

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Кафедра биотехнологии и микробиологии

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОРНЕВОГО РАКА ПЛОДОВЫХ
САЖЕНЦЕВ *Pseudomonas tumefaciens* (SMITH AND TOWNSEND)**

Выпускная квалификационная работа
студента очной формы обучения
направления подготовки 19.03.01 - Биотехнология
4 курса группы 07001419
Толмачева Петра Викторовича

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук,
Профессор кафедры биотехнологии
и микробиологии
Сиротин А.А.

БЕЛГОРОД 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Возбудитель корневого рака.....	8
1.2 История изучения возбудителя корневого рака.....	10
1.3 Симптомы корневого рака.....	12
1.4 Меры борьбы с корневым раком.....	14
1.4.1 Профилактические мероприятия против корневого рака.....	16
1.4.2 Подготовка посадочного материала.....	17
1.4.3 Контроль качества посадочного материала.....	17
1.4.4 Закладка маточника.....	18
1.4.5 Профилактические работы после закладки маточника.....	18
1.4.6 Карантин.....	19
1.4.7 Изоляция и посадка отводков в оздоровленном маточнике.....	19
1.5 Идентификация возбудителя корневого рака.....	19
1.5.1 Выделение в чистую культуру и идентификация <i>Pseudomonas tumefaciens</i>	20
1.5.2 Идентификация возбудителя корневого рака методом растений-индикаторов.....	21
1.5.3 Идентификация возбудителя корневого рака методом ПЦР-анализа.....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
2.1. Материалы исследования.....	24
2.2. Методы исследования.....	25
2.2.1. Подготовка и стерилизация лабораторной посуды.....	25
2.2.2. Приготовление питательных сред для выделения и культивирования микроорганизмов.....	26

2.2.3 Подготовка материала к посеву.....	27
2.2.4 Выделение возбудителя корневого рака в чистую и накопительную культуры из опухоли растения.....	28
2.2.5 Определение характеристик колоний выделенных микроорганизмов.....	29
2.2.5.1. Определение цвета колоний выделенных микроорганизмов.....	29
2.2.5.2. Определение консистенции колоний и особенностей роста колоний.....	29
2.2.5.3 Определение характера роста колоний	30
2.2.5.4 Определение типа дыхания выделенных микроорганизмов.....	31
2.2.6 Определение характеристик микроскопического препарата.....	31
2.2.6.1 Определение наличия спор.....	32
2.2.6.2 Окраска по Граму	33
2.2.6.3 Определение размера микробной клетки.....	34
2.2.6.4 Определение подвижности выделенных микроорганизмов.....	35
2.2.7 Выявление роста возбудителя на дисках моркови.....	36
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
3.1. Выделение возбудителя корневого рака в чистую культуру.....	38
3.2. Идентификация возбудителя корневого рака на основании морфологии колоний.....	39
3.3. Идентификация возбудителя корневого рака на основании исследования микроскопических препаратов.....	41
3.4. Тестирование выделенных микроорганизмов на дисках моркови.....	45

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	50
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	59

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день фитопатогенные бактерии являются возбудителями более 200 болезней растений, они вызывают гнили, некрозы, увядания, опухоли, хлорозы и другие поражения растительных культур. С ними связаны большие потери урожая, что наносит неисправимый вред сельскому хозяйству [9].

В настоящее время наблюдается повышение распространенности бактериальных заболеваний в Российской Федерации, одной из причин которого является изменение климата. При увеличении среднесуточной температуры в летний период на 3–4°C распространенность бактериозов повышается в 2 раза, а зараженность растений увеличивается на 30-50% [24].

Все большую опасность для сельского хозяйства представляет корневой бактериальный рак, возбудитель которого распространен в питомниках и поражает в основном плодовые культуры. Иногда он встречается на свекле, моркови, капусте, винограде, помидорах, розах, хризантемах и других культурах [18].

Формирование опухолей у плодовых культур при развитии корневого рака опасно для ряда стран Восточной Европы, в том числе Российской Федерации и стран СНГ, так как в этих странах климат характеризуется резкими температурными перепадами зимой, весной и ранней осенью. Эти климатические условия благоприятно влияют на развитие возбудителя корневого бактериального рака [33]. Кроме того сейчас наблюдается все большее усиление вредоносности корневого рака, что связано с выращиванием растительного посадочного материала по промышленной технологии, которая основывается на использовании вегетативно размножаемых подвоев [35].

Литературный обзор показывает, что заражения растений корневым бактериальным раком встречались в России в разные годы, но вредоносность

их проявлялась на отдельных очагах, небольших участках. Наиболее часто они встречались в начале прошлого века, когда не была разработана технология выращивания саженцев с использованием методов защиты от патогенов. Данная проблема характерна и для Центрально - Черноземного региона, где обнаруживались сильные поражения маточника подвоев яблони на площади 2 га [59].

Возбудитель корневого рака вызывает огромные потери урожая. Установлено, что поражение отдельных сортов плодовых культур на Украине достигало 90%. В условиях юга Украины в отдельные годы количество зараженных деревьев черешни и груши с пораженной корневой шейкой составляло 28,6-40%, а с наростами главного корня – 38,5-62,5%. В Азербайджане заражение виноградных лоз в отдельные годы составляло 3,5-38,4% [41]. В Армении заражение плодовых культур составило 7,7- 33,5%, а в отдельных очагах от 46 % до 89,3% [42-44, 74]. В Молдавии поражение саженцев яблони достигало 58,8%, а косточковых культур 11,2 % [35].

Наибольший ущерб болезнь приносит школам, питомникам и молодым садам при выращивании плодовых деревьев, так как больные растения слабо растут и неустойчивы к стрессовым факторам окружающей среды. Связи с чем выход посадочного материала снижается на 20-40% [58].

На основании вышесказанного нами была поставлена следующая цель: выделить возбудителя корневого бактериального рака из опухолевых образований корня сливы растопыренной (*Prunus cerasifera* Ehrh.) и идентифицировать его.

Для достижения поставленной в работе цели были сформулированы следующие задачи:

1. выделить возбудителя корневого рака, полученного из опухолевых образований корня сливы растопыренной (*Prunus cerasifera* Ehrh.), в чистую культуру;

2. идентифицировать возбудителя корневого рака, основываясь на характеристиках колоний;
3. идентифицировать возбудителя корневого рака, основываясь на характеристиках микроскопического препарата;
4. выявить рост возбудителя корневого рака на морковных дисках.

Объектом исследования в работе являются корневой бактериальный рак сливы растопыренной (*Prunus cerasifera* Ehrh.). Предмет исследования – идентификация возбудителя корневого рака.

Теоретической основой работы послужили исследования отечественных и зарубежных ученых, таких как А.А. Бабаяна, В.П. Израильского, В.Ф. Пересыпкина, Л.Л. Бунцевича, В.Ф. Бурдинской, М.В. Горленко, Л.Н. Григорцевича, А.Н. Игнатова, Н.Б. Лемановой, М.К. Магера, А.Т. Макрушиной, К.В. Попковой, И.Л. Сербинова, Е.М. Стороженко, Т.М. Фоменко, В.А. Чулкиной, А.А. Ячевского, M.W. Beijerinck, H.J. Conn, M. Detrait, K. Ophel, H. Sawada, E.F. Smith, C.O. Townsend, J.M. Young.

Выпускная квалификационная работа изложена на 60 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы по теме исследования, характеристики объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка используемой литературы и приложений. Список использованных источников состоит из 65 отечественных источников и 14 иностранных. В работу включены 11 рисунков, 3 таблицы, работа содержит 4 приложение.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Возбудитель корневого рака

Возбудителем корневого рака является бактерия вида *Pseudomonas tumefaciens*, известная также под названиями *Bacterium tumefaciens* и *Rhizobium radiobacter*. Вид является гетерогенным, представлен различными штаммами со специфическими свойствами, которые отличаются в зависимости от растения-хозяина [33]. Известно, что этот микроорганизм поражает растения 643 видов, которые относятся к 331 роду из 93 семейств. К нему восприимчивы около 60% всех двудольных растений [3, 36-38, 40].

Наиболее известен штамм *Pseudomonas tumefaciens* (Sm. Et Towns) Conn. – возбудитель корневого рака плодовых и рака корнеплодов свеклы [19, 31, 47].

По современной систематике возбудитель корневого рака относится к классу Shizomicetes, порядку Eubacteriales, семейству Rhisobiaceae, роду *Agrobacterium* [24].

По ареалу распространения корневой бактериальный рак – одно из самых распространенных заболеваний во многих странах мира. Он встречается на всей территории бывшего СССР, где выращивают плодовые культуры [21, 42 - 44, 57, 60], а также в Болгарии, Венгрии, Греции, Румынии, Чехословакии, Франции и Южной Африке [69,72, 75, 76, 78].

По морфологическим признакам *Pseudomonas tumefaciens* представляет собой палочковидную бактерию (бацилла), по окраске по Грамму является грамотрицательной, по отношению к кислороду - облигатно аэробной. Почвенная бактерия *Pseudomonas tumefaciens* имеет форму слегка изогнутых палочек, размер которых варьирует от 0,6x1,5 до 1,0x3,0 мкм, является подвижной и не образует спор. По расположению жгутиков *Pseudomonas tumefaciens* – перитрих, имеет 1-4 жгутика, которые располагаются одиночно или попарно [4, 47, 68].

Микрофотография возбудителя корневого рака – *Pseudomonas tumefaciens* представлена на рисунке 1.

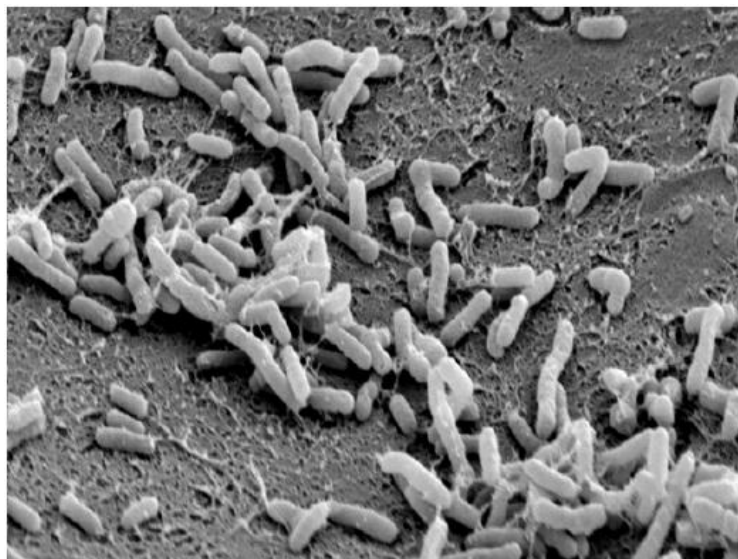


Рис. 1. Микрофотография возбудителя корневого рака – *Pseudomonas tumefaciens*

По типу питания возбудитель корневого рака – *Pseudomonas tumefaciens* является гетеротрофной бактерией, которая питается мертвым растительным материалом ризосферы, особой благоприятной среды обитания микроорганизмов, на которую влияют корневые системы растений, обогащенные питательными веществами и источниками энергии. В анаэробных условиях *Pseudomonas tumefaciens* способен использовать нитраты в качестве акцептора электронов [70].

Колонии, полученные на картофельном агаре, имеют приподнятую структуру, влажно-блестящий оттенок, светло-бежевый цвет, ровные просвечивающие края. На средах с углеводами рост возбудителя корневого бактериального рака сопровождается образованием внеклеточной полисахаридной слизи. *Pseudomonas tumefaciens* не гидролизует крахмал. Реакцию на каталазу, оксидазу и уреазу, как правило, микроорганизм показывает положительную. Оптимальная температура роста 25-30°C, однако,

растет при температуре 0-37° С. Гибнет в растениях при температуре 51° С. Оптимальный диапазон кислотности среды наблюдается при рН 6,0-9,0 [5, 20].

Способность возбудителя корневого рака вызывать у растений образование опухолей связана с наличием у них Ti-плазмиды, благодаря которой протекает опухолевая трансформация в пораненных участках растения. Включение сегмента плазмиды бактерии в ядерную ДНК растительной клетки и вызывает трансформацию растительного организма [1].

1.2 История изучения возбудителя корневого рака

Первое описание симптомов корневого бактериального рака плодовых культур в мире встречается в 1894 г. в работах Л.Х. Бэйлиа, в 1898 г. в работах Л.Р. Тафта, в 1900 г. в работах Д.М. Томи, в 1903 г. в работах Дж. Брезински, в 1905 г. в работах Х.Е Морриса [35].

Первые сведения о бактериальном корневом раке в русской литературе появились в 1912 году в трудах И.Л. Сербинова, который подробно описал внешнюю картину зараженных растений плодовых культур [51-54]. Также исследования корневого рака были проведены А.А. Ячевским в 1935 году [65].

Возбудитель корневого рака впервые был описан Бейеринком (Beijerinck) и ванн Делденом (van Delden) в 1902 г. под названием *Bacillus radiobacter* [66].

В 1906 году американские ученые Смитт и Тоунсенд выделили возбудителя корневого рака и описали его под названием *Bacterium tumefaciens* S. et T. (в настоящее время бактерия называется *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn [74].

В 1910 г. Г. О. Хеддук подтвердил, что данный микроорганизм является возбудителем опухолеобразования на корнях плодовых культур [27, 35]

В 1942 году Д. Конн дал возбудителю корневого рака другое название, реклассифицировав его под названием *Agrobacterium tumefaciens* [67].

Следующим ученым, который предложил сменить название патогену, был Х. Савада, который в 1993 году просил отменить название *Agrobacterium tumefaciens* [47], данное Конном в 1942 году, однако комиссия оставила *Agrobacterium tumefaciens* как типовой вид рода *Agrobacterium* Conn [73].

В 2001 году Д.М. Юнг с сотрудниками предложил перевести вид *Agrobacterium tumefaciens* в род *Rhizobium* [77].

Среди основных видов возбудителей корневого рака стали выделять *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium radiobacter*. В 1990 г. К. Офел и А. Керр определили один из штаммов *Agrobacterium tumefaciens* как новый вид *Agrobacterium vitis* [71].

Таким образом, систематики несколько раз переносили вид-возбудитель корневого рака в другие роды: Ленис в 1905 — в *Bacterium*, Примбран в 1933 — в *Rhizobium*, Берджи в 1934 — в *Achromobacter*, Конн в 1939 — в *Alcaligenes* и в 1942 г. — в род *Rhizobium* [28, 35]

Подробно исследовали и описали возбудителя корневого рака В.П. Израильский и его сотрудники [7-8] и М.В. Горленко [15-17]. Яковлен, Родигин, Исаева сообщали о нахождении заболевания в российских питомниках [25, 50].

Со временем корневой бактериальный рак был описан во многих странах мира: США, Англии, Франции, Италии, Индии, Африке. В СССР большой вклад в вопросы разработки мер борьбы с бактериальным раком, а также в исследования по распространению и вредности заболевания, биологическим особенностям возбудителя болезни внесли А.А. Ячевский (1910, 1935), В.О. Семашко (1916), Н.А. Яковлев (1924), Н.А. Ряховский (1933), М.И. Лопатин (1939), И.В. Воронкович, Г.Д. Успенская (1954), Д.П. Вовченко (1959, 1961, 1965), Е.В. Исаева (1968), О.З. Метлицкий, А.И. Иванов (1984) (Магер, 1980).

1.3 Симптомы корневого рака

Главный симптом заражения корневым раком – это образование опухолей на надземных (виноград, розы, хризантемы) и подземных (подвой плодовых пород, малина, древесные кустарники) органах растений [24].

Корневой бактериальный рак вызывает образование наростов (зобоватость) и опухолей. В большинстве случаев корневой рак является системным заболеванием и вызывает порчу не одного, а целого ряда растений сельскохозяйственных культур [4, 60].

Заражая растение, возбудитель корневого бактериального рака долгое время может быть в контакте с ним, но при этом может не вызывать заболевания, обязательным условием заражения является ранение растительной ткани [75]. Если возбудитель попадает в проводящую систему растения, симптомы формируются на побеговой части, что в дальнейшем приводит к истощению растений, усыханию и дальнейшей его гибели [4, 60].

Наросты могут образовываться на основных, боковых корнях и корневой шейке. Сначала они мягкие, небольшого размера, поверхность их гладкая, затем происходит их разрастание, они твердеют. Их поверхность становится бугристой, так как на них образуются новые наросты [18].

Мягкие наросты имеют белую окраску, они быстрее разрастаются, чем твердые. Средний диаметр наростов и опухолей составляет 3,5- 7,0 см, но может достигать 8-12 см и более [15-17].

Общий вид корневой системы, пораженной *Pseudomonas tumefaciens*, представлен на рисунке 2.



Рис. 2. Общий вид корневой системы плодовых саженцев, пораженных возбудителем корневого рака – *Pseudomonas tumefaciens* [4]

Осенью раковые образования загнивают и разрушаются, выделяя при этом большое количество бактерий, которые попадают в почву и заражают ее [18]. Иногда наросты разрушаются полностью, но на следующий год могут появиться на том же самом месте [39].

Pseudomonas tumefaciens имеет способность сохраняться в почве более года, что является основным путем для передачи инфекции через поврежденные корни деревьев и корневые остатки. Освободившиеся после уборки саженцев бактерии переносятся водой на корни пересаживаемых растений. Они проникают в здоровые корни через механические повреждения, которые образуются при поранении растения насекомыми и вредителями [1, 18]. Однако бактерии могут попадать не только в подземные части растения, но и в надземные через зараженный инструмент при обрезке, прививки и окулировке [64].

Возбудитель корневого рака поражает растительные клетки, но при этом не убивает их, а действует путем стимуляции их к нерегулярному делению. Под действием этих бактерий усиливается деление именно паренхимного типа растительных клеток, что приводит к увеличению их объема, к образованию наростов и опухолей [45]. Пораженные саженцы отстают в своем росте и развитии, вступают позднее в пору плодоношения, чем здоровые саженцы [18, 63].

На распространение возбудителя корневого бактериального рака значительное влияние оказывают абиотические и биотические факторы природной среды. Низкие или высокие температуры, дефицит влаги, недостаток кислорода, переуплотнение почв, механические повреждения корневой системы растений вызывают стрессы и служат активаторами процесса заражения корневым раком [62].

Большое влияние оказывает кислотность почвы: в нейтральной и слабощелочной среде возбудитель активно развивается, что не наблюдается в кислой среде при pH 5,0 и ниже [56].

В садах интенсивного типа распространению возбудителя корневого бактериального рака способствуют следующие факторы: загущение насаждения; возделывание однородных насаждений крупными массивами, активное использование гербицидов, переход на слаборослые подвои [18].

1.4 Меры борьбы с корневым раком

На сегодняшний день для снижения скорости развития корневого бактериального рака применяют целый ряд мер: выведение устойчивых к заболеваниям сортов сельскохозяйственных культур; подготовку специалистов, специализирующихся на данном заболевании; проведение качественной

диагностики растений; разработка препаратов, способствующих эффективной борьбе с корневым раком [56].

Все защитных мероприятия предназначены для снижения численности популяций возбудителя корневого бактериального рака в почве до определенного показателя, который составляет у индикаторных растений до 3%, а у посадочного материала до 0,1%. В качестве индикаторных растений на присутствие в почве возбудителя корневого рака используют бархатцы, горчицу, редис, ноготки, томаты, дурман, свеклу, подсолнечник, морковь, саженцы груши. Идентификацию возбудителя чаще всего проводят на морковных дисках [62].

Существует ряд рекомендаций предназначенных для уменьшения количества заболеваемости корневым бактериальным раком. Большое значение в защите от возбудителя имеет соблюдение правильного севооборота. Рекомендуются избегать повышенных доз азотных удобрений. Не допускается повреждение корневой системы инструментами, грызунами и насекомыми. Для избегания порчи корневой системы насекомыми обязательно проводят дезинфекцию почвы в питомнике [45].

Серьезно подходят и к долговременным фундаментальным мероприятиям, их заблаговременно планируют: подбор хорошо аэрируемых плодородных почв под плодовые насаждения, свободные от болезни; повышение супрессивности почв путем внесения высоких доз органических (100-150 т/га) и минеральных удобрений (по 120 кг д.в./га P_2O_5 и K_2O). При этом вносят физиологически кислые минеральные удобрения, уменьшающие количество возбудителя [62].

К оперативным мероприятиям защиты от корневого рака относят: выращивание здорового растительного посадочного материала и выбраковка пораженных растений; при необходимости посадочный материал стерилизуют с использованием 1%-ного раствора медного купороса в течение 2-3 минут с последующим промыванием водой; систематическая защита плодовых

насаждений от заморозков, выбраковка старых деревьев, которые потеряли иммунитет; минеральные и органические подкормки растений для повышения физиологической устойчивости их к инфекции [62].

Ликвидация бактериального корневого рака в маточнике подвоев яблони состоит из следующих этапов: профилактические мероприятия против корневого рака, подготовка посадочного растительного материала, контроль качества посадочного материала, закладка маточника, профилактические работы, карантин, изоляция и посадка отводков в оздоровленном маточнике [10].

1.4.1 Профилактические мероприятия против корневого рака

Профилактические мероприятия в борьбе против корневого рака играют важное значение и являются первичным этапом защиты от корневого рака. Под закладку нового маточника выбирается место по оптимальным растительным предшественникам, которыми могут выступать люпин, пшеница, ячмень, рожь, без возделывания на нем плодовых культур. Перед использованием почв обязательно проводится бактериологический анализ и агрохимическое обследование участка [45].

После подбора такого участка выполняют следующие агротехнические мероприятия: внесение органических удобрений в концентрации 60 т/га; внесение физиологически кислых минеральных удобрений – фосфорных и калийных; глубокая вспашка на глубину 40 см; дискование в два следа по диагонали дискатором; профилактическая обработка участка биологическим препаратом Фитоспорин М (полив 10 м^3 /га, из расчета 3 литра препарата на 1 тонну воды), который имеет противогрибковые и противобактериальные свойства; культивация с боронованием на глубину 12 см [10].

1.4.2 Подготовка посадочного материала

В начале вегетационного периода растений проводится провокационная обработка маточника препаратами Мивал-Агро (20 г/га – 1000 л раствора/га) и Хорус (200 г/га – 1000 л раствора/га), которые стимулируют развитие корневого бактериального рака, для последующего уничтожения пораженных растений. В критические периоды (высокая температура воздуха, засуха) добавляется 30%-ный раствор препарата Аминокат (300 мл/200 л воды из расчета 300 л/га). Осенью отделяются отводки для закладки оздоровленного маточника с отбором маточных кустов без признаков заражения, сортировка и упаковка отделённых отводков с последующей закладкой на зимнее хранение. Зараженные растения сжигаются [10].

1.4.3 Контроль качества посадочного материала

Перед закладкой маточника проводится обязательные лечебно-профилактические меры против корневого бактериального рака. Первоначально проводят термотерапию с погружением саженцев в теплую воду температурой 30°C на 32 часа; далее проводят обработку корневой системы перед посадкой 1%-ным раствором медного купороса в течение 5 минут или 0,2%-ным раствором борной кислоты, либо 0,1%-ным раствором сернокислого цинка с последующей промывкой водой, либо обработку корней раствором препарата Фундазола для их стерилизации от возбудителей корневого рака; проводят обмакивание корней перед посадкой в глино-торфяную смесь [45].

1.4.4 Закладка маточника

После проведения профилактических и лечебно-профилактических мероприятий проводят закладку маточника. Данный процесс состоит из следующих этапов: нарезка посадочных борозд; механизированная маркировка посадочных мест под саженцы; предпосадочный полив борозд; посадка в две строки с расстоянием 10 см в шахматном порядке на глубину 20 см выполненная вручную; послепосадочный полив – 100 м³/га [10].

1.4.5 Профилактические работы после закладки маточника

После закладки маточника проводят мероприятия по уходу за растениями: полив с внесением удобрений (Райкат Старт – 2 л/га) – 100- 300 м³/га через неделю после посадки и через неделю после первого полива, трехкратно с интервалом 7 дней; провокационная обработка препаратами Мивал-Агро (20 г/га – 1000 л раствора/га) и Хорус (200 г/га – 1000 л раствора/га) в фазу вегетации растений; междурядная обработка каждые три недели; стандартные обработки против болезней и вредителей с интервалом 10-15 дней; полив через неделю после последнего полива трехкратно с интервалом 7 дней; в критические периоды добавка 30%-го раствора препарата Аминокат (300 мл/200 л воды из расчета 300 л/га); ежемесячный оперативный мониторинг фитосанитарного состояния и ежегодная диагностика на наличие возбудителя корневого рака *Pseudomonas tumefaciens* [45].

1.4.6 Карантин

В серьезных случаях распространения возбудителя корневого бактериального рака налагают карантин. Он налагается сроком не менее 5 лет на зараженный участок прежнего маточника подвоев, где запрещается возделывание плодовых культур. На этом участке проводят глубокую вспашку на глубину 30-49 см; обработку зараженного участка противогрибковым и противобактериальным препаратом Фитоспорин М; соблюдают севооборот [10].

1.4.7 Изоляция и посадка отводков в оздоровленном маточнике

Изоляцию и посадку отводков, их сортировку и упаковку с последующей закладкой на зимнее хранение проводят заранее, в осенний период. Оценивают их фитосанитарное состояние. При отсутствии проявлений корневого рака маточник считается полностью оздоровленным [10].

1.5 Идентификация возбудителя корневого рака

Под влиянием различных причин степень возбудителя корневого рака *Pseudomonas tumefaciens* заражать растения может ослабевать, кратковременно или полностью исчезать. Кроме этого после заражения растения возбудитель болезни может существовать в его сосудах без проявления внешних признаков.

Из-за этого очень важным является своевременная диагностика растительных культур, для которой пользуются целым рядом методов [11].

Существует много различных методов идентификации возбудителя корневого рака: визуальный, микробиологический, ферментативные тесты, иммунофлуоресцентная микроскопия, иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция. Однако в последнее время все большую популярность в диагностике фитопатогенов набирает метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) благодаря своей простоте, чувствительности и высокой специфичности [28].

1.5.1 Выделение в чистую культуру и идентификация

Pseudomonas tumefaciens

Исследования проводят по общепринятым микробиологическим методам. Корни зараженных растений отмывают в стерильной воде, помещают смывы во флаконы с безазотистой питательной средой Федорова-Калининской. Состав среды представлен в приложении 1. К ней добавляют глюкозу в концентрации 10 г/л, дрожжевой автолизат – 0,1 г/л и бромтимоловый раствор – 2 мл/л. Инкубируют при температуре 25-28°C [60].

Полученные культуры пересевают в пенициллиновые флакончики с 5 мл полужидкой средой Федорова-Калининской с сахарозой или малатом и смесью витаминов: биотин – 10 мкг/л, рибофлавин – 200 мкг/л, кобаламин – 2 мкг/л, тиамин, пиридоксин, пантотенат кальция, никотиновую и парааминобензойную кислоту – по 100 мкг/л. Инкубацию культур в пенициллиновых флакончиках проводят в течение 2 недель при 28°C. В результате получают накопительную культуру микроорганизмов [60].

Из накопительных культур выделяют чистые культуры бактерий *Pseudomonas tumefaciens* на средах DAS и Эшби, состав которых представлен в приложении 2. После этого пересевают чистые культуры в пенициллиновые флакончики с 5 мл полужидкой среды Федорова-Калининской с сахарозой и через неделю чистую культуру используют для определения биохимической и физиологической активности. Параллельно чистые культуры пересевают в пробирки со средой DAS для сохранения культуры и дальнейших анализов [60]. Также возможно культивирование бактерий на среде Clark [35]. Состав питательной среды представлен в приложении 3.

Идентификацию возбудителя проводят через тест с образованием 3-кетолактозы, определяющий принадлежность к роду *Pseudomonas*, по методике Bernaerts M., Deley J. Идентификация возбудителя по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам проводят по общепринятым в бактериологической практике методам, физиологические тесты – по методике Keane [35].

1.5.2 Идентификация возбудителя корневого рака методом растений-индикаторов

Метод растений-индикаторов имеет широкое распространение. Он основывается на применении тест - растений, с помощью которых можно получить четкие результаты по наличию или отсутствию микроорганизмов, а также идентифицировать их [49].

Для идентификации бактерий вида *Pseudomonastumefaciens* обычно используют три индикаторных растения: *Kalanchoe pinnatum*, проростки города, диски моркови [12].

Молодые стебли каланхоэ на уровне 2 см заражают уколом с помощью шприца. На листьях уколы делают в главную жилку. После заражения растения изолируют во влажной камере с повышенной влажностью и оптимальной для опухолеобразования температурой 25 °С [11].

Проростки гороха после достижения ими длины в 2,5 см обрезают у верхушки, заражают место среза и помещают в термостат при 26°С [11].

Диски моркови с соблюдением строгой стерильности укладывают в чашки Петри на увлажненную дистиллированной водой фильтровальную бумагу. Наносят на поверхность дисков несколько капель суспензии микроорганизмов. Первую неделю культивирования выдерживают в термостате при 26°С [12].

Выявлено, что наилучшим индикатором являются диски моркови, на который начальный процесс опухолеобразования в виде белых бугорков наблюдается уже через 12-14 дней [11].

1.5.3 Идентификация возбудителя корневого рака методом ПЦР-анализа

Достоинствами метода ПЦР-анализа является то, что для идентификации возбудителя корневого рака достаточно около 10 копий ДНК или кДНК целевого гена. Идентификация патогенна начинается с подготовки бактериальной культуры к идентификации. Исследовать могут как почву, так и корневую ткань пораженных растений [3, 4, 35, 36-38].

Берут навеску почвы в количестве 5 г и добавляют к 30 мл стерильной дистиллированной воды в химический стакан емкостью 100 мл и встряхивают в течение 30 минут при 70 оборотах в минуту. Допускается оставить после этого образцы на 10 минут для полного осаждения осадка. Затем 50 мкм надосадочной жидкости инокулируют на подготовленную питательную среду.

Культура выдерживается при температуре 28°C в течение 5-7 дней до появления колоний [24].

Для корневых образцов 3 грамма ткани измельчают с помощью ступки и пестика и затем прodelывают такие же манипуляции, что и при исследовании навески почвы [24].

ПЦР-диагностику колоний проводят следующий образом: одну выбранную колонию добавляют к 100 мкл стерильной дистиллированной воды, кипятят в течение 5 минут и 5 мкл супернатанта используют в качестве ДНК-матриц. Реакционный раствор содержит ДНК-матрицы, реакционные смеси, включающие праймеры олигонуклеотидов, дезоксинуклеозидтрифосфаты, термостабильную ДНК-полимеразу, реакционный коктейль, поставляемый производителем (Perkin-Elmer, состоящий из Трис-основания, KCl, MgCl₂, желатин, и Epicenter, включающий в себя Трис-буфер, сульфат аммония, MgCl₂). ПЦР начинают с денатурации при 94°C в течение 5 минут, затем отжигом при 50°C в течение 1 мин и удлинением при 72°C в течение 1 минуты и конечным удлинением при 72°C в течение 10 минут. Эту процедуру повторяют 35 циклов. ПЦР-продукты разделяются с помощью электрофореза на 2% агарозном геле и визуализируются под ультрафиолетовым излучением при окрашивании в растворе бромистого этидия [24].

Для идентификации возбудителя корневого рака можно использовать универсальные праймеры для обнаружения бактерий рода *Agrobacterim*. Последовательность смысловой нити праймера следующая: 59-GATCG(G/C) GTССААТG (С/Т) TGT-39, последовательность антисмысловой цепи праймера следующая: СУТ9-59-GАТАТССАТСGАТС(Т/С) СТТ-39. Эта пара праймеров дает возможность получить 427 пар оснований. Процедура ПЦР-анализа позволяет идентифицировать патогенные и непатогенные штаммы *Pseudomonas* [3, 24].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Материалом исследования являлась микрофлора, выделенная из опухоли корневого рака, обнаруженного на корнях сливы растопыренной (*Prunus cerasifera* Ehrh.), взятой на территории Белгородской области.

Общий вид пораженного раком корня сливы растопыренной представлен на рис. 3.



Рис. 3. Общий вид корня *Prunus cerasifera* Ehrh., пораженный возбудителем корневого рака

Из образованных на поверхности корня опухолей выделялись и идентифицировались микроорганизмы, возбудители корневого рака, предположительно *Pseudomonas tumefaciens*.

Все исследования проводились в лаборатории «Биотехнологии и микробиологии» кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ».

2.2 Методы исследования

2.2.1. Подготовка и стерилизация лабораторной посуды

Важным условием для проведения любых микробиологических исследований является правильная подготовка и стерилизация лабораторной посуды, потому что использование плохо вымытой и нестерильной посуды может привести к искажению полученных результатов.

Вся посуда, бывшая ранее в употреблении, отмывается от загрязнений после предварительной дезинфекции, которая обеспечивает гибель ранее находящихся в ней микроорганизмов.

Всю посуду отмывают в горячей воде, с точным удалением агара, питательной среды, колоний микроорганизмов, надписей. После промывания посуду ополаскивают в дистиллированной воде и высушивают, после чего стерилизуют. Перед стерилизацией посуду упаковывают. Чашки Петри закрывают бумагой для избегания их открытия, колбы закрывают пробками.

Чашки Петри и другую стеклянную посуду стерилизуют сухим горячим воздухом в сухожаровом шкафу при температуре 190°С в течение 1,5 ч.

Готовые питательные среды, дистиллированную воду, пробирки с питательными средами и водой стерилизуют насыщенными паром под давлением в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 1-2 атм. При этих типах стерилизации погибают и вегетативные клетки микроорганизмов, и их споры.

Подготовку и стерилизацию лабораторной посуды проводят по стандартным микробиологическим методикам [3, 22, 26, 31, 55].

2.2.2. Приготовление питательных сред для выделения и культивирования микроорганизмов

Для выделения и культивирования возбудителя корневого рака использовали питательные среды МПА и ГМФ.

МПА – плотная питательная среда, которая используется для культивирования различных микроорганизмов, включая: энтеробактерии, псевдомонады, стафилококки и другие. В компонентный состав питательной среды входят: экстракт мясной, пептон ферментативный, натрий хлористый, агар-агар.

Для приготовления 1 л питательной среды МПА размешивали 50 г порошка в 1 л дистиллированной воды, после чего нагревали питательную среду на плитке, доводили ее до кипения, постоянно перемешивая.

ГМФ – плотная питательная среда, предназначенная для выделения, культивирования и идентификации различных микроорганизмов, включая: энтеробактерии, синегнойную палочку, стафилококки. В компонентный состав входит: ГМФ-основа, натрий хлористый, агар микробиологический.

Для приготовления 1 л питательной среды ГМФ размешивали 36 г порошка в 1 л дистиллированной воды, после чего также нагревали питательную среду на плитке, доводили ее до кипения, постоянно перемешивая.

Далее питательные среды автоклавировали при температуре 120°C и давлении 1 атм.

Приготовление питательных сред проводили по стандартным микробиологическим методикам [4, 55].

2.2.3 Подготовка материала к посеву

Перед посевом исследуемый материал подготавливали для осуществления всех дальнейших работ. Корень сливы растопыренной (*Prunus cerasifera* Ehrh.) предварительно отмывали в мыльном растворе и в водопроводной воде, после чего три раза промывали в дистиллированной воде.

После чего с корня срезалась опухоль, разрезалась на две части. Середина опухоли разделялась на большое количество маленьких комочков, из которых далее и выделяли микроорганизмы, возбудители корневого рака.

Подготовленный для высева материал отражен на рисунке 4.



Рис. 4. Подготовленный для посева материал опухоли корневого рака

Подготовку материала проводили по стандартным методикам [27].

2.2.4 Выделение возбудителя корневого рака в чистую и накопительную культуры из опухоли растения

После автоклавирования питательные среды разливали по стерильным чашкам Петри при 40-70°C. До застывания питательной среды в пламени спиртовки в нее крошили подкорковую часть опухоли, дожидались застывания питательной среды и ставили в термостат с температурным режимом 25 °С на 48 часов для выделения микроорганизма. Таким образом получали накопительную культуру из опухоли корневого рака растения.

Для выделения возбудителя корневого бактериального рака в чистую культуру готовили скошенный агар со средой МПА и ГМФ. Захватывали с помощью микробиологической петли часть колонии, похожую по морфологическим признакам на *Pseudomonas tumefaciens*, из чашки Петри переносили на скошенный агар штриховыми движениями.

Пробирки с чистыми культурами *Pseudomonas tumefaciens* ставили культивироваться в термостат с температурным режимом 25 °С на 48 часов.

Через 48 часов изучали характер роста микроорганизмов на скошенном агаре, определяли морфологические признаки колонии, определяли окраску по Грамму микроорганизма и его физиолого-биохимические свойства. Заключение о чистоте культуры делали после приготовления микропрепаратов.

Выделение культуры *Pseudomonas tumefaciens* в накопительную и чистую культуры проводили по стандартным микробиологическим методикам [14, 15, 23, 29, 30, 32].

2.2.5 Определение характеристик колоний выделенных микроорганизмов

После 24-48 суток культивирования чистых культур проводили их визуальный осмотр, при котором учитывали характер роста колоний микроорганизмов, их цвет, размер, консистенцию и особенности роста, которые учитывались при идентификации микроорганизмов в соответствии с показателями, согласно «Определителю бактерий Берджи» [61].

2.2.5.1. Определение цвета колоний выделенных микроорганизмов

При осмотре, выросших колоний, обращали внимание на их цвет и оттенок колоний. В большинстве случаев колонии бесцветные, белые, желтые, бежевые или голубоватые, реже встречаются колонии ярких цветов: красные, черные, фиолетовые, зеленые.

Иногда колонии переливаются всеми цветами радуги, на это тоже обращали внимание при осмотре.

Определение цвета колоний выделенных микроорганизмов осуществляли по стандартным методикам [14, 55].

2.2.5.2. Определение консистенции колоний и особенностей роста колоний

Для идентификации микроорганизмов учитывали консистенцию колоний. Для определения консистенции колоний к ним прикасались

микробиологической петлей в пламени спиртовки. Определяли легкость снятия колоний со среды. Делали выводы о наличии или отсутствии врастания колоний в среду, образования трещин и неровностей. Также измеряли средние размеры колоний.

Для определения консистенции микроорганизмов определяли мягкость и твердость колоний. Мягкие колонии являются маслянистыми, слизистыми, прилипают к петле или низкими, тянутся за петлей. Твердые колонии являются сухими, восковидными, волокнистыми, хрупкими, лопающимися при прикосновении микробиологической петли.

Определение консистенций и особенностей роста колоний микроорганизмов производили по стандартным микробиологическим методикам [14, 48, 55].

2.2.5.3 Определение характера роста колоний

После культивирования чистых культур выделенных микроорганизмов определяли их характер роста, который является одной из характеристик, которые учитываются при идентификации микроорганизмов. На чашках Петри и пробирках со скошенным агаром определяли специфику образования колоний на питательной среде МПА, делали заключение о росте колоний (поверхностные, глубинные или донные колонии).

Для описания поверхностных культур обращали внимание на их форму, поверхность, диаметр колоний, профиль, блеск и прозрачность, цвет и оттенок колоний, край, структуру, консистенцию.

Глубинные колонии определяли по наличию на питательной среде разрывов. Донные колонии микроорганизмов определяли по наличию прозрачных пленок на дне пробирки или чашки Петри.

Определение характера роста колоний выделенных микроорганизмов на питательных средах ГМФ и МПА осуществляли по стандартным в микробиологии методикам [14, 46, 55].

2.2.5.4 Определение типа дыхания выделенных микроорганизмов

Выделяют два типа дыхания микроорганизмов: аэробное (кислородное) и анаэробное (бескислородное) дыхание. Тип дыхания выделенных микроорганизмов определяли с помощью парафина. В чашки Петри разливали питательную среду МПА при 40-70 °С. После его застывания пересеивали чистые культуры микроорганизмов. После посева щели чашки Петри заливали парафином, чем ограничивали доступ кислорода. Микроорганизмы культивировали в термостате при 25 °С. После 24-48 часов делали заключение о характере роста микроорганизмов и соответственно о типе дыхания.

Определение типа дыхания выделенных микроорганизмов определяли по стандартным микробиологическим методикам [55].

2.2.6 Определение характеристик микрокопического препарата

Для более точной идентификации выделенных микроорганизмов проводили их микроскопирование, где учитывали наличие спор, окраску по Граму, размеры микроорганизмов в соответствии с показателями, согласно «Определителю бактерий Берджи» [61].

2.2.6.1 Определение наличия спор выделенных микроорганизмов

Все остальные характеристики выделенных микроорганизмов для их идентификации оценивали на микропрепаратах с использованием микроскопа Микромед-2. Одной из такой характеристик является наличие спор. При обычных способах окраски споры не прокрашиваются и имеют вид неокрашенных структур внутри окрасившихся вегетативных клеток. Споры не прокрашиваются, потому что они являются непроницаемыми для воды.

В редких случаях используют специальные методы окрашивания спор, при этом используют протравы, которые разрыхляют оболочку и облегчают окраску красителя. Окрашенные споры обладают кислотоустойчивостью, чем не обладают вегетативные клетки бактерий, которые обесцвечиваются под действием кислоты.

Для определения наличия спор делали нефиксированный мазок выделенных бактерий и окрашивали его по Ожешко. Для этого делали следующую последовательность действий:

1. На высушенный мазок наносили несколько капель 0,5% соляной кислоты и подогревали в течение 1-2 минут до закипания кислоты, остатки которой сливали;
1. Оставляли микропрепарат на несколько минут для остывания, после чего промывали его водой, подсушивали с помощью фильтровальной бумаги;
2. фиксировали над пламенем спиртовки;
3. Окрашивали по Цилю-Нильсену с использованием 1%-ного раствора малахитового зеленого;
4. Рассматривали препарат под микроскопом.

Окрасившиеся споры имеют рубиново-красный цвет, они обладают кислотоустойчивостью, чем отличаются от вегетативных клеток синего или зеленого цвета.

Окраску спор выделенных микроорганизмов проводили по стандартным методикам [13, 14, 32, 55].

2.2.6.2 Окраска по Граму

Для идентификации микроорганизмов проводили окраску по Граму. В зависимости от строения клеточной стенки микроорганизмы разделяются на грамположительные и грамотрицательные. Для определения типа микроорганизмов мазки обрабатывают сначала кристаллическим фиолетовым, затем йодом, после чего образуется окрашенный комплекс, который либо удерживается клеткой либо вымывается из нее при обработке спиртом. Клетки, в которых этот комплекс удерживается, называют грамположительными, а в которых вымывается, называются грамотрицательными.

Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы отличаются количеством муреина в клеточной стенке. Грамположительные микроорганизмы имеют больше муреина, чем грамотрицательные.

Для определения принадлежности выделенных микроорганизмов к группе грамположительных и грамотрицательных бактерий осуществляли следующие последовательности действий:

1. Делают фиксированный мазок;
2. Кладут на мазок кусочек фильтровальной бумаги, который предварительно пропитывают 1%-ным спиртовым раствором генциановогофиолетового;
3. Наносят на фильтровальную бумагу пару капель воды;

4. Оставляют для окрашивания на 2-3 минуты;
5. Снимают бумажку и не промывая препарат водой, наносят раствор Люголя;
6. Выдерживают раствор Люголя в течение 2 минут;
7. Сливают раствор Люголя и обрабатывают препарат 96%-ным раствором этилового спирта в течение 20-30 секунд;
8. Тщательно промывают мазок водой;
9. Окрашивают мазок фуксином и выдерживают его в течение 2-3 минут;
10. Промывают препарат водой;
11. Высушивают препарат и рассматривают его под микроскопом.

В зависимости от цвета клеток делают заключение о принадлежности микроорганизма к той или иной группе: фиолетовый цвет – грамположительные, розовый цвет – грамотрицательные.

Окраску по Граму выделенных колоний проводили по стандартным в микробиологии методикам (Сиротин, 2007; Виноградова, Козлова, 2012; Алексеев, Карпищенко, 2013).

2.2.6.3 Определение размера микробной клетки выделенных микроорганизмов

Размеры клеток микроорганизмов определяли, исследуя мазок микроорганизма, с помощью микрометра.

У кокков обычно измеряют диаметр, у палочковидных бактерий – ширину и длину клетки. Для определения размеров клеток в настоящей работе учитывали несколько значений размеров клеток, около 20-30 клеток, и находили среднее. Результаты измерений выражали в микрометрах.

Для измерения исследовали живые клетки микроорганизмов, так как фиксация искажает размеры клеток.

Деления линейки переводили в истинные размеры, так как цена деления линейки не соответствовала размерам из-за увеличения микроскопа. Для определения цены деления на столик микроскопа помещали микрометр и фокусировали изображение линейки. Далее меняли объектив на тот, которым измеряли размеры клеток. И определяли истинные размеры клеток.

Размеры клеток микроорганизмов определяли по стандартным микробиологическим методикам [14, 48, 55].

2.2.6.4 Определение подвижности выделенных микроорганизмов

Подвижность выделенных микроорганизмов определяли методом «висячей капли». Для этого микроскопировали препараты специальным образом и использовали специальное предметное стекло с лункой, изображенное на рисунке 5, покровное стекло, вазелин.

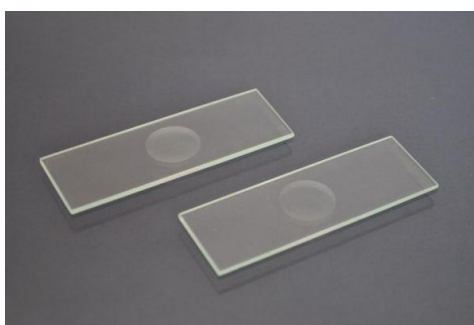


Рис. 5. Специальное предметное стекло с лункой для метода «висячей капли»

Для метода «висячей капли» выполняли следующие действия:

1. На покровное стекло наносят каплю воды, куда помещают культуру исследуемого микроорганизма с помощью бактериологической петли;
2. Смазывают края луночки специального предметного стекла вазелином;
3. Накрывают покровное стекло специальным предметным стеклом с луночкой, таким образом, чтобы капля находилась в центре луночки и прилипла к предметному стеклу;
4. Переворачивают стекло, чтобы каплю «повисала» над луночкой;
5. Рассматривают препарат в затемненном поле зрения и делают вывод о подвижности микроорганизмов.

Метод «висячей капли» проводили по стандартным микробиологическим методикам [3, 55]

2.2.7 Выявление роста возбудителя бактериального корневого рака на дисках моркови

Диски моркови являются тест - организмами для определения возбудителя корневого рака. Для выявления возбудителя корневого рака морковные диски помещались в стерильные чашки Петри с заранее смоченной автоклавированной водой фильтровальной бумагой с целью предотвращения усыхания морковных дисков.

На поверхность дисков моркови бактериологической петлей наносились выделенные микроорганизмы. Далее морковные диски ставили в термостат при температурном режиме 25°C и культивировались 48 часов. Далее делали заключение о наличии или отсутствии опухолевых образований на дисках моркови.

Определение возбудителя корневого рака с использованием дисков моркови проводили по стандартным методикам [11].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Выделение возбудителя корневого рака в чистую культуру

В ходе исследований из опухоли корневого рака, обнаруженного на корнях сливы растопыренной (*Prunus cerasifera* Ehrh.), взятой на территории Белгородской области, был выделен возбудитель корневого бактериального рака, получены накопительные культуры, представленные на рисунке 6, и чистые культуры, представленные на рисунке 7.



Рис. 6. Накопительная культура возбудителя корневого бактериального рака на питательной среде МПА



Рис. 7. Чистая культура возбудителя корневого бактериального рака на питательной среде ГМФ

3.2 Идентификация возбудителя корневого рака на основании морфологии колоний

В результате проведенных нами исследований по выделению в чистую культуру возбудителя корневого бактериального рака на питательных средах ГРФ и МПА, были получены колонии. Размер этих колоний учитывали, он отражен в таблице 1.

Таблица 1

Размеры колоний

Порядковый колонии	Повторность измерения 1, размер колонии, мм	Повторность измерения 2, размер колонии, мм	Повторность измерения 3, размер колонии, мм	Среднее значение размера колонии, мм
1	7,0	7,0	7,0	7,0 ±0,0
2	6,5	6,5	6,4	6,47 ±0,03
3	8,0	8,0	8,0	8,0 ±0,0
4	7,1	7,1	7,1	7,1 ± 0,0
5	6,8	6,8	6,9	6,83 ± 0,03
6	7,5	7,5	7,4	7,47± 0,03
7	6,9	6,9	6,9	6,9± 0,0
8	6,8	6,8	6,9	6,83 ± 0,03
9	8,1	8,2	8,1	8,13 ± 0,03 /
10	6,5	6,5	6,4	6,47 ±0,03
11	7,5	7,5	7,4	7,47± 0,03
12	8,0	8,0	8,0	8,0 ±0,0
13	6,2	6,2	6,2	6,2 ±0,0
14	7,1	7,1	7,1	7,1± 0,0
15	6,5	6,5	6,4	6,47 ±0,03
16	7,0	7,0	7,0	7,0 ±0,0
17	9,0	9,0	9,0	9,0 ±0,0

18	7,5	7,5	7,4	7,47± 0,03
19	5,6	5,6	5,6	5,6 ± 0,0
20	7,1	7,1	7,1	7,1± 0,0
Среднее значение размера микроорганизмов	7,13 ± 0,17			

Для определения принадлежности выделенного микроорганизма к группам анаэробов и аэробов, сеяли возбудителя корневого рака в чашки Петри, закрывая их парафином. При этом не наблюдался рост микроорганизмов, и было определено, что они являются аэробами. Отсутствие роста микроорганизмов отражено на рисунке 9.



Рис. 8. Отсутствие роста возбудителя корневого рака в анаэробных условиях на среде ГМФ

В ходе исследований учитывались основные характеристики колоний выделенных микроорганизмов. Они описаны в таблице 2.

Характеристика колоний выделенных микроорганизмов

Цвет колоний	Светло-бежевый, непрозрачные
Наличие отблеска	Имеют отблеск
Консистенция колоний	Тягучие
Особенности роста колоний	Мягкие, легко снимаются со среды, не образуют на ней трещин, не врастают в среду, имеют овальную форму и неровные края
Размер колонии	7,13±0,17 мм
Характер роста колоний	Поверхностный рост
Тип дыхания, рост в чашках Петри, закрытых парафином	Не растут в закрытых чашках Петри, аэробы

По морфологии колонии, выделенного микроорганизма, схожи с возбудителем корневого бактериального рака *Pseudomonas tumefaciens* по нескольким признакам. Для более точной идентификации проводили микроскопирование выделенного микроорганизма.

3.3. Идентификация возбудителя корневого рака на основании исследования микроскопических препаратов

Для идентификации выделенных микроорганизмов делали микропрепараты и определяли ряд параметров: форму бактерий, наличие спор, окраску по Граму, размер клеток микроорганизмов, подвижность микроорганизмов.

Окраска по Ожешко для определения наличия спор показала, что выделенные микроорганизмы являются беспоровыми, что представлено на рисунке 9. Кроме этого на препаратах было видно, что микроорганизмы являются палочковидными, представлены одиночными и попарно расположенными палочками.

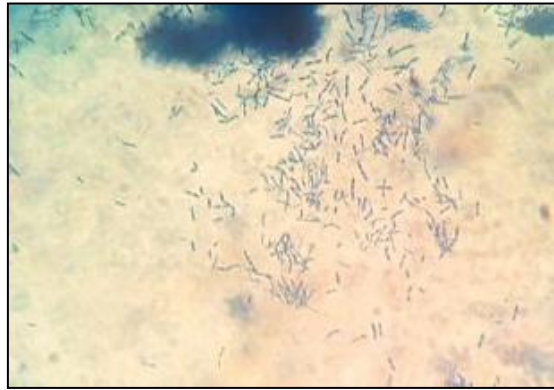


Рис. 9. Окраска по Ожешко выделенных микроорганизмов для определения наличия спор, увеличение x400

Для определения принадлежности выделенного микроорганизма к группам грамположительных и грамотрицательных бактерий, их окрашивали по Граму. В результате исследований было установлено, что выделенные микроорганизмы являются грамотрицательными. Результаты окраски представлены на рис. 10.

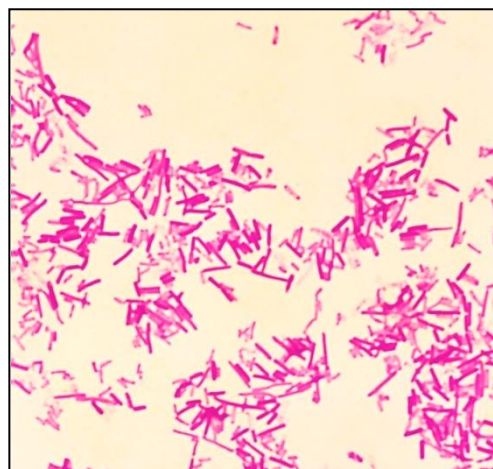


Рис. 10. Окраска выделенных микроорганизмов по Граму, увеличение x400

С помощью объект-микрометра учитывали размеры выделенного микроорганизма, которые представлены в таблице 3.

Таблица 3

Размеры выделенных микроорганизмов

Порядковый номер клетки бактерии	Повторность измерения 1, ширина/длина мкм	Повторность измерения 2, ширина/длина мкм	Повторность измерения 3, ширина/длина мкм	Среднее значение для клетки, ширина/длина мкм
1	0,6 / 1,0	0,6 / 1,1	0,6 / 1,0	0,6±0,0 / 1,03±0,02
2	0,9 / 1,5	1 / 1,5	0,9 / 1,5	0,93 ±0,02 / 1,5 ± 0,0
3	0,4 / 1,0	0,5/ 1,0	0,4 / 1,0	0,467 ±0,02 / 1,0 ± 0,0
4	0,5 / 1,5	0,6 / 1,5	0,5 / 1,4	0,52 ± 0,03 / 1,467±0,03
5	0,4 / 1,2	0,4 / 1,2	0,4 / 1,2	0,4± 0,0 / 1,2 ± 0,0
6	0,3 / 1,4	0,3 / 1,4 /	0,2 / 1,5	0,267± 0,03 / 1,43 ± 0,03
7	0,4 / 1,1	0,4 / 1,1	0,4 / 1,1	0,4 ± 0,0 / 1,1 ± 0,0
8	0,5 / 1,5	0,6 / 1,5	0,5 / 1,5	0,53 ± 0,03 / 1,5 ± 0,0
9	0,4 / 1,2	0,4 / 1,2	0,4 / 1,2	0,4 ± 0,0 / 1,2 ± 0,0
10	0,3 / 1,1	0,2 / 1,1	0,3 / 1,1	0,23 ± 0,03 / 1,1 ± 0,0
11	0,4 / 1,0	0,5/ 1,0	0,4 / 1,0	0,467 ±0,02 / 1,0 ± 0,0

12	0,5 / 1,4	0,5 / 1,4	0,5 / 1,4	0,5 ± 0,0 / 1,4 ± 0,0
13	0,9 / 1,5	1 / 1,5	0,9 / 1,5	0,93 ± 0,02 / 1,5 ± 0,0
14	0,3 / 1,4	0,3 / 1,4	0,2 / 1,4	0,267 ± 0,03 / 1,4 ± 0,0
15	0,6 / 1,5	0,6 / 1,4	0,6 / 1,4	0,6 ± 0,0 / 1,43 ± 0,03
16	0,4 / 1,2	0,4 / 1,2	0,4 / 1,2	0,4 ± 0,0 / 1,2 ± 0,0
17	0,4 / 1,0	0,5 / 1,0	0,4 / 1,0	0,467 ± 0,02 / 1,0 ± 0,0
18	0,5 / 1,5	0,6 / 1,5	0,5 / 1,5	0,53 ± 0,03 / 1,5 ± 0,0
19	0,4 / 1,1	0,3 / 1,1	0,3 / 1,1	0,33 ± 0,03 / 1,1 ± 0,0
20	0,9 / 1,5	1 / 1,5	0,9 / 1,5	0,93 ± 0,02 / 1,5 ± 0,0
Среднее значение размера микробов	0,5 ± 0,1 / 1,28 ± 0,12			

Как видно из таблицы 2 средние размеры выделенного микроорганизма составляют ширина – $0,5 \pm 0,1$ мкм, длина – $1,28 \pm 0,12$ мкм, что совпадает с литературными данными [4].

С помощью метода висячей капли определили подвижность бактерий, было установлено, что бактерии подвижны.

Были получены характеристики микроскопических препаратов выделенных бактерий, которые отражены в таблице 4.

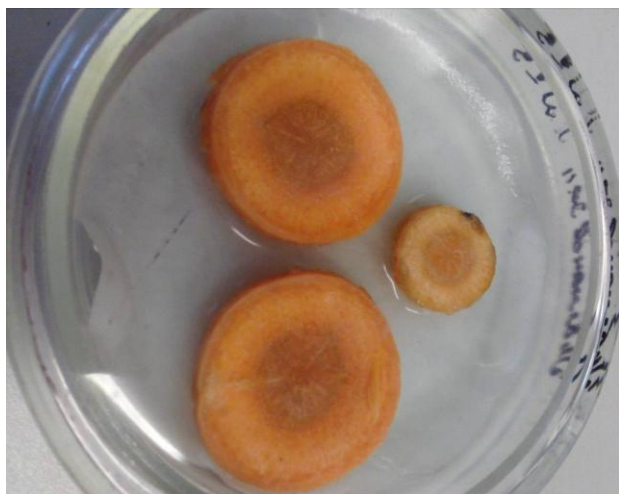
Характеристика микроскопических препаратов выделенных
микроорганизмов

Форма бактерий	Палочковидные бактерии
Наличие спор	Беспоровые бактерии
Окраска по Граму	Грамотрицательные
Средний размер микроорганизма	Ширина клетки – $0,5 \pm 0,1$ мкм, длина клетки – $1,28 \pm 0,12$ мкм
Подвижность	Подвижные

По характеристикам микроскопических препаратов, выделенного микроорганизма, можно сделать вывод, что выделенный нами в чистую культуру микроорганизм схож с возбудителем корневого бактериального рака *Pseudomonas tumefaciens* по большинству признаков.

3.4. Тестирование выделенных микроорганизмов на дисках моркови

В ходе исследований использовали тест-организмы, а именно диски корня моркови, которые заражались выделенными микроорганизмами и культивировались в условиях роста данных микроорганизмов. Результаты наблюдали через одну, две и три недели культивирования. Они отражены на рисунке 11.



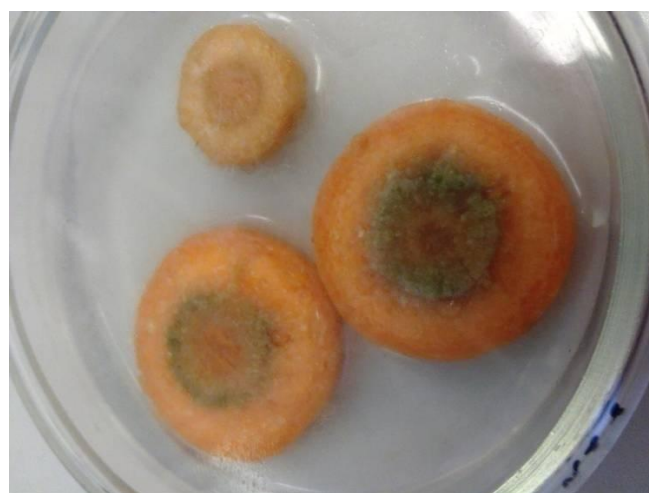
а.



б.



в.



г.

Рис. 11. Рост колонии выделенных микроорганизмов на морковных дисках:
а. – на 1 день культивирования, б. – на первой неделе культивирования,
в. – на второй неделе культивирования, г. – на третьей неделе культивирования

Как видно из рисунка 11, на морковных дисках наблюдался рост опухолевых клеток уже на 1 неделе культивирования, что подтверждает, что выделенный микроорганизм является возбудителем корневого бактериального рака.

Положительный тест на морковных дисках в совокупности с характеристиками колоний и микроскопических препаратов выделенных микроорганизмов позволяют сделать вывод, что в ходе настоящих исследований удалось выделить возбудитель корневого бактериального рака, поражающий корни сливы растопыренной (*Prunus cerasifera* Ehrh). Им явился вид бактерий *Pseudomonas tumefaciens*, так как установлено соответствие литературных данных с экспериментальными по ряду признаков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Корневой рак, или зобоватость корней – бактериальное заболевание корней плодовых растений, проявляющееся в виде образования опухолей на корнях и у корневой шейки, заболевание вызывает в России дефицит фруктов собственного производства [30].

Корневой рак распространен во всех зонах выращивания плодовых культур, его высокая вредоносность отмечается не только у нас в стране, но и за рубежом, и несмотря на применение различных мер борьбы отмечается ежегодное прогрессирование возбудителя корневого рака [14]. Из-за поражения корневым раком ежегодно снижается выход посадочного материала на 20-45%. Больные растения становятся неустойчивыми к морозу, слабо растут и со временем погибают.

Возбудитель заболевания – бактерия *Pseudomonas tumefaciens*, которая индуцирует образование опухолей у широкого круга растений, в большей степени восприимчивыми являются двудольные растения из семейств розоцветные, толстянковые, пасленовые [15].

Полученные результаты исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. В результате исследований был выделен в чистую культуру возбудитель корневого бактериального рака из опухоли корня сливы растопыренной (*Prunus cerasifera* Ehrh) при высевах на питательные среды МПА и ГМФ;
2. Идентифицирован возбудитель корневого бактериального рака на основании описания колоний, которые имели следующие характеристики: светло-бежевый цвет, непрозрачные с блеском, тягучие, овальной формы, мягкие, легко снимаются с питательной среды, не образуют на ней трещин, образуют

поверхностный рост, не растут в анаэробных условиях, строгие аэробы, средний размер колоний – $7,1 \pm 0,7$ мм.

3. Идентифицирован возбудитель корневого бактериального рака на основании микроскопических препаратов микроорганизмов, которые имели следующие характеристики: палочковидные бесспорные бактерии, грамотрицательные, подвижные, ширина клетки – $0,5 \pm 0,1$ мкм, длина клетки – $1,28 \pm 0,12$ мкм, что совпало с литературными данными.
4. идентифицирован возбудитель корневого рака на основании положительно проведенного теста с использованием морковных дисков, на которых через 1 неделю культивирования появлялись опухольевые валики, которые показывают, что микроорганизм является возбудителем корневого рака *Pseudomonas tumefaciens*.

Таким образом, ходе проведенных исследований были освоены методы выделения, исследования и идентификации патогенных для плодовых саженцев микроорганизмов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абрамова, З.И. Введение в генетическую инженерию: учебное пособие / З.И. Абрамова. – Казань: Казанский университет, 2008. – 169 с.
2. Алексеев, В.В. Медицинские лабораторные технологии / В.В. Алексеев, А.И. Карпищенко. – Т.2. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 792 с.
3. Арестова, Н.О. Бактериальные болезни на виноградниках Ростовской области: материалы международной дистанционной научно-практической конференции, посвященной 125-летию профессора А.С. Мержаниана / Н.О. Арестова. – Анапа: ГНУ Анапская ЗОСВиВСКЗНИИСиВ, 2010. – 269 с.
4. Ахатов, А.К. Защита растений от болезней в теплицах (Справочник) / А.К. Ахатов, Ф.С. Джалилов, О.О. Белошапкина, Ю.М. Стройков, В.Н. Чижов. – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2002. – 464 с.
5. Бабаян, А.А. Бактериальный рак виноградной лозы в Северо-Восточной зоне Армении и меры борьбы с ними / А.А. Бабаян, А.А. Оганесян, Ж.А. Нагапетян.–М.: Колос, 1977.– 85-93 с.
6. Бактериальные болезни растений/Под ред. В.П. Израильского / М.: Гос. изд. с.-х. литературы. – 1952. - 344 с.
7. Бактериальные болезни растений/Под ред. И.П. Израильского, изд. 3-е, перераб. и доп. – М.: Колос.– 1979. – 288 с.
8. Болезни сельскохозяйственных культур: В 3 т. / Под ред В.Ф. Пересыпкина. – К.: Урожай, 1991.– 208 с.
9. Бородин, С. Г. Бактериальные болезни подсолнечника / С. Г. Бородин, И. А. Котлярова, Г. А. Терещенко, Н. В. Пашаян // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2012. – № 1 (150). – С. 116–128.

10. Бунцевич, Л.Л. Оздоровление маточника клоновых подвоев яблони от бактериального рака корней / Л.Л. Бунцевич, Р.С. Захарченко, М.А. Костюк, Е.Н. Палецкая // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2012. – № 14(2). – С. 67–74.
11. Бурдинская, В.Ф. Латентная зараженность винограда бактериальным раком / В.Ф. Бурдинская, Н.О. Арестова // Защита и карантин растений. – 2010. – Т. 10. – С. 38-39.
12. Варенцова, Е.Ю. Вирусные и микоплазменные болезни цветочных культур / Е.Ю. Варенцова, И.И. Минкевич. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова, 2018. – 14 с.
13. Васильев, Д.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Е.А. Корнеев. – Ульяновск: УГСХА, 2003. – 102 с.
14. Виноградова, А.В. Культивирование микроорганизмов: учебное пособие / А.В. Виноградова, Г.А. Козлова. – Пермь: Изд-во Пермского национального исследовательского политехнического университета, 2012. – 97 с.
15. Горленко, М.В. Бактериальные болезни растений / М.В. Горленко. – М.: Высшая школа, 1966. – 291 с.
16. Горленко, М.В. К биологии *Pseudomonas tumefaciens* возбудителя корневого рака растений. / М.В. Горленко, И.В. Воронкевич, Г.Д. Успенская // Микробиология. – 1954. – №23. – С.322-330.
17. Горленко, М.В. О вредоносности корневого рака плодовых деревьев. / М.В. Горленко // Защита растений от вредителей и болезней. – 1961. – №7. – С. 18-19.
18. Григорцевич, Л.Н. Грибные и бактериальные микроорганизмы – возбудители раковых болезней плодовых культур / Л.Н. Григорцевич // Труды БГТУ. Серия 1: Лесное хозяйство. – 2011. – № 1 (139). – С. 202-204.

19. Грузина, В.Д. Коммуникативные сигналы бактерий / В.Д. Грузина // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – №48 (10). – С.32-39.
20. Груша, М.М. Использование иммобилизованных клеток *Agrobacterium tumefaciens* в очистке сточных вод от нефтепродуктов: сборник материалов Международной научно-практической конференции молодых ученых в рамках года науки в Республике Беларусь (20-21 апреля) / М.М. Груша. – Брест, 2017. – С. 66-68.
21. Гусаренко, Т.И. Бактериальный рак на виноградниках / Т.И. Гусаренко, М.Н. Мирзонова // Виноградарство и виноделие СССР. – 1975. – № 4. – С. 32-33.
22. Елинов, Н.П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов; аспирантов и практических работников. – СПб: Издательская фирма «Наука», 1995. – 600 с.
23. Желдакова, Р.А. Выделение и идентификация микроорганизма / Р.А. Желдакова. – Минск: Белорусский государственный университет, 2003. – 36 с.
24. Игнатов, А. Н. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России / А. Н. Игнатов, М. С. Егорова, М. В. Ходыкина // Защита и карантин растений. – 2015. – № 5. – С. 6–9.
25. Исаева, Е.В. Корневой рак – опасное заболевание в питомниках / Е.В. Исаева // Защита растений от вредителей и болезней. – 1961. – 11. – С.12.
26. Каменская, Е.П. Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней. Методы микроскопии / Е.П. Каменская. – Бийск: Издательство Алтайского государственного университета, 2015. – 40 с.
27. Кизелевич, Н.Ю. Бактериальный корневой рак плодовых семечковых культур: сборник научных статей по материалам XVIII Международной научно-практической конференции «Современные технологии сельскохозяйственного производства» (14 марта) / Н.Ю. Кизелевич. – Гродно: ГГАУ, 2014. – 246 с.

28. Колесова, Д.А. Корневой рак *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn. и косматый корень *A. rhizogenes* (Riker et al.) Conn. плодовых деревьев в центральном Черноземье России / Д.А. Колесова // Защита картофеля. – 2014. – №2. – С. 61-63.
29. Концевая, И.И. Микробиология / И.И. Концевая. – Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2011. – 126 с.
30. Концевая, И.И. Микробиология: культивирование и рост бактерий / И.И. Концевая. – Чернигов: Издательство «Десна Полиграф», 2017. – 44 с.
31. Круговая, Е.Д. Специфические стратегии клубеньковых и фитопатогенных бактерий при инфицировании растений / Е.Д. Круговая // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – №1. – С. 3-15.
32. Кузнецова, Е.А. Микробиология / Е.А. Кузнецова. – Орел: ОрелГТУ, 2005. – 188 с.
33. Леманова, Н.Б. Биологический контроль бактериального рака *Agrobacterium tumefaciens* / Н.Б. Леманова, М.К. Магер // Защита и карантин растений. – 2011. – №6. – С. 25-27.
34. Лиманская, Н.В. Выявление возбудителей некоторых болезней винограда методом полимеразной цепной реакции: IV edition International Conference of Young Researchers. Scientific abstracts (10 november) / Н.В. Лиманская, И.Д. Жунько. – Moldova, 2010. – 57 с.
35. Магер, М.К. Изучение причин повреждения плодовых культур в Молдавии бактериальным (корневым) раком / М.К. Магер. – М.: ВАСХНИЛ, 1980. – 112-113 с.
36. Макаркина, М.В. Идентификация агробактерий методом ПЦР в растениях винограда с признаками поражения бактериальным раком в ампелоценозах Краснодарского края / М.В. Макаркина, Е.Т. Ильницкая, И.В. Степанов // Российская сельскохозяйственная наука. – 2017. – №4. – С. 39-42.

- 37.Макаркина, М.В. Идентификация штаммов агробактерий в пораженных бактериальным раком ампелоценозах Анапо-таманской зоны Краснодарского края / М.В. Макаркина, И.А. Владимиров, Е.Т. Ильницкая, Т.В. Матвеева // Вестник защиты растений. – 2016. – №3 (89). – С. 100-101.
- 38.Макаркина, М.В. К вопросу о проблеме бактериального рака на виноградниках / М.В. Макаркина, Е.Т. Ильницкая//Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2014. – № 29(05). – С. 3-11.
- 39.Макрушина, А.Т. Бактериальный рак на виноградных саженцах. Бактериальные болезни растений / Макрушина А.Т. – М.: Колос, 1977. – 80-85 с.
- 40.Малых, Г. П. Методы оздоровления винограда от бактериального рака и короткоузлия: монография / Г.П. Малых, В.П. Ильина, Т.Г. Киселева; Донской гос. аграрный университет; ГНУ Всерос. НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко. – Новочеркасск: Изд-во ВНИИВиВ, 2010. – 101 с.
- 41.Мамедов, А.Х. Использование микробов-антагонистов и антибиотиков в борьбе с бактериальным раком виноградной лозы / А.Х. Мамедов. – Тбилиси: Мецниереба, 1976. – 153-155 с.
- 42.Нагапетян, Ж.А. Бактериальный рак виноградной лозы в северо-восточной зоне Армении и меры борьбы с ним: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ереван, 1973.– 19 с.
- 43.Нагапетян, Ж.А. К изучению рака виноградной лозы в Северо-Восточной зоне Армянской ССР / Ж.А. Нагапетян. – Киев: Наукова думка, 1975. – 276-278 с.
- 44.Нагапетян, Ж.А. Поражаемость виноградников Араратской равнины бактериальным раком / Ж.А. Нагапетян , Л.В. Казарян. – М.: ВАСХНИЛ, 1980. – 122-123 с.

45. Пересыпкин, В.Ф. Сельскохозяйственная фитопатология / В.Ф. Пересыпкин. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1982. – 400 с.
46. Платонова, Т.А. Морфология микроорганизмов / Т.А. Платонова, О.Г. Карноухова. – Иркутск: ИГМУ, 2012. – 25 с.
47. Попкова, К.В. Общая фитопатология / К.В. Попкова. – М.: Агропромиздат, 1989. – 399 с.
48. Прунтова, О.В. Лабораторный практикум по общей микробиологии / О.В. Прунтова, О.Н. Сахно. – Владимир: Издательство ВлГУ, 2005. – 76 с.
49. Рахманкулова, З.Ф. Физиология сельскохозяйственных и декоративных растений с основами фитопатологии / З.Ф. Рахманкулова. – Уфа: БашГУ, 2011. – 151 с.
50. Родигин, М.Н. Корневой рак в Нижнем Поволжье / М.В. Родигин, Н.А. Папаева // Защита растений. – 1930. – № 1-3. – С. 113-119.
51. Сербинов, И.Л. Бактериальный рак плодовых деревьев и весенняя обмазка их известью. / И.Л. Сербинов // С-х вестник. – 1912 а. – № 4. – С. 22-29.
52. Сербинов, И.Л. Бактериальный рак плодовых деревьев, ягодных кустарников и других садовых, а также сельскохозяйственных растений. / И.Л. Сербинов // Плодоводство. – 1912 б. – № 9. – С. 787-795.
53. Сербинов, И.Л. Бактериальный рак плодовых и других растений в современном освещении. / И.Л. Сербинов. – Петроград: типография С.Л. Кинда, 1915 б. – 32 с.
54. Сербинов, И.Л. Рак растений и борьба с ним. / И.Л. Сербинов // Прогрессивное садоводство и огородничество. – 1915 а. – № 28. – С. 772-776.
55. Сиротин, А.А. Практикум по микробиологии / А.А. Сиротин. – Белгород. 2007. – 78 с
56. Стороженко, Е.М. Болезни плодовых культур и винограда / Е.М. Стороженко. – Краснодарское книжное издательство, 1970. – 84 с.

57. Султанова, О.Д. Биология возбудителей бактериальных болезней виноградов условиях Молдавии и меры борьбы с ними: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Тбилиси, 1984 г. – 19 с.
58. Сухоцкий, М.И. Книга современного садовода. – М.: – МФЦП, 2009. – 528 с.
59. Фоменко, Т.М. О вредоносности бактериального корневого рака груши / Т.М. Фоменко // Сб. работ по селекции и агротехнике плодовых и ягодных культур. – 1975. – т.4. – С. 123-128.
60. Фунг, Т.М. Ассоциативные бактерии *Agrobacterium tumefaciens* ризопланы овощных культур Вьетнама: дис. канд. биол. наук / Т.М. Фунг. – Москва, 2015. – 115 с.
61. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджив 2-х т. Т.1 / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уилльямс. – Москва: Мир, 1997. – 432 с.
62. Чулкина, В.А. Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем плодовых и ягодных культур / В.А. Чулкина, Л.Д. Шаманская, Е.Ю. Торопова. – М.: Колос, 2006. – 240 с.
63. Чураков, Б.П. Лесная фитопатология: Учебник / Б.П. Чураков, Д.Б. Чураков, под ред. проф. Б.П. Чуракова. 2-е изд., испр. и доп. – СПб.: Издательство «Лань», 2012. – 448 с.
64. Шпаар, Д. Бактериозы культурных растений. / Д. Шпаар, Г. Клейнхемпель, Г. Мюллер, К. Науманн. – М.: Колос, 1980. – 143 с.
65. Ячевский, А.А. Бактериозы растений / А.А. Ячевский; под общ. ред. проф. Н.А. Наумова. – Посмертное издание переработанное и дополненное. – М., Л.: ОГИЗ. – 1935. – 712 с.
66. Beijerinck, M.W. Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien / M.W. Beijerinck, A. van Delden / Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. – 1902. – Vol. 9. – P. 3-43.
67. Conn, H. J. Validity of the Genus *Alcaligenes* / H.J. Conn // Journal of Bacteriology. – 1942. – Vol.44, №3. – P. 353–360.

68. Detrait, M. *Agrobacterium radiobacter* bacteremia in oncologic and geriatric patients: presentation of two cases and review of the literature / M. Detrait, L. D'Hondt, M. André, C. Lonchay, X. Holemans, J.P. Maton, J.L. Canon // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – V. 12. – P. 7-10.
69. Lehoczky, J. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection / J. Lehoczky // *Journal of Phytopathology*. – 1968. – Vol. 63, №3. – P. 239-246.
70. Llovera. Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* / Llovera, Santiago, Bonet, Ramon, Simon-Pujol, Maria D, Congregado, Francisco // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1993. – V. 59, No. 10. – P. 3516-3519.
71. Ophel, K. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines / K. Ophel, A. Kerr // *Int. J. System. Bacteriol.* – 1990. – №40. – P. 236-241.
72. Panagopoulos, O.G. Studies on byotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* / O.G. Panagopoulos, P.G Psallidas, A.S. Alivizatos // *Proceedings of the IVth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. – 1978. – P. 221-228.
73. Sawada, H. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes* / H. Sawada, H. Ieki, H. Oyaizu, S. Matsumoto // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1993. – vol. 43, №4. – P. 694-702.
74. Smith, E.F. A Plant-Tumor of Bacterial Origin / E.F. Smith, C.O. Townsend // *Science*. – 1907. – Vol. 25, №64. – P. 671–673.
75. Sultanova, O.D. *Biologiyavozbuditeleybakterial'nyhbolezneyvinograda v usloviyahMoldaviiimerybor'by s nimi: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk.* – Tbilisi, 1984 g. – 19 p.
76. Vanek, J. *Niektorepricinyodumieraniakrovvinica* / J. Vanek // *Vinohrad*. – 1974. – Vol. 12, № 7. – P. 166-167.

77. Young, J.M. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis* / J.M. Young, L.D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr, H. Sawada // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2001. – № 51. – P. 89-103.
78. Zinca, N. Influența unor factori asupra rezistenței vitei de vie la atacul de cancer (*Agrobacterium tumefaciens*) / N. Zinca // *Inst. Cercet. Prot. Plant.* – 1969. – Vol. 5. – P. 151-169.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Микрофотография возбудителя корневого рака

Pseudomonas tumefaciens

Компонент питательной среды	Количество (г/л дистиллированной воды)
K_2HPO_4	1,74
KH_2PO_4	0,91
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3
NaCl	0,5
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,01

Приложение 2. Состав питательной среды Федорова-Калининской для культивирования *Pseudomonas tumefaciens*

Компонент питательной среды	Количество (г/л дистиллированной воды)
KH_2PO_4	0,4
K_2HPO_4	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
NaCl	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,002
малат натрия	2,5
сахар	1,0
дрожжевой экстракт	1,0
агар	20,0
Бромтимоловый синий	2 мл

Приложение 3. Состав питательных сред DAS и Эшби для получения чистых культур *Pseudomonas tumefaciens*

Питательная среда DAS

Питательная среда Эшби

Компонент питательной среды	Количество (г/л дистиллированной воды)
маннит	20,0
KH_2PO_4	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
NaCl	0,2
K_2SO_4	0,1
CaCO_3	5,0
агар	20,0

Приложение 4. Состав питательной среды Clark для культивирования
Pseudomonas tumefaciens

Компонент питательной среды	Количество (г/л дистиллированной воды)
пептон	5
K_2HPO_4	5
глюкоза	5