

ДНК-МАРКЕРНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА В ПОСАДОЧНОМ МАТЕРИАЛЕ ВИНОГРАДА

Макаркина М.В., Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, Котляр В.К.

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

Реферат. Проведен ДНК-маркерный анализ саженцев винограда на предмет заражения патогенными агробактериями, вызывающими бактериальный рак. Показана эффективность тест-системы UF/B1R/AvR для идентификации возбудителя бактериального рака в посадочном материале.

Ключевые слова: виноград, бактериальный рак, ДНК-маркеры, ПЦР, *A. vitis*

Summary. DNA marker analysis of grape sapling to reveal the infection with pathogenic agrobacteria caused a crown gall was carried out. The effectiveness of the UF/B1R/AvR test system to identify the causative agent of crown gall in planting material is shown.

Key words: grapevine, crown gall, DNA-markers, PCR, *A. vitis*

Введение. Ткани виноградной лозы поддерживают рост многих бактерий, в том числе таких патогенов, как *Agrobacterium spp.* В частности, *Agrobacterium vitis* и некоторые штаммы *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* вызывают одно из наиболее вредоносных хронических заболеваний на виноградных растениях – бактериальный рак, проявляющийся обильными опухолевидными наростами растительной ткани. Агробактерии заражают виноградное растение в основном через повреждения, вызванные морозобоинами или прививкой. Сигнальные молекулы, высвобождаемые из разрушенной ткани растения, привлекают бактерии [1]. Процесс опухолеобразования инициируется интеграцией ДНК (трансферной ДНК или T-ДНК) возбудителя в растительный ядерный геном, что приводит к активации экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза гормонов растения.

Род *Agrobacterium* был введен в классификацию столетие назад Н.Д. Конном, который включил его в семейство *Rhizobiaceae* вместе с родом *Rhizobium*. Изначально это семейство включало в себя разные патогенные микроорганизмы [2]. Несколько лет назад, после пересмотра таксономии на основе геномных данных, вид *A. rhizogenes* был сохранен в роду *Rhizobium*, вид *A. vitis* был перенесен в род *Allorhizobium*, а несколько видов *Rhizobium* были перенесены в род *Agrobacterium*, который в настоящее время содержит 14 видов, включая виды *A. radiobacter*, *A. tumefaciens*, *A. rubi* и *A. larrymoorei* [3].

Преобладающим видом, вызывающим бактериальный рак у винограда, признан *A. vitis* [4]. Бактериальный рак распространен по всему миру, чаще встречается в странах с умеренно-континентальным климатом, где наносит значительный ущерб виноградникам. В том числе встречается на юге России, что делает борьбу с

бактериальным раком актуальной для этого региона [5]. В Краснодарском крае заболевание является экономически значимым, при этом отмечается его ежегодное прогрессирование [6]. Бактериальный рак в большинстве случаев имеет латентную форму и системный характер. Даже одно зараженное растение может послужить причиной заражения всего виноградника, что снижает плодоносность, а впоследствии может приводить к ранней гибели растений.

Молекулярные маркеры активно применяются для идентификации патогена. Первыми в мире стали использовать маркеры VIRD2A/VIRD2C и VIRD2A/VIRD2F. Они были изобретены J.H. Naas и его коллегами в 1995 году, так же, как и маркеры к онкогену *ipt* [7]. В 2001 году для идентификации штаммов *A. tumefaciens* M.A. Escobar и его коллегами были исследованы такие онкогены, как *iaaM*, и подобраны к ним тест-системы [8]. Существуют тест-системы для идентификации вирулентных генов *virC* и *virA* *Agrobacterium spp.* [9, 10], а также маркеры *pehAF/pehAR* и *PGF/PGR*, позволяющие выявлять ген *pehA*, встречающийся только у агробактерий *A. vitis* [10, 11].

В 2008 году учеными из Венгрии была предложена мультиплексная тест-система *PGF/PGR/VIRFF/VIRFR/VIRD2F/VIRD2R*, позволяющая не только определить *A. vitis*, как патогенного агента, но и провести дифференциацию по типу Ti-плазмиды – октопиновые/нопалиновые или витопиновые [12]. Также были разработаны тест-системы для выявления конкретных генов, определяющих синтез соответствующих опинов: *OCTF/OCTR*, *NOPF/NOPR*, *NF/NR*, *TF/TR*, *SF/SR* и *VisF/VisR*, успешно используемые для изучения разнообразия агробактерий [12-15]. В 2006 году польскими учеными была сконструирована мультиплексная тест-система *UF/B1R/B2R/AvR/ArR*, с помощью которой можно идентифицировать агробактерий сразу четырех видов – *A. tumefaciens*, *A. vitis*, *A. rhizogenes* и *A. rubi* [16].

ДНК-маркерный анализ используется для идентификации бактериального рака в посадочном материале, предоставляя достаточно точный и быстрый результат. Однако патогенные агробактерии обладают высокой генетической вариабельностью, в связи с чем на данный момент нет единой универсальной тест-системы для их диагностики.

Цель работы – идентификация возбудителя бактериального рака в латентно-зараженном посадочном материале винограда различными ДНК-маркерами.

Объекты и методы исследований. Объектом исследования выступали виноградные саженцы сортов «Каберне Совиньон» и «Саперави», предположительно зараженные бактериальным раком в латентной стадии (без видимых симптомов). Для молекулярно-генетических анализов было отобрано 4 образца – по два образца с каждого сорта. ДНК выделяли из древесины и почек модифицированным методом ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид) с добавлением поливинилпирролидона, поперечно сшитого (ПВП) на этапе гомогенизации.

Анализ ДНК осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Использовали различные ДНК-маркерные тест-системы, рекомендованные для идентификации возбудителя бактериального рака – *VIRD2A/VIRD2C*, *PGF/PGR/VIRFF/VIRFR/VIRD2F/VIRD2R* и *UF/B1R/AvR*, ранее апробированные нами [7, 12, 16-18]. В качестве положительных контролей в работу были включены имеющиеся в коллекции ФГБНУ СКФНЦСВВ образцы ДНК *A. tumefaciens* и *A. vitis*; отрицательным контролем выступала ПЦР смесь, не включающая в себя ДНК.

Обсуждение результатов. Были проанализированы образцы ДНК, выделенные из древесины и почек саженцев сортов «Каберне Совиньон» и «Саперави», на предмет заражения инфекцией бактериального рака различными ДНК-маркерными тест-системами – PGF/PGR/VIRFF/VIRFR/VIRD2F/VIRD2R, VIRD2A/VIRD2C, UF/B1R/AvR (рис. 1-3).

Первой тест-системой для изучения образцов ДНК была PGF/PGR/VIRFF/VIRFR/VIRD2F/VIRD2R. Она выбрана нами как основная в предыдущих исследованиях, так как определяет агробактерии *A. vitis* с различными типами Ti-плазмид в одной реакции [17, 18]. Однако, выполненный ПЦР-анализ с данными маркерами выявил только едва заметный фрагмент в образце под номером 1 в диапазоне между 300 и 400 п.н. (см. рис. 1).

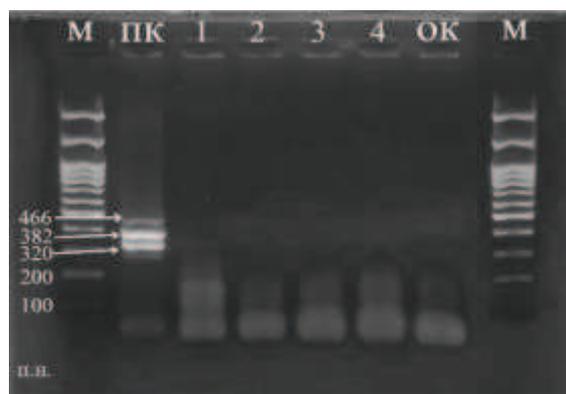


Рис. 1. Результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов тест-системой PGF/PGR/VIRFF/VIRFR/VIRD2F/VIRD2R (целевые фрагменты 466, 382 и 320 п. н.).

М – маркер молекулярного веса; ПК – положительный контроль (ДНК *A. vitis*); 1-4 – анализируемые образцы ДНК (1, 2 – из саженцев сорта «Каберне Совиньон»; 3, 4 – из саженцев сорта «Саперави»); ОК – отрицательный контроль

Было принято решение проверить исследуемые образцы на наличие *A. tumefaciens*. Тест-система VIRD2A/VIRD2C идентифицирует высококонсервативный участок *virD2* гена, встречающийся у большинства агробактерий, и долгое время она считалась универсальной для диагностики инфекции бактериального рака. Однако, стала появляться информация, что большинство штаммов *A. vitis* данная тест-система не идентифицирует, а выявляет в основном *A. tumefaciens*.

Проведенный ДНК-анализ с использованием VIRD2A/VIRD2C в нашем случае выявил четкие фрагменты, однако не в целевом диапазоне, в трех из четырех исследуемых образцов (см. рис. 2). Следует отметить, что подобные результаты были получены нами ранее, при изучении разнообразия агробактерий, паразитирующих на территории Краснодарского края, и из этого можно предположить, что данная картина характерна для штаммов *A. vitis*. Однако похожей информации в литературных источниках мы не находили.

Чтобы подтвердить или опровергнуть наличие инфекции бактериального рака, исследуемые образцы были проанализированы мультиплексной видоспецифической тест-системой UF/B1R/AvR, позволяющей идентифицировать патогенных агробактерий сразу двух видов – *A. vitis* и *A. tumefaciens* в одной реакции. Целевые фрагменты размером 478 п. н. выявлены в трех из четырех исследуемых об-

разцов ДНК, что свидетельствует о наличии инфекции бактериального рака, вызванной *A. vitis*; *A. tumefaciens* не выявлен ни в одном из изученных образцов с помощью данной тест-системы.



Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов тест-системой VIR2A/VIR2C (целевой фрагмент 225 п. н.). М – маркер молекулярного веса; ПК – положительный контроль ДНК *A. tumefaciens*; 1-4 – анализируемые образцы ДНК (1, 2 – из саженцев сорта «Каберне Совиньон»; 3, 4 – из саженцев сорта «Саперави»); ОК – отрицательный контроль

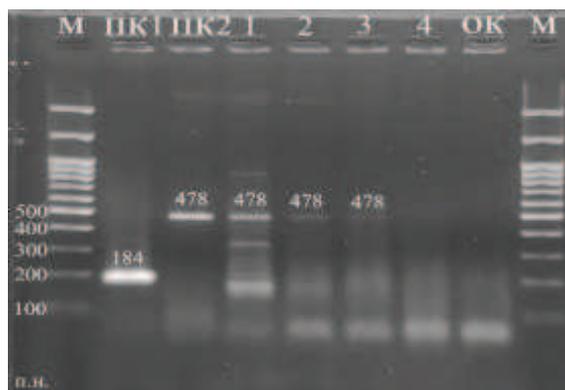


Рис. 3. Результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов тест-системой UF/B1R/AvR (целевые фрагменты 184 и 478 п. н.). М – маркер молекулярного веса; ПК1 – положительный контроль (ДНК *A. tumefaciens*); ПК2 – положительный контроль (ДНК *A. vitis*); 1-4 – анализируемые образцы ДНК (1, 2 – из саженцев сорта «Каберне Совиньон»; 3, 4 – из саженцев сорта «Саперави»); ОК – отрицательный контроль

Выводы. Проведено молекулярно-генетическое исследование виноградных саженцев на предмет заражения агробактериальной инфекцией с применением трех наборов ДНК-маркеров, рекомендованных для диагностики бактериального рака. В трех образцах из четырех исследуемых было выявлено наличие инфекции бактериального рака, вызванной агробактериями *A. Vitis*, с помощью мультиплексной тест-системы UF/AvR/B1R.

Литература

1. Диагностика бактериального рака винограда с использованием молекулярно-генетических методов / М.В. Макаркина [и др.] [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2016. № 41(5). С. 142-151. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/16/05/14.pdf>. (дата обращения: 03.11.2020).

2. Conn H.J. Validity of the genus *Alcaligenes* // J. Bacteriol., 1942. № 44. С. 353-360.
3. Flores-Félix J. D., Menéndez E., Peix A., García-Fraile P., Velázquez E. History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium* // Systematic and Applied Microbiology. 2020 №43(1). P. 126-146.
4. Burr T.J., Bazzi C., Süle S., Otten L. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies // Plant Disease. 1998. Vol. 82(12). P. 1288-1297.
5. Егоров Е.А., Шадрина Ж.А., Кочьян Г.А. Научное обеспечение развития виноградарства и виноделия в Российской Федерации: проблемы и пути решения // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. 2015. № 32 (2). С. 22-36. Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/02/03.pdf>.
6. Юрченко Е.Г., Курило П.В. Причины распространения бактериального рака винограда в ампелоценозах Западного Предкавказья и возможность использования биологических средств защиты для снижения его вредоносности [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2011. № 8(2). С. 96-108. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/11/02/11.pdf>. (дата обращения: 03.11.2020).
7. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Applied and environmental microbiology. 1995. №61(8). С. 2879-2884.
8. Escobar M.A., Civerolo, E.L., Summerfelt K.R., Dandekar, A.M. (2001). RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. № 98(23). С. 13437-13442.
9. Suzaki K., Yoshida K., Sawada H. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers // Journal of General Plant Pathology. 2004. Т. 70. № 6. С. 342-347.
10. Eastwell K.C., Kenneth C., Willis G. L., Cavileer D.T. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction // Plant Disease. 1995. Т. 79. №8. С. 822-827.
11. Herlache T.C., Hotchkiss A.T., Burr T.J., Collmer A. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologous enzymes from *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. N 1. P. 338-346.
12. Bini F., Kuczmog A., Putnoky P., Otten L., Bazzi C., Burr T.J., Szegedi, E. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens* // Vitis. 2008. №47(3). С. 181-189.
13. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // Vitis. 2002. №. 41(1). С. 37-42.
14. Szegedi E., Bottka S., Mikulás J., Otten L., Sule S. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine // Vitis. 2005. Vol. 44. N 1. P. 49-54.
15. Canaday J., Gerard J.C., Crouzet P., Otten L. Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4 // Mol. Gen. Genet. 1992. Vol. 235. N 2-3. P. 292-303.
16. Puławska J., Willems A., Sobiczewski P. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR // Systematic and Applied Microbiology. 2006. Т. 29. №. 6. С. 470-479.
17. Макаркина М.В., Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В. ПЦР-идентификация патогенных агробактерий, выявленных на виноградниках Краснодарского края, по типу содержащихся в них Ti-плазмид // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2019. Т. 74. № 1. С. 50-58.
18. Макаркина М.В., Ильницкая Е.Т. Аprobация различных ДНК-маркерных тест-систем для идентификации возбудителя бактериального рака винограда // Виноградарство и виноделие. 2019. Т. 48. С. 36-38.