

Н. В. Ліманська, А. М. Венгер, Є Шуай, В. О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (048) 68 79 64, e-mail: limty@mail.ru

ВИВЧЕННЯ АДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ ВІНОГРАДУ

*Модифіковано методика визначення адгезивності бактерій на рослинних тканинах. Вивчено адгезивні властивості 13 штамів *Rhizobium vitis*, виділених з винограду, ґрунту виноградників, і штаму *R. radiobacter*, виділеного з троянд. Показано, що штами патогенних ризобій на чотирьох тест-рослинах характеризувалися різними рівнями адгезивності (від $690,0 \pm 40,0 \cdot 10^2$ до $0,9 \pm 0,1$ КУО/мм²). Найбільша кількість клітин патогенних ризобій прикріплювалися до тканин винограду і троянд, а найменша – до тканин хризантеми і каланхоє.*

К л ю ч о в і с л о в а: бактеріальний рак, адгезія, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*.

Популяції патогенних штамів *R. vitis* і *R. radiobacter* (за минулою номенклатурою – *Agrobacterium vitis* і *A. tumefaciens* [13]) характеризуються значною мінливістю. Так, з однієї пухлини рослини, штучно зараженої патогенним штамом, можуть виділятися штами, відмінні від попереднього за низкою ознак [6].

Адгезивність – один з факторів вірулентності патогенних штамів *R. vitis* [1]. У літературі недостатньо даних щодо вивчення рівня адгезивності у даних фітопатогенів. Відомо, що штамам *R. vitis* притаманний різний рівень адгезивності [7]. Враховуючи той факт, що *R. vitis* спричиняє значні збитки виноградарству України [4, 5], актуальними є дослідження, які стосуються вивчення факторів вірулентності даних фітопатогенів.

Метою роботи було виділення штамів з природної популяції збудників бактеріального раку – з рослин та ґрунту виноградника та вивчення їх здатності до адгезії.

Матеріали і методи

Штами збудника бактеріального раку виділяли за описаною раніше методикою та ідентифікували методом ПЛР з використанням праймерів до послідовностей *ipt* та *virD₂* [3, 10]. Окремі штами використовували для зараження тест-рослин (зелених чубуків винограду і каланхоє). У виділених штамів вивчали здатність до адгезії на рослинних тканинах. Адгезивні властивості вивчали також у штаму *R. radiobacter* P2, виділеного нами з троянд і здатного спричиняти пухлини на винограді, та у колекційного штаму *R. vitis* АТ1, люб'язно наданого доктором Е. Szegedi (Угорщина). Крім того, для порівняння досліджували здатність до адгезії на тканинах винограду штамів *Escherichia coli* УКМ В-506 і *Bacillus subtilis* ОНУ-25.



Адгезивні властивості вивчали за модифікованою нами методикою Brisset et al., (1991). Замість фрагментів коренів для вивчення здатності штамів до адгезії використовували фрагменти рослинних тканин, які отримували наступним чином. Здерев'янілі чубуки винограду ретельно мили з детергентом під проточною водою, ополіскували, очищували від кори і в асептичних умовах подрібнювали на фрагменти 3x2x1 мм за картонним шаблоном. Пагони троянд, хризантеми і каланхое ретельно мили, ополіскували, поміщали у розчин 70 % етилового спирту на 3 - 5 секунд, ополіскували у стерильній воді та подрібнювали на фрагменти 3x2x1 мм. У якості тест-рослин використовували виноград, троянду, хризантему, каланхое. Виноград, троянди та хризантеми було обрано у якості об'єктів дослідження через те, що в умовах помірного клімату патогенні ризобії найчастіше уражують саме ці рослини [11]. Каланхое — це тест-рослина, яка часто використовується у діагностиці бактеріального раку [1].

Готували суспензії бактеріальних клітин концентрацією 10^{10} кл/мл. Для постановки досліду використовували стерильні пластикові планшети для імунологічних досліджень. У лунку планшети вносили по 150 мкл суспензії бактеріальних клітин і фрагмент тканини тест-рослин. Контролем слугували лунки планшет зі стерильною водою, в які поміщали фрагменти досліджених тест-рослин. Постановка контролю дозволяла виявити природню мікробіоту, яка містилася у рослині і залишалася після дезинфекції.

Після години інкубації при кімнатній температурі фрагменти рослинних тканин поміщали у 1,5 мл епендорфи із стерильною дистильованою водою і 10 секунд струшували на вортексі. Відмивання повторювали ще раз у другому епендорфі, а після цього тканини розтирали у 1,5 мл 10 мМ ХЕПЕС, рН 7,5. По 100 мкл суспензії розтертої тканини висівали на чашки Петрі з середовищем YPGA [12]. Досліди проводили у п'яти повторностях. Після двох діб культивування при 28 °С обраховували кількість колоній, що вирости, і знаходили кількість колоній утворюючих одиниць (КУО) на 1 мм² площі прикріплення, враховуючи те, що загальна площа фрагмента рослинної тканини становила 22 мм². Отримані дані обробляли методами математичної статистики на основі пакета прикладних програм "Statistica 6.0" ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення

З 42 досліджених зразків ґрунту та рослин винограду сортів Каберне Совіньон і Мерло було виділено 12 штамів збудника бактеріального раку (штами *R. vitis* 201, *R. vitis* 2, *R. vitis* 412 — з ґрунту, решта штамів — із здерев'янілої лози).

Результати досліджень показали, що рівень адгезивності штамів *R. vitis*, виділених як з лози, так і ґрунту, і *R. radiobacter* був різним в залежності від штаму та дослідженої тест-рослини і коливався від 700 ± 40 до $0,9 \pm 0,1$ КУО/мм² (табл.). Оскільки у контролях спостерігався ріст природньої мікробіоти рослин, ми обчислювали значення рівня адгезивності досліджених штамів з урахуванням кількості КУО/мм² у контролі, для чого від дослідного значення адгезивності віднімали контрольне.

Низький рівень адгезії досліджених штамів у порівнянні з даними попередніх авторів щодо адгезивності патогенних ризобій [7], ймовірно, пояснюється відмінностями у вірулентному потенціалі штамів або впливом ендогенної мікробіоти використаних тест-рослин.



Таблиця

Рівень адгезивності штамів на різних тест-рослинах, КУО/мм²

Tabl.

Attachment level of strains on the different test-plants, CFU/mm²

Штам	Тест-рослина			
	Виноград	Троянда	Хризантема	Каланхое
<i>R. vitis</i> AT1	28,0±5,0	30,0±11,0	20,2±6,1	27,0±3,8
<i>R. vitis</i> 14K1	2,7±0,7	2,3±0,6	20,1±1,9	3,2±0,2
<i>R. vitis</i> 18M	32,0±9,0	1,0±0,3	15,0±3,1	14,0±6,7
<i>R. vitis</i> 6MT	45,0±1,0	157,0±49,5	45,0±2,2	29,6±5,7
<i>R. radiobacter</i> P2	98,4±29,0	90,0±0,9	109,0±39,6	196,1±50,2
<i>R. vitis</i> C24	140,0±20,0	40,0±10,2	220,0±40,0	34,0±0,9
<i>R. vitis</i> 19M	88,3±19,7	95,0±16,0	6,4±0,1	138,3±60,4
<i>R. vitis</i> СМШ	690,0±40,0	29,7±5,1	97,0±40,3	22,0±4,8
<i>R. vitis</i> 6МШ	54,2±1,0	97,2±16,0	119,0±30,0	10,6±4,5
<i>R. vitis</i> 412	410,0±9,8	180,4±8,3	11,0±1,0	78,2±1,1
<i>R. vitis</i> 61MT	14,0±2,0	14,3±1,0	2,0±0,1	20,3±3,0
<i>R. vitis</i> 201	44,6±3,0	80,1±15,0	31,4±5,6	14,3±6,2
<i>R. vitis</i> 2	9,7±2,0	11,0±0,9	70,2±2,3	1,1±0,2
<i>R. vitis</i> 2Ш	30,0±3,8	0,9±0,1	20,4±3,2	1,1±0,1
<i>B. subtilis</i> ОГУ-25	15,0±2,0	НТ*	НТ	НТ
<i>E. coli</i> УКМ В-506	0,8±0,6	НТ	НТ	НТ

*НТ — зразки не тестувалися

Найбільший рівень адгезивності на усіх чотирьох тест-рослинах проявив штам *R. radiobacter* P2, найменший — штами *R. vitis* 14K1 і *R. vitis* 2Ш, виділені з лози винограду сорту Каберне Совіньон.

Адгезивний рівень штаму *B. subtilis* ОГУ-25 на винограді склав 15 ± 2 КУО мм². Відомо, що штами *B. subtilis* населяють рослинні тканини і можуть бути навіть антагоністами штамів збудника бактеріального раку [9]. Прикріплення клітин штаму *E. coli* УКМ В-506 до тканин винограду пояснюється тим, що бактерії родини *Enterobacteriaceae* здатні колонізувати рослини [8]. Адгезивність дослідженого штаму до рослинних тканин була невисокою ($0,8 \pm 0,6$ КУО/мм²).

Досліджені штами ризобій проявляли різний рівень адгезивності на усіх чотирьох тест-рослинах. Якщо порівнювати значення адгезивності, то найбільша кількість клітин патогенних ризобій прикріпилася до тканин винограду, а найменша — до тканин хризантеми і каланхое.

Отримані результати можна пояснити тим, що первинно досліджені штами були виділені з винограду, тому фактори патогенності найбільш ефективно проявляються по відношенню до цієї рослини. До тканин каланхое, яке є традиційною тест-рослиною, клітини ризобій виявили менший рівень адгезивності. Це може вказувати на те, що патогенний потенціал штамів проявляється щодо каланхое недостатньо. Дійсно, при зараженні дев'ятьма дослідженими патогенними штамами (*R. vitis* 14K1, *R. vitis* 18M, *R. vitis* 6MT, *R. vitis* C24, *R. vitis* 19M, *R. vitis* СМШ, *R. vitis* 6 МШ,



R. radiobacter P2) каланхоє і зелених чубуків винограду пухлиноутворення на всіх рослинах спостерігалось у разі інокуляції винограду. При зараженні каланхоє пухлиноутворення спричинили лише два штами (*R. vitis* 19M і *R. radiobacter* P2).

Різні рівні адгезивності штамів збудника бактеріального раку свідчать про відмінності у їх вірулентному потенціалі. Дані, отримані за допомогою модифікованої нами методики, дозволять провести порівняльні дослідження різноманітності штамового складу *R. vitis* і *R. radiobacter* на насадженнях уражених рослин.

Таким чином, досліджені штами збудників бактеріального раку винограду характеризуються різним ступенем адгезивності, що може бути свідченням гетерогенності природної популяції. Рівень адгезивності штамів різнився в залежності від тест-рослини, до тканин якої відбувалося прикріплення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Байдербек Р. Опухоли растений. — М.: Колос, 1981. — С. 114.
2. Маркова Ю. А., Романенко А. С., Духанина А. В. Выделение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* из растительных тканей // Микробиология. — 2005. — Т.74, № 5. — С. 663 — 666.
3. Милкус Б. Н., Конуп Л. О., Жунько І. Д., Ліманська Н. В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковозузя та скручування листя // Мікробіол. журн. — 2005. — Т. 67, № 1. — С. 41 — 48.
4. Милкус Б. Н., Лиманская Н. В., Жунько И. Д., Конуп Л. А., Бойко О. А. Выявление возбудителя бактериального рака в почве виноградника в разные сезоны вегетации // Виноградарство и виноделие: Сб. науч. тр. ИВиВ “Магарач”. — Ялта: ИВиВ “Магарач”, 2007. — С. 66 — 68.
5. Чернышева З. С., Назарчук В. С. Бактериальный рак как причина изреживания виноградных насаждений в Одесской области // Проблемы онкологии и тератологии растений. — Л.: Наука, 1975. — С. 155 — 157.
6. Belanger C., Canfield M., Moore L. W., Dion P. Genetic analysis of nonpathogenic *Agrobacterium tumefaciens* mutants arising in crown tumors // J. Bacteriol. — 1995. — 177, № 13. — P. 3752 — 3757.
7. Brisset M. N., Rodriguez-Palenzuela P., Burr T. J., Collmer A. Attachment, chemotaxis, and multiplication of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 and biovar 3 on grapevine and pea // Appl. Environm. Microbiol. — 1991. — 57, № 11. — P. 3178 — 3182.
8. Cooley M. B., Miller W. G., Mandrell R. E. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7 and competition by *Enterobacter asburiae* // Appl. Environm. Microbiol. — 2003. — V.69, № 8. — P. 4915 — 4926.
9. Eastwell K. C., Sholberg P. L., Sayler R. J. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agents of crown gall disease of grapevines // Crop protection. — 2006. — 25, № 11. — P. 1191-1200.
10. Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. — 1995. — 61, № 8. — P. 2879 — 2884.
11. Manulis S., Chalupowicz L., Dror O., Kleitman F. Molecular diagnostic procedures for production of pathogen-free propagation material // Pest Manag. Science. — 2002. — 58. — P. 1126 — 1131.
12. Pionnat S., Keller H., Richer D. et al. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries // Appl. Environm. Microbiol. — 1999. — 65, № 9. — P. 4197 — 4206.
13. 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, А. Н. Венгер, Е Шуай, В. А. Иваница

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 68 79 64, e-mail: limmy@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКУ ВИНОГРАДА

Реферат

Модифицирована методика определения адгезивности бактерий на растительных тканях. Изучены адгезивные свойства 13 штаммов *Rhizobium vitis*, выделенных из винограда и почвы виноградника, и штамма *R. radiobacter*, выделенного из розы. Показано, что штаммы патогенных ризобий на четырех тест-растениях характеризовались разными уровнями адгезивности (от $690,0 \pm 40,0$ до $0,9 \pm 0,1$ КОЕ/мм²). Наибольшее количество клеток патогенных ризобий прикреплялись к тканям винограда и розы, а наименьшее — к тканям хризантемы и каланхоэ.

К л ю ч е в ы е с л о в а: бактериальный рак, адгезия, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*.

N. V. Limanska, A. M. Venger, Ye Shuai, V. O. Ivanytsya

Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: 8 (048) 68 79 64, limmy@mail.ru

THE STUDY OF ATTACHMENT PROPERTIES OF GRAPE CROWN GALL AGENTS STRAINS

Summary

The method of bacterial attachment properties study on plant tissues was modified. The adhesive properties of 13 *Rhizobium vitis* strains isolated from grape and vineyard soil, and of the *R. radiobacter* strain isolated from rose were studied. It was shown that the strains of pathogenic rhizobia had different levels of adhesiveness (from $690,0 \pm 40,0$ to $0,9 \pm 0,1$ CFU/mm²). The greatest number of pathogenic rhizobia cells attached to grape and rose tissues and the least number — to chrysanthemum and kalanchoe tissues.

K e y w o r d s: crown gall, adhesion, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*.

