

KLASIČNE METODE DOLOČANJA BAKTERIJE *Agrobacterium vitis*

Eva FABJANČIČ¹

Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo,
Inštitut za fitomedicino, Ljubljana

IZVLEČEK

Med klasične metode določanja rastlinskih patogenih bakterij uvrščamo opazovanje tipičnih bolezenskih znamenj na rastlini, izolacijo bakterij na gojiščih, karakterizacijo z morfološkimi, fiziološkimi in biokemičnimi testi ter okuževanje gostiteljskih rastlin. Na primeru povzročitelja bakterijskega raka na vinski trti bomo prikazali izolacijo bakterij na semiselektivnem gojišču, barvanje bakterij po Gramu, test katalaze in oksidaze ter določanje biokemičnih in fizioloških lastnosti bakterij izoliranih iz tumorjev na vinski trti: rast pri 37 °C, rast na 2 % NaCl, tvorba 3-ketolaktoze, tvorba kisline iz eritritola, adonitola in melecitoze, izraba citrata, litmus milk test, tvorbo baze iz malonata in tartrata. S temi testi lahko razlikujemo med seboj tri različne biovarje bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Kljub pomanjkljivostim klasičnih bakterioloških metod za identifikacijo in karakterizacijo izolatov, kot sta dolgotrajnost in nezadostna občutljivost, z njimi lahko odkrijemo fenotipske lastnosti bakterij. Vsekakor pomenijo bistveno dopolnitev novejšim, hitrejšim in zanesljivejšim metodam določanja bakterij, kot so serološke metode, določanje profila maščobnih kislin in različne molekularne tehnike.

Ključne besede: *Agrobacterium vitis*, biokemični testi, izolacija, patogenost, simptomi

ABSTRACT

CLASSICAL IDENTIFICATION METHODS OF *Agrobacterium vitis*

Classical identification methods of plant pathogenic bacteria include knowledge of the most typical disease symptoms on plants, isolation of pure bacterial cultures on media, characterisation with morphological, physiological and biochemical tests and artificial inoculation of host plants. Isolation of causal agent of grape crown gall on semiselective media, Gram staining, catalase and oxidase tests and different biochemical and physiological characteristics of isolated bacteria from grapevine tumors like growth at 37 °C, growth on 2 % NaCl, 3-ketolactose production, acid production from erythritol, adonitol and melezitose, citrate utilization, litmus milk activity, alkali production from malonic and L-tartaric acid will be described. These diagnostic tests separate the strains of *Agrobacterium tumefaciens* into three biovars. Phenotypical characteristic of bacterial isolates can be detected with these classical bacteriological methods for identification and characterization, although there are some disadvantages like long duration and insufficient sensitivity. Anyway, they represent important supplement of new, fast and more reliable bacterial detection methods like serological studies, fatty acid analyses and different molecular-based techniques.

Keywords: *Agrobacterium vitis*, biochemical tests, isolation, pathogenicity, symptoms

¹ univ. dipl. inž. agr., SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

1. UVOD

V primerjavi z glivami je identifikacija fitopatogenih bakterij, zaradi njihove specifične zgradbe, težaven in zapleten postopek. Ker so bakterije enocelični organizmi, jih ne moremo identificirati le na podlagi morfoloških lastnosti, zato se v svetu uporabljajo že dolgo znane klasične bakteriološke metode, kamor uvrščamo opazovanje tipičnih bolezenskih znamenj na rastlini, izolacijo bakterij na gojišču, označitev (karakterizacijo) izolatov z morfološkimi, fiziološkimi in biokemičnimi testi ter okuževanje gostiteljskih rastlin za ugotavljanje patogenosti (Colwell in Grigorova, 1987). S pomočjo teh postopkov lahko ločujemo različne biovarje bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, ki okužujejo različne gostiteljske rastline; biovar 1 okužuje predvsem pečkato sadje, biovar 2 koščičarje in biovar 3, ki se od leta 1990 imenuje *Agrobacterium vitis*, vinsko trto (Kerstens in De Ley, 1989, Ophel in Kerr, 1990). Opredelili bomo lastnosti *A. vitis*, ki je povzročitelj bakterijskega raka koreninskega vratu na vinski trti.

2. MATERIAL IN METODE DE LA

Iz vzorcev rastlin vinske trte z značilnimi bolezenskimi znamenji bakterijskega raka z različnih območij Podravskega in Posavskega vinorodnega rajona, smo izolirali bakterije *A. vitis* na dveh selektivnih gojiščih (Roy in Sasser, 1983, Brisbane in Kerr, 1983). Od klasičnih bakterioloških metod za identifikacijo in karakterizacijo izolatov smo uporabili vizualno in mikroskopsko opazovanje: oblika, velikost in obarvanost zraslih kolonij na gojiščih, barvanje po Gramu (Fahy in Persley, 1983) test katalaze in oksidaze (Colwell in Grigorova, 1987, Macfaddin, 1980) ter določanje fizioloških in biokemičnih lastnosti: rast pri 37 °C, rast na 2 % NaCl, oblikovanje 3-ketolaktoze, oblikovanje kisline iz eritritola, adonitola in melezitose, izraba citrata, litmus milk test, oblikovanje baze iz malonata in tartrata (Kerstens in De Ley, 1984, Macfaddin, 1980, Ophel in Kerr, 1990, Schaad, 1988).

Naredili smo še test patogenosti na rastlinah paradižnika (*Lycopersicum esculentum*) sončnic (*Helianthus annuus*) in kalanhoj (*Kalanchoe tubiflora*), ki jih bakterija *A. vitis* tudi okužuje (Schaad, 1988).

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

3. 1. Značilna bolezenska znamenja na rastlini

Bolezenska znamenja se pojavijo najpogosteje na deblu v okolici cepljenega mesta ali na poškodovanem delu rastline. Snovi, ki se oblikujejo ob poškodbi rastlinskega tkiva sprožijo encimske reakcije, s pomočjo katerih se prenese del bakterijske DNA (T-DNA s Ti-plazmida) v rastlinsko celico, ki tako spremenjena začne oblikovati opine in povečano količino rastlinskih hormonov avksinov in citokininov. Kot posledica teh sprememb se oblikujejo sferični, gladki do grbančasti tumorski izrastki. Manjši imajo videz bradavic, večji pa lahko dosežejo tudi velikost jajca. Proti koncu rastne dobe se tumorji posušijo in večji tudi odpadejo. V naslednjem letu se znova pojavijo na istem mestu ali okoli njega. Trs v okolici tumorjev poka, kar vodi do tvorbe novih izrastkov znotraj vzdolžnih razpok. Število izrastkov se veča in sčasoma lahko prekrije ves starejši les. Okužene rastline slabše rastejo, deli trsa nad izrastki hirajo in slednjič trs propade (Burr *et al.*, 1998).

3. 2. Vizualno in mikroskopsko opazovanje bakterije vrste *A. vitis*

3. 2. 1. Izolacija bakterij na gojiščih

Da lahko bakterijam določimo osnovne lastnosti moramo najprej izolirati čisto kulturo, kar pomeni da imamo skupino organizmov, ki se je razvila iz ene same celice ali iz posamezne skupine enakih celic. Če na primarnem gojišču ne dobimo čiste kulture je potrebno precepljanje na novo gojišče vse dokler ne izoliramo zelene čiste kulture (Colwell in Grigorova, 1987). Da bi izločili saprofitske bakterije smo za nacepljanje bakterij izbrali dve selektivni izolacijski gojišči za *Agrobacterium vitis*. To sta gojišči Roy-Sasser (RS) ter Brisbane in Kerr (3DG).

Na RS gojišču se po 5 do 7 dneh inkubacije pri temperaturi 27 °C oblikujejo majhne, okrogle kolonije z značilnim rdečim centrom in belimi robovi, na 3DG gojišču pa po 5 dneh inkubacije kremno oranžne, kroglaste, gladke, sluzaste kolonije (Ophel in Kerr, 1990).

3. 2. 2. Barvanje po Gramu

Prvi korak pri identifikaciji neznane bakterije je barvanje po Gramu. Ta test nam da koristne informacije o obliki in velikosti celic in ločuje Gram-pozitivne in Gram-negativne vrste. Rezultat nam pomaga pri nadaljnjih odločitvah pri izboru kriterijev za določanje značilnosti zelenega seva.

Agrobacterium vitis je vrsta paličastih bakterij, velikih 1,5–3 x 0,6-1 tisočinko milimetra, ki se obarvajo rdeče, kar pomeni Gram negativne bakterije (Fahy, 1983).

Uporabili smo standardni test oksidaze, ki ga je opisal Kovacs leta 1956. Bakterije *Agrobacterium vitis* se na test odzivajo različno. Sev je oksidazno pozitiven, če se na filter papirju impregniranem z raztopino tetrametil-p-fenilendiamin dihidrokloridom, kamor naneseemo bakterije v 10 sekundah pojavi rdeče obarvanje, delno pozitiven, če se obarvanje pojavi v 10-60 sekundah in negativen, če se obarvanje po 60 sekundah ne pojavi (Colwell, 1987, Klement, 1990, Schaad, 1988).

3. 2. 3. Test katalaze

Katalaza je encim, ki razgrajuje vodikov peroksid (toksičen produkt dihanja pri bakterijah) v vodo in kisik. Večino rastlinskih patogenih bakterij je katalazno pozitivnih. Iz tega stališča ta reakcija tudi ni posebej uporabna za identifikacijo rastlinskih bakterij, lahko pa na ta način preverimo ali je bakterijska kolonija živa. S cepilno zanko prenesemo 24-48 ur staro bakterijsko kolonijo z gojišča na predmetno stekelce. Nato pa razmaz prelijemo s kapljico 20 % raztopine vodikovega peroksida H₂O₂. Pojav mehurčkov plina je pozitivna reakcija, oz. dokaz, da so še fermenti katalaze v proučevani kulturi (Arseničević, 1997, Klement, 1990).

3. 3. Biokemični testi za določitev bakterije vrste *Agrobacterium vitis*

Razvrstitev bakterijskih izolatov v biovarje ali vrste je možna ob uporabi čistih izolatov, na katerih naredimo serijo biokemično – fizioloških testov.

Bakterije *Agrobacterium tumefaciens* biovarja 3 oz. *A. vitis* dajejo pozitivne rezultate pri rasti na gojišču z 2 % NaCl, izrabi citrata, oblikovanju kisline iz adonitola ter oblikovanju baze iz malonata in tartrata, variabilne rezultate pri reakciji oblikovanja 3-ketolaktoze in rasti pri 37 °C ter negativne rezultate pri reakcijah oblikovanja kisline iz eritritola in melezitose. Na litmus milk testu dajejo alkalno reakcijo. Pri testih opazujemo bodisi rast bakterij ali pa spremembo barve gojišča po določenem času, ki je predpisan za posamezen test.

Preglednica 1: Diagnostični testi s katerimi ločujemo med seboj različne seve bakterije *Agrobacterium tumefaciens* v tri biovarje (povzeto po virih: Kersters in De Ley, 1984, Macfaddin, 1980, Ophel in Kerr, 1990, Schaad, 1988).

Table 1: Diagnostics characteristics used to differentiate biovars of the genus *Agrobacterium* (Source: Kersters and De Ley, 1984, Macfaddin, 1980, Ophel and Kerr, 1990, Schaad, 1988).

TEST	REAKCIJA		
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
	biovar 3	biovar 2	biovar 1
Rast pri 37 0C	V	-	+
Oblikovanje 3-ketolaktoze	V	-	+
Litmus milk test	ALK	AC	ALK
Rast na 2 % NaCl	+	-	+
Oblikovanje kisline iz:			
eritritola	-	+	-
adonitola	+		
melezitoze	-	-	+
Izraba citrata	+	+	V
Oblikovanje baze iz malonata	+	+	-
Oblikovanje baze iz tartrata	+	+	V

Legenda:
V - variabilno, AL - Kalkalno, AC - kislo, + pozitivna reakcija, - negativna reakcija

Preglednica 2: Rastne značilnosti in barvne spremembe gojišč uporabljenih v biokemičnih testih za determinacijo bakterije *A. vitis* (Kersters in De Ley, 1984, Macfaddin, 1980, Ophel in Kerr, 1990, Schaad, 1988).

Table 2: Growth characteristics and color changes of media used for biochemical determination of *A. vitis* (Kersters in De Ley, 1984, Macfaddin, 1980, Ophel in Kerr, 1990, Schaad, 1988).

Test	Za bakterijo <i>Agrobacterium vitis</i> značilne spremembe na gojiščih
Rast pri 37 0C	variabilno: raste ali ne
Oblikovanje 3-ketolaktoze	variabilno: oblikuje ali ne, če oblikuje je viden rumen obroč CuO ₂ okrog celične mase
Litmus milk test	alkalna reakcija, ki se izraža v modrem obarvanju gojišča
Rast na 2 % NaCl	raste
Oblikovanje kisline iz eritritola	ne oblikuje kisline, ki bi obarvala gojišče rumeno, modro obarvanje pomeni tvorbo baze
Oblikovanje kisline iz adonitola	oblikuje kislino; rumeno obarvanje gojišča
Oblikovanje kisline iz melezitozene	oblikuje kisline, ni rumenega obarvanja gojišča
Izraba citrata	izrablja citrat; modro obarvanje gojišča
Oblikovanje baze iz malonata	oblikuje bazo; modro obarvanje gojišča
Oblikovanje baze iz tartrata	oblikuje bazo; modro obarvanje gojišča

3. 4. Test patogenosti

Celična morfologija, oblika kolonij na gojišču, biokemične in fiziološke lastnosti bakterij o patogenosti ne izražajo ničesar. Vemo, da vse bakterije rodu *Agrobacterium* niso patogene. Patogenost seva določa Ti- plazmid, za katerega je znano, da se lahko prenaša iz celice v celico in s tem povzroča patogenost oz. nepatogenost posamezne bakterijske celice. Idealno je, če lahko kot gostiteljsko rastlino uporabljamo enako rastlino, iz katere smo bakterije izolirali, vendar pa to praktično ni vedno možno (Fahy in Persley, 1983). Tudi v našem primeru je okuzevanje vinske trte kot gostiteljske rast-

line preveč dolgotrajen postopek, saj lahko simptome okužbe odčitavamo šele po nekaj mesecih, kar vsekakor ni praktično, za ugoden potek raziskav bakterij vrste *A. vitis*. Zato smo se odločili za ustrezne alternativne rastline, ki dajejo hitrejša rezultata. Mednje sodijo paradižnik, sončnica in kalanhoja. Patogeni sevi po 2-4 tednih na mestu umetne okužbe oblikujejo tumorsko tkivo, ki je dokaz njihove virulentnosti (Fahy in Persley, 1983).

4. SKLEPI

Pojavljanje bakterije *Agrobacterium vitis* na trsih vinske trte je bilo v Sloveniji v preteklosti bolj ali manj sporadično, v zadnjih letih pa postaja v določenih vinogradih poglaviti zdravstveni problem in povzročja pomembno gospodarsko škodo.

Okuženosti rastlin s povzročitelji bakterijskih bolezni ni mogoče določiti le na osnovi vizualnega pregleda, ampak so za to potrebne laboratorijske analize.

Za določevanje posameznih vrst rastlinskih patogenih bakterij se v svetu uporabljajo že dolgo znane klasične bakteriološke metode, kamor uvrščamo opazovanje tipičnih bolezenskih znamenj na rastlini, izolacijo bakterij na gojišču, označitev (karakterizacijo) z morfološkim, fiziološkim in biokemičnimi testi ter okuževanje gostiteljskih rastlin za ugotavljanje

patogenosti. Problem klasičnih bakterioloških metod je v njihovi dolgotrajnosti in zapletenosti, vendar lahko z njihovo pomočjo odkrijemo fenotipsko variabilnost izolatov bakterij.

V zadnjih letih je genska tehnologija omogočila hitrejša in bolj natančne analize organizmov tudi na molekularni ravni. Te raziskave bodo pripomogle k uspešnejši diagnostiki in poznavanju narave povzročitelja, ta spoznanja pa lahko pomagajo tudi pri iskanju rešitve na področju varstva rastlin pred bakterijskimi boleznimi.

5. VIRI

- Arsenijević M. 1997. Bakterioze biljaka. Novi Sad, S Print: 145-167
- Brisbane P. G., Kerr A. 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. Journal of Applied Bacteriology, 54: 425-431
- Burr J.T., Bazzi C., Sule S., Otten L. 1998. Crown Gall of Grape, Biology of *Agrobacterium vitis* and Development of Disease Control Strategies. Plant Disease, 82, 12: 1288-1297
- Colwell R.R., Grigorova R. 1987. Methods in Microbiology. Current Methods for Classification and Identification of Microorganisms. London, Academic Press, 19: 1-21
- Fahy P.C., Persley G.J. 1983. Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. Australia, Academic Press: 393
- Kerstens K., De Ley J. 1984. *Agrobacterium* (Conn, 1942), V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Staley *et al.* (ur.). Baltimore, Williams & Wilkins, vol. 1: 244-254
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C., 1990, Methods in Phytobacteriology, Akademiai Kiado, Budapest, s. 135-143, 270-273
- Macfaddin J. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd edition. Baltimore, Williams & Wilkins: 527
- Ophel K., Kerr A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. International Journal of Systematic Bacteriology, 40: 236-241
- Roy M. and Sasser M. 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. Phytopathology, 73: 810
- Schaad N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. St. Paul, Minnesota, APS Press, The American Phytopathological Society: 1-37
- Šabec-Paradiž M., Lapajne S., Munda A., Pajmon A., Škerlavaj V., Urek G., Weilguny H., Zemljč Urbančič M., Žerjav M. 1999. Bakterijski rak koreninskega vratu na vinski trti, *Agrobacterium vitis* Ophel in Kerr, 1990. Tehnološki list 78/99. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije, ISBN 961-6224-49-2