

SPREMLJANJE BAKTERIJ IZ RODU *AGROBACTERIUM* NA VINSKI TRTI V LETIH 2006 IN 2007

Igor ZIDARIČ¹

Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLEČEK

Rak koreninskega vratu vinske trte povzročajo bakterije iz rodu *Agrobacterium* od katerih je najbolj razširjena bakterija *Agrobacterium vitis*. Bolezen je v Slovenskih vinogradih v manjšem obsegu razširjena že desetletja in ni povzročala večje škode. Zadnjih nekaj stresnih situacij kot je zimska pozeba je povzročilo pojav bolezenskih znamenj in odmiranje trte v povečanem obsegu. Prav tako je z odprtjem trga vse težje nadzirati kakovost in zdravstveno stanje sadilnega materiala. Bolezen se najhitreje širi prav z okuženimi rastlinami. Agrobakterije med rastlinskimi škodljivimi organizmi uvrščamo v kategorijo nadzorovanih nekarantenskih organizmov, ki so pod uradnim fitosanitarnim nadzorom v pridelavi in trženju sadilnega materiala vinske trte. Zaradi večjega pojava bolezenskih znamenj v vinogradih in trsnicah v zadnjih letih, se je FURS odločila za uvedbo dvoletnega posebnega programa, ki smo ga izvedli v letih 2006 in 2007. Program je obsegal vizualna opazovanja, odvzem vzorcev in laboratorijsko določitev povzročitelja. V okviru programa so bili odvzeti in analizirani 203 vzorci, od katerih smo v 161 primerih potrdili agrobakterije. Bakterije smo izoliralirali iz bazičnega, certificiranega in standardnega sadilnega materiala. Prav tako smo bakterije potrdili v matičnih rastlinah.

Ključne besede: *Agrobacterium* spp., vinska trta, vzorčenje, laboratorijsko določevanje

ABSTRACT

MONITORING OF BACTERIA OF THE GENUS *AGROBACTERIUM* ON GRAPEVINE IN 2006 AND 2007

Grapevine crown gall is caused by bacteria of the genus *Agrobacterium* among which the bacterium *Agrobacterium vitis* is the most widely spread. The disease has been present in the Slovene vineyards to a lesser extent for decades but has not caused any greater damage. A few recent stress situations such as winter frost have caused the appearance of disease symptoms and a more intensive decay of grapevine. Also, the opening of market has made more difficult the surveillance of quality and health condition of planting material. The disease has been spreading most rapidly by way of infected plants. Among organisms harmful to plants Agrobacteria are classified in the category of controlled non-quarantine organisms under the official phytosanitary surveillance in the production and marketing of grapevine planting material. Due to increasing number of disease symptoms in vineyards and nurseries in the recent years, the Phytosanitary Administration of the Republic of Slovenia decided to introduce a special two-year programme which was performed in 2006 and 2007. The programme included visual observations, sampling and laboratory determination of the agent. The number of samples taken and analysed in frame of the programme was 203; the presence of agrobacteria was confirmed on 161 of them. The bacteria were isolated from basic, certified and standard planting material. They were also confirmed in mother plants.

¹ dipl. inž. ag., Hacquetova 17, SI-1001 Ljubljana

Ključne besede: *Agrobacterium* spp., vine, sampling, laboratory detection

1 UVOD

Tumorske zadebelitve in izrastki različnih oblik oz. rak koreninskega vratu, kot danes imenujemo to bolezen, je vinogradnikom znana že več kot 100 let. Bakterijo povzročiteljico tumorskih zedebelev na vinski trti in številnih ostalih gostiteljskih rastlinah je Conn leta 1942 poimenoval *Agrobacterium tumefaciens* (Young, 2005). Kasneje so ugotovili, da večino tumorskih sprememb na vinski trti povzroča druga vrsta bakterije. Ophel in Kerr (1990) sta jo poimenovala *Agrobacterium vitis*. Bakterijo *A. vitis* smo v Sloveniji prvič izolirali in določili leta 1998.

Agrobakterije, ki okužujejo vinsko trto, se lahko širijo na različne načine, pri čemer bi izpostavili predvsem širjenje s sadilnim materialom. Burr in ostali (1998) so zapisali, da se moramo pri preprečevanju širjenja osredotočiti predvsem na odporne sorte, na tehnologijo, ki znižuje možnost različnih poškodb in na neokužen sadilni material. Ophel (1988) je zapisal, da je okužen sadilni material najpomembnejši dejavnik širjenja patogena in je uporaba neokuženega sadilnega materiala celo bistvena za nemoteno proizvodnjo, saj se pri latentno okuženem sadilnem materialu lahko pojavijo bolezenska znamenja že ob vsakem večjem stresu. Vsem pogojem, ki so potrebni za preprečevanje širjenja patogena, sicer lahko teoretično zadostimo, vendar v praksi naletimo na velike ovire.

Razvoj bolezenskih znamenj pri rastlinah, ki so okužene z bakterijami iz rodu *Agrobacterium* je edinstven. Tumorji se razvijejo le tedaj, ko bakterije vnesejo svoj dedni material v dedni material gostiteljskih rastlin. Rastlinske celice tako postanejo avtonomno deleče se tumorske celice (Burr in sod. 1998). Patogenost *Agrobacterium vitis* je tako pogojena s prenosom dela Ti-plazmida v jedro DNA rastlinske celice. Ekspresija T-DNA se kaže v hiperprodukciji rastlinskih hormonov avksinov in citokininov, kar ima za posledico nastanek tumorjev in izločanje opinov (Kaufman in sod. 1996).

2 PROGRAM IN METODE DELA

Posebni program spremljanja bakterij iz rodu *Agrobacterium* je bil namenjen odkrivanju okužb, ki jih omenjene bakterije povzročajo na vinski trti. S programom spremljanja smo začeli zaradi vse večjega pojavljanja bolezenskih znamenj, ki jih na vinski trti povzročajo agrobakterije. Zaradi specifične biologije bakterije smo v času spomladanskih pregledov izvedli vzorčenja le na osnovi bolezenskih znamenj, v času jesenskih pregledov pa na osnovi bolezenskih znamenj in na mestih pridelave sadilnega materiala, tudi na osnovi latentnega pojava povzročitelja.

Obseg programa:

- vizualna opazovanja v vinogradih, matičnjakih, matičnih vinogradih in trsnicah
- odzemanje vzorcev pri sumljivih bolezenskih znamenjih
- odzemanje vzorcev za testiranje na osnovi latentne okuženosti
- laboratorijske analize
- vpisi v aplikacijo FITO – nadzor
- izdelava karte razširjenosti in opravljenih pregledov

Organizacije vključene v program:

- Kmetijski inštitut Slovenije
- Fitosanitarna inšpekcija
- Fitosanitarna uprava Republike Slovenije
- ostali (pooblaščenji izvajalci javne službe zdravstvenega varstva rastlin)

Metoda za dokazovanje okužbe pri vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji:

- izolacija bakterij neposredno iz svežih tumorskih izrastkov
- inkubacija v PBS pufri
- nacepljanje na selektivna gojišča (1A, 2E, 3DG in R/S)
- gojenje v čisti kulturi
- po potrebi barvanje po Gramu
- Metoda za dokazovanje latentne okuženosti se od opisane razlikuje v zahtevnejši izolaciji bakterij iz rastlinskega tkiva, saj je koncentracija bakterij v takšnih vzorcih bistveno manjša.

Za potrditev bakterije smo opravili še:

- molekularno biološko metodo PCR: začetna oligonukleotida *pehA(F)* / *pehA(R)* za določanje *A. vitis* (Eastwell, 1995), začetna oligonukleotida *cytF* in *cytR* za določanje tumorogenih sevov (Hass, 1995) in začetna oligonukleotida *VCF/VCR* za določanje patogenih sevov (Sawada in sod., 1994)
- test patogenosti na testnih rastlinah (sončnica, kalanhoja, paradižnik)
- pri nekaterih izolatih smo opravili še sistem BIOLOG

Laboratorijske analize od priprave prispelih vzorcev, izolacije bakterij na gojiščih, identifikacije povzročitelja in potrditvene teste smo opravili na KIS-u. Vodena je bila tudi evidenca o prispelih vzorcih in rezultatih analiz, ki so bili vneseni v aplikacijo FITO – nadzor.

3 REZULTATI

V okviru dvoletnega programa so bili odvzeti 203 vzorci vinske trte, 192 vzorcev na osnovi sumljivih ali izrazitih bolezenskih znamenj in 11 na osnovi preverjanja latentne zastopanosti patogena. Bakterije iz rodu *Agrobacterium* smo potrdili v 161 vzorcih (Preglednica 1) od tega v enem vzorcu, kjer smo preverjali latentno zastopanost patogena. V 143 vzorcih smo potrdili bakterijo *A. vitis*, v 12 primerih *A. tumefaciens* in v 6 primerih smo določili le rod *Agrobacterium*. Polovica odvzetih vzorcev je imela izražena za bolezen zelo specifična bolezenska znamenja. Pri večini vzorcev so se bolezenska znamenja pojavila na cepljenem mestu. Pri nekaterih vzorcih so se bolezenska znamenja pojavila tudi na cepiču in podlagi. Iz petih vzorcev kljub izrazitim bolezenskim znamenjem nismo uspeli izolirati živih bakterij.

Preglednica 1: Število vzorčenj in število vzorcev v katerih so bile ugotovljene bakterije iz rodu *Agrobacterium* po preglednikih/vzorčevalcih v letu 2006 in 2007

| PREGLEDNIK/ VZORČEVALEC | ŠT. VZORCEV | ŠT. VZORCEV V KATERIH SO BILE POTRJEENE BAKTERIJE IZ RODU <i>AGROBACTERIUM</i> | REZULTAT LABORATORIJSKE ANALIZE NEGATIVEN |
|------------------------------------|------------------------|---|--|
| FSI | 148 | 119 | 29 |
| KGZS - NM | 24 | 13 | 11 |
| KIS | 31 | 29 | 2 |
| SKUPAJ | 203 | 161 | 42 |

Preglednica 2: Vrsta vzorčenega materiala in rezultat laboratorijskih analiz v letu 2006 in 2007

| VRSTA MATERIALA | ŠT. VZORCEV | ŠT. VZORCEV V KATERIH SO BILE POTRJEJENE BAKTERIJE IZ RODU <i>AGROBACTERIUM</i> | REZULTAT LABORATORIJSKE ANALIZE NEGATIVEN |
|-------------------|-------------|---|---|
| MR | 23 | 16 | 7 |
| MR - certifiiran | 5 | 4 | 1 |
| PO | 3 | 2 | 1 |
| TRTA | 18 | 11 | 7 |
| SA | 107 | 88 | 19 |
| SA - certificiran | 28 | 27 | 1 |
| SA - bazični | 2 | 2 | 0 |
| SA - standard | 17 | 11 | 6 |
| SKUPAJ | 203 | 161 | 42 |

Opombe:

- SA – sadilni material, cepljenka vinske trte
 MR – matična rastlina (deli matične rastline)
 PO – podlaga
 TRTA – deli vinske trte

V letu 2007 smo na testiranje v referenčni laboratorij poslali 10 izolatov agrobakterij. Od tega tri izolate uporabljamo kot referenčne. Analize so opravili na inštitutu IVIA (Instituto Valenciano de investigaciones agrarias) v Španiji. Namen testiranja je bila primerjava naših rezultatov in rezultatov referenčnega laboratorija in s tem preverjanje zanesljivosti vpeljanih metod, ki jih pri identifikaciji agrobakterij uporabljamo pri nas. Na podlagi dobljenih rezultatov referenčnega laboratorija smo ugotovili, da so se rezultati naših in njihovih analiz ujemali.

Preglednica 3: Rezultati identifikacije desetih izolatov agrobakterij v našem in referenčnem laboratoriju (IVIA) in njihova primerjava

| zaporedna št. vzorca | rezultati KIS | | | | rezultati IVIA | | |
|----------------------|---------------|-----------|---------------|-----------------------|----------------|-----------|----------------------------|
| | PCR (pehA) | PCR (cyt) | Multiplex PCR | Rezultat | PCR (pehA) | PCR (tmr) | Rezultat |
| 1 | + | + | <i>A.v</i> | <i>A.vitis</i> | + | + | <i>A.vitis</i> |
| 2 | - | + | <i>A. t</i> | <i>A. tumefaciens</i> | - | - | <i>A. tumefaciens</i> |
| 3 | + | | <i>A.v</i> | <i>A.vitis</i> | + | - | <i>A.vitis</i> |
| 4 | - | | <i>A. r</i> | <i>A. rhizogenes</i> | - | - | <i>A. sp. (rhizogenes)</i> |
| 5 | + | | <i>A.v</i> | <i>A.vitis</i> | + | + | <i>A.vitis</i> |
| 6 | + | | <i>A.v</i> | <i>A.vitis</i> | + | + | <i>A.vitis</i> |
| 7 | - | | <i>A. t</i> | <i>A. tumefaciens</i> | - | - | <i>A. tumefaciens</i> |
| 8 | + | | <i>A.v</i> | <i>A.vitis</i> | + | + | <i>A.vitis</i> |
| 9 | - | | <i>A. t</i> | <i>A. tumefaciens</i> | - | - | <i>A. tumefaciens</i> |
| 10 | + | | <i>A.v</i> | <i>A.vitis</i> | + | - | <i>A.vitis</i> |

V okviru programa je bilo vzorčenih 28 sort vinske trte, ter podlagi SO4 in Kober 5BB. Agrobakterije smo potrdili v sortah: Babič, Beli pinot, Chardonnay, Gamay, Kerner,

Kraljevina, Kraljica vinograda, Laški rizling, Modra frankinja, Modri pinot, Plavac mali, Portugalka, Ranfol, Ranina, Rebula, Refošk, Renski rizling, Rumeni muškat, Sauvignon, Syrah, Šentlovrenka, Šipon, Traminec, Zelen, Zweigelt in Žametna črnina. Pri sortah Vitoria in Zeleni silvanec agrobakterij nismo potrdili. Agrobakterije smo potrdili tudi v podlagi SO4. Kot podlage vzorcev (cepljenk), na katere so bile cepljene žlahtne sorte vinske trte v katerih smo določil agrobakterije so bile: SO4, Kober 5BB, Teleki 5C, Binova, Richter (brez oznake selekcije), VI M, Paulsen (brez oznake selekcije), Teleki 8B in 420 A. Izvor sadilnega materiala v katerem smo potrdili agrobakterije je bil iz Slovenije, Francije (podlage) in Hrvaške (cepič).

4 SKLEPI

V okviru programa so bili skupno odvzeti 203 vzorci, od katerih je imela polovica izrazita bolezenska znamenja. Le 11 vzorcev je bilo odvzetih na osnovi preverjanja latentne zastopanosti patogena in v enem od teh so bile potrjene agrobakterije. Ustreznost uporabljenih metod za identifikacijo agrobakterij smo potrdili z vzporednimi analizami vzorcev v referenčnem laboratoriju. Agrobakterije smo potrdili v 161 vzorcih, kar je 79,3 %. V 143 primerih oz. 89 % je bila izolirana bakterija *Agrobacterium vitis* v 18 primerih pa smo izolirali ostale agrobakterije. Za nastanek tumorskih sprememb na trti velja, da jih v 90% povzročajo bakterije *A. vitis* v 10% pa te spremembe povzročajo ostale vrste agrobakterij. Patogene bakterije smo potrdili v sadilnem materialu, matičnih trsih, vinski trti oz. njenih delih. Izvor sadilnega materiala, ki je bil vključen v laboratorijske analize, je bil iz Slovenije, Hrvaške in Francije. Večina vzorcev so bile okužene cepljenke vinske trte zato sklepamo, da je tudi pri nas za širjenje agrobakterij kriv predvsem okužen sadilni material. Ustreznost uporabljene metode za identifikacijo agrobakterij smo potrdili z vzporednimi analizami vzorcev v referenčnem laboratoriju.

5 LITERATURA

- Burr, T., J., Bazzi, C., Süle, S., Otten, L. 1998. Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant disease*, 82: 1288 -1297
- Eastwell, C., K. 1995. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant disease*, 79: 822 - 827
- Haas, J., H., Moore, L., W., Ream, W., Manulis, S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and environmental microbiology*, 61: 2879 – 2884
- Kaufman, M., Kassemeyer, H., H., Otten, L. 1996. Isolation of *Agrobacterium vitis* from grapevine propagating material by means of PCR after immunocapture cultivation. *Vitis*, 35: 151 – 153
- Ophel, K., Burr, T., J., Magarey, P., A., Kerr, A. 1988. Detection of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in South Australian grapevine propagation material. *Australasian plant pathology vol: 17 (3)*. 61 - 66
- Ophel, K., Kerr, A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for Strains of *Agrobacterium* biovar 3 from Grapevines. *International journal of systematic bacteriology*. Vol 40, no. 3: 236 – 241
- Sawada, H., Ieki, H., Matsuda, I. 1994. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and environmental microbiology*, 61: 828 – 831
- Young, M., J., Kerr, A., Sawada, H. 2005. Genus II. *Agrobacterium* Conn 1942. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol two. 340 – 345