

УДК 579.25:632.35:634.8.03/.05

Н. В. Ліманська, асп.Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра мікробіології та вірусології,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65026, Україна; e-mail: limmy@mail.ru

ДІАГНОСТИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ ВІНОГРАДУ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ ДВОХ ПАР ПРАЙМЕРІВ

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням двох пар праймерів — до послідовності *vir D₂* і послідовності *ipt* Ті-плазмиди — проведено тестування 171 штаму агробактерій, виділених з лози винограду і ґрунту виноградника. Отримано дані про кількість *vir D₂* — і *ipt* — позитивних штамів.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), *Agrobacterium*, бактеріальний рак винограду

Захворювання, яке викликає *Agrobacterium vitis*, — бактеріальний рак винограду — постає загрозою для виноградників багатьох країн світу [1]. Патогенні агробактерії здатні викликати безсимптомну інфекцію рослини, і лоза зовнішньо здорових кущів при вегетативному розмноженні виявляється основним джерелом розповсюдження збудника бактеріального раку [2]. При виробництві садівного матеріалу необхідно провадити відбір прищепних та підщепних лоз, вільних від збудника бактеріального раку. Крім того, досліджується ґрунт ділянки, призначеної для закладання виноградника, тому що *Agrobacterium vitis* здатні зберігатися впродовж довгого часу в коренях винограду після викорчовування старих насаджень [3, 4].

Раніше діагностика збудника бактеріального раку потребувала значних витрат часу, оскільки необхідним етапом у встановленні патогенності штаму було тестування на рослинах-індикаторах. Подібні дослідження не можуть бути застосовані для скринінгу великої кількості зразків. Сучасною альтернативою постають молекулярно-генетичні методи аналізу, котрі дозволяють виявити ділянки ДНК, характерні тільки для геному певних штамів [5], у даному випадку — патогенних [6].

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у дійсний час широко застосовується за діагностики збудників різних захворювань, в тому числі — захворювань рослин [7]. Для виявлення патогенних штамів *Agrobacterium vitis* відомі праймери до послідовностей Ті-плазмиди, наявність яких в бактеріальній клітині зумовлює її патогенні властивості [6].

Метою даної роботи було виявлення патогенних штамів агробактерій, виділених з лози винограду та ґрунту виноградника з випадками

захворювання на бактеріальний рак, за допомогою ПЛР з використанням праймерів до різних послідовностей геному бактерій.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом для дослідження слугували штами агробактерій, виділені із лози зовнішньо здорових та інфікованих кущів винограду сортів Каберне Совіньон, Мерло, Піно чорний, Шардоне, а також штами агробактерій, виділені із ґрунту виноградників. В якості контролів використовували *Agrobacterium radiobacter* K55, *A. tumefaciens* FA2, а також *A. vitis* AV3, *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* AT1, люб'язно надані E. Szegedi.

З ґрунту виноградника агробактерії виділяли наступним чином. Зразки ґрунту, відібрані на глибині 30 см, заливали в день відбору зразків стерильною дистильованою водою. Рівень води над наважкою 100 г складав 1 см. Через добу зберігання при 4 °С суспензію над осадом ґрунту висівали в об'ємі 100 мкл на чашку Петрі з напівселективним середовищем Рой і Сасера (RSM) [8].

З лози збудника бактеріального раку виділяли згідно методу Лехоцьки [9]. Лозу подрібнювали на фрагменти товщиною 5 мм і заливали стерильною дистильованою водою, а через добу зберігання при 4 °С отриману суспензію висівали на середовище RSM.

Через 5–7 днів інкубації при 25 °С колонії пересівали на скошений картопляний агар. Для тестування використовували однодобові культури. ПЛР провадили у двох варіантах. У першому випадку застосовували праймери до ділянки *vir D₂*, а в другому варіанті — праймери до ділянки *ipt*, розроблені Haas et al. [6].

ДНК виділяли шляхом теплового лізису бактеріальної суспензії (концентрація клітин 10^8 кл/мл). Суспензію готували на дейонізованій воді з Тритоном X-100 і азидом натрію. Зразки центрифугували впродовж 5 хвилин при 5700 g і для ПЛР використовували надосадову рідину, яка містить нуклеїнові кислоти [10]. ПЛР провадили в об'ємі 20 мкл. Вміст реакційної суміші: 10 пмоль кожного з праймерів, 200 мкМ кожного дезоксинуклеозидтрифосфату, 2 Од Таq-полімерази, 2 мМ MgSO₄, 4 мкл буфера для проведення ПЛР (5x). (Усі реагенти фірми "Амплиценс", Росія). Об'єм зразка, який вносили до реакційної суміші, складав 5 мкл. Негативним контролем слугувала суміш, у яку замість зразка вносили еквівалентну кількість дейонізованої води.

Ампліфікацію здійснювали згідно параметрам Haas et al. [6]. Час початкової денатурації — 3 хвилини [11], температура відпалу становила 52 °С. Реакцію провадили в програмованому термостаті "Терцик" фірми "ДНК — Технологія" (Росія). Електрофорез провадили в 1,5 % агарозному гелі. Бромистий етидій для візуалізації продуктів ПЛР входив до складу трис-боратного буфера для електрофорезу ("Амплиценс", Росія). Гель фотографували за допомогою відеосистеми "Samsung" в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм). Для

оцінки молекулярної ваги ампліфікованих фрагментів використовували маркери 200–800 пар основ ("Амплісенс", Росія).

Результати та їх обговорення

В ході дослідження було проведено тестування 165 штамів бактерій, виділених із лози винограду сортів Каберне Совіньон, Мерло, Піно чорний, Шардоне, та шести штамів, виділених із ґрунту виноградників. ПЛР провадили також в дослідках зі штамми *A. vitis* AT1, *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* AB3.

Штами тестували методом ПЛР два рази — за допомогою праймерів до послідовності *vir D2* і праймерів до послідовності *ipt* (рис. 1). Ген *vir D₂* кодує ендонуклеазу, яка розпізнає межі транспортованої у рослинну клітину ділянки Ті-плазміди [12]. Ця ділянка характерна для усіх патогенних видів роду *Agrobacterium* — *A. tumefaciens* і *A. vitis*, а також для виду *A. rhizogenes*, який викликає патологічну проліферацію коріння [6]. Ген *ipt* є відповідальним за синтез ізопентилтрансферази. Він виявляється у штамів *A. tumefaciens* та більшості штамів *A. vitis*, які продукують октопін і нопалін, але не у *A. rhizogenes* [6, 13]. Як наслідок, реакція з *vir D₂* — праймерами дозволяє виявити більш широкий спектр патогенних штамів агробактерій, а реакція з *ipt* — праймерами детектує безпосередньо штамми, що утворюють пухлини.

В літературі немає достатньої кількості даних щодо співвідношення *vir D₂* — і *ipt* — позитивних штамів серед агробактерій, виділених із ґрунту виноградника або лози винограду [6]. Кожен із досліджених штамів ми тестували на присутність ділянок *vir D₂* і *ipt* (рис. 1). В якості контрольних штамів використовували *vir D₂* — і *ipt* — позитивний штам *A. tumefaciens* FA2 та *vir D₂* — і *ipt* — негативний *A. radiobacter* K55.

В ході дослідження були отримані наступні результати. Штам *A. tumefaciens* C58 та штам *A. vitis* AT1, який продукує нопалін, дали позитивні результати у реакціях з обома парами праймерів. Штам *A. vitis* AB3 характеризується наявністю невеликої октопін/кукумопін — плазміди, яка, як вважають, подібно до інших невеликих плазмід утворилася в результаті делеції ряду ділянок, в тому числі — гена *ipt* [13]. Відповідно, патогенність даного штаму можна виявити, використовуючи у ПЛР праймер *vir D₂* (табл. 1).

Із 165 штамів, виділених з лози винограду, 36 зразків, тобто 21,8 %, виявилися *vir D₂* — позитивними. З наданими зразками був проведений повторний ПЛР — аналіз з використанням пари праймерів до послідовності *ipt*. Дослідження показали, що не усі *vir D₂* — позитивні штамми, виділені з лози, виявляються *ipt* — позитивними (табл. 2).

Із шести штамів агробактерій, виділених з ґрунту виноградників, *vir D₂* — позитивними виявилися 3 зразки, з яких позитивну реакцію з *ipt*-праймерами виявляв один зразок (табл. 2). Штами, які не дали позитивної реакції з *ipt* — праймерами — 13 штамів із 39 *vir*

D_2 -позитивних, належать або до *A. rhizogenes*, або до LHR — штамів *A. vitis*. LHR — штами ("limited host range"), відомі для агробактерій, характеризуються обмеженим колом рослин — хазяїв.

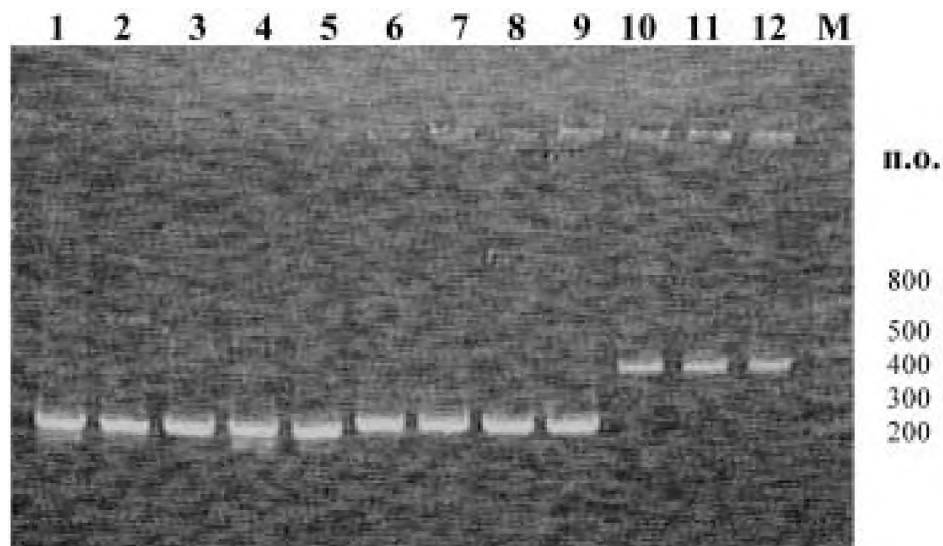


Рис. 1. Електрофорез продуктів реакції в агарозному гелі. 1–9 — зразки, проампліфіковані з праймерами до послідовності *vir D₂*; 10–12 — зразки, проампліфіковані з праймерами до послідовності *ipt* (позитивні зразки, отримані з ґрунту виноградника); 7, 12 — контрольний зразок — позитивний штам *A. tumefaciens* FA2; М — маркери молекулярної ваги (200–800 пар основ, "Амплісенс", Росія).

Таблиця 1

Тестування колекційних штамів *Agrobacterium*

Штам	Опіні, що продукується	Результати ПЛР	
		з <i>vir D₂</i> - праймерами	<i>ipt</i> - праймерами
<i>A. vitis</i> АТ1	нопалін	+	+
<i>A. vitis</i> АВ3	октопін	+	-
<i>A. tumefaciens</i> А348	невідомий	+	+

Таблиця 2

Тестування штамів, виділених з виноградника

Джерело зразку	Загальна кількість зразків	Кількість <i>vir D₂</i> - позитивних штамів	Кількість <i>ipt</i> - позитивних штамів
Лоза	165	36	24
Ґрунт	6	3	1

За допомогою досліджень з двома парами праймерів ми можемо зафіксувати навіть штами, які не несуть ділянку *ipt*, такі як, наприклад, *A. vitis* АВЗ.

Висновки

1. У діагностиці бактеріального раку винограду методом ПЛР доцільним є використання двох пар праймерів до різних ділянок Ті-плазмиди.
2. Для штамів агробактерій, виділених з винограду, спостерігається досить широка розбіжність у співвідношенні кількості штамів, що несуть ділянки *vir D₂* та *ipt*, і штамів, геном яких містить лише ділянку *vir D₂*.

Висловлюємо щирю подяку лабораторії мікробіології і вірусології Одеського кон'ячного заводу, на базі якої виконувалась експериментальна робота, та доктору Е. Szegedi (Угорщина) за надані штами.

Література

1. Burr T.J., Bazzi C., Sule S., Otten L. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies // Plant Dis. — 1998. — V. 82. — P. 1288–1297.
2. Burr T. J., Katz B. H. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Dis. — 1984. — V. 68. — P. 976–978.
3. Bouzar H., Oudah D., Krimi Z., Jones J.B., Trovato M., Petit A., Dessaux Y. Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population // Appl. Environm. Microbiol. — 1993. — V. 59. — P. 1310–1317.
4. Krimi Z., Petit A., Mougel P., Dessaux Y., Nesme X. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium spp.* in soils // Appl. Environm. Microbiol. — 2002. — V. 68, № 7. — P. 3358–3365.
5. Cha R. S., Thilly W. G. Specificity, efficiency and fidelity of PCR // PCR primer: a laboratory manual. — Cold Spring Harbour laboratory press: NY., 1995. — P. 37–53.
6. Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. — 1995. — V. 61, № 8. — P. 2879–2884.
7. Manulis S., Chalupowicz L., Dror O., Kleitman F. Molecular diagnostic procedures for production of pathogen — free propagation material // Pest Manag. Science. — 2002. — V. 58. — P. 1126–1131.
8. Roy M., Sasser M. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 // Phytopathology. — 1983. — V. 73. — P. 810.
9. Lehoczky J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines // Vitis. — 1971. — V. 10. — P. 215–221.
10. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in bleeding sap after isolation on a semiselective medium // Vitis. — 2002. — V. 41, № 1. — P. 37–42.
11. Лиманская Н. В. Выявление *Agrobacterium vitis* в почве виноградника // Виноградарство и виноделие: Сб. науч. тр. ИВиВ "Магарач" — Ялта: ИВиВ "Магарач", 2003. — С. 29–31.
12. Wang K., Herrera - Estrella A., Montagu M. Overexpression of *vir D₁* and *vir D₂* genes in *Agrobacterium tumefaciens* enhances T-complex formation and plant transformation // J. Bacteriol. — 1990. — V. 172. — P. 4432–4440.
13. Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — V. 37. — P. 53–80.

Н. В. Лиманская

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, г. Одесса, 65926, Украина

**ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА ВИНОГРАДА
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДВУХ ПАР ПРАЙМЕРОВ**

Резюме

При помощи полимеразной цепной реакции с использованием пар праймеров к последовательностям *vir D₂* и *ipt* Ti-плазмиды проведено тестирование 171 штамма агробактерий, выделенных из лозы винограда и почвы виноградника. Получены данные о количестве *vir D₂* — и *ipt* — положительных штаммов.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция (ПЦР), *Agrobacterium*, бактериальный рак винограда.

N. V. Limanska

Odessa National University, Department of microbiology and virology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa 65026, the Ukraine

**DETECTION OF CROWN GALL OF GRAPE BY THE POLYMERASE
CHAIN REACTION METHOD WITH TWO PAIRS OF PRIMERS**

Summary

171 agrobacteria strains isolated from grapevine cuttings and vineyard soil were tested by the polymerase chain reaction with primers based on the *vir D₂* and *ipt* genes. The data about quantity of *vir D₂* — and *ipt* — positive strains were obtained.

Keywords: polymerase chain reaction (PCR), *Agrobacterium*, crown gall of grape.