

BAKTERIOZNI RAK VINOVE LOZE

Nemanja Kuzmanović¹, Aleksa Obradović²

¹Institut za epidemiologiju i dijagnozu patogena, Julius Kühn-Institut (JKI),
Federalni istraživački centar za gajene biljke, Braunschweig, Nemačka

²Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija
e-mail: kuzmanovic1306@gmail.com, aleksao@agrif.bg.ac.rs

Rad primljen: 05.04.2019.

Prihvaćen za štampu: 15.04.2019.

Izvod

Bakteriozni rak smatra se jednim od najvažnijih i najrasprostranjenijih bakterijskih oboljenja vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Ustanovljen je u gotovo svim zemljama gde se gaji vinova loza. Bakteriozni rak je ekonomski vrlo značajno oboljenje vinove loze, a posebno je ozbiljno u rasadnicima i mladim vinogradima. Tipični simptomi bakterijskog raka ispoljavaju se u vidu tumora na nadzemnim delovima vinove loze. Vrsta *Agrobacterium vitis* glavni je prouzročivač ovog oboljenja. Patogen sistemski zaražava vinovu lozu i prisutan je u sprovodnom tkivu domaćina, a može biti latentno prisutan u asimptomatičnom biljnom materijalu. Takođe, patogen je detektovan i kao epifit na površini različitih organa vinove loze, kao i u rizosferi i zemljištu u blizini biljaka domaćina. *A. vitis* može biti raširen na velike udaljenosti putem naizgled zdravog sadnog materijala, što predstavlja najznačajniji način introdukcije i širenja bolesti. U Srbiji, bakteriozni rak se javlja sporadično, mada je u pojedinim godinama zabeležena jača pojava ovog oboljenja uz visoku stopu zaraženih biljaka i izražene štete. Kontrola bakterijskog raka nije laka, s obzirom da ne postoje efikasne kurativne mere. Stoga se strategija zaštite prvenstveno zasniva na preventivnim merama. Korišćenje zdravog sadnog materijala i zasnivanje vinograda na površinama koje nisu kontaminirane patogenom neizostavna je mera. Biološka kontrola i proizvodnja otpornih sorti predstavljaju obećavajuće mere kontrole u budućnosti.

Ključne reči: *Agrobacterium vitis*, tumorogene bakterije, Ti plazmid, sistemski kolonizacija, zaražen sadni materijal

UVOD

Bakteriozni rak se ispoljava na mnogim ekonomski značajnim gajenim biljkama širom sveta i smatra se jednim od najvažnijih i najrasprostranjenijih bakterijskih oboljenja vinove loze (*Vitis vinifera* L.) (Kuzmanović i sar., 2018).

Prvi poznati pisani podatak o raku vinove loze i raku biljaka uopšte, potiče iz XIX veka, kada su Fabre i Dunal (1853) opisali ovo oboljenje u Francuskoj. Bakteriorna priroda raka vinove loze utvrđena je u Italiji, krajem XIX veka (Cavara, 1897). Iz biljaka vinove loze sa simptomima raka, izolovana je bakterija, koja je tada nazvana *Bacillus ampelopsorae*, i dokazana je njena patogenost. Ovo je ujedno i prvi podatak o bakterijama kao prouzrokovateljima oboljenja tipa raka na biljkama.

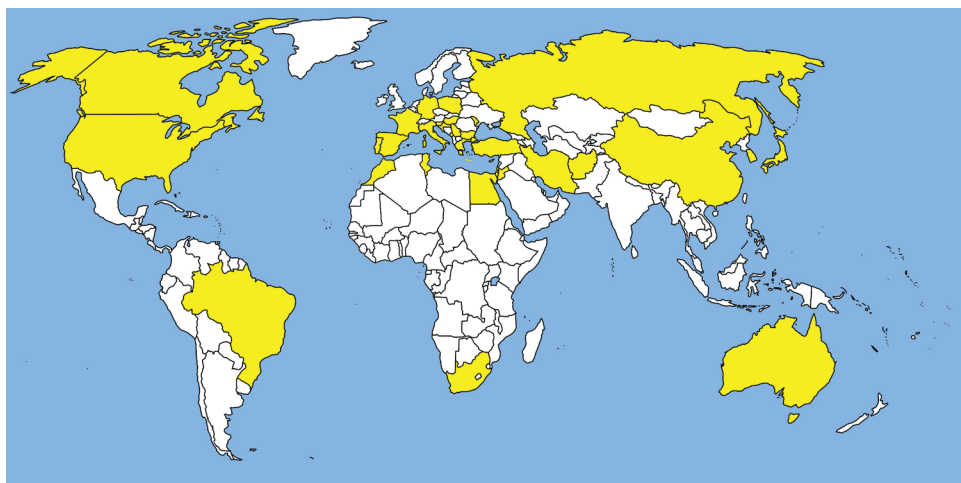
U ovom preglednom radu prikazane su osnovne karakteristike bakterijskog raka vinove loze, uključujući ekonomski značaj, rasprostranjenost, infektivni proces, simptomatologiju i epidemiologiju ovog oboljenja. Prouzrokovatelj oboljenja i njegova taksonomija biće ukratko opisani u narednom poglavlju. Uzimajući u obzir temu broja, detaljan pregled mera kontrole bakterijskog raka vinove loze biće predstavljen u posebnom odeljku. Kratak istorijat proučavanja ovog oboljenja u našoj zemlji i rezultati nedavno sprovedenih istraživanja biće takođe sumirani.

GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST I EKONOMSKI ZNAČAJ

Bakterijski rak je široko rasprostranjen i ustanovljen je u gotovo svim evropskim zemljama gde se gaji vinova loza, u Severnoj i Južnoj Americi, Kini, Japanu, Srednjem Istoku, Australiji, kao i u Severnoj i Južnoj Africi (Slika 1). Bolest je takođe prisutna u našoj zemlji (videti poglavlje „Prisustvo bakterijskog raka vinove loze u Srbiji“ za više detalja).

Bakterijski rak je ekonomski vrlo značajno oboljenje, a posebno je ozbiljno u regionima sa niskim zimskim temperaturama. Povrede od izmrzavanja na lastarima i čokotima predstavljaju okidač za infekciju (videti poglavlje „Infektivni proces i simptomatologija“). Bolest je posebno štetna u rasadnicima, gde negativno utiče na srastanje i prijem kalemova, dok je sadni materijal sa vidljivim simptomima neadekvatan za dalju distribuciju i mora biti uništen.

Ukoliko se bolest javi u vinogradu, štetni efekti ogledaju se u smanjenju bujnosti i prinosa zaraženih biljaka. Na primer, oboljenje je smanjilo bujnost i prinos i do 40% na sorti Zinfandel u SAD (Schroth et al., 1988). U težim slučajevima, ovo oboljenje može prouzrokovati izumiranje pojedinih organa ili čitavih biljaka. Izumiranje je posebno izraženo kod mladih biljaka, naročito kada oboljenje zahvati spojno mesto podloge i plemke. U nedavnom istraživanju utvrđeno je da zajedno tumorogeni i netumorogeni sojevi *A. vitis* mogu negativno uticati na srastanje i čvrstinu spojnog mesta, odnosno na dalju rasadničarsku proizvodnju i zasnivanje vinograda (Hao et al., 2017).



Slika 1. Geografska rasprostranjenost bakterioznog raka vinove loze (obeleženo žutom bojom) prema podacima dostupnim u literaturi (Kuzmanović i sar., 2018).

PROUZROKOVAČ OBOLJENJA

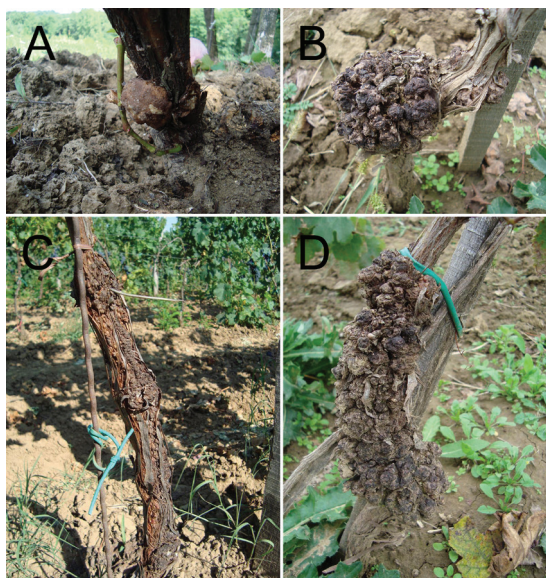
Prouzrokovaci bakterioznog raka vinove loze su tumorogene vrste iz familije *Rhizobiaceae*. Vrsta *Agrobacterium vitis* smatra se glavnim prouzrokovateljem oboljenja. U redim slučajevima, iz obolelih biljaka vinove loze izolovani su tumorogeni sojevi *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium* biovar 1) i *Rhizobium rhizogenes* (*Agrobacterium* biovar 2) (Kuzmanović i sar., 2018).

Taksonomija vrste *A. vitis* je tokom poslednjih 50-ak godina više puta doživljavala promene. Tumorogeni sojevi izolovani iz vinove loze prvobitno su bili definisani kao atipična grupa koja nije mogla biti klasifikovana niti kao *Agrobacterium* biovar 1 ni biovar 2 (Panagopoulos and Psallidas, 1973). Ovi atipični sojevi su zatim klasifikovani kao *Agrobacterium* biovar 3 (biotip 3) na osnovu njihovih specifičnih biohemijskih i fizioloških osobina (Süle, 1978). Kasnije, formalno je opisana vrsta *Agrobacterium vitis* koja je uključila *Agrobacterium* biovar 3 sojeve (Ophel and Kerr, 1990). Nedavno je pokazano da je vrsta *A. vitis* filogenetski različita od ostalih predstavnika roda *Agrobacterium* i predloženo je prebacivanje ove vrste u rod *Allorhizobium* (Mousavi et al., 2014; Mousavi et al., 2015; Ormeño-Orrillo et al., 2015). Dakle, prema poslednjim taksonomskim podacima, pravilan naziv za ovu vrstu je *Allorhizobium vitis*, iako se naziv *Agrobacterium vitis* može i dalje nesmetano i validno upotrebljavati.

INFEKCIONI PROCES I SIMPTOMATOLOGIJA

Infekcioni proces *A. vitis* i tumorogenih vrsta familije *Rhizobiaceae* je veoma kompleksan i predstavlja svojevrsan prenos genetičkog materijala iz bakterije u biljku (Gelvin, 2017). *A. vitis* inficira vinovu lozu kroz povrede koje najčešće nastaju kao posledica niskih temperatura tokom zime ili kalemljenjem. Tokom infekcije, biljka biva genetički transformisana, te stoga ova pojava predstavlja jedinstven primer prirodnog genetičkog inženjeringa. Patogenost je prvenstveno uslovljena prisustvom tumor-indukujućeg (Ti) plazmida u genomu bakterije, gde se nalazi većina gena odgovornih za patogenost (Zhu et al., 2000). Bakterijski geni, ugrađeni u genom biljke domaćina, kodiraju proizvodnju biljnih hormona auksina i citokinina, što dovodi do proliferacije biljnog tkiva i razvoja tumora. Nakon ostvarene infekcije tumori se mogu razvijati i bez prisustva patogena. Kao posledica transformacije, u tumorima se takođe sintetišu opini, jedinjenja koje kao selektivni izvor hranljivih materija, koristi patogen (Dessaux and Faure, 2018).

Simptomi bakterioznog raka ispoljavaju se u vidu tumora na nadzemnim organima vinove loze, pretežno na prizemnom stablu, oko spojnog mesta podloge i plemke, ali i na kracima i lukovima čokota, nekada i do jednog metra iznad površine zemlje (Slika 2). Prvi simptomi, koji se ispoljavaju početkom proleća, najčešće su neupadljivi, s obzirom da su mladi tumori prekriveni mrtvom korom stabla. Novoformirani tumori su beličaste do svetlo žute, svetlo zelene ili ružičaste boje. Daljim razvojem bolesti tumori se uvećavaju, a može doći i do razvoja dužih kontinuiranih zadebljanja cilindričnog, sferičnog ili kruškastog oblika, koja u najtežim slučajevima u potpunosti opasuju stablo (Slika 2). Na ovaj način protok hranljivih materija i vode u biljci je otežan. Tokom jeseni tkivo tumora postaje tamno-mrke boje, hrapavo, uz prisustvo mnogobrojnih pukotina. Tumorogeni, ali i netumorogeni *A. vitis* sojevi takođe prouzrokuju nekrozu korena i njegovo izumiranje (Burr et al., 1987b) (Slika 3). Na kalemovima, simptomi bakterioznog raka mogu biti pomešani sa kalusnim tkivom koje se razvija na spojnom mestu podloge i plemke. Tumori se retko uočavaju na korenu vinove loze.



Slika 2. Simptomi bakterijskog raka vinove loze. Lokalizovani tumori na prizemnom stablu (A). Sferična zadebljanja na spojnem mestu podloge i plemke (B). Kontinuirana tumorozna zadebljanja na nadzemnom stablu (C). Stablo potpuno obavijeno tumorom (D).



Slika 3. Simptomi nekroze korena vinove loze. Nekroza korena vinove loze iz rasadnika (A), inokulisanih reznica (B) i inokulisanih mladih sadnica (C) (Kuzmanović i sar., 2018).

EPIDEMIOLOGIJA

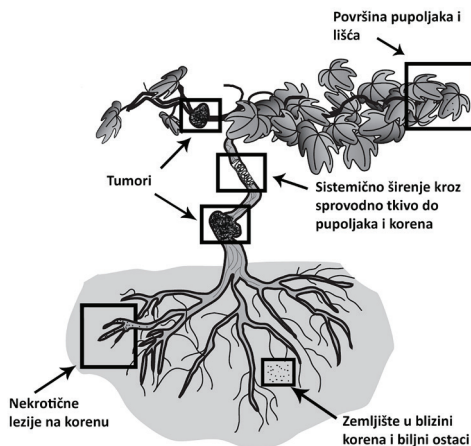
A. vitis sistemski zaražava vinovu lozu i prisutan je u sprovodnom tkivu domaćina (Lehoczky, 1971) (Slika 4). Patogen je takođe izolovan iz latentno zaraženih asimptomatičnih biljaka vinove loze (Lehoczky, 1971).

Iako *A. vitis* retko indukuje tumore na korenu vinove loze, u stanju je da kolonizuje korenov sistem odakle je neretko izolovan (Burr et al., 1987a; Burr et al., 1995; Lehoczky, 1978). Shodno tome, navodi se da korenov sistem može

predstavljati rezervoar za *A. vitis*, u kome se patogen može održati i preživeti nepovoljne ekološke uslove (Lehoczky, 1978). Patogen je takođe često izolovan iz nekrotičnih lezija na korenu inficiranih biljaka (Burr et al., 1987a).

A. vitis može biti neravnomerno rasprostranjen u biljci i populaciona dinamika u pojedinim biljnim delovima može varirati u zavisnosti od sorte i doba godine (Bauer et al., 1994; Stover et al., 1997b). Npr. prema istraživanju sprovedenom u Nemačkoj, korišćenjem metode izolacije bakterija, *A. vitis* je bio najbrojniji tokom proleća, dok je tokom leta populacija patogena bila smanjena, da bi se tokom jeseni vratila na nivo iz proleća (Bauer et al., 1994). Nedavna studija koja je koristila molekularne tehnike takođe je ukazala da se populacija *A. vitis* smanjila tokom leta, u poređenju sa prolećnim i jesenjim periodom (Faist et al., 2016), potvrđujući rezultate Bauer i sar. (1994).

A. vitis prvobitno nije detektovan u zelenim lastarima i pupoljcima vinove loze (Bauer et al., 1994), iako su pojedine studije indirektno ukazivale da patogen može biti prisutan u ovom tkivu (Lehoczky, 1989). Kasnije, korišćenjem PCR metode, utvrđeno je da se *A. vitis* može održati u latentnom obliku u zelenim pupoljcima (Poppenberger et al., 2002). U nedavnoj studiji koja je primenila visoko osetljivu metodu DNK ekstrakcije i real-time PCR, *A. vitis* je detektovan u zelenim pupoljcima i meristemskom tkivu biljaka vinove loze (Johnson et al., 2016). Takođe, ista studija je ukazala da *A. vitis* može biti prisutan kao epifit na površini zelenih pupoljaka. U narednoj studiji, patogen je detektovan u spavajućim pupoljcima i na površini lišća vinove loze u više komercijalnih vinograda (Canik Orel et al., 2017) (Slika 4).



Slika 4. Mesta održavanja *A. vitis* u i na biljkama vinove loze, i u zemljištu (Kuzmanović i sar., 2018).

Uzimajući u obzir sposobnost patogena da se održi u vinovoj lozi, kao i na samim biljkama, *A. vitis* se može raširiti iz rasadnika na velike udaljenosti putem naizgled zdravog sadnog materijala. Ovaj način se ujedno smatra i najznačajnijim putem širenja ovog patogena. Dakle, patogen može biti latentno prisutan u asimptomatičnom materijalu, sve dok se ne uspostave povoljni uslovi za razvoj bolesti. Patogen je takođe detektovan u divljoj lozi (Canik Orel et al., 2017; Genov et al., 2006; Johnson et al., 2016), koja bi mogla predstavljati značajan izvor inokuluma u prirodi.

A. vitis se održava u zemljištu, pretežno u rizosferi, ali i u blizini zaraženih čokota (Bishop et al., 1988; Burr et al., 1987a) (Slika 4). Do sada je *A. vitis* detektovan u zemljištu isključivo u zajednici sa vinovom lozom i nema podataka da je izolovan iz zemljišta gde nije bila prisutna ova biljna vrsta.

Iako je pojava bakterioznog raka prvenstveno povezana sa zaraženim sadnim materijalom, patogen prisutan u zemljištu takođe može biti odgovoran za infekcije vinove loze (Bishop et al., 1988; Pu and Goodman, 1993). Međutim, zemljište predstavlja značajan izvor inokuluma jedino ako je veoma kontaminirano, gde je visoka brojnost populacije patogena (10^6 cfu/g) (Bishop et al., 1988). Sa druge strane, sadnja vinove loze u slabije infestirano zemljište sa nižim nivoom populacije patogena (10^4 cfu/g), nije rezultirala sistemčnim infekcijama biljaka u periodu od 10 nedelja. Zabeleženo je da nematode mogu povećati broj ostvarenih infekcija patogenom prisutnim u zemljištu. S tim u vezi, kombinovana inokulacija korenovog sistema vinove loze sa *Meloidogyne hapla* i *A. vitis* (10^{2-3} cfu/g zemljišta) dovela je do infekcije korena, a zatim i sistemčne kolonizacije biljaka (Süle i sar., 1995).

A. vitis se može održati bar dve godine u saprofitnoj fazi, u biljnim ostacima zaražene vinove loze (Burr et al., 1995). Međutim, smatra se da patogen može preživeti i duži vremenski period, sve dok su biljni ostaci prisutni u zemljištu. S obzirom da se delovi korena vinove loze mogu održati u zemljištu duži vremenski period nakon vađenja zaraženih čokota, zajedno sa njima preživljava i *A. vitis* predstavljajući potencijalni izvor infekcije.

PROUČAVANJE BAKTERIOZNOG RAKA VINOVE LOZE U SRBIJI

Proučavanje problematike bakterioznog raka vinove loze bilo je posebno intenzivno tokom sedamdesetih godina u našoj zemlji. Ovo oboljenje vinove loze prvi put je uočeno u Srbiji 1962. godine, na području trsteničkog vinogorja, na sorti Kardinal uveženoj iz Italije (Panić, 1977). U tom periodu, bolest je ugrozila gajenje vinove loze u pojedinim delovima Srbije, te je došlo do krčenja mnogih vinograda, pretežno u zapadno-moravskom i subotičko-horgoškom vinogradarskom rejonu (Arsenijević, 1997; Arsenijević i sar., 1974; Panić 1973). Pojava simptoma je

zabeležena i u zapadno-moravskom rejonu, ali i u nišavsko-južnomoravskom, timočkom, subotičko-horgoškom, banatskom i kosovsko-metohijskom (Arsenijević 1997; Arsenijević i sar., 1974; Panić, 1977). Prema tadašnjim zapažanjima, bakteriوزni rak najčešće je bio prisutan na sortama Afusali, Kardinal, Kraljica Vinograda, Muskat Hamburg, Beli Burgundac, Merlo i Italijanski Rizling, dok su Game Crni i Crni Burgundac navedene kao nešto otpornije (Panić, 1977).

Iz obolelih biljaka vinove loze u okolini Horgoša izolovani su sojevi bakterija i proučene su njihove morfološke, odgajivačke, biohemijske i patogene odlike (Arsenijević i sar., 1974). Utvrđeno je da izolovani sojevi pripadaju vrsti *A. tumefaciens*. Tada sojevi iz vinove loze još uvek nisu bili izdvojeni kao poseban biovar (biotip), odnosno vrsta. Takođe, proučavane su metode dijagnoze bakteriوزnog raka na loznim kalemovima (Panić, 1976). Preliminarna dijagnoza donošena je na osnovu karakterističnih simptoma, a u cilju dokazivanja prisustva patogena u loznim kalemovima, izvršena je inokulacija test biljaka sojevima koji su izolovani iz obolelog tkiva.

Uopšteno gledajući, bakteriوزni rak je od prvih istraživanja sprovedenih 70-ih godina prošlog veka bio sporadično prisutan u našim vinogradima, ali je stepen štetnosti bio nizak. Međutim, u poslednjih desetak godina, u većini vinogradarskih rejona primećena je jača pojava bakteriوزnog raka uz visoku stopu zaraženih biljaka i izražene štete. U pojedinim vinogradima, više od polovine biljaka bilo je zahvaćeno rakom, što je dovelo do krčenja čitavih zasada. Kako bi se upotpunilo znanje o bakteriوزnom raku vinove loze u našoj zemlji, izvedena su istraživanja u Laboratoriji za fitobakteriologiju, Univerziteta u Beogradu-Poljoprivrednog fakulteta, počevši od 2010. godine. Izvršeni su izolacija, identifikacija i karakterizacija prouzrokovala ovog oboljenja kod nas, kao i proučavanje genetičkog diverziteta populacije patogena, i poređenje sa referentnim sojevima poreklom iz međunarodnih kolekcija.

Simptomatični uzorci vinove loze prikupljeni su u 22 lokaliteta, raspoređena u gotovo svim vinogradarskim rejonima u našoj zemlji. Kao proukovač oboljenja identifikovana je isključivo vrsta *A. vitis* (Kuzmanović i sar., 2012b; Kuzmanović i sar., 2012a; Kuzmanović i sar., 2014). Međutim, iz jednog uzorka vinove loze izolovan je i tumorogeni soj *A. tumefaciens* (biovar 1) (Kuzmanović, neobjavljeni podaci). Među proučavanim sojevima *A. vitis* poreklom iz Srbije ustanovljene su genetičke razlike, vezane kako za hromozomsku, tako i plazmidnu DNK (Kuzmanović i sar., 2015; Kuzmanović i sar., 2014). Različitim molekularnim metodama definisano je više genetičkih grupa. Većina analiziranih sojeva *A. vitis* izolovanih uglavnom iz mladih komercijalnih vinograda u šest evropskih zemalja tokom perioda 2003-2011. bila je genotipski srodna, što je ukazivalo na njihovo zajedničko poreklo (Kuzmanović i sar., 2015). Ovi sojevi su verovatno rašireni zaraženim sadnim materijalom.

KONTROLA

Kontrola bakterioznog raka nije laka, s obzirom da ne postoje efikasne kurativne mere. Preparatima na bazi bakra mogu se suzbiti bakterije prisutne na površini tumora, ali njima se ne eliminiše patogen koji je sistemski prisutan u biljci. Kada jednom dospe u vinograd, *A. vitis* je gotovo nemoguće suzbiti. Stoga se strategija kontrole bakterioznog raka prvenstveno zasniva na preventivnim merama. Korišćenje zdravog sadnog materijala i zasnivanje vinograda na površinama koje nisu kontaminirane patogenom predstavljaju neizostavne mere.

Dijagnoza oboljenja – detekcija patogena

Redovna analiza i provera sadnog materijala i matičnih vinograda trebalo bi da predstavlja obaveznu meru kontrole patogena. Takođe, važno je testirati zamljište na prisustvo tumorogenih bakterija pre samog zasnivanja vinograda. Uprkos svojoj štetnosti, *A. vitis* i ostale tumorogene bakterije ne smatraju se karantinskim bakterijama u mnogim zemljama. Ovaj patogen svrstan je u grupu štetnih i široko rasprostranjenih organizama koji mogu redukovati vrednost sadnog materijala. Stoga, razmena i distribucija loznih kalemova i sadnog materijala ne podleže striktnoj fitosanitarnoj kontroli. Otežavajuća okolnost je i činjenica da trenutno ne postoji standardizovan protokol za uzorkovanje biljnog materijala, a zatim i za detekciju i identifikaciju patogena.

Analiza biljaka na prisustvo *A. vitis* tradicionalno se zasnivala na izolaciji patogena na hranljive podloge i analizu izolovanih sojeva korišćenjem biohemijско-fizioloških testova i izvođenju testa patogenosti (Moore et al., 2001). Izolacija patogena iz tkiva tumora je uglavnom efikasna, naročito iz mladih i aktivnih tumora. Sa druge strane, niska brojnost i neravnomerna distribucija patogena u asimptomatičnim biljkama ograničava efikasnost metoda detekcije. U literaturi je opisana metoda ekstrakcije patogena iz sprovodog tkiva asimptomatičnih reznica ili kalemova vinove loze pomoću vakuum pumpe (Bazzi et al., 1987). Uopšteno, gore opisane procedure su vremenski veoma zahtevne i nisu pogodne za rutinsku analizu većeg broja uzoraka.

Sa druge strane, molekularne metode, pre svega PCR tehnika, mogu biti pogodne za brzu detekciju patogena u biljnom materijalu i zemljištu. Takođe, ovaj pristup se generalno koristi za brzu identifikaciju izolovanih sojeva i preliminarnu determinaciju njihove patogenosti, kroz detekciju Ti plazmida. Međutim, visok stepen genetičkog diverziteta patogena, prvenstveno Ti plazmida, može ograničiti specifičnost PCR metode (Kuzmanović i sar., 2016). Moguće je da bakterija ne bude detektovana postojećim metodama. Međutim, i dalje ne možemo biti potpuno sigurni da je materijal zdrav. Stoga i dalje postoji potreba za daljim unapređenjem specifičnosti i osetljivosti metoda detekcije i identifikacije patogena, i za definisanjem procedure uzorkovanja biljnog materijala.

Proizvodnja zdravog sadnog materijala

Proizvodnja zdravog sadnog materijala svakako je preduslov za sprečavanje introdukcije i širenja oboljenja. Mere koje su raspoložive u cilju proizvodnje zdravih loznih kalemova obuhvataju primenu termoterapije (Bazzi et al., 1991). Naime, potapanjem kalemova u vodu temperature 50°C u trajanju 30 min može se značajno smanjiti nivo populacije bakterija, međutim ne i potpuno eliminisati patogen (Burr et al., 1996). Sa druge strane, više temperature mogu negativno uticati na vitalnost pupoljaka. Iako se termoterapijom *A. vitis* ne eliminiše u potpunosti, termoterapija i dalje predstavlja korisnu meru u pojedinim delovima sveta.

Još jedna mera je i reprodukcija sadnog materijala u laboratorijskim uslovima u specijalnom supstratu. U ovu svrhu se koristi tkivo mladih pupoljaka, s obzirom da je smatrano da se bakterija ne nalazi u vrhovima lastara, pa je vinova loza dobijena iz ovih delova slobodna od prisustva bakterije. Međutim, novija istraživanja su pokazala da patogen zapravo može biti prisutan u pupoljcima i meristemskom tkivu (Johnson et al., 2016). Stoga se može zaključiti da se kulturom tkiva iz pupoljaka ne može pouzdano eliminisati patogen. Dodatak odgovarajućih antibiotika koji ne inhibiraju rast biljke i termoterapija bi mogli biti primenjeni kao dodatna mera u kulturi tkiva.

Agrotehničke mere

U kontroli bakterioznog raka prvenstveno se preporučuje korišćenje sorti i podloga otpornih prema prouzrokovaču oboljenja. Više studija bavilo se proučavanjem osetljivosti različitih vrsta i sorti vinove loze na infekciju *A. vitis* (Jung et al., 2016; Roh et al., 2003; Stover et al., 1997a). Utvrđeno je da je *V. vinifera* najosetljivija. Kao visoko osetljive sorte navode se najpopularnije i najtraženije sorte kao što su Chardonnay, Merlot, Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Riesling, itd. Istraživanja na temu genetike otpornosti vinove loze su limitirana, ali svakako obećavajuća (Kuczmog et al., 2012).

Potrebno je sprovoditi agrotehničke mere koje utiču na smanjenu pojavu povreda koje predstavljaju ulazna vrata za patogena, odnosno predstavljaju okidač za infekciju (Moyer, 2013). Pri podizanju novih vinograda treba voditi računa o konfiguraciji terena i birati mesta koja nisu podložna mrazu. Takođe, ukoliko je moguće, treba kontrolisati vodni režim u vinogradu. Čokoti na vlažnim mestima imaju produžen porast kasnije u sezoni, te su skloniji povredama od mraza. Osim toga, intenzivno đubrenje takođe može stimulisati rast vinove loze kasnije tokom sezone. Stoga je potrebno koristiti mere koje obezbeđuju blagovremeno i dobro zdravlje lastara i njihovu veću toleranciju na mraz. U cilju zaštite biljaka od mraza, posebno spojnog mesta, u pojedinim regionima se koristi mera zagrtanja prizemnih delova čokota.

S obzirom na manji značaj zemljišnih infekcija, ukoliko se bakteriozni rak pojavi na manjem procentu biljaka u vinogradu, kao korisna mera može se pre-

poručiti podsađivanje, odnosno uklanjanje zaraženih biljaka i sadnja novih zdravih kalemova. Pri tome, mora se voditi računa da se uklone i delovi korena i zemljišta oko zaraženih biljaka, kako bi se smanjila mogućnost infekcije podsađenih biljaka.

Biološka kontrola

Biološka kontrola korišćenjem antagonističkih sojeva je potencijalno obećavajući pristup u zaštiti od bakterioznog raka vinove loze. Tako je kontrola bakterioznog raka korišćenjem nepatogenog soja *R. rhizogenes* (prethodno ime *Agrobacterium radiobacter*) K84, i njegove poboljšane genetički modifikovane forme (soj K1026) primenjivana uspešno na različitim biljnim vrstama širom sveta (Kerr, 2016). Međutim, ovi agensi nisu bili efikasni u prevenciji *A. vitis* i kontroli bakterioznog raka vinove loze. Nekoliko drugih antagonističkih sojeva pokazalo je određenu efikasnost u kontroli *A. vitis* i još uvek se sprovode istraživanja u cilju određivanja njihovog potencijala i procene komercijalne vrednosti. S tim u vezi, najviše su proučavani nepatogeni sojevi *A. vitis* F2/5 (Burr and Reid, 1994) i ARK-1 (Kawaguchi et al., 2017) koji su pokazali izvestan potencijal u prevenciji bakterioznog raka. Međutim, istraživanja su i dalje u toku i za sada ne postoji komercijalno dostupan preparat baziran na ovim sojevima. Eterična ulja pojedinih aromatičnih biljaka takođe su ispoljila antibakterijsku aktivnost prema *A. vitis* (Habbadi et al., 2017), što bi mogao predstavljati alternativni pristup u kontroli bakterioznog raka vinove loze u budućnosti.

Zahvalnica

Ovaj rad je rezultat istraživanja u okviru projekta III46008 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. S Print, Novi Sad.
- Arsenijević, M., Stojić, J., and Panić, M. (1974): Contribution to the study of bacterial canker of the grapevine (*Agrobacterium tumefaciens*). Plant Protection, 25: 257-264.
- Bauer, C., Schulz, T. F., Lorenz, D., Eichhorn, K. W., and Plapp, R. (1994): Population dynamics of *Agrobacterium vitis* in two grapevine varieties during the vegetation period. Vitis, 33: 25-29.
- Bazzi, C., Piazza, C., and Burr, T. J. (1987): Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine cuttings. EPPO Bulletin, 17: 105-112.
- Bazzi, C., Stefani, E., Gozzi, R., Burr, T. J., Moore, C. L., and Anaclerio, F. (1991): Hot-water treatment of dormant grape cuttings: Its effects on *Agrobacterium tumefaciens* and on grafting and growth of vine. Vitis, 30: 177-187.
- Bishop, A. L., Katz, B. H., and Burr, T. J. (1988): Infection of grapevines by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. Phytopathology, 78: 945-948.

- Burr, T. J., and Reid, C. L. (1994): Biological control of grape crown gall with non-tumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 213-219.
- Burr, T. J., Katz, B. H., and Bishop, A. L. (1987a): Populations of *Agrobacterium* in vineyard and nonvineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Disease*, 71: 617-620.
- Burr, T. J., Reid, C. L., Tagliatti, E., and Bazzi, C. (1995): Survival and tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil. *Plant Disease*, 79: 677-682.
- Burr, T. J., Reid, C. L., Splittstoesser, D. F., and Yoshimura, M. (1996): Effect of heat treatments on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis* *in vitro* and in dormant grape cuttings. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 119-123.
- Burr, T. J., Bishop, A. L., Katz, B. H., Blanchard, L. M., and Bazzi, C. (1987b): A root-specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* biovar 3. *Phytopathology*, 77: 1424-1427.
- Canik Orel, D., Reid, C. L., Fuchs, M., and Burr, T. J. (2017): Identifying environmental sources of *Agrobacterium vitis* in vineyards and wild grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68: 213-217.
- Cavara, F. (1897): Tubercolosi della vite. Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate. *Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane*, 30: 483-487.
- Dessaux, Y., and Faure, D. (2018): Niche construction and exploitation by *Agrobacterium*: how to survive and face competition in soil and plant habitats. *Current Topics in Microbiology and Immunology*.
- Fabre, E., and Dunal, M. F. (1853): Observations sur les maladies régnantes de la vigne. *Bulletin de la Société d'Agriculture du Département de l'Hérault*, 40: 46.
- Faist, H., Keller, A., Hentschel, U., and Deeken, R. (2016): Grapevine (*Vitis vinifera*) crown galls host distinct microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 82: 5542-5552.
- Gelvin, S. B. (2017): Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annual Review of Genetics*, 51: 195-217.
- Genov, I., Atanassov, I., Tsvetkov, I., and Atanassov, A. (2006): Isolation and characterization of *Agrobacterium* strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes, *V. vinifera* ssp. *silvestris*. *Vitis*, 45: 97-101.
- Habbadi, K., Meyer, T., Vial, L., Gaillard, V., Benkirane, R., Benbouazza, A., Kerzaon, I., Achbani, E. H., and Lavire, C. (2017): Essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus vulgaris* exert a protective effect against the phytopathogen *Allorhizobium vitis*. *Environmental Science and Pollution Research International*.
- Hao, L., Kemmenoe, D. J., Orel, D. C., and Burr, T. (2017): The impacts of tumorigenic and non-tumorigenic *Agrobacterium vitis* strains on graft strength and growth of grapevines. *Plant Disease*.
- Johnson, K. L., Cronin, H., Reid, C. L., and Burr, T. J. (2016): Distribution of *Agrobacterium vitis* in grapevines and its relevance to pathogen elimination. *Plant Disease*, 100: 791-796.
- Jung, S.-M., Hur, Y.-Y., Preece, J. E., Fiehn, O., and Kim, Y.-H. (2016): Profiling of disease-related metabolites in grapevine internode tissues infected with *Agrobacterium vitis*. *The Plant Pathology Journal*, 32: 489-499.

- Kawaguchi, A., Inoue, K., Tanina, K., and Nita, M. (2017): Biological control for grapevine crown gall using nonpathogenic *Rhizobium vitis* strain ARK-1. Proceedings of the Japan Academy Series B Physical and Biological Sciences, 93: 547-560.
- Kerr, A. (2016): Biological control of crown gall. Australasian Plant Pathology, 45:15-18.
- Kuczmog, A., Galambos, A., Horvath, S., Matai, A., Kozma, P., Szegedi, E., and Putnoky, P. (2012): Mapping of crown gall resistance locus *RcgI* in grapevine. Theoretical and Applied Genetics, 125: 1565-1574.
- Kuzmanović, N., Biondi, E., Bertaccini, A., and Obradović, A. (2015): Genetic relatedness and recombination analysis of *Allorhizobium vitis* strains associated with grapevine crown gall outbreaks in Europe. Journal of Applied Microbiology, 119: 786-796.
- Kuzmanović, N., Pulawska, J., Hao, L., and Burr, T. J. (2018): The ecology of *Agrobacterium vitis* and management of crown gall disease in vineyards. Current Topics in Microbiology and Immunology.
- Kuzmanović, N., Gašić, K., Ivanović, M., Prokić, A., and Obradović, A. (2012a): Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia. Archives of Biological Sciences, 64: 1487-1497.
- Kuzmanović, N., Čalić, A., Ivanović, M., Gašić, K., Puławska, J., and Obradović, A. (2012b): First report of *Agrobacterium vitis* as the causal agent of grapevine crown gall in Serbia. Plant Disease, 96: 286-286.
- Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Gašić, K., Zlatković, N., and Obradović, A. (2014): Characterization and phylogenetic diversity of *Agrobacterium vitis* from Serbia based on sequence analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) region. European Journal of Plant Pathology, 140: 757-768.
- Kuzmanović, N., Biondi, E., Ivanović, M., Prokić, A., Zlatković, N., Bertaccini, A., and Obradović, A. (2016): Evaluation of different PCR primers for identification of tumorigenic bacteria associated with grapevine crown gall. Journal of Plant Pathology, 98: 311-319.
- Lehoczky, J. (1978): Root-system of the grapevine as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* cells. Pages 239-243 in: 4th International conference on plant pathogenic bacteria, Angers, France.
- Lehoczky, J. (1989): Inoculation experiment on trellised grapevines with *Agrobacterium tumefaciens* to study the process of crown gall disease. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 24: 283-291.
- Moore, L. W., Bouzar, H., and Burr, T. J. 2001. *Agrobacterium*. Pages 17-35 in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. N. W. Schaad, J. B. Jones and W. Chun, eds. APS Press, St Paul, Minnesota.
- Mousavi, S. A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., and Lindström, K. (2015): Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. Systematic and Applied Microbiology, 38: 84-90.
- Mousavi, S. A., Osterman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., and Lindstrom, K. (2014): Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. Systematic and Applied Microbiology, 37: 208-215.
- Moyer, M. (2013): Grapevine crown gall, disease management white paper. <http://wine.wsu.edu/wp-content/uploads/sites/66/2013/05/2013-CrownGallWhiteSheet.pdf>

- Ophel, K., and Kerr, A. (1990): *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 236-241.
- Ormeño-Orrillo, E., Servín-Garcidueñas, L. E., Rogel, M. A., González, V., Peralta, H., Mora, J., Martínez-Romero, J., and Martínez-Romero, E. (2015): Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics. *Systematic and Applied Microbiology*, 38: 287-291.
- Panagopoulos, C. G., and Psallidas, P. G. (1973): Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith i Townsend) Conn. *Journal of Applied Bacteriology*, 36: 233-240.
- Panić, M. (1976): Metoda dokazivanja bakterioznog raka loznih kalemova. Pages 301-308 in: Poljoprivredna znanstvena smotra, Zagreb.
- Panić, M. (1977): O bakterioznom raku vinove loze. Pages 185-211 in: Savjetovanje o ekškoriozi i virusnim bolestima vinove loze Zbornik radova, IRC - Hepok, Mostar.
- Poppenberger, B., Leonhardt, W., and Redl, H. (2002): Latent persistence of *Agrobacterium vitis* in micropropagated *Vitis vinifera*. *Vitis*, 41: 113-114.
- Pu, X.-A., and Goodman, R. N. (1993): Effects of fumigation and biological control on infection of indexed crown gall free grape plants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44: 241-248.
- Roh, J. H., Yun, H. K., Park, K. S., Lee, C. H., and Jeong, S. B. (2003): *In vivo* evaluation of resistance of grape varieties to crown gall disease. *Plant Pathology Journal*, 19: 235-238.
- Schroth, M. N., McCain, A. H., Foott, J. H., and Huisman, O. C. (1988): Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant Disease*, 72: 241-246.
- Stover, E. W., Swartz, H. J., and Burr, T. J. (1997a): Crown gall formation in a diverse collection of *Vitis* genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 26-32.
- Stover, E. W., Swartz, H. J., and Burr, T. J. (1997b): Endophytic *Agrobacterium* in crown gall-resistant and -susceptible *Vitis* genotypes. *Vitis*, 36: 21-26.
- Süle, S. (1978): Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary. *Journal of Applied Bacteriology*, 44: 207-213.
- Süle, S., Lehoczky, J., Jenser, G., Nagy, P., and Burr, T. J. (1995): Infection of grapevine roots by *Agrobacterium vitis* and *Meloidogyne hapla*. *Journal of Phytopathology*, 143: 169-171.
- Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J., Farrand, S. K., and Winans, S. C. (2000): The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*, 182: 3885-3895.

Abstract
CROWN GALL OF GRAPEVINE

Nemanja Kuzmanović¹, Aleksa Obradović²

¹*Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Braunschweig, Germany*

²*University of Belgrade – Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia*

e-mail: kuzmanovic1306@gmail.com, aleksao@agrif.bg.ac.rs

Crown gall is considered one of the most important and widespread bacterial diseases of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Disease is present in almost all grapevine-growing areas worldwide. Crown gall is an economically important plant disease of grapevine, especially in nurseries and newly established vineyards. Typical symptoms of grapevine crown gall disease include tumor formation on the aerial parts of host plants. *Agrobacterium vitis* is primary species causing this disease. *A. vitis* colonizes grapevine systemically and can persist latently in symptomless plant material. It is also detected as an epiphyte on grapevine and can survive in soil exclusively in association with host plants. Crown gall can be efficiently disseminated to distant geographical areas via international trade of propagation material, which is considered the main pathway of disease introduction and spread. In Serbia, crown gall was observed sporadically on grapevine, although it occurred with high incidence and severity in some years. Because there are no effective curative control measures, the disease is especially challenging to manage. Therefore, the disease management strategy is based on preventive measures. Use of pathogen-free planting material in areas with no history of the crown gall represents main prerequisite for the disease prevention. Biological control and production of resistant grape varieties are promising as future control measures.

Key words: *Agrobacterium vitis*, tumorigenic bacteria, Ti plasmid, systemic colonization, infected plant material