

ВИЯВЛЕННЯ ЛАТЕНТНОЇ ФОРМИ ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ В ДЕЯКИХ СОРТАХ ВИНОГРАДНИХ РОСЛИН

Досліджували деякі підщепні і прищепні сорти винограду на інфікованість пухлиноутворюючими агробактеріями за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції. В ході дослідження параметри полімеразної ланцюгової реакції були модифіковані. Показано, що інфікованим збудником бактеріального раку виявився не тільки рядовий садівний матеріал, але і сертифіковані клони винограду. Отримані результати вказують на необхідність включення *Agrobacterium vitis* у перелік збудників, тестування на наявність яких сертифікованого садівного матеріалу винограду є обов'язковим.

Ключові слова: *Agrobacterium vitis*, полімеразна ланцюгова реакція, виноград, бактеріальний рак.

Бактеріальний рак - системне захворювання, збудник розповсюджується по судинній системі рослини, виділяється зі здерев'янілих пагонів та коріння [1]. Інфікована рослина може не проявляти симптомів захворювання і при вегетативному розмноженні бути джерелом розповсюдження *A. vitis* на значній території [1]. Викликається грам негативною бактерією *Agrobacterium vitis* (*Rizobium vitis*), яка вражає виноград і здатна викликати безсимптомну інфекцію як на прищепних, так і на підщепних сортах. Бактерії, потрапивши крізь пошкодження до рослини, переносяться по судинній системі і призводять до системної інфекції [1].

Сорти винограду чутливі до бактеріального раку у різній мірі [2, 7]. Серед підщепних сортів більш чутливими до зараження *A. vitis* є *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5ББ, *V. berlandieri* x *V. riparia* СО₄. Пухлини виявляються на цих сортах частіше, ніж на сортах *V. riparia* x *V. rupestris* 101 – 14 і *V. riparia* x *V. rupestris* 3309 [2]. Згідно досліджень, підщепні сорти *V. riparia* і *V. rupestris* загалом більш резистентні до ураження бактеріальним раком, ніж сорти *V. vinifera* [2, 6].

Високочутливими прищепними сортами винограду є Каберне Совіньон, Мускат олександрійський, Мерло рожеве, Кардинал [3]. Ступінь ураження певного сорту залежить від кліматичної зони культивування винограду [4, 5].

Візуальний фітосанітарний контроль не дозволяє розпізнати куші з латентною інфекцією і запобігти заготовленню з них лози для вегетативного розмноження рослин. Необхідною постає діагностика за допомогою сучасних швидких молекулярно-генетичних методів аналізу. Метод полімеразної ланцюгової реакції дозволяє у швидкі строки визначити наявність пухлиноутворюючих бактерій в лозі, корінні винограду, ґрунті [3, 4].

Метою наших досліджень було дослідження деяких сортів винограду на інфікованість збудником бактеріального раку.

Матеріали і методи досліджень. Впродовж 2012-2013 років досліджували клони підщепних сортів *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5ББ, *V. berlandieri* x *V. riparia* СО₄, *V. riparia* x *V. rupestris* 101 – 14 і *V. riparia* x *V. rupestris* 3309, клони прищепних сортів Каберне Совіньон, Мерло червоне, Мускат олександрійський, Кардинал (господарства Одеської області) на латентну інфікованість пухлиноутворюючими агробактеріями. Виділення збудника бактеріального раку зі здерев'янілої лози винограду проводили згідно методу Лехоцьки [8] з висівом на напівселективне середовище Рой і Сасера (RSM) [9]. Після інкубації впродовж 5 - 7 днів при 25 °С колонії пересівали на скошений картопляний агар. ПЛР проводили з ДНК, виділеними з ододобових культур шляхом теплового лізису бактеріальної суспензії [6]. Загальний об'єм реакційної суміші для

проведення ПЛР становив 20 мкл, об'єм зразка - 5 мкл. У реакційну суміш вносили по 10 пмоль кожного з праймерів, 200 мкМ кожного дезоксинуклеозидтрифосфату, 2 Од Таq-полімерази, 2 мМ MgSO₄, 4 мкл буфера для проведення ПЛР (5x). (Усі реагенти фірми „Амплиценс”, Росія). Використовували праймери до послідовності *ipt* Тi-плазмиди [6].

Позитивним контролем слугував патогенний штам *A. tumefaciens* FA2, люб'язно наданий доктором Т. J. Burr (Корнуельський університет, США), негативним контролем – дейонізована вода.

Ампліфікацію проводили згідно Naas et al. [6], збільшивши час початкової денатурації до 3-х хвилин, а температуру відпалу у процесі добору оптимальних параметрів ПЛР - до 52 °С.

Реакцію проводили у програмувальному термостаті „Терцик” фірми „ДНК – Технологія” (Росія). Електрофорез проводили в 1,5 % агарозному гелі. Бромистий етидій для візуалізації продуктів ПЛР входив до складу трис-боратного буфера для електрофорезу („Амплиценс”, Росія). Гель фотографували за допомогою відеосистеми „Mintrop” в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі - 312 нм). Для оцінки молекулярної ваги ампліфікованих фрагментів використовували маркер 800 – 200 пар основ („Амплиценс”, Росія).

Результати досліджень. За даними дослідників, латентна інфекція пухлиноутворюючими агробактеріями можлива на усіх підщепних сортах [10]. В ході дослідження нами був встановлений відсоток кущів з латентною інфекцією серед клонів підщепних сортів з виноградників Одеської області. Всього було протестовано 104 куща клонів винограду. Сорти *V. berlandieri* x *V. riparia* CO₄, *V. riparia* x *V. rupestris* 101 – 14 і *V. riparia* x *V. rupestris* 3309 виявилися вільними від збудника, на той час, як *V. berlandieri* x *V. riparia* Кабера 5ББ в 6,2 % випадків був уражений бактеріальним раком (табл.1).

Таблиця 1

Інфікованість підщепних сортів винограду *A. Vitis*

Сорт	Відсоток інфікованих кущів, %
<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i> CO ₄	0
<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i> 101 – 14	0
<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i> 3309	0,1
<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i> Кабера 5ББ	5,4

Аналізували кущі клонів прищепного сорту Каберне Совіньон, Мускат олександрійський, Мерло рожеве, Кардинал. Всього було протестовано 110 кущів винограду прищепних сортів.

Найбільш ураженими бактеріальним раком серед прищепних сортів виявилися Каберне Совіньон і Мускат олександрійський (табл. 2).

Таблиця 2

Інфікованість прищепних сортів винограду *A. vitis*

Сорт	Матеріал	Виробник	Відсоток інфікованих кущів, %
Каберне Совіньон	клоновий	Франція	25,5
		Україна	5,2
Мерло червоне	клоновий	Франція	15,0
Мускат олександрійський	клоновий	Франція	20,0
Кардинал	клоновий	Франція	12,0

До системи сертифікації садівного матеріалу, прийнятої Європейським Співтовариством, не надходить тестування рослин на наявність збудника бактеріального раку винограду. Як наслідок, садівний матеріал може містити *A. vitis*. Симптоми захворювання проявляються на саджанцях з латентною інфекцією вже на 1 – 2 рік після посадки. З ураженим садівним матеріалом збудник бактеріального раку потрапляє до ґрунту, і інфікована ділянка може довгий час залишатися резервуаром *A. vitis* [11].

Отримані результати вказують на необхідність включення *A. vitis* у перелік збудників, на наявність яких тестування сертифікованого садівного матеріалу є обов'язковим.

Подальші дослідження у даному напрямку дозволять зробити висновки про поширеність бактеріального раку на виноградниках, а також необхідність тестування кущів клонів, які були закуплені за кордоном, на наявність збудника бактеріального раку винограду.

Література

1. Леманова Н. Б. Бактериальные болезни винограда и плодовых культур / Н. Б. Леманова, Э. Ш. Гатина. – Кишинев: Штиинца, 1991. – С. 27.
2. Маленин И. Устойчивость некоторых европейских сортов и подвоев к бактериальному раку / И. Маленин // Лозарство и винарство. – 1981. – № 1. – С. 32.
3. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies / Burr T. J., Bazzi C., Süle S., Otten L. // Plant Dis. – 1998. – V. 82. – P. 1288 – 1297.
4. Burr T. J. Crown gall of grape: biology and disease management / Burr T. J., Otten L. // Annu. Rev. Phytopathol. – 1999. – V. 37. – P. 53–80.
5. Ferreira J. H. S. Susceptibility of grapevine rootstocks to strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 / Ferreira J. H. S., Zyl F. G. H. // S. Afr. J. Enol. Vitic. – 1997. – № 7. – P. 101 – 104.
6. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains / Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S. // Appl. Environm. Microbiol. – 1995. – V. 61, № 8. – P. 2879 – 2884.
7. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils / Krimi Z., Petit A., Mougél P. et al. // Appl. Environm. Microbiol. – 2002. – V. 68, № 7. – P. 3358 – 3365.
8. Lehoczky J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines / Lehoczky J. // Vitis. – 1971. – V. 10. – P. 215 – 221.
9. Roy M. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 / Roy M., Sasser M. // Phytopathology. – 1983. – V. 73. – P. 810.
10. Szegedi E. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in bleeding sap after isolation on a semiselective medium / Szegedi E., Bottka S. // Vitis. – 2002. – V. 41, № 1. – P. 37 – 42.
11. Stover E. W. Crown gall formation in a diverse collection of *Vitis* genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis* / Stover E. W., Swartz H. J., Burr T. J. // Am. J. Enol. Vitic. – 1997. – № 48. – P. 26 – 32.

Конуп Л. А., Чистякова В. Л., Конуп А. И., Николаева Н. И.

Выявление латентной формы возбудителя бактериального рака винограда в некоторых сортах виноградных растений

*Исследовались некоторые подвойные и привойные сорта винограда на зараженность опухолеобразующими агробактериями методом полимеразной цепной реакции. В ходе исследования параметры полимеразной цепной реакции были модифицированы. Показано, что инфицированными бактериальным раком является не только рядовой посадочный материал, но и сертифицированные клоны винограда. Полученные результаты указывают на необходимость включения *Agrobacterium vitis* в список обязательных при проверке сертифицированного посадочного материала.*

Ключевые слова: *Agrobacterium vitis*, полимеразная цепная реакция, виноград, бактериальный рак.

L. Konup, V. Chistyakova, A. Konup, N. Nikolaeva

Crown gall disease on some grapevine cultivars and their diagnostics

*Some rootstock and scion cultivars grown in the Ukraine have been tested for the presence of tumorigenic agrobacteria polymerase chain reaction. During investigation the conditions of polymerase chain reaction were modified. It was shown that certificated material may be infected by crown gall disease as well as regular planting material. Our data indicate the necessity of including *Agrobacterium vitis* in the list of pathogens that should be tested in the process of certified planting material production.*

Keywords: *Agrobacterium vitis*, polymerase chain reaction, grapes, crown gall.