

УДК 579.25:632.35:634.8.03/.05

Н. В. Ліманська, асп., **І. Д. Жунько**, асп., **Б. Н. Мілкус**, д-р біол. наук, проф., **Л. О. Конуп**, наук. співроб.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра мікробіології та вірусології,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65026, Україна.
Тел.: (0482) 748-71-31; e-mail: limmy@mail.ru

ВИЯВЛЕННЯ *IPT*-ПОЗИТИВНИХ ШТАМІВ АГРОБАКТЕРІЙ У ТКАНИНАХ ВИНОГРАДУ МЕТОДОМ ПЛР

Зелені пагони винограду, томати і диски моркви заражали штамми агробактерій, для яких методом полімеразної ланцюгової реакції була доведена наявність гена *ipt*. На томатах і моркві пухлиноутворення спостерігалося рідше, ніж на винограді. При тестуванні утворених пухлинних тканин винограду *ipt*-позитивні агробактерії були виділені лише з 17,6 % пухлин. Вірогідно, більшість штамів втратили досліджений ген патогенності, або ж *ipt*-позитивні агробактерії були присутніми у тканинах пухлин у незначній кількості, недостатній для виявлення за допомогою методу ПЛР.

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

Пухлини, які викликаються *Agrobacterium vitis* і *Agrobacterium tumefaciens*, є зовнішніми проявами латентного захворювання і розвиваються на рослинах через 2–3 роки після посадки у випадку поранення на штамбах, рукавах, однолітніх пагонах [1, 2]. Інфіковані рослини відстають у рості, і у ряді випадків захворювання може призвести до повної або часткової загибелі куща [3].

Життєздатні агробактерії у пухлинах зустрічаються у невеликій кількості і виділяються як із зовнішніх тканин пухлини, так і з внутрішніх [4].

Незважаючи на те, що первинні пухлини є наслідком реалізації патогенних властивостей пухлиноутворюючих агробактерій, патогенні штамми виділяються з пухлин рідко [5, 6]. Гіпотеза осередкованої рослиною-хазяїном генетичної мінливості популяцій *A. tumefaciens* передбачає зміни у геномі бактерії під впливом речовин рослини, що колонізується, таких, наприклад, як ацетосирингон [7, 8, 9]. Окремі патогенні штамми *A. tumefaciens*, виділені з пухлин яблоні та інокульовані на рослини того ж виду, призводили до появи у пухлинах більш ніж 99 % авірулентних штамів, в геномі яких відбулися мутації. У даних штамів виявлені делеції ділянок Tі-плазміді або точкові мутації регуляторного гена *virG*. Фактори рослини-хазяїна забезпечують переважне виживання авірулентних штамів агробактерій у порівнянні з патогенними штамми [7]. Вірогідно, саме тому виділення патоген-

них штамів *A. tumefaciens* на селективних середовищах навіть з первинних пухлин не завжди призводить до позитивних результатів [4].

У дійсний час існує необхідність розробки ефективної діагностики бактеріального раку винограду, пов'язана з широким розповсюдженням захворювання на виноградниках України, АР Крим, Республіки Молдова.

Метою проведеної роботи явилось тестування штамів агробактерій на патогенність з використанням рослин-індикаторів, а також виявлення штамів, які несуть ділянку *ipt*, у здерев'янілій лозі та пухлинних тканинах винограду.

Матеріал і методи досліджень

Із здерев'янілої лози агробактерії виділяли за методом Лехоцьки [10]. Агробактерії з пухлин виділяли шляхом розташування на щільному середовищі Рой і Сасера фрагментів пухлин розміром 0,5 на 0,5 мм або висівом суспензії розтертої пухлини [11]. Через 5–7 днів інкубації при 25 °С колонії, що виростили, пересівали на скошений картопляний агар, і однодобові культури використовували для виділення ДНК [12].

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували праймери до послідовності *ipt* Ті-плазміді [13]. Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 10 пмоль кожного з праймерів, 2 Од Таq-полімерази, 200 мкмоль кожного дезоксинуклеозидтрифосфату, 2 ммоль MgSO₄, 4 мкл п'ятикратного буфера для проведення ПЛР (усі реагенти фірми "Амплиценс", Росія). Об'єм проби, що вносилося у реакцію, складав 5 мкл. У якості негативного контролю використовували деіонізовану воду, в якості позитивного контролю — патогенний штам *A. tumefaciens* FA2, люб'язно наданий доктором Т. J. Burr (Корнельський університет, США). Ампліфікацію провадили згідно з параметрами Naas et al. [13], однак температура відпаалу була підвищена до 52 °С з метою запобігання неспецифічних реакцій, а час початкової денатурації збільшено до 3 хвилин.

Для зараження у якості тест-рослин використовували томати, зелені пагони винограду і диски моркви. Зараження провадили згідно з загальноприйнятою методикою [1, 14, 15].

Результати та їх обговорення

Штами агробактерій були виділені із здерев'янілих пагонів хворих та візуально здорових кущів винограду. З ДНК даних штамів була проведена ПЛР з праймерами до послідовності *ipt*. Продукт гена *ipt*-ізопентенилтрансфераза — каталізує синтез цитокінінів [16]. Згідно з дослідженнями Naas et al., використання *ipt*-праймерів дозволило серед агробактерій з відомими патогенними властивостями виявити 97,6 % штамів, здатних до пухлиноутворення. Штами, які виявилися *ipt*-негативними (2,4 %), були віднесені Naas et al. до штамів з обме-

женим колом рослин-хазяїв (LHR-штами, від англ. "limited host range") [13]. LHR-штами не містять ділянки *ipt*, але залишаються здатними до пухлиноутворення за рахунок інших генів Ті-плазмід, онкогенна дія яких не встановлена, і викликають захворювання лише у певних рослин-хазяїв [16]. Усі авірулентні штами агробактерій у дослідженнях Naas et al. виявлялися *ipt*-негативними [13].

Враховуючи високий відсоток штамів з патогенними властивостями, які вдається виявляти за допомогою праймерів до послідовності *ipt*, дані праймери були обрані нами для тестування штамів агробактерій. Наявність ділянки *ipt* у геномі дослідженого штаму, доведена методом ПЛР, свідчить про потенційну здатність даного штаму агробактерій до пухлиноутворення.

Виявлені *ipt*-позитивні штами були використані для зараження томатів, дисків моркви і, враховуючи первинне джерело виділення бактерій, — зелених пагонів винограду (3–4 міжвузля пагона) [15].

Пухлиноутворення на дисках моркви спостерігалось у випадку 48,7 % *ipt*-позитивних штамів агробактерій, а на томатах було відмічене лише у випадку 7,5 % досліджених штамів, що, вірогідно, пояснюється широкою розповсюдженістю серед *A. vitis* штамів з обмеженим колом рослин-хазяїв [16]. На пагонах винограду пухлини виникали у випадку 55 % досліджених штамів агробактерій. Можливо, що штами, які не ініціювали пухлиноутворення, є високоспецифічними по відношенню до рослини-хазяїна і уражують виноград певних сортів [17]. Також ймовірно, що штами, виявлені у ПЛР як *ipt*-позитивні, тобто ті, що несуть ген Ті-плазмід, відповідальний за патогенні властивості збудника, крім того, несуть плазмід IncW або IncQ - груп несумісності. Вказані плазмід пригнічують продукцію патогенними агробактеріями ауксинів і цитокінінів, тобто онкогенну здатність штаму [18]. Пухлина не утворюється.

Штам, який містить ген патогенності *ipt* і не викликає пухлиноутворення за умов експерименту, вірогідно, за інших обставин може проявити патогенні властивості. У випадку високоспецифічності штаму по відношенню до рослини-хазяїна, цілком ймовірно, що штам, який не викликав пухлиноутворення у рослин сорту, використаного для тестування агробактерій на патогенність, при колонізації рослини іншого сорту призведе до захворювання. У випадку, якщо ініціація пухлиноутворення пригнічується внаслідок взаємодії генів плазмід несумісності, можливе відновлення онкогенної здатності за втрати клітинами певних плазмід. Таким чином, тестування агробактерій на наявність *ipt*-послідовності дозволяє виявити не тільки ті штами, які викликають пухлиноутворення при тестуванні на рослинах-індикаторах, але й більш широкий спектр потенційно небезпечних штамів.

З пухлин, які утворилися на зелених пагонах винограду, нами було проведено повторне виділення штамів агробактерій на середовищі Рой і Сасера з наступним тестуванням у ПЛР. Агробактерії, які несли послідовність *ipt*, були виділені лише із 17,6 % пухлин заражених пагонів (рис. 1).

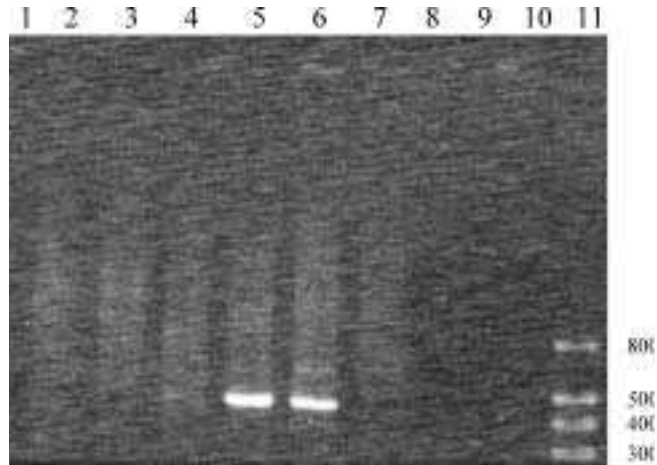


Рис. 1. Електрофорез продуктів ПЛР з культурами агробактерій, отриманих з пухлин зелених пагонів винограду: 1–3, 7–10 — негативні зразки; 5 — *ipt*-позитивний зразок патогенного штаму; 6 — контрольний патогенний штам *A. tumefaciens*; 11 — маркери молекулярної ваги (АмпліСенс, Росія).

Вірогідно, штами, раніше ідентифіковані з допомогою ПЛР як *ipt*-позитивні, втратили досліджений ген патогенності, або ж *ipt*-позитивні агробактерії були присутніми у тканинах пухлин у незначній кількості, недостатній для виявлення за допомогою методу ПЛР. Отримані результати підтверджують дані попередніх дослідників, які вказують на те, що патогенні агробактерії не завжди можна виділити з пухлин уражених рослин [4, 19]. Непатогенні штами у пухлинах превалюють [5].

Для яблуні показано, що ряд патогенних штамів *Agrobacterium*, виділених з тканин пухлини, у подальшому за вторинним експериментальним зараженням не виділяються з пухлин тестованої рослини [7]. Кількість патогенних агробактерій у даних пухлинах невелика [4], або патогени відсутні. Припускають, що поява авірулентних штамів є результатом індукованої рослиною-хазяїном втрати здатності агробактерій викликати пухлиноутворення внаслідок точкових мутацій, відповідальних за прояв патогенності [7]. Отримані нами дані вказують на вірогідність подібного процесу у різних рослин-хазяїв.

Висновки

1. Патогенні агробактерії з пухлинних тканин винограду вдається виділити не завжди;
2. Для діагностики бактеріального раку винограду доцільно поряд з тканинами пухлин аналізувати тканини лози, коренів рослини, що дозволяє мінімізувати вірогідність помилкових негативних результатів, які можуть бути отримані за тестування лише тканин пухлини.

Робота здійснювалася в рамках виконання держбюджетної теми № М/214 – 2004 за наказом Міністерства освіти і науки України № 630 від 29.07.04.

Література

1. Леманова Н. Б. Бактериальный рак винограда и способы борьбы с заболеванием. — Кишинев: Штиинца, 1988. — 98 с.
2. Зоз Н. Н., Леманова Н. Б., Чернышева З. С. и др. Проблема защиты растений от бактериального рака // Патологические новообразования у растений. Сб. научн. трудов. — Черноголовка, 1983. — С. 12–26.
3. 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.
4. Cubero J., Martinez M. C., Llop P., Lopez M. M. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours // J. Appl. Environm. Microbiol. — 1999. — V. 86. — P. 591–602.
5. Canfield M. L., Moore L. W. Isolation and characterization of opine-utilizing strains of *Agrobacterium tumefaciens* and fluorescent strains of *Pseudomonas spp.* from rootstocks of *Malus* // Phytopathology. — 1991. — V. 81. — P. 440–443.
6. Nautiyal C. S., Dion P. Characterization of the opine-utilizing microflora associated with samples of soil and plants // Appl. Environm. Microbiol. — 1990. — V. 56. — P. 2576–2579.
7. Belanger C., Canfield M., Moore L. W., Dion P. Genetic analysis of nonpathogenic *Agrobacterium tumefaciens* mutants arising in crown tumors // J. Bacteriol. — 1995. — V. 177. — P. 3752–3757.
8. Fortin C., Nester E. W., Dion P. Growth inhibition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone // J. Bacteriol. — 1992. — V. 174. — P. 5676–5685.
9. Fortin C., Marquis C., Nester E. W., Dion P. Dynamic structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmids // J. Bacteriol. — 1993. — V. 175. — P. 4790–4799.
10. Lehoczký J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines // Vitis. — 1971. — V. 10. — P. 215–221.
11. Roy M., Sasser M. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 // Phytopathology. — 1983. — V. 73. — P. 810.
12. Szegedi E., Bottká 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.
13. 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.
14. Matsumoto S., Ophel K., Skene K. G. M., Scott N. S. Partial characterization of *Agrobacterium vitis* strains // Vitis. — 1992. — V. 31. — P. 195–203.
15. Pu X.-A., Goodman R. N. Tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grapevine plants // Am. J. Enol. Vitic. — 1993. — V. 44. — P. 249–254.
16. Burr T. J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — V. 37. — P. 53–80.
17. Ferreira J. H. S., Zyl F. G. H. Susceptibility of grapevine rootstocks to strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 // S. Afr. J. Enol. Vitic. — 1997. — № 7. — P. 101–104.
18. Миклашевичюс Э., Авдиенко И. Д., Мишке И. В., Чернин Л. С. Подавление продукции цитокининов у *Agrobacterium tumefaciens* антионкогенными плазмидами IncW и IncQ-групп несовместимости // Генетика. — 1988. — Т. 24, № 2. — С. 250–258.
19. Переннихатка В. И. Биологические свойства штаммов *Agrobacterium tumefaciens* различного происхождения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / НИИ микробиол. и вирусол. им. Заболотного. — К., 1986. — 20 с.

Н. В. Лиманская, И. Д. Жунько, Б. Н. Милкус, Л. А. Конуп
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, г. Одесса, 65926, Украина

ВЫЯВЛЕНИЕ IPT-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ АГРОБАКТЕРИЙ В ТКАНЯХ ВИНОГРАДА МЕТОДОМ ПЦР

Резюме

Зеленые побеги винограда, томаты и диски моркови заражали штаммами агробактерий, для которых методом полимеразной цепной реакции было доказано наличие гена *ipt*. На томатах и моркови опухолообразование наблюдалось реже, чем на винограде. При тестировании образовавшихся опухолевых тканей винограда *ipt*-положительные агробактерии были выделены только из 17,6 % опухолей. Вероятно, большинство штаммов утратили исследуемый ген патогенности, или же *ipt*-положительные агробактерии присутствовали в тканях опухолей в незначительном количестве, недостаточном для выявления при помощи метода ПЦР.

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

N. V. Limanska, I. D. Zhunko, B. N. Milkus, L. O. Konup
Odessa National University, Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa 65026, the Ukraine

DETECTION OF PATHOGENIC AGROBACTERIA STRAINS IN GRAPEVINE TISSUES BY PCR METHOD

Summary

Green grapevine shoots, tomato plants and discs of carrot were inoculated with the agrobacteria strains. It was shown previously by the polymerase chain reaction that the given strains were *ipt*-positive. Tumor development on grapevine occurred more often than on tomato plants and carrots. The strains with *ipt* gene were revealed only in 17,6 % of newly developed tumors. The majority of the strains could lose this tumor-inducing gene, or the *ipt*-positive strains survived in tumors in a minute quantity not sufficient for PCR test.

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