

IDENTIFICACIÓ I EPIDEMIOLOGIA DE FITOPLASMAS DE LA VINYA A CATALUNYA

La Viña, A., Batlle, A.,

*Departament de Patologia Vegetal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA).
08348 CABRILS. Barcelona.*

Durant els darrers anys s'han observat símptomes similars als produïts per fitoplasmes en diferents àrees vitícoles de Catalunya. Per a la seva identificació es va utilitzar la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Es va realitzar la amplificació d'un fragment de 880 pb del gen 16S rDNA comú a la majoria de fitoplasmes coneguts. En totes les prospeccions realitzades durant els anys 1994 i 1995 només es va identificar el fitoplasma que produeix la malaltia del *Bois Noir* (BN). Durant 1996 s'han identificat parcel·les amb un elevat índex de plantes amb símptomes de fitoplasmes a l'Alt Empordà. En una de les parcel·les afectades per el BN es va fer un seguiment de la evolució de la incidència d'aquesta malaltia durant tres anys i de la distribució espacial de la mateixa. Els resultats obtinguts mostren que la malaltia evoluciona des de una situació agregada a una al atzar.

INTRODUCCIÓ

En prospeccions realitzades a diferents àrees vitícoles de Catalunya per a la identificació de fitoplasmes es varen observar plantes amb símptomes similars als produïts per aquests patògens. Els símptomes que s'observaren foren enrotllament de les fulles que prenen color groc o vermellós segons les varietats, necrosis internerval de les fulles. Reducció del creixement de la planta i mort en alguns casos. El símptoma més característic es la falta de lignificació a les tiges quan arriba la tardor. Els fruits es marceixen o no arriben a formarse. Els símptomes apareixen a la soca de forma irregular, afectant primer a una part de la planta i en anys consecutius a la resta i s'observen amb claredat al final de l'estiu i començaments de tardor.

Les malalties produïdes per fitoplasmes en vinya han estat descrites a molts països com França, Itàlia, Alemanya, EEUU i Austràlia (Caudwell, 1990 i Osler et al. 1992). De totes elles les més greus son la *Flavescencia daurada* (FD) i el *Bois Noir* (BN). Encara que les dues malalties produeixen símptomes semblants a les vinyes afectades, la gravetat del BN es menor, ja que la disseminació de la malaltia es més lenta. El fitoplasma associat a la malaltia del *Bois Noir* ha estat recentment associat als fitoplasmes del grup stolbur. Aquests fitoplasmes poden trobar-se a gran quantitat de espècies vegetals tant herbàcies com llenyoses. Per aquest motiu es pensa que el BN no es transmet vinya a vinya sinó que es possible que passi per hostes intermediaris, amb el que la disseminació es més lenta. A més el vector de la FD el cicadeliid *Scaphoideus titanus* no es capaç de transmetre el BN. Per aquest darrer fitoplasma només ha estat citat el cicadeliid *Hyalestes obsoletus* com a vector de la malaltia a Alemanya (Maixner, 1994).

En aquest treball es presenta el resultat de les prospeccions realitzades durant els anys 1994, 1995 i 1996 a les comarques de l'Alt Empordà, Conca del Barberà, Penedès i El Segrià. També es presenta la evolució en la incidència de plantes afectades per el fitoplasma associat al BN en una parcel·la de Poblet (Conca de Barberà), així com la seva distribució a la parcel·la. El coneixement de la evolució de la distribució espacial pot ajudar a esbrinar els mecanismes de disseminació de la malaltia i poder establir unes mesures de control.

Per altra banda s'ha avaluat la eficàcia de les tècniques de detecció per a la identificació del fitoplasma associat al BN. S'han comparat els resultats obtinguts amb la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i amb la tècnica serològica ELISA utilitzant un antiserum per el stolbur, grup al que pertany el BN.

MATERIAL I MÈTODES

Durant el mes de juny de 1994 es varen prospectar les comarques del Alt Empordà, del Penedès, de la Conca del Barberà i del Segrià amb la finalitat de identificar si estava present en el nostre país el vector de la FD, el cicadèlid *S.titanus*.

Durant els mesos de setembre i octubre de 1994, 1995 i 1996 es varen prospectar les mateixes comarques, on es varen prendre mostres de les plantes amb símptomes. Per determinar si el agent causant dels símptomes era un fitoplasma, les mostres es varen analitzar mitjançant la tècnica de reacció en cadena de la polimersa (PCR). Es varen utilitzar els iniciadors U3-U5 (Ahrens et al. 1994), per la amplificació d'un fragment de 880 pb del gen 16S rDNA comú a la majoria de fitoplasmes coneguts i iniciadors específics per la determinació dels fitoplasmes del grup stolbur (Daire, no publicat). La extracció i realització de la tècnica es va fer seguint la metodologia de Ahrens i Seemüller (1992) i Daire et al. (1993). La amplificació es va verificar mitjançant electroforesis en gel de agarosa 1,5%.

Per tal de poder realitzar la classificació dels fitoplasmas, a 10 ml del DNA amplificat amb els iniciadors U3-U5 s'els va aplicar l'enzim de restricció *Alu I*. Els fragments obtinguts mitjançant la digestió es varen analitzar mitjançant electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

L'estudi de la evolució de la incidència i distribució de la malaltia es va realitzar en una parcel·la de vinya de la varietat cv.Chardonnay. En aquesta parcel·la es va delimitar una subparcel·la de 500 plantes (20 columnes per 25 plantes en cada columna). Durant tres anys consecutius s'ha anotat la posició de totes i cadascuna de les plantes que manifestaven símptomes de la infecció per fitoplasmes i positives en l'anàlisi de *Bois Noir*, mitjançant la tècnica de la PCR, tal com s'ha indicat anteriorment. Els índex de agregació de Lloyd (LIP) s'han determinat mitjançant el programa PATCHY (Maixner, 1993).

Per la posta a punt de la tècnica ELISA es varen estudiar diferents factors com època de recollida de mostres, material vegetal, mètodes d'extracció i tamps. Com a mètode d'extracció s'han assajat la homogenització amb polytron i amb morter i la difusió de petits fragments de material vegetal en un tampó adequat. Els tamps utilitzats varen ésser MGB, pH 7,6, K_2HPO_4 0,1M, KH_2PO_4 0,03M, sacarosa 0,3M i 2% PVP y TRIS-ClH 0,5M, pH 8,2 amb 2% PVP.

RESULTATS

El vector de la FD, *S.titanus*, es va trobar a totes les plantacions i en nombre bastant elevat, 5-7 individus per fulla. Aquest cicadèlid es troba a la part basal de la planta i a les fulles ombrejades i més fresques de la mateixa.

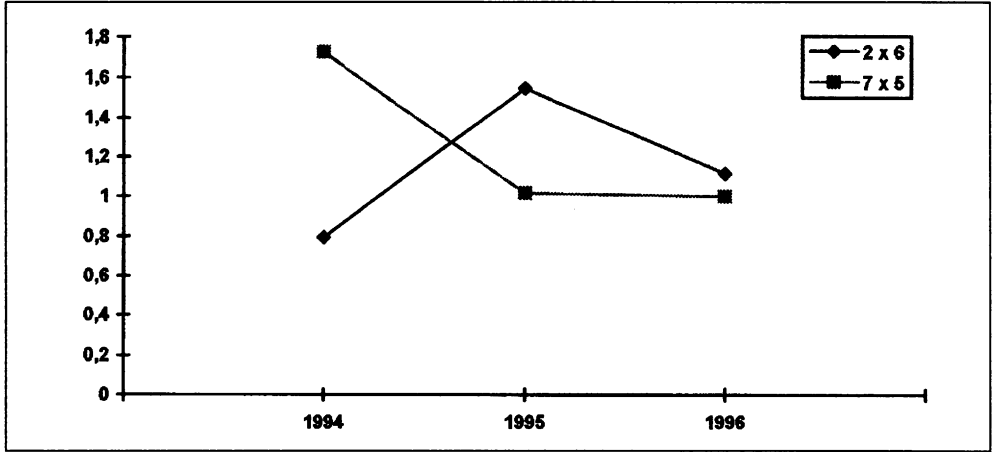
En les prospeccions realitzades durant 1994 i 1995, es varen observar plantes amb símptomes a una parcel·la del Penedès, una de la Conca de Barberà i una del Segrià. En totes les mostres recol·lectades es va determinar únicament el fitoplasma associat al *BN* de la vinya. La incidència a una d'aquestes parcel·les és actualment del 14%. Recentment, setembre de 1996, s'han localitzat però, a l'Alt Empordà, parcel·les de vinya afectades per fitoplasmes amb uns elevats percentatges de incidència (50-80%). En totes les mostres amb símptomes i analitzades amb la tècnica de la PCR, s'ha detectat la banda corresponent al gen 16S rDNA de la majoria de fitoplasmes, estant pendent la seva classificació.

Al any 1994 la incidència a la parcel·la on es realitza l'estudi epidemiològic era del 3,4%. Es va determinar que la distribució de plantes malaltes es presentava agregada amb un índex de Lloyd significatiu de 1,727 (Gràfica 1). A l'any 1995 la incidència havia augmentat a un 7,20% apareixent nous focus de infecció de 12 plantes amb un índex de Lloyd de 1,548 (Gràfica 1). Al 1996 la incidència ha estat del 14% de plantes malaltes i ha augmentat la mida dels focus de infecció (Gràfica 2). S'ha determinat que existeix un gradient significatiu de la malaltia que segueix un model exponencial al llarg de les files agronòmiques des de la soca 1 a la soca 25. Es presenta una disminució dels índex d'agregació, el que indica una evolució de la malaltia des de una situació agregada a una a l'atzar.

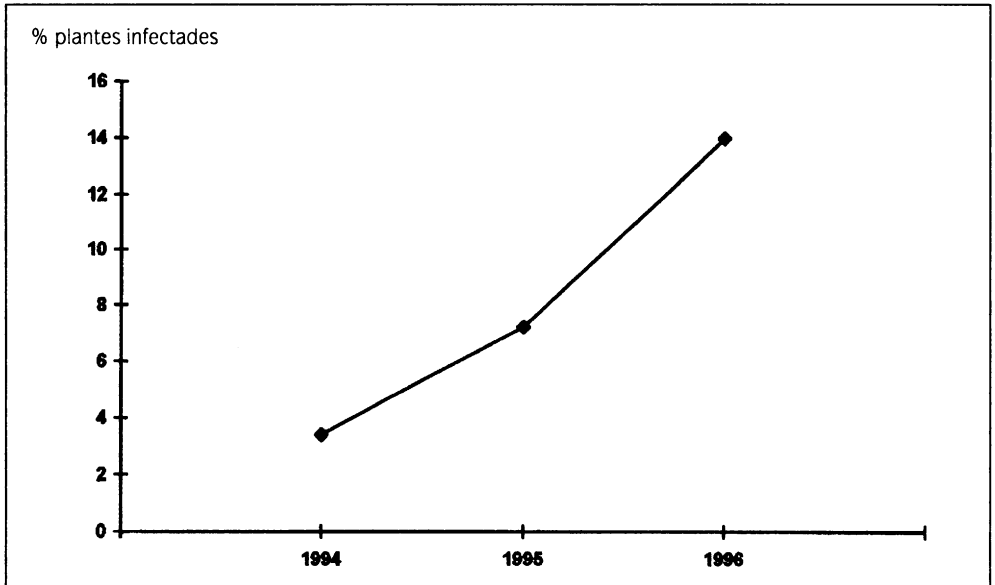
Els millors resultats amb la tècnica ELISA es varen obtenir en mostres recollides durant els mesos de

setembre-octubre i utilitzant com material vegetal els nervis principals de la fulla. El tampó MGB va donar millors resultats que el TRIS. La tècnica de la PCR es més sensible i permet la detecció en un període més ampli de temps des de juny fins novembre. La tècnica ELISA podria utilitzar-se en prospeccions a gran escala per determinar la incidència de la malaltia en parcel·les on prèviament s'hagin determinat plantes positives mitjançant la PCR i utilitzant uns bons controls tant positius com negatius.

Gràfica 1. Evolució del índex de agregació de Lloyd (LIP) els anys 1994, 1995 i 1996 per a nuclis de infecció de 12 plantes i de 35 plantes.



Gràfica 2. Evolució del percentatge de plantes malaltes durant tres anys a una parcel·la de 500 plantes de la cv. Chardonnay.



CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts ens alerten sobre dues qüestions, en primer lloc la presència generalitzada del vector de la *FD*, *S. titanus*, en totes les finques prospectades, representa un perill per la difusió de la *FD* en cas de que aquesta fos detectada en el nostre país. La expansió d'aquesta malaltia es molt ràpida, en el Rousillon (França) va passar de 60 Ha al 1991 a 20000 Ha al 1993. (Informació de la Cambra Agrària dels Pirineus Orientals).

La presència de *BN* sembla menys preocupant, ja que tant a França com a les parcel·les de Catalunya on s'ha detectat fins ara, la expansió de la malaltia es lenta. De totes maneres en prospeccions realitzades a altres indrets (Navarra) s'han localitzat parcel·les amb uns alts índex de *BN* (Batlle i Laviña, no publicat), per el que es pensa que en segons quines zones podria haver vectors més eficients. Actualment el nostre equip esta portant a terme estudis epidemiològics en diferents zones, que comprenen identificació de vectors, identificació d'hostes alternatius i els estudis de distribució i disseminació de plantes malaltes, ja esmentats en els resultats.

Els únics mètodes de control a aplicar son la utilització de material vegetal sa i el control del insecte vector. En la propagació del material vegetal és molt important verificar que el material de partida es sa o be realitzar tractaments preventius de termoteràpia, si es sospita que poden haver plantes mares infectades. Els tractaments preventius de termoteràpia es realitzen submergint les plantes amb aigua calenta, un dels més eficaços es el tractament de 50°C durant 45 minuts. El control del vector *S. titanus* es realitza mitjançant tractaments fitosanitaris en el moment adequat. S'aconsella un primer tractament larvicida un mes després de l'eclosió dels ous i un segon tractament després del període de permanència del primer. *S. titanus* es infectiu després d'un període de latència de 40 dies, a partir de la adquisició del fitoplasma.

BIBLIOGRAFIA

AHRENS, U. i SEEMÜLLER, E. 1992. Detection of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.

AHRENS, U., LORENZ, K.H., KISON, H., BERGES, R., SCHNEIDER, B. i SEEMÜLLER, E. 1994. Universal, cluster-specific and pathogen-specific PCR amplification of 16S rDNA for detection and identification of mycoplasmalike organisms. 10 th International Congress of the international organization for mycoplasmaology (IOM), Burdeos (Francia).

CAUDWELL, A. 1990. Epidemiology and characterization of Flavescence dorée (FD) and other grapevine yellows. *Agronomie* 10:655-663

DAIRE, X., CLAIR, D., LARRUE, J., BOUDON-PADIEU, E. i CAUDWELL, A. 1993. Diversity among mycoplasma-like organisms inducing grapevine yellows in France. *Vitis* 32: 159-163.

MAIXNER, M. 1993. PATCHY. Ein Programm zur Analyse räumlicher Verteilungsmuster von Rebkrankheiten. *Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd* 45 < . 157-164

MAIXNER, M. 1994. Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalestes obsoletus* (Auchenorrhyncha:Cixiidae). *Vitis* 33:103-104.

OSLER, R., BOUDON-PADIEU, E., CARRARO, A., CAUDWELL, A. y REFATTI, E. 1992. First results on the trials in progress to identify the vector of the agent of a Grapevine yellows in Italy. *Phytopath. medit.* 31: 175-181.