

А.М. Венгер, Н.Е. Волкова

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення,
вул. Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,
тел.: +38 (048)789 52 89, e-mail: venger87@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ ДІАГНОСТИКИ БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО

Мета. Розробка молекулярної біотехнології діагностики бактеріального раку у хмелю звичайного. **Методи.** Ізоляція чистої культури клітин, екстракція ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), гель-електрофорез. **Результати досліджень.** Для екстракції тотальної ДНК з тканин хмелю звичайного використано буфер, який враховує наявність у тканинах хмелю специфічних сполук. Проведена ПЛР з праймерами до генів вірулентності і патогенності *Ti*-плазміді і ДНК чистої культури збудника бактеріального раку рослин *Agrobacterium tumefaciens*, здорових зразків хмелю звичайного, зразків хмелю звичайного з візуальними симптомами бактеріального раку і суміші ДНК агробактерій і здорового хмелю, взяті в пропорції 1:1, 1:5, 1:10. Отримано продукти ПЛР з праймерами до генів патогенності і вірулентності *Ti*-плазміді і ДНК, виділеними з чистої культури *A. tumefaciens*, тканин зразків хмелю звичайного з візуальними симптомами ураження агробактерій і суміші ДНК агробактерій і здорового хмелю. За результатами ПЛР з тотальною ДНК здорових зразків хмелю і в негативному контролі (ПЛР-суміш без ДНК) продуктів ампліфікації не виявлено. Хворими бактеріальним раком вважали ті зразки хмелю звичайного, в тотальній ДНК яких виявлено гени вірулентності і патогенності *Ti*-плазміді. Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного складається з етапу виділення і очищення тотальної ДНК з тканин хмелю, етапу двокрокової ПЛР-детекції *Ti*-плазміді і генів *ipt* і *virD2*, що відповідають за патогенність і вірулентність, і етапу гель-електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації, їх візуалізації та обліку результатів. **Висновки.** Діагностика бактеріального раку хмелю повинна включати детекцію генів патогенності і вірулентності *ipt* і *virD2*.

Ключові слова: хміль звичайний, бактеріальний рак, полімеразна ланцюгова реакція, біотехнологія.

Хміль європейський, або звичайний *Humulus lupulus* L., відноситься до родини *Cannabaceae*. Шишки використовують традиційно для пивоваріння, але завдяки наявності унікальних біоактивних компонентів хміль використовується також у медицині, харчовій, фармакологічній промисловості [2]. У період росту і розвитку хміль уражується чисельними патогенами, що викликають хвороби, які призводять до зниження кількості та якості врожаю.

Одним із патогенів хмелю звичайного є збудник бактеріального раку грам-негативна бактерія *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend, Conn). Даний



патоген інтегрує патогенну Tі-плазмиду в геном рослини, що ініціює синтез фітогормонів, які викликають надмірний поділ клітини та утворення пухлини. Така пухлина руйнується при низьких температурах, що може викликати загибель рослини [4]. Уражена рослина може змінити свої якості, зокрема, рівень гірких та ароматичних кислот в складі шишок. *A. tumefaciens* є ґрунтовою бактерією, через що її накопичення у ґрунті може викликати контамінацію рослини шляхом попадання через пошкоджені підземні частини [1]. Невиліковність бактеріального раку робить актуальним проведення ранньої детекції *A. tumefaciens* у рослин, добору рослин, вільних від збудника, та їх подальше розмноження в умовах, що запобігають ураженню.

Для діагностики захворювання використовується мікробіологічний метод, який є довготривалим, дозволяє виявити збудника бактеріального раку рослин *A. tumefaciens*, але не виявляє у агробактерії патогенну Tі-плазмиду. Також запропоновано поєднання мікробіологічного та молекулярно-біологічного методів, спрямованих на культивування *A. tumefaciens* на поживному середовищі та подальшу ідентифікацію патогенних штамів з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [3]. Але використання такого підходу є довготривалою процедурою та має низку недоліків. По-перше, існує вірогідність невиявлення *A. tumefaciens*, адже таким чином можна виявити лише ті клітини, що проросли на середовищі. По-друге, здійснюється ідентифікація патогенних штамів *A. tumefaciens* через наявність продуктів ампліфікації з праймерами до генів вірулентності або патогенності, але наявність патогенних властивостей не обумовлює наявності вірулентних, і навпаки. Все це робить актуальним розробку надійного та ефективного способу детекції бактеріального раку хмелю звичайного.

Мета даної роботи полягала в розробці молекулярної біотехнології діагностики бактеріального раку у хмелю звичайного.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували рослини сортів хмелю звичайного Альта та Клон 18, люб'язно надані Інститутом сільського господарства Полісся НААН.

Тотальну ДНК виділяли з листя або мікропагонів п'яти здорових, введених в культуру *in vitro* та бруньок п'яти хворих з візуальними симптомами ураження *A. tumefaciens* – наявністю корончатих галів зразків сортів хмелю за методом [5] (далі – здорові та хворі зразки, відповідно). ДНК з ізольованої культури *A. tumefaciens* виділяли за методом [3].

З листя, бруньок та мікропагонів зразка сорту Альта з візуальними симптомами захворювання на бактеріальний рак в чисту культуру ізольовано агробактерії на поживне середовище YPGA для культивування бактерій біовару 1 (патогенного для хмелю) [6].

Умови ПЛР та послідовності праймерів наведено в [3]. ПЛР проводили у трьох повторностях. Електрофоретичний розподіл (в 2 % агарозних гелях) та візуалізацію продуктів ампліфікації проведено за загальноприйнятими методами.



Результати та обговорення

Більшість праймерів, сконструйованих для видо- і родоспецифічної детекції патогенів, засновано на варіабельності послідовностей ДНК в регіонах внутрішніх транскрибованих спейсерів ядерної рибосомної ДНК. Кластери рибосомних генів завдяки особливостям їх структурно-функціональної організації є найбільш перспективними для діагностичного використання. Регіони багатокопійної рДНК, які включають внутрішні транскрибовані спейсери (ITS1 і ITS2) і 5,8S рДНК, придатні для ампліфікації в ПЛР і містять ділянки, які значно різняться за швидкістю молекулярної еволюції.

Для видової ПЛР-детекції агробактерії досліджували консервативну послідовність гена патогенності Ті-плазмиди *ipt*, що містить внутрішні транскрибовані спейсери, за допомогою ПЛР з парою праймерів Cyt F і Cyt R, очікувана довжина продукту ампліфікації 427 пар нуклеотидів (п.н.), та найбільш консервативний регіон гена вірулентності *virD2* за допомогою ПЛР з парою праймерів vir A і vir C, довжина продукту ампліфікації 224 п.н.

Проведено ПЛР-аналіз ДНК здорових та хворих зразків хмелю, чистої культури *A. tumefaciens* та суміші ДНК здорових зразків хмелю і чистої культури *A. tumefaciens* в співвідношенні 1:1, 5:1, 10:1. Продукти ПЛР довжиною 224 п.н. та 427 п.н. виявлені у зразках ДНК, виділеної з чистої культури *A. tumefaciens*, уражених зразків хмелю та сумішей тотальної ДНК здорових зразків хмелю та *A. tumefaciens* (рис.). При ПЛР-аналізі ДНК здорових зразків хмелю та в негативном контролі (ПЛР-суміш без ДНК) продуктів ампліфікації не виявлено.

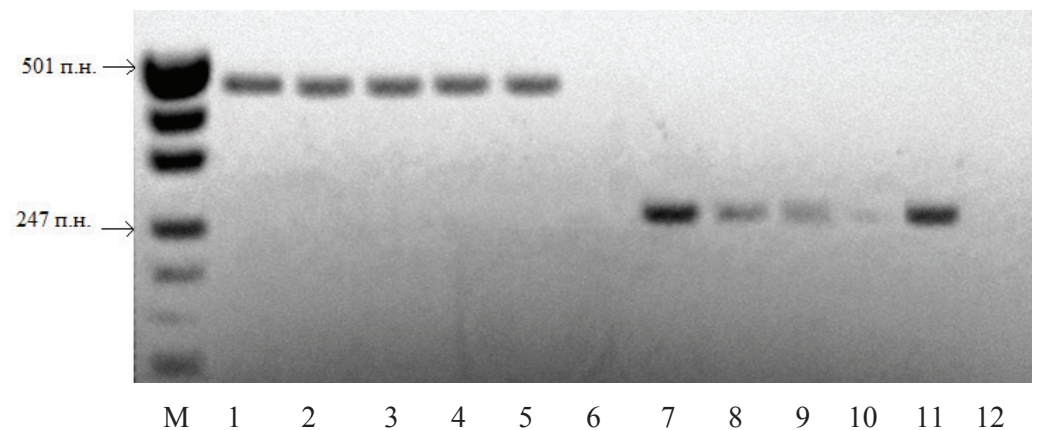


Рис. Електрофореграма продуктів ампліфікації регіонів генів *ipt* (1-6) та *virD2* (7-12) в ДНК *A. tumefaciens* (1, 7), суміші ДНК *A. tumefaciens* та хмелю сорту Альта в співвідношенні 1:1, 1:5, 1:10 (2-4, 8-10), ДНК хворого (5, 11) та здорового (6, 12) зразків хмелю сорту Альта. М – маркер молекулярної маси рUC19 ДНК/MspI

Fig. Electrophoregram of the amplification products of genes *ipt* (1-6) and *virD2* (7-12) in DNA of *A. tumefaciens* (1, 7), the mixture of DNA *A. tumefaciens* and hop variety Alta in the ratio 1:1, 1:5, 1:10 (2-4, 8-10), DNA of the ill (5, 11) and healthy (6, 12) samples of hop variety Alta. M- molecular weight marker рUC19 DNA/MspI

Оскільки наявність патогенних властивостей у бактерій не обумовлює наявності вірулентних, і навпаки, то хворими на бактеріальний рак зразками хмелю та патогенними штамми агробактерії вважали ті, виділена ДНК з яких мала одночасно сайти праймування як для праймерів до гена патогенності Ті-плазміді *ipt*, так і гена вірулентності *virD2*.

Двохетапна перевірка присутності в тотальній ДНК Ті-плазміді важлива для оцінювання ризику наявності патогенних штамів *A. tumefaciens* у тканині хмелю. Так, за наявності в Ті-плазміді регіону *virD2*, який відповідає за вірулентність, але при відсутності гена патогенності *ipt*, *A. tumefaciens* не здатний викликати бактеріальний рак, тому при відсутності гена *ipt* наявність *A. tumefaciens* є припустимою [3]. Слід зазначити важливість етапу виділення та очищення ДНК із зразків тканин хмелю саме методом, який враховує наявність таких специфічних сполук, як гумулон, лупулон, ксантагумол та ін. [5]. Використання даного методу виділення тотальної ДНК з зразків хмелю дозволяє уникнути стадії ізоляції патогенів для їх ідентифікації та проводити їх видову детекцію безпосередньо на рівні геномів в багатокомпонентній системі.

За використанням даного підходу проведено діагностику донорних рослин сортів Клон 18 та Альта та добрано зразки для введення в культуру *in vitro* 10 зразків чубуків кожного сорту. Подальше спостереження за даними зразками в процесі розмноження показало відсутність інфекції.

Таким чином, розроблена молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного містить етап виділення та очищення тотальної ДНК з тканин хмелю, етап двокрокової ПЛР-детекції Ті-плазміді та генів *ipt* і *virD2*, що відповідають за патогенність та вірулентність, та етап гель-електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації, їх візуалізації та врахування результатів. Запропонована біотехнологія є надійним та ефективним підходом для експрес-діагностики бактеріального раку хмелю звичайного на ранніх стадіях патогенеза.

Діагностика бактеріального раку хмелю звичайного повинна включати детекцію генів патогенності та вірулентності *ipt* і *virD2*.

Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного складається з етапів екстракції тотальної ДНК з урахуванням очищення від специфічних для тканин хмелю речовин, двокрокової ПЛР-ампліфікації регіонів Ті-плазміді в багатокомпонентній системі «рослина-патоген», гель-електрофорезу та обчислення результатів аналізу.

А.Н. Венгер, Н.Э. Волкова

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения,
ул. Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина,
тел.: +38 (048)789 52 89, e-mail: venger87@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО

Реферат

Цель. Разработка молекулярной биотехнологии диагностики бактериального рака у хмеля обыкновенного. **Методы.** Изоляция чистой культуры клеток, экстракция ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), гель-электрофорез. **Результаты исследований.** Для экстракции тотальной ДНК из тканей хмеля обыкновенного использован буфер, который учитывает наличие в тканях хмеля специфических соединений. Проведена ПЦР с праймерами к генам вирулентности и патогенности Ti-плазмиды и ДНК чистой культуры возбудителя бактериального рака растений *Agrobacterium tumefaciens*, здоровых образцов хмеля обыкновенного, образцов хмеля обыкновенного с визуальными симптомами бактериального рака и смеси ДНК агробактерий и здорового хмеля, взятых в пропорции 1:1, 1:5, 1:10. Получены продукты амплификации ДНК, выделенной из чистой культуры *A. tumefaciens*, тканей образцов хмеля обыкновенного с визуальными симптомами поражения агробактериями, и смеси ДНК агробактерий и здорового хмеля. В результате ПЦР-анализа в ДНК здоровых образцов хмеля и негативном контроле (ПЦР-смесь без ДНК) продуктов амплификации не обнаружено. Больными бактериальным раком считали те образцы хмеля обыкновенного, в тотальной ДНК которых выявлено гены вирулентности и патогенности Ti-плазмиды. Молекулярная биотехнология диагностики бактериального рака хмеля обыкновенного состоит из этапа выделения и очистки тотальной ДНК из тканей хмеля, этапа двушаговой ПЦР-детекции Ti-плазмиды и генов *ipt* и *virD2*, отвечающих за патогенность и вирулентность, и этапа гель-электрофоретического разделения продуктов амплификации, их визуализации и учета результатов. **Выводы.** Диагностика бактериального рака хмеля должна включать детекцию генов патогенности и вирулентности *ipt* и *virD2*.

Ключевые слова: хмель обыкновенный, бактериальный рак, полимеразная цепная реакция, биотехнология.

A.M. Venger, N.E. Volkova

Plant-Breeding and Genetics Institute; 3, Ovidiopska doroga Str., Odesa, 65036, Ukraine,
tel.: +38 (048)789 52 89, e-mail: venger87@ukr.net

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY OF HOP CROWN GALL DIAGNOSTIC

Summary

Aim. The development of molecular biotechnology for crown gall diagnosis in hop.
Methods. Isolation of pure culture cells, extraction of DNA, polymerase chain reac-



tion (PCR), gel electrophoresis. **Results.** For the total DNA extraction from the tissue there were used the buffer, which recorded the presence in hop tissue such specific compounds as humulone, lupulon, xanthohumol and others. There were performed PCRs with primers for genes of virulence and pathogenicity of the Ti-plasmid and DNAs extracted from the pure culture of the crown gall causative *Agrobacterium tumefaciens*, healthy samples of hop, hop samples with visual crown gall symptoms and *agrobacterium* and hop DNA mixtures at the ratio of 1:1 1:5, 1:10. PCR products were obtained with the primers to virulence and pathogenic genes of Ti-plasmid and DNA extracted from a pure culture of *A. tumefaciens*, the hop tissue samples with visual symptoms of crown gall and the mixtures of DNA from hop. According to the results of PCRs with total DNA from healthy samples of hops and controls (PCR-mix without DNA) the amplification products were not observed. Infected by crown gall were considered those samples of hop in which the total DNA virulence and pathogenicity genes of Ti-plasmid were identified. **Conclusion.** The diagnosis of hops should include the detection of pathogenes and virulence genes *ipt* and *virD2*.

Key words: *Humulus lupulus*, crown gall, polymerase chain reaction, biotechnology.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ліманська Н. В. Наявність патогенних штамів *Agrobacterium vitis* у ґрунті виноградників // Вісник аграрної науки. – 2005. – № 2. – С. 81–83.
2. Chadwick L. R., Pauli G. F., Farnsworth N. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties // *Phytomedicine* – 2006. – 13. – P. 119–131.
3. Haas J. M., Moore L. W., Ream W., Manulis S. Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – 61, № 8. – P. 2879–2884.
4. Jia Y. H., Lia L. P., Houa Q. M., Pana Shen Q. An *Agrobacterium* gene involved in tumorigenesis encodes an outer membrane protein exposed on the bacterial cell surface // *Gene*. – 2002. – 284. – P. 113–124.
5. Okada Y., Saeki K., Inaba A., Suda N., Kaneko T., Ito K. Construction of gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter // *Plant Physiol.* – 2003. – 160. – P. 1101–1108.
6. Pionnat S., Keller H., Richer D. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries // *Appl. Environm. Microbiol.* – 1999. – 65, № 9. – P. 4197–4206.

Стаття надійшла до редакції 04.12.2014 р.

