

УДК 632.35:634.8.03/.05

А. Г. Мерлич, Д. В. Халахурда, Н. В. Ліманська
ЧИСЕЛЬНІСТЬ ЕНДОФІТНОЇ МІКРОБІОТИ У ЧУБУКАХ
ВИНОГРАДУ

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул.
Дворянська, 2, 65082, Одеса, e-mail: limanska@gmail.com

Merlich A. G., Khalakhurda D. V., Limanska N. V. Population density of endophytic microbiota in grapevine cuttings.

Experimental infection with pathogenic agrobacterial strain resulted in increasing of general population density of microbiota. Bacteria from *Agrobacterium tumefaciens* C58 strain migrated in vessels through the all length of the cuttings (21 - 37 cm), but the main quantity of bacteria retained in the lowest part.

Key words: *Agrobacterium*, grapevine, endophytic microbiota

Вступ. Бактеріальний рак винограду - поширене захворювання, яке призводить до значних втрат виноградарства багатьох країн світу [3]. Збудниками бактеріального раку є *Agrobacterium vitis*/*Rhizobium vitis* [8], а в деяких випадках - *Agrobacterium tumefaciens*/*R. radiobacter* (Conn 1942) [2, 4]. Концентрація пухлиноутвірних агробактерій у судинах інфікованого винограду за даними різних авторів складає від 4×10^2 кл/мл [7] до $15,4 \times 10^3$ кл/мл [5]. Необхідним постає вивчення чисельності мікробіоти у винограді місцевих сортів, а також створення моделі для застосування біологічних препаратів.

Метою роботи було виявлення чисельності представників ендofітної мікробіоти у чубках винограда за штучного інфікування збудниками бактеріального раку.

Матеріал і методи дослідження. Для тестування на винограді у березні 2011 року були відібрані чубуки *Vitis vinifera* L. сорту Восторг. Чубуки були оброблені добової культурою *Agrobacterium tumefaciens* C58 у концентрації $2,0 \times 10^8$ КУО/мл.

Чубуки зі щойно зрізаними базальними кінцями, які замочували на 15 хвилин в агробактеріальній суспензії, слугували позитивними контролями. Негативними контролями були чубуки, замочені на 15 хвилин у стерильній воді з водогону. Всього у позитивному контролі обробці підлягало 15 чубуків, у негативному – 19 рослин. Через 90 днів після інокуляції чубуки тестували на наявність патогенних агробактерій. Для цього представників мікробіоти судин винограду екстрагували за методом Я. Лехоцьки (1968). Чубуки фламбували для стерилізації поверхні, а потім разом із коренем розрізали на верхню, середню та нижню частини. Корені винограду після ретельного промивання стерилізували за допомогою спирту, щоб на результати не впливала наявність мікроорганізмів на корінні.

Чубуки, які загалом складали 21 – 37 см у довжину, розрізали на три рівні частини в залежності від довжини чубука, які умовно називали “нижня”, “середня” та “верхня” частини. Далі частини винограду розрізали на дрібні фрагменти (приблизно 0,5 см у довжину) і вимочували у стерильній воді на протязі 30 хв на шейкері за кімнатної температури.

З кожного зразка здійснювали посів 50 мкл суспензії на середовище Роя і Сасера з 1,5 % агар-агара [6]. З верхніх, нижніх та середніх частин чубуків здійснювали окремі висіви.

Склад середовища Рой і Сасера (г/л): адонітол - 4,00; дріжджовий екстракт - 0,14; борна кислота - 1,00; $MgSO_4$ - 0,20; K_2HPO_4 - 0,90; KH_2PO_4 - 0,70; NaCl - 0,20; «Браво» (фунгіцид - хлораталоніл) - 4,00; агар - агар - 15,00. рН середовища - 7,2. Після автоклавування 10 хвилин при 1 атм і охолодженні в середовище додавали трифенілтетразоліума хлорид (0,08 г/л).

Через 5 днів інкубації підраховували кількість колоній, які виростили при посіві окремих частин рослин, та отримані результати обробляли статистично за допомогою пакета прикладних програм «Excel».

Результати дослідження та їх обговорення.

Облік кількості КУО, які виростили на середовищі Роя і Сасера, показало, що у нижніх частинах чубуків чисельність представників мікробіоти була значно більшою, ніж у середній і тим більше – у верхніх частинах чубуків. Облік результатів висіву з позитивного контролю показав різницю між кількістю КУО нижньої та середньої частини 7,7 разів, між нижньої та верхньої – майже 40 разів. У негативному контролі різниця у чисельності мікробіоти між нижньої та верхніми частинами була ще набагато більше: кількість бактерій у 1 мл суспензії тканин нижньої частини чубуків перевищувала таку у середній частині у 7,4 рази, а у верхній частині – у 270 разів. Якщо розглядати чисельність у контролях, то видно, що різниці

між нижніми (рис. 1) та середніми частинами чубуків (рис. 2) за кількістю мікробіоти майже однакові, хоча у позитивному контролі загальна чисельність у цих частинах приблизно у три рази більше (9466 ± 2736).

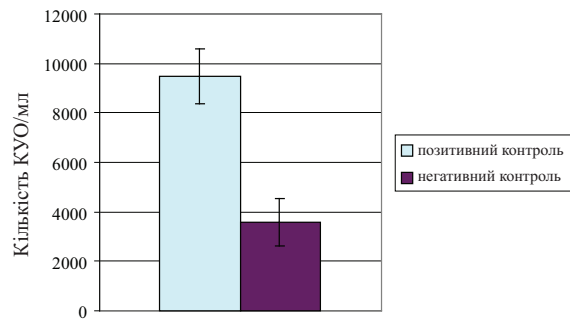


Рис. 1. Чисельність мікробіоти нижніх частин чубуків винограду.

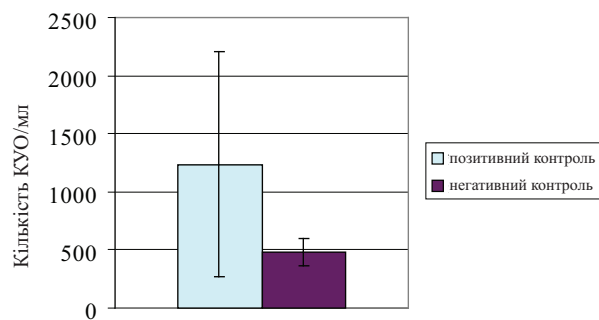


Рис. 2. Чисельність представників мікробіоти судин винограду, виявлених у середній частині штучно інфікованих чубуків.

Але слід відмітити, що у негативному контролі, обробленому лише водою, представники мікробіоти дуже мало представлені у верхній частині чубуків ($13,3 \pm 57,4$). Це можна пояснити тим, що чубуки для дослідів відбирали напочатку березня, коли рух соку у винограді ще не розпочався. Отже, не було відтоку мікробіоти судин зі штамбу винограду до дистальних пагонів. Штучне зараження патогенним штамом агробактерій у позитивному контролі призвело до підвищення загальної чисельності мікробіоти, у чубуках, що вижили, представники якої проникли навіть у верхні частини пагонів.

Різниця між чисельністю бактерій верхніх частин чубуків у позитивному та негативному контролях складала 18 разів (рис. 3).

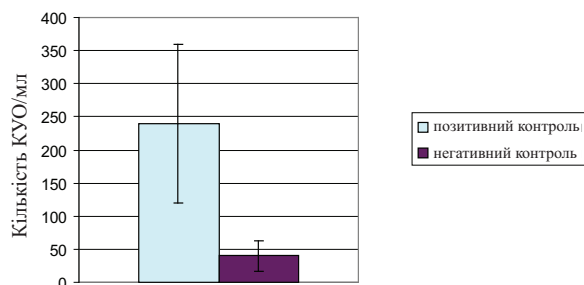


Рис. 3. Чисельність мікробіоти верхніх частин чубуків винограду.

Однак, все ж таки, масованого проникнення агробактерій навіть у позитивному контролі не спостерігалось. Це може бути поясненим некрозами у нижніх та середніх частинах чубуків. Так, було показано, що масоване інфікування збудниками бактеріального раку у лабораторних умовах призводить до інтенсивних некрозів радше від утворення пухлин, ймовірно, через надпродукцію ауксину і пектолітичну активність [1].

Висновки

1. За штучного зараження при вимочуванні у суспензії штама *A. tumefaciens* C58 агробактерії мігрують по судинам на усю довжину пагона (21 – 37 см), але найбільша чисельність бактерій зберігається у нижній частині чубуків.
2. Досліджена модель “чубуки винограду” – “патогенна агробактерія” може застосовуватися для вивчення інфекційного процесу, а також для застосування біологічних препаратів.

Автори вдячні Ліманській Л.І. за люб’язно надані сортові чубуки винограду.

Робота виконувалась у рамках тем НУ/3-2011 і № 477.

Список літератури:

1. Bazzi C., Alexandrova M., Stefani E., Anaclerio F., Burr T. J. Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic agrobacteria // *Vitis*. – 1999. – Vol. 38, № 1. – P. 31 – 35.
2. Burr T.J., Bazzi C., Süle S., Otten L. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies // *Plant Dis.* – 1998. – Vol. 82. – P. 1288 – 1297.
3. Burr T.J., Reid C.L., Adams C.E., Momol E.A. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from feral *Vitis riparia* // *Plant Disease*. – 1999. – Vol. 83, № 2. – P. 102 – 107.

4. Lastra B., Llop P., Lopez M. M. Characterization of *Agrobacterium* strains isolated from grapevine in Galicia (Spain) II Proc. Congress of the European Foundation for Plant Pathology. - Taormina (Italy), 2000. - P. 178-179.
5. Lehoczky J. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection II Phytopathol. Z. - 1968. - Vol. 63. - P. 239-246.
6. Roy M., Sasser M. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 II Phytopathology. - 1983.-Vol. 73.-P.810.
7. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium II Vitis. - 2002. - Vol. 41, № 1.- P. 37- 42.
8. 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* II Int. J. of Syst. and Evolut. Microbiol. - 2001.- Vol. 51.- P. 89- 103.