Zbornik predavanj in referatov s 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 3.-4. marec 1999 str. 265-268

AGROBACTERIUM VITIS NA VINSKI TRTI V SLOVENIJI

Marta ŠABEC-PARADIŽ[1], Vojko ŠKERLAVAJ[2]

Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Na zastopanost bakterij *Agrobacterium* sp. smo preiskali 35 vzorcev trsov in cepljenk, ki smo jih zbrali v 3 slovenskih pokrajinah. 24 vzorcev je imelo sumljive rakaste izrastke, preostalih 11 pa ne. Vzorce smo preiskovali s 4 metodami: z izolacijo kolonij na 4 selektivnih gojiščih, z dokazovanjem zastopanosti onkogenov *tmr, acs* in *vis* na T-DNA z verižno reakcijo s polimerazo, z določanjem opinov v tumornem tkivu in s testiranjem patogenosti izolatov na testnih rastlinah. Pri 19 vzorcih z znamenji bolezni smo dokazali okuženost z *A. vitis* z molekularno metodo, pri 14 pa smo dokazali opine. Z molekularno metodo smo okuženost z *A. vitis* dokazali tudi pri 1 vzorcu brez znamenj bolezni. *A. tumefaciens* nismo našli.

Ključne besede: *Agrobacterium vitis, A. tumefaciens,* vinska trta, rak, Slovenija, opini, verižna reakcija s polimerazo

ABSTRACT

AGROBACTERIUM VITIS ON GRAPEVINE IN SLOVENIA

35 samples of grapevine plants and propagating material were taken in 3 slovene provinces and tested for the presence of *Agrobacterium* sp. 24 samples had suspicious tumorous symptoms, the others 11 did not. The samples were tested by 4 methods: isolation of colonies on 4 selective media, detection of T-DNA carrying oncogenes *tmr, acs* and *vis* with the PCR, detection of opines in tumor tissue and testing for pathogenicity on plants. 19 samples with symptoms were proved to be infected with *A. vitis* by the molecular method and 14 by the detection of opines. By the molecular method *A. vitis* was also proved in 1 sample without symptoms. *A. tumefaciens* was not found.

Keywords: *Agrobacterium vitis, A. tumefaciens,* grapevine, crown gall, Slovenia, opines, PCR

1 UVOD

Na vinski trti lahko povzročijo bolezenska znamenja 3 biovarji *Agrobacterium tumefaciens*. Biovarja 1 in 2 imata širok spekter gostiteljskih rastlin in škodo med drugim povzročata tudi na pečkarjih in koščičarjih, dočim bv. 3 povzroča škodo le na vinski trti (15). *A. tumefaciens* bv. 3 so leta 1990 predlagali za novo vrsto *A. vitis* (17).

Bolezenska znamenja na trsih in cepljenkah so izrastki, razpoke in odebelitve, ki se običajno pojavijo zgodaj poleti. Rakasti izrastki se ponavadi razvijejo okoli cepljenega mesta. Na starejših rastlinah se lahko širijo okoli podolžnih razpok, ki zajamejo vso rastlino. Rakaste tvorbe lahko najdemo tudi na podlagah. Huje prizadete rastline hirajo in lahko kmalu propadejo. Okužba je lahko tudi latentna (2, 7).

Na podlagi bolezenskih znamenj ne moremo sklepati, ali gre za okužbo z *A. tumefaciens* ali *A. vitis*. Rakaste tvorbe lahko razlikujemo od kalusa z določanjem opinov v soku iz maceriranega sumljivega tkiva (25). Okuženost rastlin z *Agrobacterium* sp. lahko

[1] dipl. ing. kmet., SI-1000 Ljubljana, Hacquetova 17
[2] dipl. ing. kmet., prav tam

dokažemo pri rastlinah z bolezenskimi znamenji ali brez njih (latentna okužba) z določanjem biokemičnih in fizioloških lastnosti izoliranih bakterij z gojitvenimi metodami ali z določanjem sestave maščobnih kislin v celicah (4, 12, 13, 14, 23). Opisane so tudi serološke metode, ki pa se zaradi metodoloških težav niso uveljavile (3). Patogenost izolatov lahko dokažemo s testiranjem na testnih rastlinah in z molekularno biološkimi metodami, s katerimi lahko hkrati razlikujemo tudi vrsto povzročitelja (10, 16, 21).
Rakaste tvorbe, ki jih na vinski trti povzročajo agrobakterije se pojavljajo v številnih državah in kontinentih (7). Sumljive izrastke in propadanje huje prizadetih trt opažajo v zadnjih letih pogosto tudi v naših vinogradih in trsnicah (22). Pogosto jih opažajo v Podravskem in Posavskem vinorodnem rajonu, v Primorskem pa zelo redko. Videz, številčnost in razširjenost vzbujajo sum, da jih povzroča *Agrobacterium* sp.. Vzorce s sumljivimi izrastki so leta 1998 poslali tudi na preiskavo v tujino, vendar povzročitelja niso uspeli izolirati in dokazati.
Namen našega dela je bil zbrati vzorce s sumljivimi izrastki in brez njih v Posavskem in Podravskem vinorodnem rajonu, ugotoviti ali gre res za rakaste tvorbe, izolirati morebitne povzročitelje in jih diferencirati.

2 MATERIAL IN METODE

35 vzorcev za laboratorijske preiskave smo zbrali jeseni leta 1998 v 9 vinogradih in 6 trsnicah s Podravskega in Posavskega vinorodnega rajona in v enem matičnjaku s Podravskega vinorodnega rajona. Bolezenska znamenja je imelo vseh 15 vzorcev trsov in polovica od 18 vzorcev cepljenk. Vzorca iz matičnjaka nista imela bolezenskih znamenj.

Okuženost s patogenimi agrobakterijami smo dokazovali na 4 načine. Opine oktopin, nopalin in vitopin smo določali v vzorcih trsov s sumljivimi izrastki po metodah, ki so jih opisali Otten in Schilperoort (1978) ter Szegedi in sod. (1988) (18, 25).
Vzorce smo pripravili po metodah, ki so jih opisali Burr in Katz (1983), Moore in sod. (1988) in Schultz (1992) ter jih nacepili na 4 gojišča, selektivna za vse tri biovarje *Agrobacterium* sp. (5, 6, 16, 19, 20).
Zastopanost genov *tmr*, *acs* in *vis* na T-DNA smo pri izolatih dokazovali po metodi Schultza (1993) (21). Patogenost izolatov smo testirali na rastlinah *Kalanchoe daigremontiana* kot sta opisala Anderson in Moore (1979) (16).

3 REZULTATI

A. tumefaciens bv. 1 in bv. 2 nismo dokazali kot povzročitelja bolezni pri nobenem vzorcu. Značilne kolonije se na selektivnih gojiščih za ta biovarja niso pojavile. Sumljive kolonije, ki so zrasle iz dveh vzorcev, smo testirali z začetnim oligonukleotidom *tmr*. Do namnožitve značilne sekvence ni prišlo.
Kolonije, ki so zrasle iz vzorcev iz matičnjaka, niso bile sumljive za *Agrobacterium* sp. in jih nismo testirali naprej.
Iz vseh vzorcev z bolezenskimi znamenji, tako tistih iz vinogradov, kakor tistih iz trsnic, so zrasle značilne kolonije za *A. vitis* vsaj na enem od obeh za to bakterijo selektivnih gojišč. Sumljive kolonije so zrasle tudi iz vzorcev nekaterih cepljenk brez bolezenskih znamenj.
Vse kolonije, tipične ali sumljive za *A. vitis* smo analizirali z verižno reakcijo s polimerazo z začetnima oligonukleotidoma *acs* in *vis*. Okuženost s patogenim *A. vitis* smo tako dokazali pri 13 od 14 testiranih trsov in pri 6 od 9 vzorcev cepljenk z bolezenskimi znamenji, pa tudi pri 1 cepljenki brez njih.
Opine smo dokazali v 14 od 15 vzorcev trsov z bolezenskimi znamenji in sicer v 11 vzorcih oktopin in v po enem vzorcu nopalin, nopalin in oktopin ter oktopin in vitopin.

Testiranja patogenosti izolatov na testnih rastlinah niso bila uspešna. Odebelitve se niso pojavile niti na rastlinah, okuženih s pozitivnimi kontrolami.

4 RAZPRAVA

Naša raziskava je pokazala, da so bile rakaste tvorbe pri odvzetih trsih posledica okuženosti z *A. vitis*, saj smo pri 13 od 15 vzorcev okuženost dokazali z zastopanostjo opinov in značilnih sekvenc, pri 2 vzorcih pa vsaj z eno metodo. Uporabljene metode so učinkovite tudi za dokazovanje latentne okuženosti cepljenk, saj smo *A. vitis* izolirali tudi iz ene cepljenke, ki ni kazala znamenj bolezni. To so prvi dokazi okuženosti trte z *A. vitis* v Sloveniji.

Pri vzorcih, ki imajo izrazita bolezenska znamenja in tako velike izrastke, da iz njih lahko izcedimo sok, za dokazovanje okuženosti zadostuje analiza glede prisotnosti opinov. Vitopin vsebujejo le izrastki, ki jih inducira *A. vitis*, medtem ko oktopin in nopalin lahko vsebujejo tudi izrastki, ki jih inducirata oba biovarja *A. tumefaciens* (8, 25). Za katero vrsto povzročitelja gre, ugotovimo z izolacijo bakterij na gojiščih, selektivnih za posamezne povzročitelje. Tudi latentno okuženost lahko dokažemo le, če povzročitelja izoliramo na gojišču. Z molekularnimi metodami, ki smo jih uporabili, smo dokazali, da so izolirane bakterije res agrobakterije. Uporabljeni začetni oligonukleotidi *tmr*, *acs* in *vis* omogočajo namnožitev značilnih sekvenc na delu plazmida (T-DNA), ki se vgradi v rastlinski genom, in lahko povzroči tvorbo tumorja. Tako smo dokazali, da so izolirane bakterije imele plazmide z geni za patogenost (9, 10, 20, 21).

Dejstvo, da smo ob ugotavljanju okuženosti z *Agrobacterium* sp. dokazali le *A. vitis*, lahko pomeni da je, podobno kot v svetu, tudi pri nas to tista vrsta bakterij, ki najbolj pogosto povzroča rakaste tvorbe na vinski trti (2, 6, 7, 24).

Vzrokov za naše neuspešno testiranje patogenosti na testnih rastlinah je lahko več. Okuževali smo novembra, zato je verjetno, da so bile rastline *K. daigremontiana* slabše dovzetne za okužbo (1, 25). Znano je, da sevi lahko izgubijo gene za patogenost, vendar pa je v našem primeru metoda z verižno reakcijo s polimerazo dokazala, da so bili pri izoliranih sevih onkogeni zastopani.

Dejstvo, da vinogradniki v Primorskem vinorodnem okolišu, za razliko od drugih slovenskih okolišev, opažajo rakaste tvorbe le izjemoma, je verjetno posledica ugodnejše klime. Znano je, da *Agrobacterium* lahko razvije svoje patogeno delovanje in povzroči rakaste tvorbe le ob poškodbi trsa. Najpogostejši vzrok poškodb so pozebe, te pa so v Primorskem vinorodnem okolišu redkejše. Ta sklepanja se ujemajo z opažanji, da so v svetu in Evropi, rakaste tvorbe pogostejše v državah, kjer so tudi pozebe pogostejše, npr. v Nemčiji, Kanadi in ZDA (2, 8).

Z nadaljnjimi preiskavami bi kazalo dognati razširjenost okužbe zlasti z *Agrobacterium vitis* v Sloveniji in preizkusiti načine za preprečevanje širjenja bolezni, kar bi omogočilo tudi uvajanje usmerjenih preventivnih ukrepov.

Zahvala

Za metodološke napotke pri določanju agrobakterij se zahvaljujem dr. Thomasu F. Schultzu, Vitolab, Lauffen a. N., Nemčija.

5 LITERATURA

Anderson A. R. / Moore T. W. (1979): Host specifity in genus *Agrobacterium*.- Phytopathology, 69/4, str. 320-323.

Bauer C. in sod. (1994): Population dynamics of *Agrobacterium vitis* in two grapevine varieties during the vegetation period.- Vitis, 33, str. 25-29.

Bazzi C. / Piazza C. (1987): Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine cuttings.- EPPO Bulletin, 17, str. 105-112.

Bouzar H. in sod. (1993): Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon source utilisation patterns and fatty acid profiles.- Phytopathology, 83, str. 733-739.

Brisbane P. G. / Kerr A. (1983): Selective media for three biovars of *Agrobacterium*.- J. Appl. Bacteriol., 54, str. 425-431.

Burr T. J. / Katz B. H. (1983): Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil.- Phytopathology, 73, str. 163-165.

Burr T. J. in sod. (1998): Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies.- Plant Disease, 82/12, str. 1288-1297.

Canaday J. in sod. (1992): Organisation and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine plasmid pTiS 4.-Mol. Gen.- Genet, 235, str. 292-303.

Chilton M.-D. in sod. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis.- Cell, 11, str. 263-271.

Dong L. - C. in sod. (1992): Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*.- Phytopathology, 82, str. 434-439.

Gaudin V. in sod. (1994): Bacterial genes modifying hormonal balances in plants.- Plant. Physiol. Biochem., 32/1, str. 11-29.

Holt J. G. in sod. (1994): Bergey's manual of determinative bacteriology.- Ed. Williams & Wilkins, 9 th ed., str. 71 in 130.

Jäger J. in sod. (1989): The indexing of grapevine propagating material latently infested by *Agrobacterium tumefaciens* bv. 3 – isolate identification by gas chromatography of whole cell fatty acids.- Vitic. Enol. Sci., 44, str. 177-182.

Kersters K. / De Ley J. (1984): *Agrobacterium* Conn 1942.- V Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.1, N.R. Krieg, ed. Williams and Wilkins, Baltimore, str. 244-254 .

Knauf V. C. in sod. (1982): Genetic factors controlling the host range of *Agrobacterium tumefaciens*.- Phytopathology, 77/12, str. 1545-1549.

Moore L. W. in sod. (1994): *Agrobacterium*.- V: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press, ed. Schaad N.W., 2nd ed., str. 16-34.

Ophel K. / Kerr A. (1990): *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines.- Int. J. Syst. Bacteriol., 40, str. 236-241.

Otten L. / Schilperoort R. A. (1978): A rapid micro scale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities.- Biochimica Biophysica Acta, 527, 497-500.

Roy M. A. / Sasser M. (1983): A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3.- Phytopathology, 73, str. 810.

Schultz T. F. (1992): Untersuchungen zur Epidemiologie und Phylogenie von *Agrobacterium vitis* sp. nov., dem Erreger der Mauke an Weinreben.- Ph.D. Thesis, Neustadt.

Schultz T.F. *et al.* (1993): Amplification of different marker sequences for identification of *Agrobacterium vitis* strains.- Vitis, 22, 179-182.

Sebenik D. (1998): Skrivnostni rak na trsih.- Sodobno kmetijstvo, 5, 4. Februar.

Spies A. G. (1979): Isolation and characterization of *Agrobacterium* species.- N. Z. J. Agric Research, 22, str. 631-636.

Stover E. W. in sod. (1997): Crown gall formation in a diverse collection of *Vitis* genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*.- Am. J. Enol. Vitic., 48, str. 26-32.

Szegedi E. in sod. (1988): Opines in crown gall tumors by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*.- Physiological and molecular plant pathology, 32, str. 237-247.