

УДК 632.3:632.911.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАТЕНТНОЙ СТАДИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА ВИНОГРАДА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Макаркина М.В., аспирант, Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар)

Реферат. Проведены исследования растительного материала винограда с использованием ДНК-маркерных тест-систем к *pehA*, *virF* и *virD2* генам, которые позволяют определить заражение растений винограда патогенными агробактериями, вызывающими развитие бактериального рака.

Ключевые слова: бактериальный рак, латентная стадия, виноград, *pehA*, *virF*, *virD2*, полимеразная цепная реакция

Summary. Studies were conducted plant material of grapes using marker test-systems for *pehA*, *virF* and *virD2* genes, which allow determining the infection of grape plants with pathogenic agrobacteria that cause the development of crown gall in grapes.

Key words: crown gall, latent stage, grape-vine, *pehA*, *pehA*, *virF*, *virD2*, polymerase chain reaction

Введение. Одним из наиболее важных факторов, определяющих стабильное и длительное плодоношение виноградников, является фитосанитарное состояние насаждений. Бактериальные и вирусные заболевания винограда наносят ощутимый урон производству, так как по сути своей являются хроническими болезнями. Бактериальный рак – одно из наиболее вредоносных хронических заболеваний виноградной лозы.

Экономический ущерб от бактериального рака значительно варьирует в зависимости от области возделывания винограда. Развитию заболевания способствует угнетение виноградного растения различными стресс-факторами (морозобоины, повреждения насекомыми и грызунами, засухи или переувлажнения, поранения агротехническим инструментом, обработка стимуляторами роста и т.д.). В Краснодарском крае заболевание растений бактериальным раком является экономически значимым, при этом отмечается его ежегодное прогрессирующее [1].

В настоящее время известно, что возбудители бактериального рака на винограде – бактерия *Agrobacterium vitis* и некоторые штаммы *Agrobacterium tumefaciens*. Характерной особенностью поражения виноградного растения бактериальным раком является системный характер заражения, то есть все органы однажды зараженного растения остаются инфицированными в течение всей жизни.

Системный характер инфекции в виноградной лозе впервые был продемонстрирован J. Lechoczky [2, 3] в Венгрии и позже подтвержден несколькими независимыми лабораториями [4, 5, 6]. Кроме того, болезнетворный микроорганизм может находиться в растении бессимптомно в течение нескольких лет, не вызывая роста опухолей, пока не появятся соответствующие условия. Поэтому вегетативное размножение зараженных кустов приводит к производству инфицированного посадочного материала, способствуя тем самым дальнейшему распространению заболевания.

Для идентификации латентной стадии бактериального рака рекомендуют использовать тест-системы к основным вирулентным генам *A. tumefaciens* – *virD2*, *virC* и *A. vitis* – *pehA*,

virD2, *virF*. Долгое время универсальными праймерами для обнаружения всех патогенных агробактерий считались праймеры к *virD2* гену *A. tumefaciens* [7]. Однако ряд исследований в данном направлении поставил под сомнение их универсальность [8, 9]. F. Vini и соавторы рекомендуют для идентификации возбудителя бактериального рака использовать мультиплексную ПЦР с тремя парами праймеров – к *pehA*, *virD2* и *virF* генам патогена [9]. Хотя данная тест-система применима только для *A. Vitis*, ее можно использовать для массового анализа образцов, в которых предварительно идентифицирована в качестве возбудителя бактериального рака агробактерия вида *A. vitis* [10, 11].

К. Suzuki и соавторы предлагают для идентификации патогенных агробактерий использовать тест-систему VCF3/VCR3 к *virC* гену, которая позволяет идентифицировать онкогенную Ti-плазмиду у большинства штаммов *Agrobacterium* [12]. Однако в исследованиях словенских ученых данные праймеры также неоднозначно выявляли патогенные штаммы *A. vitis* [13].

Успешно применяется на практике [8, 13] мультиплексный протокол, предложенный J. Pulawska и соавторами [14], включающий в себя 1 универсальный прямой праймер (UF) и 4 видоспецифических обратных праймера (B1R, B2R, AvR, ArR), с помощью которых возможно определить 4 вида агробактерий (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* и *A. rubi*) в одной пробе. Разработана также и высокочувствительная методика выявления *A. vitis* на основе Real-Time ПЦР [15].

В настоящее время в Российской Федерации определение инфекции бактериального рака проводится в основном микробиологическим методом, занимающим 40-45 суток. Таким образом, ранняя и достоверная диагностика присутствия возбудителя бактериального рака в лозе винограда является актуальной проблемой.

Методы ДНК-диагностики в настоящее время признаны одними из наиболее эффективных, поэтому необходимо внедрять их в широкое практическое применение в аграрном секторе России. ДНК-маркерная диагностика возбудителя бактериального рака винограда позволяет в сжатые сроки и с меньшим объемом работ идентифицировать патогенные агробактерии в латентной стадии.

Цель исследований – апробация и оптимизация метода ПЦР-диагностики латентной стадии бактериального рака в посадочном материале и в плодоносящих насаждениях винограда.

Объекты и методы исследований. Для отработки методики ПЦР-анализа использовали в качестве материала 48 образцов опухолевидных наростов собранных в 8 виноградарских хозяйствах разных районов Краснодарского края. Для выявления латентной стадии бактериального рака использовали 28 образцов визуально-здорового растительного материала винограда – побеги, листья, одревесневшие части растения, собранные в 4 виноградарских хозяйствах Краснодарского края. Образцы отбирались как в плодоносящих насаждениях, так и в школке (молодом материале) винограда, где предполагалась возможность заражения.

ДНК выделяли методом ЦТАБ с некоторыми дополнениями [16, 17]. Образцы анализировали методом ПЦР [18, 19] на наличие ДНК возбудителя бактериального рака винограда. ПЦР проводили в 25 мкл смеси, содержащей 50-70 нг ДНК, 1x ПЦР-буфер для Taq-полимеразы с сульфатом аммония, 0,125 мМ/мкл dNTP, 0,25 пМ/мкл каждого праймера, 0,05% БСА, 0,125 е.а/мкл Taq-полимеразы (ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия). Полимеразную цепную реакцию проводили по стандартной методике, амплификацию осуществляли на приборе Eppendorf Mastercycler gradient (Германия) по следующей схеме: 5 минут при 94 °С – начальная денатурации, далее 40 циклов: 18 секунд – денатурации при 94 °С,

40 секунд – отжиг праймеров при 60 °С, 60 секунд – синтез при 72 °С; последний цикл синтеза – 4 минуты при 72 °С. Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» ФГБНУ СКФНЦСВВ.

Обсуждение результатов. На первом этапе, для отработки методики ПЦР анализа, исследования проводились на образцах опухолевидных наростов, где содержится большая концентрация ДНК агробактерий, вызывающих бактериальный рак на виноградных растениях. Так как возбудителями бактериального рака винограда являются агробактерии, относящиеся к двум видам – *A. vitis* и *A. tumefaciens*, для анализа были отобраны видоспецифические праймеры к последовательности гена *pehA* [20], позволяющие идентифицировать агробактерии вида *A. Vitis* и праймеры к *virD2* гену, являющиеся универсальными для патогенных агробактерий, однако определяющие в основном *A. tumefaciens* [7, 13].

С помощью праймеров PGF/PGR к *pehA* гену удалось амплифицировать целевой фрагмент во всех исследуемых образцах. Целевые последовательности *virD2* гена обнаружены только у 20 % исследуемых образцов. Это говорит о том, что опухолевидные образования на виноградных растениях, в нашем случае, – это результат жизнедеятельности агробактерий вида *A. vitis*.

В связи с тем, что среди вида *A. Vitis* есть как патогенные агробактерии, так и не патогенные, следует использовать при анализе также праймеры к основным вирулентным генам *A. vitis*. Известно, что патогенные *A. vitis* отличаются между собой по типу Ti-плазмиды – октопин-, нопалин- и витопинсодержащие. С помощью тест-систем VIRFF₁/VIRFR₂ и VIRD2S4F₇₁₆/VIRD2S4R₁₀₃₆ можно выявить агробактерии сразу трёх типов Ti-плазмид [9]. Поэтому их рекомендуют включать в мультиплексный ПЦР-протокол вместе с тест-системой PGF/PGR к *pehA* гену для выявления всех патогенных агробактерий *A. vitis*. Данная мультиплексная тест-система успешно работала на анализируемых нами образцах (рис.).

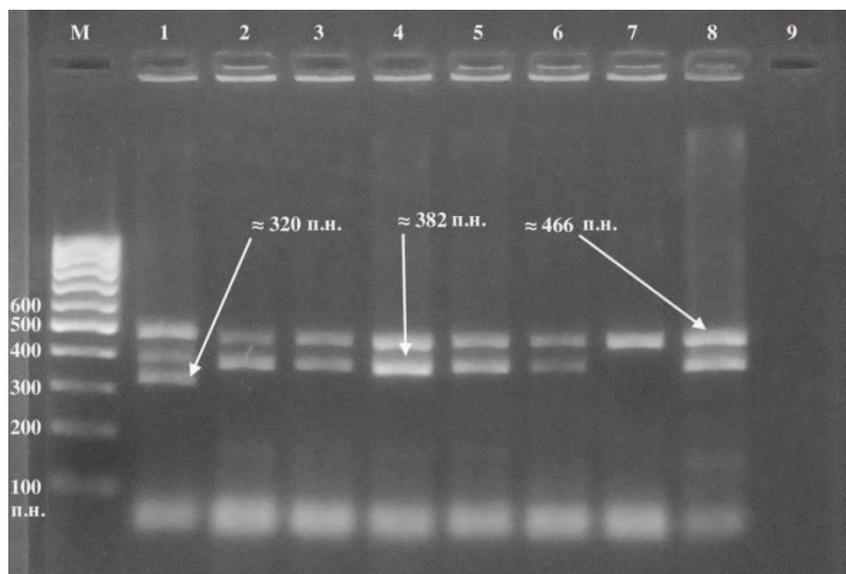


Рис. Результаты мультиплексной ПЦР с тремя парами праймеров: PGF/PGR (466 п.н.), VIRFF₁/VIRFR₂ (382 п.н.) и VIRD2S4F₇₁₆/VIRD2S4R₁₀₃₆ (320 п.н.). М-маркер веса.

Примечание: образцы ДНК из: 1 – Абрау-Дюрсо, 2 – Крымск; 3 – Тамань; 4 – Темрюк; 5 – Копанской; 6 – Анапа; 7 – Горячий Ключ; 8 – Красносельское; 9 – отрицательный контроль (ПЦР – смесь без ДНК)

Как видно из рисунка, исследуемые изоляты агробактерий генетически отличаются друг от друга. В образцах из Абрау-Дюрсо выявлены фрагменты обоих вирулентных генов, что говорит, вероятно, о высокой вредоносности данных агробактерий или, возможно, о смешанной инфекции – наличии двух различных штаммов агробактерий в одном образце. В образцах из Горячего Ключа так же обнаружены целевые фрагменты *virF* и *virD2* генов, однако положительный результат был не стабильным ввиду низкой концентрации ДНК патогена, что связано с тем, что материалом служили не опухоли, а фрагменты виноградной лозы с признаками агробактериальной инфекции. У большинства анализируемых образцов детектированы целевые фрагменты только гена *virF*.

Таким образом, с помощью мультиплексной тест-системы к *pehA*, *virF*, и *virD2* генам нам удалось выявить наличие агробактериальной инфекции во всех анализируемых образцах ДНК, выделенных из опухолевидных наростов (см. рис.).

Следующим шагом было изучение 28 образцов визуально здорового растительного материала винограда, собранного в хозяйствах из четырех точек Краснодарского края, – окрестностей городов Анапы, Новороссийска, Темрюка и Краснодара, где предполагалась возможность инфицирования растений.

С помощью мультиплексной тест-системы PGF/PGR, VIRFF₁/VIRFR₂ и VIRD2S4F₇₁₆/VIRD2S4R₁₀₃₆ было выявлено наличие агробактериальной инфекции *A. vitis* в 100 % исследуемых образцов. Образцы отличались по наличию вирулентных генов. У большинства образцов (Новороссийск, Краснодар, Темрюк) было идентифицировано наличие фрагментов *virD2* и *virF* генов одновременно, что говорит, вероятно, о высокой вирулентности агробактерий в данных образцах или о смешанной инфекции.

В образцах из Анапы обнаружены только фрагменты гена *virF*, что указывает на то, что агробактерии в данных образцах, возможно, обладают меньшей вирулентностью.

У незначительного количества (8 %) образцов отмечено отсутствие целевых фрагментов генов *virF* и *virD2*, что говорит о том, что в сосудистой системе виноградного растения могут обитать *A. vitis* непатогенные для виноградного растения.

Выводы. Апробирована методика определения наличия агробактериальной инфекции в растительном материале винограда на основе метода ПЦР. С помощью мультиплексной тест-системы к генам *pehA*, *virF* и *virD2* удалось определить возбудителя бактериального рака винограда в растениях без визуальных признаков заболевания.

В качестве возбудителя бактериального рака на виноградниках Краснодарского края выявлены агробактерии вида *A. vitis*, отличающиеся между собой по набору вирулентных генов.

Литература

1. Егоров, Е.А. Научное обеспечение развития виноградарства и виноделия в Российской Федерации: проблемы и пути решения / Е.А. Егоров, Ж.А. Шадрин, Г.А. Кочьян // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – 2015. – № 32 (2) – С. 22-36. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/02/03.pdf>.
2. Lehoczky, J. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection / J. Lehoczky // Phytopath. – 1968. – V. 63, №3. – P. 239-246.
3. Lehoczky, J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines / J. Lehoczky // Vitis. – 1971. – V. 10. – P. 215-221.
4. Burr, T.J. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens* / T.J. Burr, B.H. Katz // Plant Disease. – 1984. – V. 68. – P. 976-978.
5. Tarbah, F.A. Systemic spread of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in the vascular system of grapes / F.A. Tarbah, R.N. Goodman // Phytopathology. – 1987. – V. 77. – P. 915-920.

6. Thies, K.L. Characterization of *Agrobacterium* isolates from muscadine grape / K.L. Thies, D.E. Griffin, C.H. Graves, C.P. Hedgewood // *Plant Disease*. – 1991. – V. 75. – P. 634-637.
7. Haas, J.H. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains / J.H. Haas, L.W. Moore, W. Ream, S. Manulis // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – V.61, № 8. – P. 2879-2884.
8. Kuzmanović, N. Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia / N. Kuzmanović, K. Gašić, M. Ivanović, A. Prokić, A. Obradović // *Archives of Biological Sciences*. – 2012. – V. 64, № 4. – P.1487-1494.
9. Bini, F. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens* / F. Bini, A. Kuczmog, P. Putnoky // *Vitis Journal of Grapevine Research*. – 2008. – V.47, №3. – P.181-190.
10. Tolba, I.H. Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt / I.H. Tolba, M.F. Zaki // *Annals of Agricultural Sciences*. – 2011. – V. 56, №. 2. – P. 113-119.
11. Chebil, S. Occurrence of *Agrobacterium vitis* carrying two opine-type plasmids in tunisian vineyards / S. Chebil, R. Fersi, S. Chenenaoui, E. Abdellatif, G. Durante, E. Zacchi, A. Mliki // *J. Plant Pathol. Microbiol.* –2013. – V. 4. – P.1-4.
12. Suzaki, K. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers / K. Suzaki, K. Yoshida, H. Sawada // *Journal of General Plant Pathology*. – 2004. – V. 70, №. 6. – P. 342-347.
13. Lamovšek, J. Comparative study of diagnostic methods used for monitoring of common grape vine (*Vitis vinifera* L.) crown gall (*Agrobacterium vitis* Ophel & Kerr) in Slovenia / J. Lamovšek, I. Zidarič, I. M. Pleško, U. R. E. K. Gregor, S. Trdan // *Acta agriculturae Slovenica*. – 2015. – T. 103, V.2. - P. 313-321.
14. Puławska, J. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR / J. Puławska, A. Willems, P. Sobiczewski / J. Puławska, A. Willems, P. Sobiczewski // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2006. – V. 29, №.6. – P. 470-479.
15. Johnson, K.L. Development of a magnetic capture hybridization real-time PCR assay for detection of tumorigenic *Agrobacterium vitis* in grapevines / K.L. Johnson, D. Zheng, S. Kaewnum, C.L. Reid, T. Burr // *Phytopathology*. – 2013. – V.103, № 6. – P. 633-640.
16. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // *Phytochem. Bull.* – 1987. – V. 19. – P. 11-15.
17. Tamari, F. A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues / F. Tamari, C.S. Hinkley, N. Ramprasad // *Journal of biomolecular techniques*. – 2013. – V. 24(3). – P. 113-118.
18. Ильницкая, Е.Т. Молекулярно-генетическая оценка исходного и селекционного материала / Е.Т. Ильницкая // *Современные инструментально-аналитические методы исследования плодовых культур и винограда*. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. – С. 5-23.
19. Шибата, Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов / Д.К. Шибата // *Молекулярная клиническая диагностика*. – М.: Мир, 1999. – С. 395-427.
20. Szegedi, E. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium / E. Szegedi, S. Bottka // *Vitis-Journal of Grapevine Research*. – 2002. – V. 41, №. 1. – P. 37-42.