

УДК 579.25:632.35:634.8.03/.05

Н.В. Ліманська<sup>1</sup>, В.О. Іваниця<sup>1</sup>, А.Г. Гаврик<sup>1</sup>, Ж.Ю. Сергеева<sup>1</sup>,  
Ф.І. Товкач<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,  
Одеса, 65082, Україна, e-mail: limanska@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

## ВПЛИВ БАКТЕРІОЦИНІВ *RHIZOBIUM VITIS* НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ УТВОРЕННЯ ПУХЛИН У РОСЛИН

Показано, що бактеріоцини 25% досліджених штамів *Rhizobium vitis*, виділених з рослин винограду півдня України, спричиняють *in vitro* лізис бактерій збудників бактеріального раку штаму *Rhizobium radiobacter* C58. Застосування бактеріоцинів трьох досліджених штамів *Rhizobium vitis in vivo* на тест-рослинах каланхое і зелених чубуках винограду значно пригнічує експериментальне утворення пухлин.

Ключові слова: бактеріоцини, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, бактеріальний рак винограду.

Перспективним напрямком захисту рослин, який активно розробляється, є використання бактеріоцинів — речовин, що діють проти бактерій близькоспоріднених штамів [7]. У боротьбі з бактеріальним раком плодів широко відомим є використання агроцину — бактеріоцину, що синтезується штамом *Rhizobium rhizogenes* K84 (*Agrobacterium radiobacter* K84) [10], на основі якого виготовляються біологічні препарати [6]. Даний бактеріоцин, однак, не є дієвим щодо захисту винограду, на якому бактеріальний рак спричиняють *R. vitis* і *R. radiobacter* [4]. Показано, що антагоністичними речовинами, які можуть застосовуватися для захисту винограду, є бактеріоцини, що продукуються штамми *R. radiobacter* HLB-2, *R. vitis* E26 [4, 9]. Оскільки бактеріальний рак спричиняє значні економічні збитки виноградарям України [3], необхідним є пошук продуцентів бактеріоцинів серед місцевих штамів та оцінка можливості їх використання як агентів біологічного захисту рослин. У попередніх дослідженнях нами було вивчено перехресну дію бактеріоцинів штамів збудників бактеріального раку, виділених з рослин винограду півдня України [2]. Метою даної роботи було виявлення штамів-продуцентів бактеріоцинів, активних проти високовірулентного штаму *R. radiobacter* C58.

© Н.В. Ліманська, В.О. Іваниця, А.Г. Гаврик, Ж.Ю. Сергеева, Ф.І. Товкач, 2010



### Матеріали і методи дослідження

Матеріалом дослідження були 20 штамів збудників бактеріального раку, виділених з рослин винограду сорту Каберне Совіньон двох виноградників Одеської області у 2008 та 2010 роках. Ідентифікацію та визначення патогенності штамів здійснювали за допомоги полімеразної ланцюгової реакції [3]. Виявлення бактеріоциногенної активності штамів та отримання бактеріоцинів проводили згідно методу, описаному раніше [2]. Як тест-штам для експериментального утворення пухлин застосовували *R. radiobacter* C58.

Проводили зараження рослин каланхое *Kalanchoe daigremontiana* Mill. [1] та зелених чубуків винограду *Vitis vinifera* L. сорту Піно чорний [8]. Зараження здійснювали у трьох повторностях. На листі каланхое робили надрізи завдовжки 2 см, наносили 100 мкл надосадової рідини, яка містила неочищені бактеріоцини, а через 10–15 хвилин проводили зараження суспензією клітин штаму *R. radiobacter* C58 у концентрації  $1 \cdot 10^8$  КУО/мл. У контролі замість бактеріоцинів наносили 100 мкл стерильної дистильованої води. Раневі поверхні обгортали вологою ватою та парафільмом на 7 днів, а потім пов'язки знімали. Облік результатів зараження проводили через 30 днів після зараження.

Зелені чубуки винограду стерилізували. Спочатку мили під проточною водою з детергентом, потім витримували 3 хвилини у 1% розчині хлороталонілу (фунгіцид «Браво»), 30 сек у 70° спирті, у стерильній дистильованій воді промивали 3 рази по 3 хвилини. Чубуки поміщали у склянки зі стерильним голодним агаром (0,8%). Зараження проводили так само, як і для рослин каланхое, за виключенням того, що раневими поверхнями слугували проколи стерильною голкою поверхні зрізу міжвузля чубука, а місце зараження не обгортали парафільмом і ватою. Облік результатів проводили через 21 день, оцінюючи розміри пухлин за наступною шкалою: «++++» — добре виражене пухлиноутворення по усій раневій поверхні; «+++» — пухлиноутворення на більшій частині раневої поверхні; «++» — пухлини присутні на половині і менше від площі раневої поверхні; «+» — на раневій поверхні присутні окремі точкові ділянки пухлиноутворення; «—» — відсутність пухлиноутворення.

### Результати досліджень та їх обговорення

Із 20 досліджених штамів збудників бактеріального раку бактеріоциногенну активність щодо *R. radiobacter* C58 проявили 5 штамів (табл. 1). Бактеріоцини штамів *R. vitis* 1к, *R. vitis* 5к, *R. vitis* 7к, *R. vitis* 11к і *R. vitis* 29д лізували клітини *R. radiobacter* C58. Діаметр зон лізису складав від 0,6 до 1,9 см.

Отримані результати вказують на те, що антагоністичні речовини штамів збудників бактеріального раку, виділених з одного регіону, мають різний спектр дії і відрізняються за здатністю до лізису клітин певних штамів. На відміну від виду *R. vitis* з вузьким колом рослин-господарів



[4], штами виду *R. radiobacter* уражують велику кількість дводольних рослин [1]. Так, штам *R. radiobacter* С58 було первинно виділено з вишні [5]. Саме тому отримані нами дані є перспективними для розробки біопрепаратів не тільки для захисту винограду [2], а й для боротьби зі збудниками бактеріального раку на інших рослинах.

Таблиця 1

Чутливість штаму *R. radiobacter* С58 до бактеріоцинів із збудників бактеріального раку

Table 1

Sensitivity of *R. radiobacter* С58 strain to bacteriocins of crown gall agent strains

Штам-продуцент	Наявність зон лізису	Штам-продуцент	Наявність зон лізису
<i>R. vitis</i> 1к	+*	<i>R. vitis</i> 1д	—
<i>R. vitis</i> 5к	+	<i>R. vitis</i> 2д	—
<i>R. vitis</i> 6к	—**	<i>R. vitis</i> 3д	—
<i>R. vitis</i> 7к	+	<i>R. vitis</i> 4д	—
<i>R. vitis</i> 8к	—	<i>R. vitis</i> 5д	—
<i>R. vitis</i> 9к	—	<i>R. vitis</i> 29д	+
<i>R. vitis</i> 11к	+	<i>R. vitis</i> 31д	—
<i>R. vitis</i> 13к	—	<i>R. vitis</i> 33д	—
<i>R. vitis</i> 14к	—	<i>R. vitis</i> 48д	—
<i>R. vitis</i> 15к	—	<i>R. vitis</i> 49д	—

Примітка: \* — наявність лізису клітин *R. radiobacter* С58, \*\* — відсутність зони лізису.

Для зараження тест-рослин були обрані штами, бактеріоцини яких давали найбільші діаметри зон лізису, а саме — штами *R. vitis* 5к, *R. vitis* 7к, *R. vitis* 11к і *R. vitis* 29д. Результати зараження рослин каланхоє представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив бактеріоцинів на утворення пухлин *R. radiobacter* С58 на каланхоє

Table 2

Bacteriocin effect on tumour formation by *R. radiobacter* С58 on kalanchoe

Штам-продуцент бактеріоцину	Пухлиноутворення (у трьох повторностях)		
Контроль*	++++	++++	++++
<i>R. vitis</i> 5к	++++	++++	++++
<i>R. vitis</i> 7к	+	—	+
<i>R. vitis</i> 11к	—	±	—
<i>R. vitis</i> 29д	+	+	—

\* — замість бактеріоцинів вносили стерильну дистильовану воду



Як видно з наведених даних, бактеріоцини штаму *R. vitis* 5к, дієві *in vitro* проти клітин *R. radiobacter* C58, були нездатними до пригнічення експериментального утворення пухлин на раневих поверхнях рослин каланхое. Бактеріоцини решти продуцентів значно пригнічували процес утворення пухлин, особливо бактеріоцини штаму *R. vitis* 11к, після обробки якими лише у одному повторі спостерігалася одинична горбкуватість, що могла бути наслідком розростання калусу. В інших повторах рана поверхня залишалась без змін (рис.).



Рис. Зовнішній вигляд місць інфікування каланхое *Kalanchoe daigremontiana* Mill. бактеріями штаму *R. radiobacter* C58:

- 1 — без застосування бактеріоцинів;  
2 — з попередньою обробкою бактеріоцинами штаму *R. vitis* 11к.

Fig. Surfaces of *Kalanchoe daigremontiana* Mill. inoculated with *R. radiobacter* C58 bacteria:

- 1 — without bacteriocin treatment; 2 — precede treatment with *R. vitis* 11к strain bacteriocins.

У подальших дослідженнях бактеріоцини штамів *R. vitis* 7к, *R. vitis* 11к і *R. vitis* 29д були використані для обробки зелених чубуків винограду (табл. 3).

Таблиця 3  
Вплив бактеріоцинів на утворення пухлин на зелених чубуках винограду

Table 3  
Bacteriocin effect on tumour formation on grapevine green cuttings

Штам-продуцент бактеріоцину	Пухлиноутворення (у трьох повторностях)		
контроль*	++	++	+
<i>R. vitis</i> 7к	—	—	—
<i>R. vitis</i> 11к	—	—	—
<i>R. vitis</i> 29д	—	—	—

\* — замість бактеріоцинів вносили стерильну дистильовану воду

При зараженні зелених чубуків винограду пухлиноутворення загалом проявляється не так виразно, як при застосуванні цілої рослини, але дозволяє отримати швидкий результат і тому широко застосовується при тестуванні штамів-антагоністів [8]. Результати наших досліджень показали повну відсутність пухлиноутворення на зелених чубуках винограду під впливом бактеріоцинів досліджених штамів.

Отримані дані свідчать про перспективність використання досліджених штамів-продуцентів бактеріоцинів при створенні біологічних препаратів для захисту рослин від бактеріального раку. Крім того, актуальним постає подальший пошук продуцентів з подібними антагоністичними властивостями серед штамів *R. vitis*, виділених на півдні України.

*Робота виконувалась у рамках проекту Міністерства освіти і науки України № НУ/448-2009 від 06.07.2009.*

## ЛІТЕРАТУРА

1. Байдербек Р. Опухоли растений: Пер. с нем. — М.: Колос, 1981. — С. 114.
2. Лиманская Н.В., Иваница В.А., Сергеева Ж.Ю., Товкач Ф.И. Бактериоциногенная активность штаммов *Rhizobium vitis* и *Pantoeae agglomerans*, выделенных из растений винограда // Микробиол. і біотехн. — 2009. — Т. 8, № 4. — С. 26–32.
3. Мілкус Б.Н., Конуп Л.О., Жунько І.Д., Ліманська Н.В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковузля та скручування листя // Микробиол. журн. — 2005. — Т. 67, № 1. — С. 41–48.
4. Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — Vol. 37. — P. 53–80.
5. Goodner B., Hinkle G., Gattung S., Miller N. et al. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58 // Science. — 2001. — Vol. 294. — P. 2323–2327.
6. Kerr A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84 // Plant Dis. — 1980. — Vol. 64. — P. 25 – 30.
7. Lavermicocca P., Lonigro S.L., Valerio F., Evidente A., Visconti A. Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* // Appl. Environm. Microbiol. — 2002. — Vol. 68, № 3. — P. 1403–1407.
8. Pu X. — A., Goodman R.N. Tumour formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grapevine plants // Am. J. Enol. Vitic. — 1993. — Vol. 44, № 3. — P. 249–254.
9. Wang H.M., Wang H.X., Ng T.B., Li J.Y. Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis*



- strain E26 with activity against *A. tumefaciens* // Plant Pathol. — 2003. — Vol. 52. — P. 134–139.
10. Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajude et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis* // Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2001. — 51. — P. 89–103.



Н.В. Лиманская<sup>1</sup>, В.А. Иваница<sup>1</sup>, А.Г. Гаврик<sup>1</sup>, Ж.Ю. Сергеева<sup>1</sup>,  
Ф.И. Товкач<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,  
Одесса 65082, Украина; e-mail: limanska@gmail.com

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

## ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ *RHIZOBIUM VITIS* НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ У РАСТЕНИЙ

### Реферат

Показано, что бактериоцины 25% исследованных штаммов *Rhizobium vitis*, выделенных из растений винограда юга Украины, вызывают *in vitro* лизис бактерий возбудителей бактериального рака штамма *Rhizobium radiobacter* C58. Применение бактериоцинов трех исследованных штаммов *Rhizobium vitis* *in vivo* на тест-растениях каланхое и зеленых черенках винограда значительно угнетает образование опухолей в эксперименте.

Ключевые слова: бактериоцины, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, бактериальный рак винограда.

N.V. Limanska<sup>1</sup>, V.O. Ivanytsia<sup>1</sup>, A.G. Gavryk<sup>1</sup>, Zh.Yu. Sergeeva<sup>1</sup>,  
F.I. Tovkach<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Odesa National I.I. Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,  
Ukraine, e-mail: limanska@gmail.com

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,  
154, Academic Zabolotny str., Kyiv, D03680, Ukraine

## EFFECT OF *RHIZOBIUM VITIS* BACTERIOCINS ON EXPERIMENTAL TUMOUR FORMATION IN PLANTS

### Summary

Bacteriocins of 25% of investigated *Rhizobium vitis* strains isolated from grapevines in southern Ukraine caused *in vitro* lysis of crown gall agents of *Rhizobium radiobacter* C58 strain. Treatment with bacteriocins from three *R. vitis* strains *in vivo* on test-plants kalanchoe and grapevine green cuttings lead to significant decrease in tumour formation.

Key words: bacteriocins, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, crown gall of grapevine.

