

Problematyka występowania raka bakteryjnego winorośli *Allhorizobium vitis* w Polsce i na świecie

dr inż. Janusz Mazurek

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Katedra Ochrony Roślin, Centrum Diagnostyki Chorób Roślin



Rak bakteryjny na winorośli

Agrobacterium tumefaciens



Szeroki zakres żywicieli > 140 gatunków

Agrobacterium (Allorhizobium) vitis



Wąski zakres żywicieli – praktycznie tylko *V. vinifera*

Rak bakteryjny (*Agrobacterium vitis*) - nomenklatura

Agrobacterium tumefaciens



Agrobacterium tumefaciens biovar 3 (1977)



Agrobacterium vitis (1990)

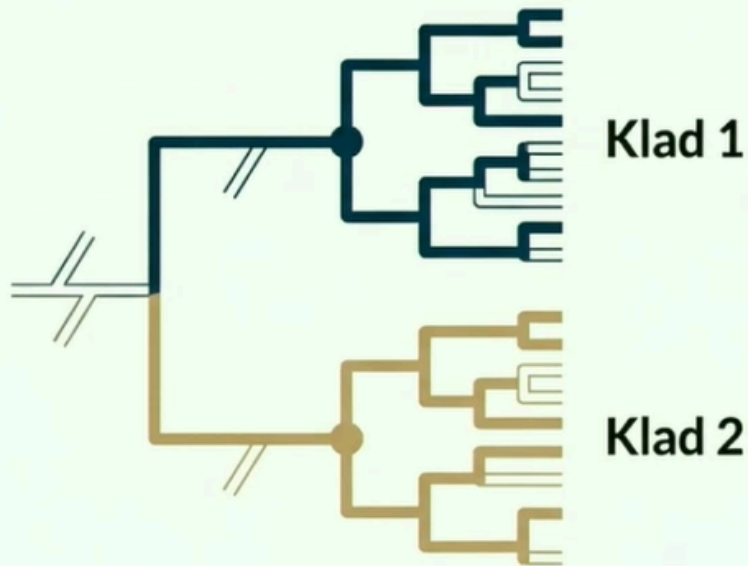


Rhizobium vitis (***Allorhizobium vitis***!!!)

Jest to gatunek dominujący, jakkolwiek izolowane są szczepy tumorigeniczne *Agrobacterium tumefaciens*

Rak bakteryjny (*Agrobacterium vitis*) - nomenklatura

Najnowsze badania genetyczne (Kuzmanowicz et al., 2022) wskazują, że w rzeczywistości jest to kompleks co najmniej 2 gatunków, włącznie z ostatnio wykrytym *Allorhizobium ampelinum* sp. nov.



Allorhizobium vitis sensu stricto

Klad 1: Obejmuje szczep typowy K309T.

Allorhizobium ampelinum sp. nov.

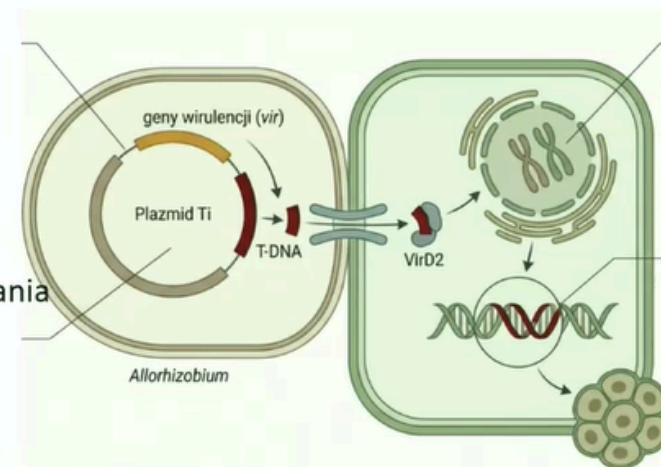
Klad 2: Obejmuje szczep typowy S4T.

Różnica metaboliczna

Szczepy *All. vitis* sensu stricto posiadają unikalną zdolność do degradacji 4-hydroksyfenylooctanu.

Rak bakteryjny – schemat infekcji.

- Zraniona roślina wydziela substancje pobudzające *Agrobacterium*
- Następuje aktywacja **plazmidu indukującego guzy (Ti)**, który zawiera dwa kluczowe regiony:
- **T-DNA:** jednoniciowy fragment DNA, który integruje się z genomem komórki roślinnej
- Koduje on geny odpowiedzialne za syntezę hormonów roślinnych (auksyn i cytokinin), co prowadzi do **niekontrolowanej proliferacji komórek** i formowania guzów, a także geny **syntezy opin** – unikalnych związków wykorzystywanych przez bakterie jako źródło węgla i azotu
- **Region vir (wirulencji):** Zestaw genów, których produkty białkowe są niezbędne do wycięcia, ochrony i transportu T-DNA do komórki gospodarza



- T DNA jest transportowany przez specjalny kanał kontaktujący się z komórką roślinną.
- Opakowujące T-DNA białka zawierają w swej strukturze zakodowany adres, pod który należy je dostarczyć, T-DNA w komórce roślinnej kierowany jest do jądra;
- Tam włącza się do materiału genetycznego komórki i uruchamia produkcję **opin** oraz hormonów roślinnych



Inne czynniki wirulencji (enzymy) – poza plazmidem Ti

- Chociaż plazmid Ti jest niezbędny do indukcji guzów, inne czynniki bakteryjne przyczyniają się do pełnej patogeniczności *A. vitis*
- **Poligalakturonaza (PG):** Kodowana przez gen *pehA*, jest enzymem degradującym pektyny w ścianie komórkowej roślin.
- ✓ Jest to ważny czynnik wirulencji, który przyczynia się do powstawania nekrotycznych zmian na korzeniach winorośli, co jest objawem charakterystycznym dla *A. vitis*, a także do zwiększonej tumorigeniczności.
- **Katalaza:** Gen kodujący katalazę został zidentyfikowany jako czynnik wirulencji zaangażowany w proces tworzenia guzów.

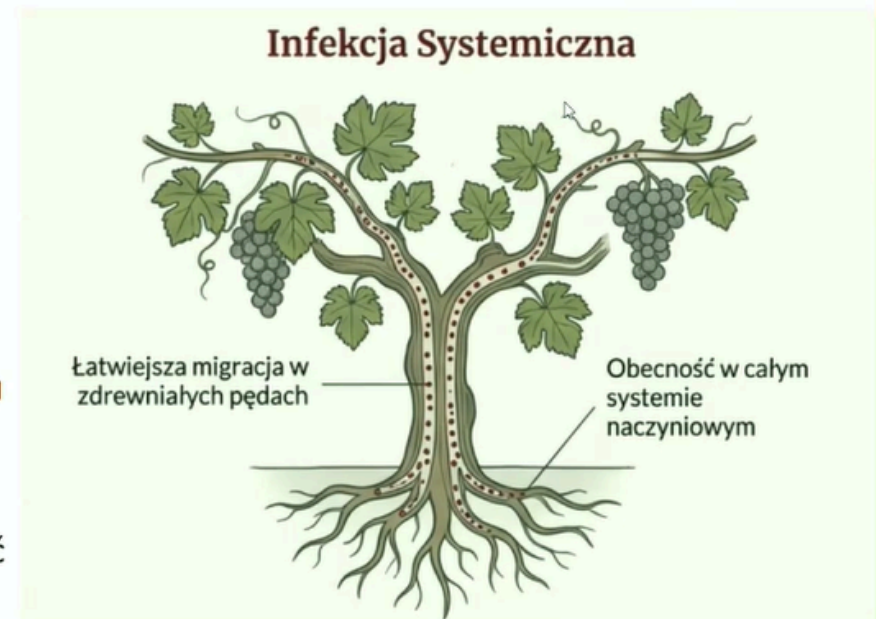
Objawy raka bakteryjnego

- Głównym objawem choroby są guzy, które najczęściej tworzą się w miejscach zranień:
- **na pniu w pobliżu powierzchni gleby,**
- **na ramionach oraz w miejscu szczepienia.**
- **Początkowo guzy są mięsiste i białawe.** Z czasem stają się twarde, zdrewniałe i przybierają ciemną, korkowatą strukturę
- Rozrastające się guzy niszczą tkankę naczyniową, utrudniając transport wody i składników odżywczych, co prowadzi do osłabienia wzrostu winorośli, spadku plonów (nawet o 40%) i w skrajnych przypadkach do zamierania całych roślin.
- Oprócz guzów, *A. vitis* wywołuje również zlokalizowane, **wklęsłe nekrozy na korzeniach.**
- **Patogen może przetrwać systemicznie wewnątrz rośliny**, nie dając żadnych objawów, co przyczynia się do jego rozprzestrzeniania na całym świecie wraz z zakażonym materiałem rozmnożeniowym



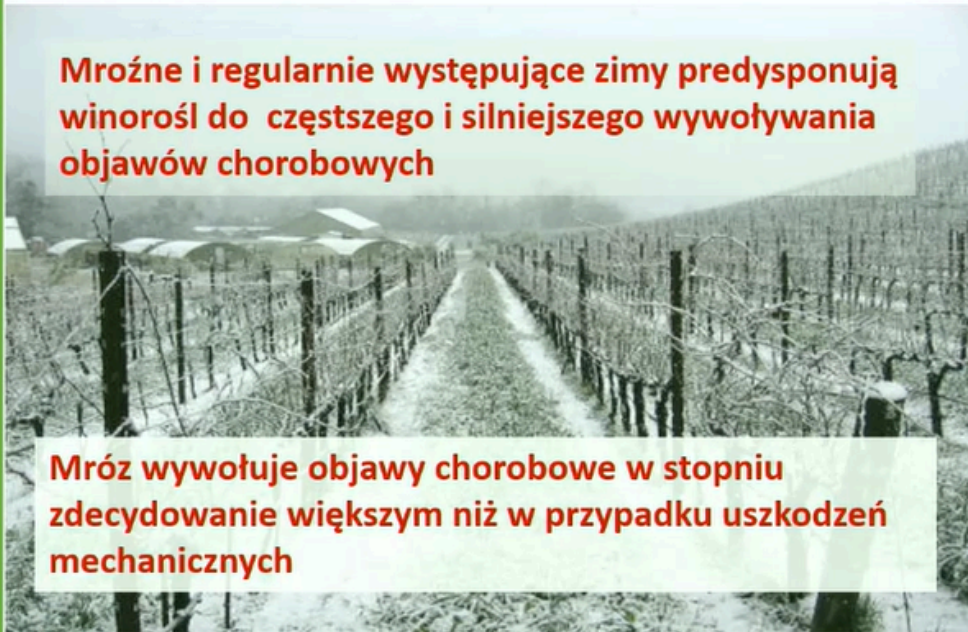
Rak bakteryjny – cykl rozwojowy

- Bakterie są izolowane **w soku komórkowym** winorośli
- *A. vitis* zimuje przede wszystkim **w systemie korzeniowym**
- Wiosną w warunkach dużej wilgotności następuje **transport bakterii wraz z wodą**
- Podczas „wędrowki” bakterie dostają się **w obręb ran** powstałych najczęściej **po zimie**
- Do tegorocznych pędów dostają się w fazie uzależnionej od rozwoju naczyń pomiędzy zdrewniałymi pędami, a łożami
- W badania nie izoluje się bakterii w łożach, **aż do początku ich lignifikacji**
- Nie stwierdza się bakterii **w wierzchołkach pędów**
- Bakterie są transportowane przez ksylem, ale ich obecność stwierdza się w tkance bezpośrednio pod korą



Rak bakteryjny – rola klimatu

Mroźne i regularnie występujące zimy predysponują winorośl do częstszego i silniejszego wywołania objawów chorobowych



Mróz wywołuje objawy chorobowe w stopniu zdecydowanie większym niż w przypadku uszkodzeń mechanicznych

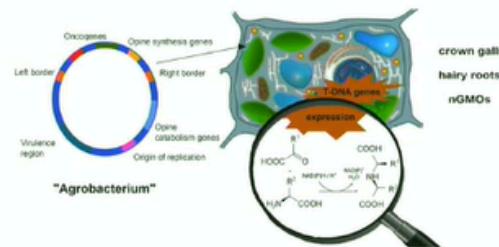
- **Najpoważniejsze problemy bakteria wywołuje w chłodnych rejonach klimatycznych** choć ma również znaczenie w regionach śródziemnomorskich
- Winnice często są pozbawione guzów bakteryjnych nawet przez kilka lat, aż do wystąpienia warunków sprzyjających infekcjom **(głównie uszkodzenia mrozowe)**
- We Włoszech pojawienie się guzów było związane z **ostrymi zimami** jakie miały miejsce **w latach 1984-1985**
- W Stanach Zjednoczonych nie obserwowano większych uszkodzeń, aż do momentu rozszerzenia produkcji na obszary, gdzie winorośl była wystawiona na uszkodzenia mrozowe. **Wtedy liczba objawów dramatycznie wzrosła**

Wrażliwość odmian i podkładek winorośli na porażenie rakiem bakteryjnym w różnych krajach

Kraj	Wrażliwe	Oporne	Kraj	Wrażliwe	Oporne
Południowa Afryka	<u>Muscat d'Aleksandrie</u> ,	Chardonay , Semillon, Riesling , Carignan	Południowa Afryka	110-Richter, 99-Richter, Jacques, Ramsey	<u>Paulsen 775</u> , <u>Freedom</u> , <u>Couderc 3309</u> , 101-14 <u>Mgt</u> , Kober 5BB
Chile	Pumard, Pais, Pedro Jimenez, Torontel, Muscatel negra	Regina	Hiszpania	161-49	
Włochy	Merlot, Lambrusco, Albana, Italia	Regina	Włochy	<u>Teleki 5C</u> , 17-37, <u>Paulsen 775</u> , Kober 5BB	
Izrael	<u>Muscat d'Aleksandrie</u> , Dabuki		Węgry	Kober 5BB , <u>Teleki 5C</u> , <u>Teleki 8B</u> , <u>Paulsen 775</u> , 287C	<u>Riparia Gloire</u> , 101-14 <u>Mgt</u>
U.S.	Chardonay , Merlot, Riesling , Cabernet sauvignon	Większość odmian i krzyżówek <u>V.labrusca</u>	Izrael	Ruggeri 140	1103 Paulsen
			USA	110-Richter, <u>Teleki 5C</u>	<u>Couderc 3309</u> , <u>Riparia Gloire</u> , 101-14 <u>Mgt</u>

Najważniejsze czynniki infekcyjne

- **Chemotaksja bakterii do ran** na winorośli
- Szczególne powinowactwo bakterii do **ran spowodowanych przez mróz**
- Indukcyjne właściwości fenoli i innych związków pojawiających się w miejscu zranienia
- Rośliny wydzielają **chemoatraktanty** acetosyringon (też *A. tumefaciens*) **syrynian metylu**
- Indukcja onkogenów
- Produkcja auksyn i cytokinin
- **UTYLIZACJA OPIN**



A. vitis zawiera specjalne enzymy umożliwiające rozkład opin i ich wykorzystywanie

OPINY – są to związki niskocząsteczkowe wydzielane przez tkanki roślinne, wyłącznie pod wpływem bakterii zawierających plazmid Ti, które stanowią dla bakterii niszę pokarmową

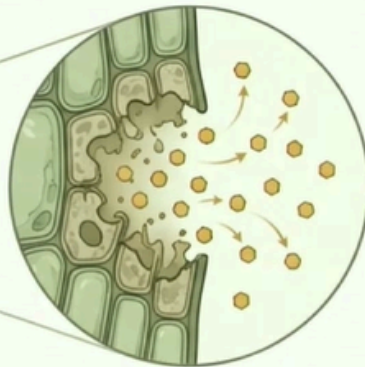
Proces infekcyjny

Krok 1:
Rana jako sygnał



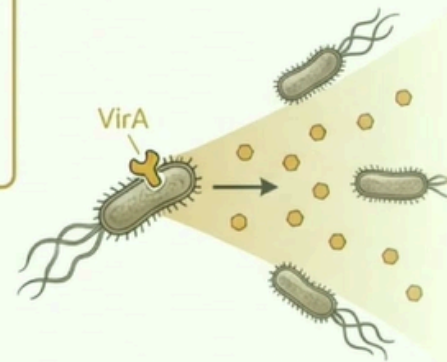
Proces infekcji rozpoczyna się od zranienia rośliny (np. przez mróz, grad, uszkodzenia mechaniczne).

Krok 2:
Wyciek sygnałów chemicznych



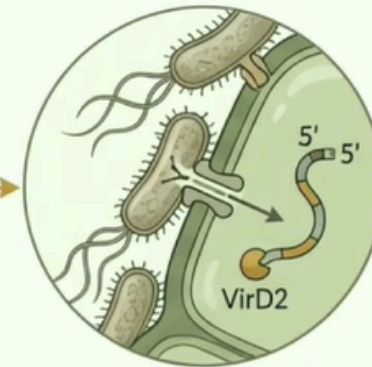
Zranione komórki roślinne uwalniają specyficzne związki fenolowe, takie jak **acetosyringon**.

Krok 3:
Chemotaksja –
ruch do celu



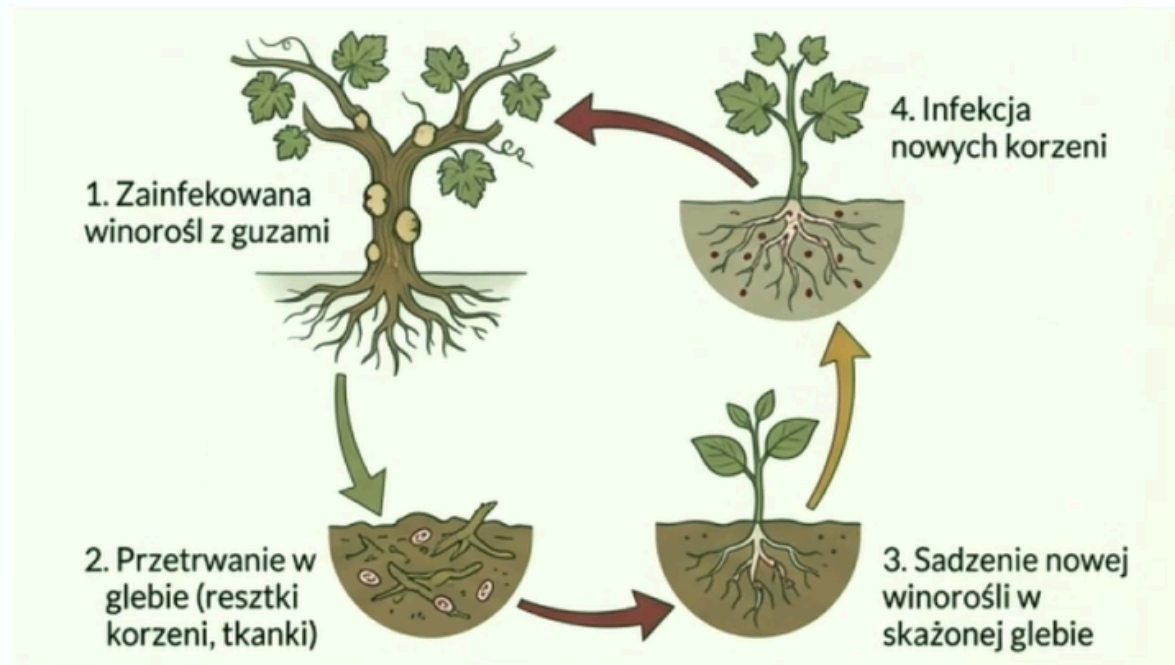
Związki te działają jak **chemoatraktanty**. Bakterie wykrywają je i rozpoczynają ukierunkowany ruch (chemotaksję) w stronę rany.

Krok 4:
Przyłączenie
i transformacja

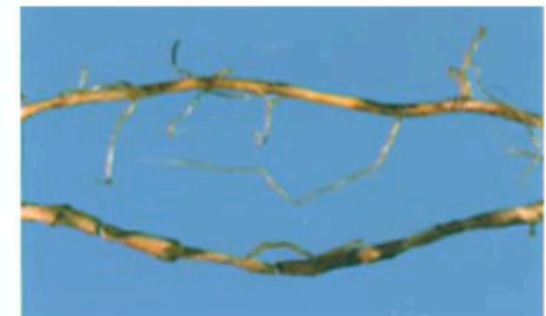


Po dotarciu do rany, bakterie przyczepiają się do komórek roślinnych, co aktywuje geny *vir* i rozpoczyna proces transferu T-DNA.

Rak bakteryjny – cykl rozwojowy



Na korzeniach brak jest typowych guzów natomiast występują lokalne zranienia



Rak bakteryjny – cykl rozwojowy

- Bakterie *A.vitis* mogą porażać także inne rośliny niż winorośl jednak w jakiś szczególny sposób **wykazują powinowactwo przede wszystkim do krzewów winnej latorośli**
- Mogą co prawda rozwijać w obrębie ryzosfery innych roślin niż winorośl, ale **jest to rozwój nieporównywalnie słabszy** od tego jaki odbywa się w sąsiedztwie korzeni winorośli
- Bakterie *A. vitis* “czują się” zdecydowanie lepiej **w obecności korzeni winorośli** niż w przypadku innych roślin
- Raz porażone krzewy stają się bowiem źródłem porażenia dla nowych nasadzeń **praktycznie tak długo, jak długo szczątki roślinne nie zostaną całkowicie rozłożone**

RYZOSFERA

- ✓ Strefa pierwotnego oddziaływania korzeni w glebie o zasięgu zmiennym w czasie i przestrzeni.
- ✓ Różni się składem od innych części gleby i wpływa na obieg azotu.
- ✓ Stymuluje rozwój bakterii, zarówno pod względem ilości, jak i zróżnicowania, natomiast wpływa ograniczająco na zróżnicowanie grzybów

Rola mikrobiomu gleby w infekcji nie jest dobrze poznana



Rak bakteryjny – różnicowanie genetyczne

- **Biotypy nietumorgeniczne** znaleziono w glebie wśród dzikich odmian winorośli
- **Biotypy tumorgeniczne** znaleziono w glebach praktycznie wyłącznie wśród odmian uprawnych

KONKLUZJA:

Na glebach, na których od lat nie uprawiano winorośli, istnieje niewielkie ryzyko występowania biotypów wywołujących guzy

Podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym z pojawienie się *A. vitis* na plantacjach winorośli jest zainfekowany materiał szkółkarski

POZYSKIWANIE SADZONEK WOLNYCH OD *A. VITIS*

- Uwalnianie sadzonek od bakterii przy pomocy gorącej wody
- Hodowla z sadzonek z merystemów wierzchołkowych
- Selekcja negatywna
- Wczesne wykrywanie
 - detekcja patogena



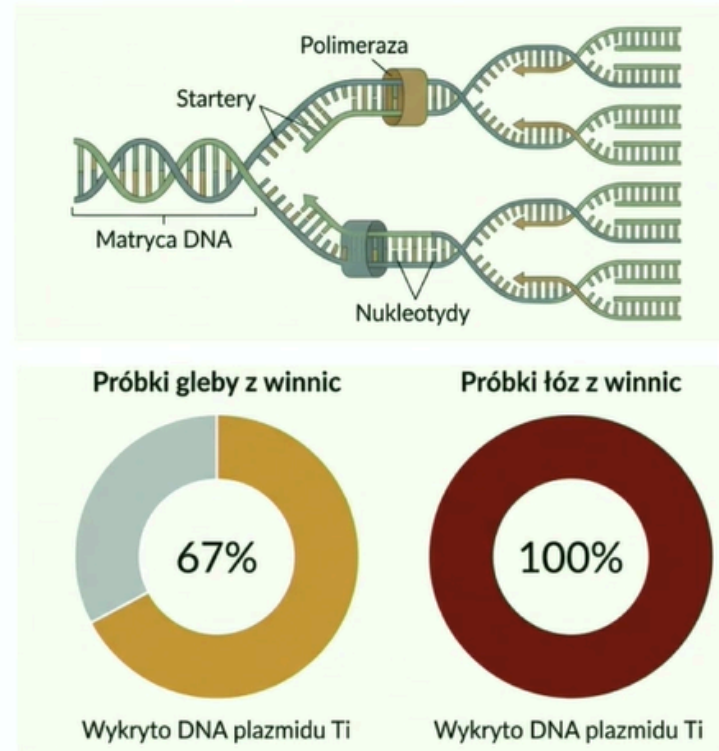
Tworzenie mateczników wolnych od infekcji

- Istotą tej metody jest pozyskiwanie szczytowych (0,1 - 1,0 mm) fragmentów pędów, zawierających **tylko merystem wierzchołkowy pędu i ewentualnie kilka najmłodszych zawiązków liściowych**.
- Hodowle merystemów bywają najczęściej łączone z innymi metodami zwalczania bakterii i wirusów: termoterapią, chemioterapią, krioterapią, czy nawet - stosunkowo rzadko spotykaną – elektroterapią.
- Pozyskiwane w ten sposób sadzonki są następnie wysadzone w matecznikach, z reguły **w takich miejscach, gdzie wcześniej winorośl nigdy nie rośla**.
- Dla pewności tak pozyskane rośliny mateczne i tak są, co roku sprawdzane na obecność bakterii.
- Sadzonki pozyskiwane metodą kultur tkankowych z merystemów wierzchołkowych wykazują **brak objawów chorobowych nawet po 7 latach od ich posadzenia w warunkach klimatu chłodnego**, który sprzyja aktywizacji bakterii w tkankach.



Metody wykrywania DNA bakterii w tkankach roślinnych

- **PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy) dla plazmidu Ti** – jako metoda podstawowa (szybka i praktyczna), **ale niska czułość szczególnie w przypadku badań gleby**
- Pozwala odróżniać szczepy patogeniczne i niepatogeniczne
- Ostatnio opracowano **nowe wysoce specyficzne startery PCR** ('repa' i 'virD3cons') do badania powszechności patogenu – **10-krotnie większa czułość detekcji**
- Testy dowodzą, że **patogen jest szeroko rozpowszechniony w tkankach**, nawet bez widocznych objawów (uśpiony). Wczesne wykrywanie w materiale przeznaczonym do sadzenia jest więc kluczowe



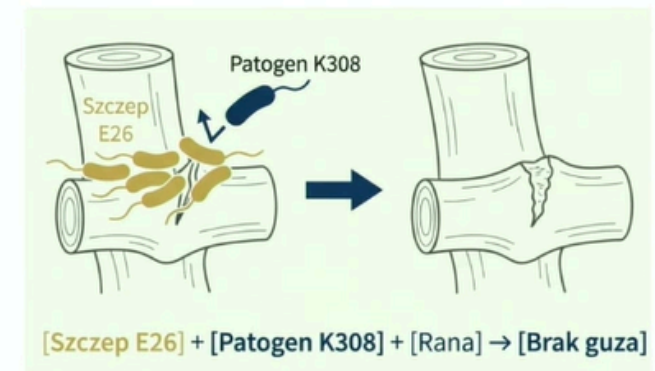
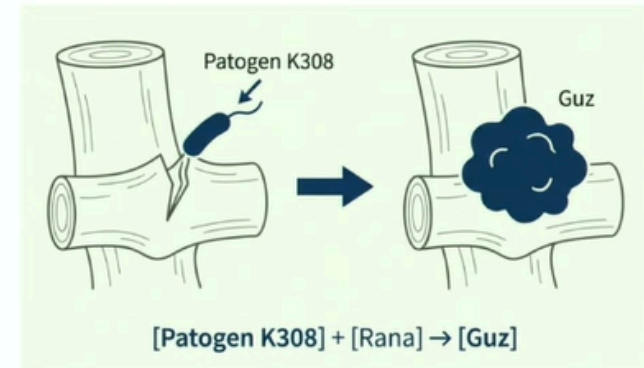
Ochrona biologiczna

- Wyizolowano szczepy rodzaju *Bacillus* o silnych właściwościach antagonistycznych. Zidentyfikowano kilka gatunków: *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. halotolerans*, *B. subtilis* i *B. anthracis*.
- ✓ Szczepy te wykazywały zdolność do inhibicji wzrostu patogenu in vitro (do 39,6%) oraz redukcji wielkości guzów in planta. **Konsorcja mikrobiologiczne złożone z różnych kompatybilnych szczepów *Bacillus*** w badaniach również wykazywały wysoką skuteczność
- *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN: wykazuje działanie antagonistyczne,
- *Pseudomonas fluorescens* '1100-6': wykazał zdolność do redukcji wielkości guzów i populacji patogenu na roślinach.
- *Agrobacterium radiobacter* K84: Jest to komercyjny bio-pestycyd skuteczny przeciwko wielu szczepom *Agrobacterium*, jednak generalnie nieskuteczny wobec *A. vitis* ze względu na oporność tego patogenu na produkowaną przez K84 agrocynę 84

Ochrona biologiczna

▪ Antagonistyczne szczepy *Agrobacterium*

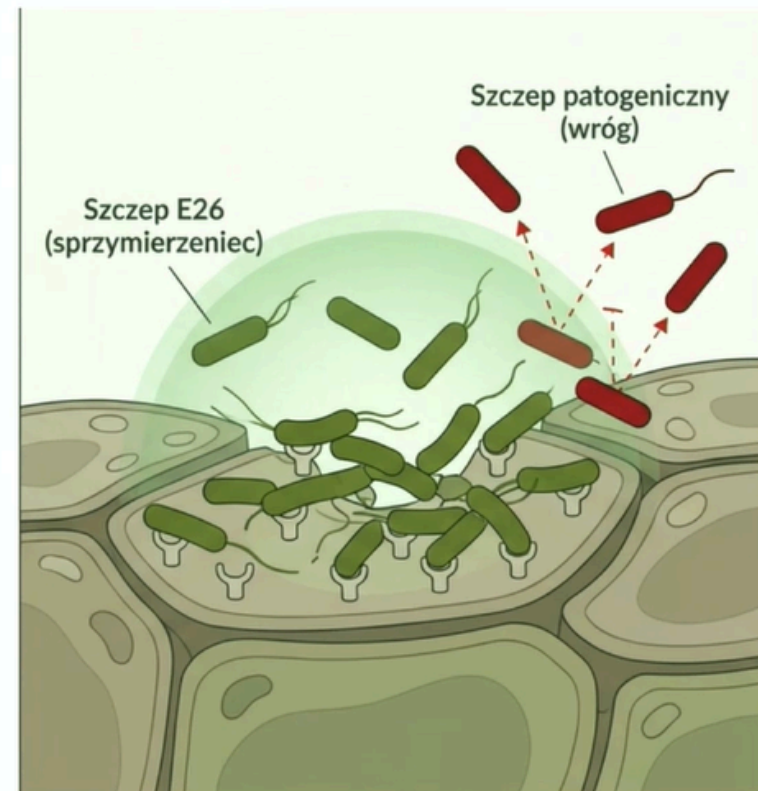
- ✓ Szczep K84 (Polargocyna) – brak efektywności
- ✓ Szczep F2/5
- ✓ Szczep CG1077 (mutant F2/5 pozbawiony możliwości wytwarzania agrocyny)
- ✓ Szczep VAR 03-1
- ✓ Szczep J 73
- ✓ Szczep MI15 – nietumorigeniczny *A. vitis*
- ✓ Szczep HLB-2 + fumigant (methyl isotiocyanate) (VORLEX)
- ✓ **Szczep E 26**



Ochrona biologiczna

Allorhizobium vitis szczep E26

- **Nietumorgeniczny** – nie posiada plazmidu Ti
- **Produkuje agromycynę** – substancję antybiotykopodobną
- **Konkurencja o miejsce**
- **Chemotaksja** – wykazuje zdolność do aktywnego ruchu w kierunku ran dzięki obecności **genu *mcp***, co jest kluczowe dla jego skuteczności
- Gen ***mcp*** jest niezbędny, aby skutecznie znaleźć ranę i zapewnić ochronę.
- Mutanty bez genu ***mcp*** tracą zdolność efektywnej ochrony



Zwalczanie raka bakteryjnego

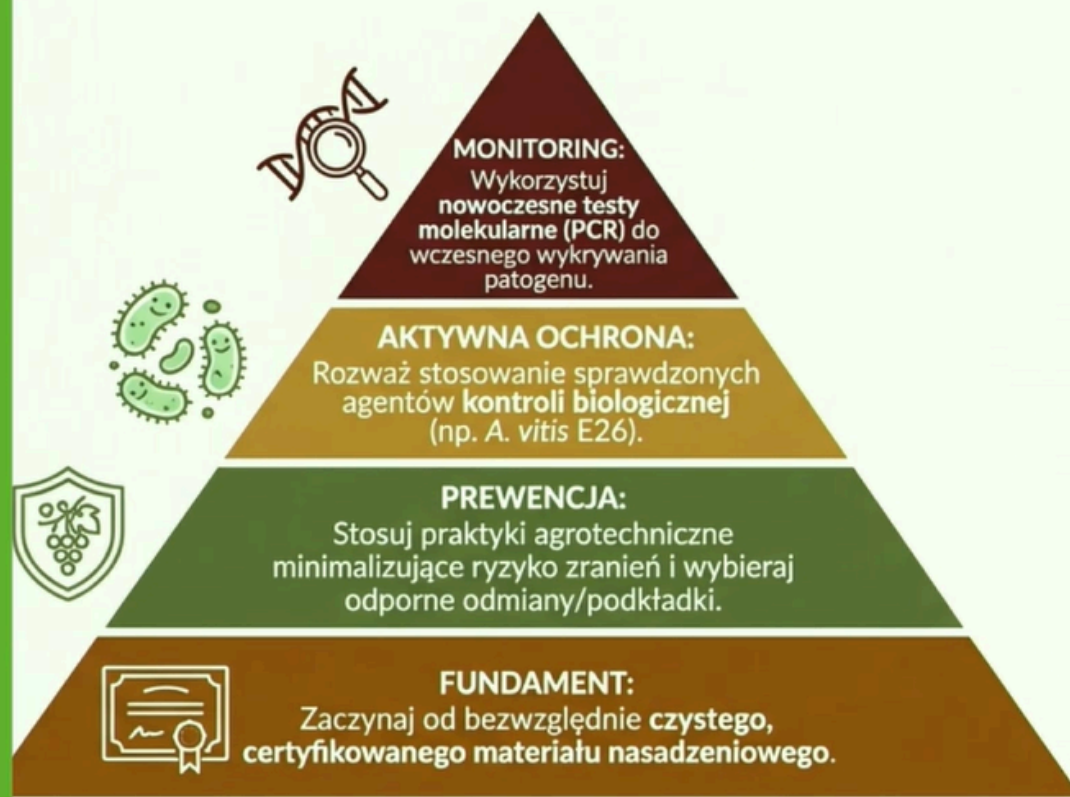
Kluczowy jest wybór stanowiska: Należy unikać terenów podmokłych, ciężkich gleb oraz miejsc narażonych na zastoiska mrozowe, ponieważ uszkodzenia mrozowe pni są głównymi miejscami infekcji

- Ochrona przed mrozem
 - ✓ dobór podkładek (*Couderc 3309, 101-14 Mgt, Riparia Gloire*) i odmian (Fetaska regala, Pinot Gris, Muscat Ottonel) odpornych na *A. vitis*
 - ✓ właściwe zbilansowane nawożenie jesienne (K_2O)
 - ✓ unikanie zabiegów mechanicznych przy sadzonkach tak długo, jak długo utrzymuje się mróz i wszelkich uszkodzeń mechanicznych pni
- Unikanie mokrych i ciężkich ziemi
- Unikanie wystawy północnej
- Zdrowy materiał rozmnożeniowy
- Zwalczanie szkodliwych nicieni

Zwalczanie raka bakteryjnego cd.

- Właściwe zbalansowane cięcie
 - Okopywanie sadzonek w celu ochrony dolnej części pni sadzonek **(0,25-0,50 m)**
 - Utrzymywanie właściwego wigoru roślin, od późnego lata do jesieni dla zapewnienia właściwego zdrewnienia
 - Można prowadzić winorośl na dwa pnie i wybierać mniej chore pędy
 - W przypadku nagminnych wypadów rośliny należy karczować wraz z korzeniami
 - Miedź regularnie stosowana do zwalczania mączniaka rzekomego *częściowo* chroni przed infekcją *A. vitis*
 - Przy produkcji sadzonek termoterapia
- **Trwają badania nad tworzeniem transgenicznych winorośli posiadających geny kodujące peptydy przeciwbakteryjne lub mechanizmy blokujące integrację bakteryjnego T-DNA.**

Kluczowe strategie i spojrzenie w przyszłość



Kierunki przyszłych badań



- Badania nad ekologią *All. vitis* w glebach poza winnicami w celu zrozumienia naturalnych rezerwuarów.



- Określenie tumorogeniczności szczepów wykrywanych w środowisku naturalnym.



- Dalsze doskonalenie szybkich i opłacalnych metod diagnostycznych dla szkótek i winogrodników.