Н.В.Лиманская, м.н.с.
Б.Н.Милкус, д.б.н., профессор,
И.Д.Жунько, м.н.с.
Л.А.Конуп, м.н.с.
Д.В.Бойко, студ.
Одесский национальный университет им. И.И.Мечникова, кафедра микробиологии и вирусологии

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ОПУХОЛЕОБРАЗУЮЩИХ АГРОБАКТЕРИЙ НА СОРТАХ ВИНОГРАДА, ВОСПРИИМЧИВЫХ И УСТОЙЧИВЫХ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА

Изучение ряда привойных сортов винограда, устойчивых к возбудителю бактериального рака и районированных в Украине, показало, что латентно инфицированными патогенными Agrobacterium vitis и A.tumefaciens были 0-4,0% растений. Растения восприимчивых привойных сортов способствовали поддержанию популяции патогена в 8,8-40,0% растений. Подвойный сорт V.berlandieri x V.riparia Кобера 5ББ был латентно инфицирован на 30,0%. Для выявления патогенных штаммов A. vitis и A. tumefaciens использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Насаждения, свободные от вышеуказанных агробактерий, были рекомендованы для производства саженцев.

Опухолеобразующие агробактерии поражают двудольные растения 93 семейств [9]. Различия в поражаемости растений отдельными штаммами агробактерий могут быть связаны как с восприимчивостью растения-хозяина, так и с вирулентностью патогена [5]. Установлено, что способность *Agrobacterium vitis* и *A. tumefaciens* поражать разные сорта винограда связана с генами Ti-плазмиды. Причем штаммы с одинаковым типом Ti-плазмиды могут быть вирулентными на одних сортах винограда и авирулентными на других [11]. Эти данные позволили выдвинуть предположение о том, что, по крайней мере, один из факторов растения-хозяина, который определяет восприимчивость к возбудителю бактериального рака, может варьировать у представителей одного и того же вида растений.

При закладке виноградника очень важен выбор сортов, которые были бы устойчивы к возбудителю бактериального рака [8].

В зависимости от сорта винограда, популяция *A. vitis* в растении развивается с разной скоростью, и пик популяции при одинаковых условиях приходится на разные месяцы [6].

Устойчивые генотипы винограда способствуют сохранению невысокой популяции патогенных агробактерий в растении, в то время, как в восприимчивых сортах популяция патогенных агробактерий выше [14]. Сравнительное выявление опухолеобразующих агробактерий в растениях, восприимчивых и устойчивых к заболеванию, представляет интерес для исследований, связанных с разработкой мер, ограничивающих распространение бактериального рака винограда.

Целью работы было изучение распространенности бактериального рака на восприимчивых и устойчивых к заболеванию сортах винограда, районированных на юге Украины.

Для исследований отбирали одревесневшие побеги и корни растений ряда привойных и подвойных сортов винограда. Всего было исследовано 530 образцов.

Агробактерии выделяли по методу Я. Лехоцки [12] на полуселективной среде Рой и Сасера (1983). Через 5-7 дней инкубации при 25?С выросшие колонии пересевали на скошенный картофельный агар (200 г картофеля на 1 л воды. Полученный экстракт автоклавировали при 1 атм в течение 10 минут (рН 7,2). Исследовали одно-двухсуточные культуры. Выявление опухолеобразующих агробактерий проводили с помощью приготовленного нами набора для диагностики бактериального рака винограда методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Использовали праймеры к последовательностям *vir_2* и *ipt* генома патогенных штаммов *A. vitis* и *A. tumefaciens* [10]. Состав реакционной смеси: 5,8 мкл деионизованой воды; 4 мкл 5х ПЦР буфера; 2,0 мкл 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов (200мкМ); 1,0 мкл каждого из 10 мМ праймеров (*vir_2* или *ipt*); 0,4 мкл Taq-полимеразы, 5 ед/мкл (2 Ед); 0,8 мкл 50 мМ Mg^{++} (2 мМ Mg^{++}). Использовали реагенты фирмы «АмплиСенс», Россия.

В качестве отрицательных контролей использовали реакционные смеси, в которые вносили ДНК авирулентного штамма *A. radiobacter* K55 и стерильную деионизованную воду. В качестве положительного контроля использовали ДНК опухолеобразующего штамма агробактерий, выделенного из винограда.

ДНК агробактерий выделяли методом теплового лизиса суспензии клеток [16]. Исследованный образец (надосадочную жидкость, которая содержит ДНК) вносили в объеме 5 мкл в реакционную смесь [10].

Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Время первичной денатурации и температура отжига были увеличены по сравнению с параметрами Haas et al. (1995) до 3 минут и 52°С соответственно. Для электрофореза продуктов ПЦР использовали 1,5% агарозный гель и трисборатный буфер, который содержал бромид этидия ("АмплиСенс", Россия). Гель фотографировали с помощью видеосистемы "Samsung" в ультрафиолетовом свете (длина волны 312 нм).

Исследовались образцы одревесневших побегов и корней винограда привойных и подвойных сортов, которые поступали из ряда хозяйств юга Украины.

Таблица

Распространение опухолеобразующих агробактерий на сортах винограда, восприимчивых и устойчивых к возбудителю бактериального рака

Сорт	Область культивирования или происхождение партии посадочного материала	Количество образцов	Латентная зараженность, %
	Привойные сорта		
Каберне-Совиньон	Одесская	96	8,8 – 40,0
	Николаевская	30	33,3
Мерло розовый	Одесская	120	8,0-36,0
Саперави	Одесская	26	11,5
Шардоне	Одесская	40	0 – 4,0
	Импорт из Германии	20	0
Рислинг рейнский	Одесская	16	0
Лидия	Николаевская	20	0
Траминер розовый	Одесская	20	0
	Подвойные сорта		
V. berlandieri x *V. riparia* Кобера 5ББ	Одесская	32	6,2
	Херсонская	20	0
	АР Крым	50	0 - 30,0
	Импорт из Сербии	20	0
V. riparia x *V. Rupestris* 101-14	Херсонская	20	0

Выявлено, что на сортах, которые, в соответствии с данными литературы, являются устойчивыми к возбудителю бактериального рака, опухолеобразующие агробактерии распространены в меньшей степени, чем на сортах, восприимчивых к заболеванию (табл.).

На исследованных насаждениях сортов Рислинг рейнский, Лидия, Шардоне, Траминер розовый возбудитель бактериального рака не выявлялся или был выявлен у небольшого количества растений (4%-ная зараженность на сорте Шардоне).

Сорт Рислинг рейнский (*Vitis vinifera* L.) был отнесен И. Малениным (1989) в условиях Болгарии к толерантным к возбудителю бактериального рака, а сорт Траминер розовый — к слабовосприимчивым. Сорт Лидия относится к виду *Vitis labrusca*. Растения данного вида более устойчивы к поражению возбудителем бактериального рака, чем растения вида *Vitis vinifera*. Сорт Шардоне, согласно наблюдениям ряда исследователей [2], менее восприимчив к возбудителю бактериального рака, чем другие привойные сорта, как например, Мерло розовый. Это объясняет меньшее количество пораженных кустов на сортах Лидия, Шардоне и Рислинг рейнский.

Сорт Каберне-Совиньон на юге Украины относится к высоко восприимчивым к возбудителю бактериального рака [2, 3]. Сорт Мерло является относительно устойчивым к морозам [1] и также восприимчив к возбудителю бактериального рака [2, 3].

Многочисленные растрескивания растительных тканей, возникающие под воздействием низких температур, в особенности после оттепели, представляют собой раневые поверхности, привлекающие патогенные агробактерии, которые находятся в тканях растений в виде латентной инфекции [8, 14].

На исследованных насаждениях сортов Мерло розовый и Каберне-Совиньон количество латентно инфицированных растений было наибольшим (40,0% и 36,0% соответственно).

Сорт Саперави отнесен И. Малениным (1989) к сортам, устойчивым к возбудителю бактериального рака. Тестирование образцов сорта Саперави, полученных из хозяйства Одесской области, позволило установить наличие потенциально патогенных агробактерий у 11,5% растений.

Подвойные сорта винограда более устойчивы к возбудителю бактериального рака, чем привойные сорта, однако в них возбудитель бактериального рака может находиться в стадии латентной инфекции [2]. Так, сорт *V. riparia* x *V. rupestris* 101-14, полученный из хозяйств Херсонской области, был свободен от возбудителя бактериального рака, в то же время 6,2% растений сорта *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5ББ из хозяйства Одесской области были латентно инфицированны опухолеобразующими агробактериями [4]. Сорт *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5ББ в условиях Венгрии, Италии, Болгарии довольно часто поражается бактериальным раком [3, 7, 15].

Лоза сорта *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5ББ, завезенная для исследования из хозяйств АР Крым, оказалась инфицированной опухолеобразующими штаммами агробактерий на 30,0%. Таким образом, зараженность растений зависела не только от восприимчивости сорта, но и от происхождения посадочного материала.

Из полученных результатов следует, что восприимчивые и устойчивые сорта винограда, культивируемые на юге Украины, в разной степени способствуют сохранению популяции опухолеобразующих бактерий в растении.

Известно, что при искусственном заражении растений патогенным штаммом агробактерий уже через два месяца численность популяции возбудителя бактериального рака на устойчивом сорте *Vitis amurensis* 689 была намного меньшей, чем численность популяции *A.vitis* на восприимчивом сорте *V. vinifera* Каберне-Совиньон. Через 10 месяцев после заражения численность популяции опухолеобразующих агробактерий в растениях сорта Каберне-Совиньон была в 6 раз выше, чем численность популяции на сорте *V. amurensis* 689 и в 70 раз выше, чем численность агробактерий на сорте *V. riparia* x *V. rupestris* 3309 [14].

Полученные нами результаты подтверждают и дополняют эти данные.

Проведенные исследования позволили нам выявить насаждения, свободные от возбудителя бактериального рака, и рекомендовать их для производства посадочного материала винограда на юге Украины.

Исследования выполнены при поддержке госбюджетной темы Министерством образования и науки Украины (ДЗ/165-05 приказ № 440 от 26.07.05).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Докучаева Э.Н., Комарова Э.С., Пилипенко Н.Н. Сорта винограда. — К.: Урожай, 1986. — 286 с.
2. Леманова Н.Б., Гатина Э.Ш. Бактериальные болезни винограда и плодовых культур. — Кишинев: Штиинца, 1991. — С.21-46.
3. Маленин И.Г. Проучвания върху биологията и епидемиологията на бактериалния рак и системите за борба с него, маната и оидиума по лозата в България: Автореф. дис. ... д-ра на селскостопанските науки / Институт по лозарство и виноделие гр. Плевен. — Плевен, 1989. — 64 с.
4. Мілкус Б.Н., Конуп Л.О., Жунько И.Д.,Ліманська Н.В. Тестирования некоторых сортов винограда на наличие возбудителя бактериального рака и вирусов коротковузля и скручивания листвы // Мікробіол. журн. — 2005. — Т. 67, № 1. — С.41-48.
5. Anderson A.R., Moore L.W. Host specificity in the genus Agrobacterium // Phytopathology. — 1979. — Vol. 69, № 4. — P.320-323.
6. Bauer C., Schultz T F., Lorenz D. et al. Population dynamics of Agrobacterium vitis in two grapevine varieties during the vegetation period // Vitis. — 1994. — Vol. 33. — P.25-29.
7. Burr T.J., Bazzi C., Sule 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.
8. Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — Vol. 37. — P.53—80.
9. De Cleen M., De Ley J. The host range of crown gall // Bot. Rev. — 1976. — Vol. 42. — P.389-462.
10. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic Agrobacterium strains // Appl. Environm. Microbiol. — 1995. — V.61, №8. — P.2879-2884.
11. Knauf V.C., Yanofsky M., Montoya A., Nester E. Physical and functional map of an Agrobacterium tumefaciens plasmid that confers a narrow host range // J. Bacteriol. — 1984. — Vol.160. — P.564-568.
12. Lehoczky J. Further evidences concerning the systemic spreading of Agrobacterium tumefaciens in the vascular system of grapevines // Vitis. — 1971 — Vol.10. — P.215-221.
13. Roy M., Sasser M. A medium selective for Agrobacterium tumefaciens biovar 3 // Phytopathology. — 1983. — Vol.73. — P.810.
14. Stover E.W., Swartz H.J., Burr T.J. Endophytic Agrobacterium in crown gall —resistant and —susceptible Vitis genotypes // Vitis. — 1997. — Vol.36. — P.21-26
15. Sule S., Moszar J., Burr T.J. Crown gall resistance of Vitis spp. and grapevine rootstocks // Phytopathology — 1994 — Vol. 84, № 6. — P. 607-611.
16. Szegedi E., Bottka S. Detection of Agrobacterium vitis by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // Vitis — 2002. - Vol.41, № 1. - P.37-42

Поступила 11.05.06.