanus* Ball (Auchenorrhyncha, Cicadellidae) vektora fitoplazme vinove loze *Flavescence dorée*. VIII savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 27. novembar – 1. decembar 2006, Zbornik rezimea: 116-117.
- Kuzmanović, S. (1986): Žutilo na vinovoj lozi (neobjavljeni podaci).
- Kuzmanović, S., Starović, M., Tošić, M., Stojanović, S., Tomić, T. (2002): Elektronsko-mikroskopska detekcija fitoplazme vinove loze u Srbiji. Zaštita bilja, Vol. 53 (2-3), Br. 240-241, 75-86, (štampano 2005).
- Kuzmanović, S., Starović, M., Tošić, M., Stojanović, S., Tomić, T. (2003): Phytoplasmas on grapevine in Serbia, p. 93-94. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy).
- Kuzmanović, S., Martini, M., Ferrini, F., Ermacora, P., Starović, M., Tošić, M., Osler, R. (2004): Stolbur i *Flavescence dorée* fitoplazme prisutne na vinovoj lozi u Srbiji. V Kongres zaštite bilja, Zlatibor, 22-26 novembar 2004. Zbornik rezimea, 138-139.

- Kuzmanović, S., Osler, R., Tošić, M., Martini, M., Starović, M., Stojanović, S., Aleksić, G. (2006a): Grapevine cv. Plovdina as indicator of Flavescence dorée. Extended Abstracts of 15th Meeting of ICVG, 3-7, April 2006, Stellenbosch, South Africa, pp. 99-99a.
- Kuzmanović, S., Ivanović, Ž., Starović, M., Živković, S., Jošić, D. (2006b): Sorte vinove loze domaćini Flavescence dorée fitoplazme u Srbiji. VIII savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24. novembar - 1. decembar 2006., Zbornik rezimea, 103-104.
- Kuzmanović, S. (2007): Fitoplazmoze vinove loze u Srbiji. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, 1-84.
- Kuzmanović, S., Martini, M., Ivanović, Ž., Jošić, D., Živković, S., Starović, M. (2007): Detection and incidence of FD and BN phytoplasmas in vineyards of different grapevine cultivars in Serbia. Bulletin of Insectology, Vol. LX (2) Dec. 2007, pp. 371-372. Published by: Department of Agroenvironmental Sciences and Technologies *Alma Mater Studiorum* University of Bologna ISSN 1721-8861.
- Kuzmanović, S., Martini, M., Ermacora, P., Ferrini, F., Starović, M., Tošić, M., Carraro, L., Osler, R. (2008a): Incidence and molecular characterization of Flavescence dorée and stolbur phytoplasmas in grapevine cultivars from different viticultural areas of Serbia. *Vitis* 47 (2), pp. 105-111.
- Kuzmanović, S., Starović, M., Ivanović, Ž., Aleksić, G., Stojanović, S., Živković, S., Gavrilović, V. (2008b): Rasprostranjenost fitoplazmoza vinove loze u Srbiji. XXIII Savetovanje o unapređenju proizvodnje voća i grožđa, Grocka, 25. jul 2008. Zbornik naučnih radova, Beograd, Vol. 14. (5), 121-128.
- Lee, I.-M., Martini M., Bottner K.D., Dane R.A., Black M.C., Troxclair N. (2003): Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93: 1368-1377.
- Malisano, G., Firrao, G., Locci, R. (1996): 16S rDNA-derived oligonucleotide probes for the differential diagnosis of plum leptonecrosis and apple proliferation phytoplasmas. *EPPO Bulletin*, 26: 421-428.
- 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*, p.297.
- Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casati, P., Bianco, P.A., Benedetti, R., Bertaccini, A. (2002): Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes* 16:197-208.
- Milosavljević, D. (1999): Poljoprivredna stanica, Kruševac (lična komunikacija).
- Morone, C., Boveri, M., Giosuè, S., Gotta, P., Rossi, V., Scapin, I., Marzachi, C. (2007): Epidemiology of Flavescence Dorée in Vineyards in Northwestern Italy. *Phytopathology*, 97(11):1422-1427.

- Osler, R. (2004): Department of «Biologia Applicata alla Dipesa delle Piante», University of Udine, Italy (lična komunikacija).
- Pešić, R. (1997): „Rubin“, Kruševac (lična komunikacija).
- Schneider, B., Seemüller E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C. (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In: Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Vol. 2 pp 369-380. Edited by S. Razin and J.G. Tully, Academic Press, New York.
- Zahavi, T., Sharon, R., Mawassi, M., Naour, V. (2009): Long term effects of stolbur phytoplasma on grapevines in Israel. Extended abstracts 16th Meeting of OCVG, Dijon, France, 31.Aug-4Sept 2009, 147-148.

(Primljeno: 08.12.2009.)

(Prihvaćeno: 15.01.2009.)

WIDESPREAD OF GRAPEVINE PHYTOPLASMAS DISEASE IN SERBIA

SLOBODAN KUZMANOVIĆ¹, DRAGANA JOŠIĆ², MIRA STAROVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹,
NENAD TRKULJA¹, NENAD DOLOVAC¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹

1 Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

2 Institute for Soil Science, Belgrade, Serbia

SUMMARY

The widespread of phytoplasmas of the grapevine in Serbia was investigated from 2003 to 2005. A total of 505 vineyards were examined in 25 vineyard areals. According to results geographical distribution of phytoplasmas in vineyards in Serbia was obtained, as well as the disease severity and types of pathogens that were identified. Phytoplasmas presence has been proved in 22 of 25 vineyards areals, and in 354 of 505 observed vineyards. Incidence of phytoplasmas were registered in the vines of all varieties observed and tested, but in unequal severity. High level of infection of vine (in some cases over 50%) was found in vineyard areals of Sićevo, Župa, Trstenik and Negotin. On the other hand, phytoplasmas were not found or not proved in areals of Pocerško, Prokupačko and Ražanjško.

The high severity were detected at vine cvs. Plovdina (90%) and Chardonnay (67%), medium at cvs. Župski bojadiser (34%), Frankovka (29%) and Smederevka (27%), low at Black Burgundy (20%), Rhine Riesling (18%) and Italian Riesling (9%), and in trace at cv. Prokupac (4%).

The presence of two phytoplasmas were proved by PCR: »*Candidatus* Phytoplasma vitis« (Flavescence dorée - FD) and »*Candidatus* Phytoplasma solani« (Bois noir - BN). It was proved that »*Candidatus* Phytoplasma vitis« in Serbia belongs to 16SrV-C strain.

Key words: grapevine, phytoplasmas, identification, FD, BN, distribution and the region of Serbia.

(Received: 08.12.2009.)

(Accepted: 15.01.2009.)