

Н.В. Ліманська, С.А. Серков, Ж.Ю. Сергеева, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, e-mail: limanska@gmail.com

ВИЯВЛЕННЯ ШТАМІВ *RHIZOBIUM VITIS* І *R. RADIOBACTER* МЕТОДОМ ПЛР З ВИКОРИСТАННЯМ ПРАЙМЕРІВ ДО РІЗНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНОМУ

*Методом полімеразної ланцюгової реакції виявлено наявність патогенних штамів *Rhizobium vitis* і *R. radiobacter* у тканинах безсимптомних рослин і у пухлинах винограду. Проведено порівняльне тестування з використанням п'яти пар праймерів до різних ділянок геному цих бактерій. Показано, що у рослинах винограду сорту Каберне Совіньон патогенні штами склали 18,5% від загальної популяції *Rhizobium*.*

*Ключові слова: *Rhizobium vitis*, *R. radiobacter*, полімеразна ланцюгова реакція, бактеріальний рак винограду.*

Бактеріальний рак — це захворювання, поширене в усіх регіонах культивування винограду. Серед сортів винограду виділяють як більш, так і менш сприйнятливі до бактеріального раку, але повністю резистентні сорти невідомі [5]. Сорт Каберне Совіньон є одним з найбільш чутливих до ураження бактеріальним раком в умовах України [1]. Саме тому необхідною постає своєчасна та високоточна діагностика захворювання на насадженнях, призначених для виробництва садивного матеріалу винограду.

Оскільки бактеріальний рак винограду — це системна інфекція, за якої збудники поширюються по судинах рослини, для діагностики латентного захворювання здійснюють виділення бактерій *Rhizobium vitis* і *R. radiobacter* (за колишньою номенклатурою — *Agrobacterium vitis* і *A. tumefaciens*) [4] з пагонів або коріння [1, 11, 14]. Для дослідження біологічних властивостей штамів збудників звичайно виділяють безпосередньо з пухлинної тканини рослин. Існує низка методик детекції патогенних ризобій у пухлинних тканинах, в тому числі ті, що передбачають виділення бактерій на живильні середовища [11, 14, 16].

Найкращим методом діагностики фітопатогенів є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [16]. При підборі послідовностей праймерів у випадку збудників бактеріального раку слід враховувати той факт,



що *R. vitis* і *R. radiobacter* характеризуються значною генетичною різноманітністю [6, 15].

Метою роботи було виявлення штамів *R. vitis* і *R. radiobacter* у рослинах винограду за допомоги ПЛР з різними парами праймерних ділянок.

Матеріали і методи дослідження

Для дослідження відбирали здерев'янілі пагони, а також пухлинні тканини рослин сорту Каберне Совіньон виноградника в Одеській області. Відбір проводили влітку і восени 2010 року, по три лози з рослини винограду, розташовані ближче до штамбу. Лозу мили, фламбували, нарізали на фрагменти 5 мм товщиною, заливали стерильною водою і поміщали на добу у холодильник при 4 °С. Отриману суспензію висівали на середовище Рой і Сасера [10, 12].

Пухлини мили, відважували 1 г та, видаливши верхній шар, подрібнювали у 1 мл стерильного середовища LB (рН 7,2) і висівали 100 мкл розведень 10^{-2} та 10^{-3} на напівселективне середовище Рой і Сасера [12]. Колонії, що вирости, підраховували через 7 днів. Досліди проводили у трьох-п'яти повторностях. Статистичне опрацювання здійснювали за допомоги пакета прикладних програм STATISTICA 6.0.

З колоній, що вирости, здійснювали пересів бактерій на скошений картопляний агар. Ізольовані штами досліджували методом ПЛР з використанням праймерів до ділянки гена ізопентенилтрансферази та ділянок гена ендонуклеази VirD₂, плазміди патогенності [17], послідовностей генів *virC* Ті-плазміди [13], а також ділянок хромосомного гена полігалактуронази [7, 14].

В роботі використовували метод біо-ПЛР [8]. Бактеріальну суспензію у концентрації 10^8 кл/мл на дейонізованій воді, яка містила Тритон Х-100 і азид натрію, витримували 10 хв при 95 °С. Зразки центрифугували 5 хв при 5700 g, і надосадову рідину використовували для проведення ПЛР [14]. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила по 10 пмоль кожного з праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеозидтрифосфатів, 2 Од Таq-полімерази ("Fermentas"), 2 мМ MgSO₄, 2 мкл буфера (10x, ("Fermentas")). У реакційну суміш вносили по 5 мкл надосадової рідини зразка. Ампліфікацію проводили згідно з параметрами Haas et al. [17], збільшивши час початкової денатурації до 3 хв, а час елонгації в останньому циклі — до 7 хв [3]. Відпал здійснювали при 52 °С, крім праймерів до ділянок полігалактуронази, для яких окремо підбирали умови ампліфікації. Ампліфікацію здійснювали у програмованому термоциклері "BioRad" (США). Електрофорез продуктів ПЛР проводили у 1,5% агарозному гелі. Трисборатний буфер для електрофорезу містив бромід етидію ("Амплиценс", Росія). Гель фотографували під УФ—випромінюванням за допомоги відеосистеми "GelDoc" "BioRad".



Результати досліджень та їх обговорення

Ділянка винограду, з якої відбирався досліджуваний матеріал, містила як рослини з симптомами захворювання, так і безсимптомні рослини, які обстежували на наявність латентної інфекції.

Посіви індигенної мікробіоти пагонів вісімнадцяти рослин винограду та подальше тестування методом ПЛР показали наявність збудників бактеріального раку у 67% тестованих зразків. Ймовірно, наявність на ділянці великої кількості рослин із пухлинами призвела до проникнення фітопатогенних бактерій у здорові рослини. Крім того, можливо й те, що досліджені рослини були первинно інфіковані ще під час отримання садивного матеріалу, а при висадженні на виноградник самі по собі слугували джерелом поширення фітопатогенів.

З десяти зразків на напівселективному середовищі штами ризобій було виділено із семи зразків пухлинних тканин. Загальна кількість ризобієподібних колоній на середовищі Рой і Сасера склала у середньому $(3,4 \pm 1,4) \times 10^5$ на 1 г пухлинної тканини. Для наступного тестування у ПЛР було відібрано 65 штамів ризобій, з яких патогенними виявилися 18,5%. Отримані результати співпадають з даними попередніх дослідників, що вказують на присутність у пухлинах переважної кількості авірулентних штамів *R. vitis* і *R. radiobacter*. Частина таких штамів, ймовірно, є представниками нормальної мікробіоти рослини, а решта — штамми, що індукували пухлинний процес, а потім стали мутантними за генами патогенності внаслідок впливу захисних факторів рослини [9].

Первинне виявлення фітопатогенних штамів у ПЛР проводили з використанням пар праймерів до послідовності гена ізопентенилтрансферази та ділянок гена ендонуклеази *VirD₂*, *Ti*-плазміді так, як це було рекомендовано Manulis та ін. для тестування садивного матеріалу [11]. Так, Manulis та ін. вказують, що використання обох пар праймерів при тестуванні рослин, призначених для вегетаційного розмноження, дозволяло відібрати садивний матеріал, цілком вільний від збудника бактеріального раку [11]. Згідно з дослідженнями Naas та ін. (1995), які вперше запропонували використовувати саме ці праймерні ділянки, деякі патогенні штами *R. vitis* є *ipt*-негативними і виявляються за допомоги праймерів до ділянок *virD₂* [17]. Згідно з нашими попередніми дослідженнями, праймери *virD₂*, дійсно, дозволяли виявити ширше коло штамів [2]. Тестування штамів, виділених з рослинного матеріалу сорту Каберне Совіньон, показало невелику розбіжність у кількості штамів, що несли послідовності *ipt* і *virD₂* (17,0% і 18,5%, відповідно). Але при використанні праймерів до послідовності *virD₂* слід враховувати той факт, що за їх допомоги виявляється також вид *R. rhizogenes*, який не являє загрози для винограду, тоді як з праймерами до послідовності *ipt* виявляються безпосередньо пухлинотвірні штами [17]. Отже, кількість потенційно небезпечних штамів, виявлених у ПЛР з *virD₂*, може бути



перебільшеною, і праймери *ipt* є зручними “маркерами” саме одного з генів, що відповідає за пухлинне переродження тканин [2, 11, 17].

Ізольовані штами тестували у ПЛР також з використанням праймерів до послідовностей генів *virC* Ті-плазміди (праймери VCF3/VCR3 і VCF^{b3}/VCR^{b3}) і гена полігалактуронази (праймери PGF/PGR). Праймери VCF3/VCR3 [13] було обрано через те, що вони були визнані кращими для виявлення *R. vitis* і *R. radiobacter* у винограді згідно з дослідженням Kitagai та ін. [8]. Suzaki та ін. було запропоновано праймерні ділянки VCF^{b3}/VCR^{b3} [13], які є цікавими через амплікони великого розміру, що можуть бути надалі використані для рестрикційного аналізу при вивченні генетичного поліморфізму всередині популяцій *R. vitis* і *R. radiobacter*.

Наші дослідження показали, що ПЛР з праймерами VCF3/VCR3 і VCF^{b3}/VCR^{b3} дозволяє виявити таку ж саму кількість штамів, як і у випадку праймерів *virD₂* і *ipt*, відповідно (табл. 1).

Таблиця 1

Виявлення *R. vitis* і *R. radiobacter* серед ізольованих представників мікробіоти винограду методом ПЛР з різними праймерами

Table 1

Detecting of *R. vitis* and *R. radiobacter* strains among the isolated representatives of grapevine microbiota by PCR with different primers

Праймери	Послідовність	Автор	Виявлено штамів, %
<i>ipt</i> (CYT/CYT')	5' – GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT - 3' 5' – GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT - 3'	Haas et al., 1995	17,0
<i>virD₂</i> (A/C')	5' – ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT - 3' 5' – TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA - 3'	Haas et al., 1995	18,5
VCF3/ VCR3	5' – GGC GGG CGY GCY GAA AGR AAR ACY T - 3' 5' – AAG AAC GYG GNA TGT TGC ATC TYA C - 3', де N – A, C, G або T; R – A або G; Y – C або T.	Suzaki et al., 2004	18,5
VCF ^{b3} / VCR ^{b3}	5' – ATC ATT TGT AGC GAC T - 3' 5' – AGC TCA AAC CTG CTT C - 3'	Suzaki et al., 2004	17,0
PGF/PGR	5' – GGG GCA GGA TGC GTT TTT GAG - 3' 5' – GAC GGC ACT GGG GCT AAG GAT - 3'	Herlache et al., 1997	90,7



Праймери PGF/PGR було підбрано до послідовності гена полігалактуронази, присутнього у *R. vitis*, але не у *R. radiobacter*, при цьому даний ген виявляється як у патогенних, так і у непатогенних штамів [7]. ПЛР з праймерами PGF/PGR потребувала оптимізації параметрів у порівнянні із запропонованими [7, 14]. Так, через неспецифічні амплікони (рис. 1, а) концентрацію йонів магнію було зменшено до 1,25 мМ, а температуру відпалу праймерів підвищено до 68 °С. За таких параметрів було отримано поодинокі амплікони із заданими розмірами 466 п.о. (рис. 1, б).

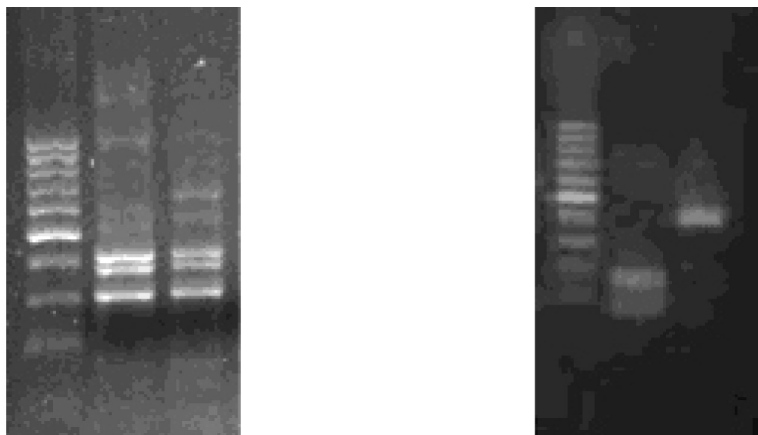


Рис. Електрофореграма продуктів ПЛР з ДНК штамів, виділених з рослин винограду:

а – температура відпалу праймерів 54 °С, концентрація йонів магнію 2,0 мМ, трек 1 – маркери молекулярної маси (100 – 1000 п.о.), треки 2 і 3 – продукти ПЛР з праймерами PGF/PGR; б – температура відпалу праймерів 68 °С, концентрація йонів магнію 1,25 мМ, трек 1 – маркери молекулярної маси (100 – 1000 п.о.), трек 3 – продукт ПЛР з праймерами PGF/PGR.

Fig. Electrophoregram of PCR products with DNA of strains isolated from grapevine plants:

a – annealing temperature is 54 °С, Mg^{++} concentration is 2,0 мМ, track 1 – markers of molecular weight, tracks 2 and 3 – products of PCR with PGF/PGR primers; b – annealing temperature is 68 °С, Mg^{++} concentration is 1,25 мМ, track 1 – markers of molecular weight, track 3 – a product of PCR with PGF/PGR primers.

Серед 65 штамів, виділених з винограду на напівселективне середовище Рой і Сасера, колонії яких були характерні для ризобій, 90,7% були визначені як такі, що належать до виду *R. vitis*. Решта штамів, ймовірно, є *R. radiobacter*, або ж іншими представниками мікробіоти, які дають подібні до ризобій колонії. Із 18,5% штамів патогенних ризобій ген полігалактуронази було виявлено у 17,0%, тобто переважна більшість

штамів з тканин винограду були представлені видом *R. vitis*, що співпадає з даними інших дослідників [9].

Отже, для діагностики латентної інфекції бактеріального раку на винограді слід рекомендувати праймери до послідовності *ipt* і праймери *virD₂* або VCF3/VCR3. Результати досліджень свідчать про переважну присутність у тканинах рослин винограду непатогенних штамів *R. vitis* і *R. radiobacter* (81,5% у порівнянні з 18,5% патогенних).

Роботу було виконано у рамках держбюджетної теми № 477, що фінансується МОНМС України.

ЛІТЕРАТУРА

1. Леманова Н.Б. Бактериальные болезни винограда и плодовых культур / Н.Б. Леманова, Э.Ш. Гатина. — Кишинев: Штиинца, 1991. — С. 21—46.

2. Лиманська Н.В. Діагностика бактеріального раку винограду методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням двох пар праймерів / Лиманська Н.В. // Вісник Одеського національного університету. — 2004. — Т. 9, № 5. — С. 177—182.

3. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики *A. vitis* / Н.В. Лиманская, И.Д. Жунько, Л.А. Конуп, Б.Н. Милкус // Виноградарство и виноделие. — 2003. — № 6. — С. 14—16.

4. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajude 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 [et al.] // Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2001. — 51. — P. 89—103.

5. Burr T.J. Crown gall of grape: biology and disease management / T.J. Burr, L. Otten // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — Vol. 37. — P. 53—80.

6. Characterization of plasmid borne and chromosome encoded traits of *Agrobacterium biovar* 1, 2 and 3 strains from France / M. Ride, S. Ride, A. Petit [et al.] // Appl. Environm. Microbiol. — 2000. — Vol. 66, № 5. — P. 1818—1825.

7. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologous enzymes from *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum* / T.C. Herlache, A.T. Hotchkiss, T.J. Burr, A. Collmer // Appl. environm. microbiol. — 1997. — Vol. 63, № 1. — P. 338—346.

8. Kumagai L. Detection and differentiation of pathogenic *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* in grapevine using multiplex Bio-PCR / L. Kumagai, A.-L. Fabritius // 2th Annual National Viticulture Research



Conference (Davis, USA, July 9 – 11, 2008). – Davis: University of California, 2008. – P. 42–43.

9. *Lastra B.* Characterization of *Agrobacterium* strains isolated from grapevine in Galicia (Spain) / B. Lastra, P. Llop, M. M. Lopez // Proc. Congress of the European Foundation for Plant pathology (Taormina (Italy), September 20–23, 2000). – Taormina: University Press, 2000. – P. 178–179.

10. *Lehoczky J.* Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection / J. Lehoczky // Phytopathol. Z. – 1968. – Vol. 63. – P. 239–246.

11. *Molecular* diagnostic procedures for production of pathogen-free propagation material / S. Manulis, L. Chalupowicz, O. Dror, F. Kleitman // Pest Manag. Science. – 2002. – Vol. 58. – P. 1126–1131.

12. *Roy M.* A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 / M. Roy, M. Sasser // Phytopathology. – 1983. – Vol. 73. – P. 810.

13. *Suzaki K.* Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers / K. Suzaki, K. Yoshida, H. Sawada // J. gen. plant pathol. – 2004. – Vol. 70, № 2. – P. 342–347.

14. *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. – 2002. – Vol. 41, № 1. – P. 37–42.

15. *Ti plasmids* from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries / S. Pionnat, H. Keller, D. Richer [et al.] // Appl. Environm. Microbiol. – 1999. – Vol. 65, № 9. – P. 4197–4206.

16. *Tzfira T.* *Agrobacterium*: from biology to biotechnology / T. Tzfira, V. Citovsky. – New-York:Springer, 2008. – 750 p.

17. *Universal* PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains / J.H. Haas, L.W. Moore, W. Ream, S. Manulis // Appl. Environm. Microbiol. – 1995. – V. 61, № 8. – P. 2879–2884.



Н.В. Лиманская, С.А. Серков, Ж.Ю. Сергеева, В.А. Иваница

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, e-mail: limanska@gmail.com

ВИЯВЛЕНИЕ ШТАММОВ *RHIZOBIUM VITIS* И *R. RADIOBACTER* МЕТОДОМ ПЦР С ПРАЙМЕРАМИ К РАЗНЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ГЕНОМА

Реферат

Методом полимеразной цепной реакции выявлено присутствие патогенных штаммов *Rhizobium vitis* и *R. radiobacter* в тканях бессимптомных растений и в опухолях винограда. Проведено сравнительное тестирование с использованием пяти пар праймеров к различным участкам генома данных бактерий. Показано, что в растениях винограда сорта Каберне Совиньон патогенные штаммы составляли 18,5% от общей популяции *Rhizobium*.

Ключевые слова: *Rhizobium vitis*, *R. radiobacter*, полимеразная цепная реакция, бактериальный рак винограда.

N.V. Limanska, S.A. Serkov, Zh.Yu. Sergeeva, V.O. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: limanska@gmail.com

DETECTION OF *RHIZOBIUM VITIS* AND *R. RADIOBACTER* STRAINS BY PCR WITH THE PRIMERS TO DIFFERENT GENOME SEQUENCES

Summary

Pathogenic *Rhizobium vitis* and *R. radiobacter* strains in symptomless plants and grapevine tumors were revealed by PCR technique. The comparative tests with five primer pairs to different sequences of bacterial genome were carried out. It was shown that in plants of Cabernet Sauvignon cultivar 18.5% from total *Rhizobium* population were represented by pathogenic strains.

Key words: *Rhizobium vitis*, *R. radiobacter*, polymerase chain reaction, crown gall of grape.

