

Коротаєва Н.В., Ліманська Н.В.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
Шампанський провулок, 2, Одеса 65058, Україна

ВИЯВЛЕННЯ ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ *RHIZOBIUM VITIS* НА ВИНОГРАДНИКАХ ПІВДНЯ УКРАЇНИ

Встановлено, що загальна чисельність мікробіоти пухлинних тканин винограду складала від $(2,3 \pm 0,8) \times 10^3$ до $(7,3 \pm 0,4) \times 10^5$ КУО/г. Кількість бактерій роду *Rhizobium* коливалася від $(1,2 \pm 0,2) \times 10^2$ до $(2,1 \pm 0,2) \times 10^4$ КУО/г залежно від дослідженої рослини. Визначено, що незначний відсоток (3,1 – 4,9%) штамів є онкогенними. Виділено нові патогенні штами (*R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 та *R. vitis* ONU390), які мають плазмідні гени патогенності *virC*, *ipt* та *virD*₂.

Ключові слова: *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, виноградики, південь України, бактеріальний рак.

Дослідження бактерій, пов'язаних із виноградом, фокусуються переважно на збудниках захворювань, таких, як бактеріальний рак рослин, що спричиняється *Rhizobium vitis*, а іноді онкогенними штамми *Rhizobium radiobacter* [2]. Корончатий гал є одним із небезпечних та розповсюджених захворювань винограду. Від наслідків цієї хвороби економічно найбільш страждають країни з розвинутим виноградарством та виноробством [15].

Ключовим моментом у циклі розвитку бактеріального раку є систематичне виживання *R. vitis* у рослинах винограду. У 1968 р. *Lehoczky J.* вперше показано, що збудник корончатого галу виживає та розповсюджується по ксилемі винограду, що провокує виникнення пухлин за різних ушкоджень тканин рослини [9]. У дослідженнях *Jager J. et al.* (1989) показано, що *R. vitis* зберігаються у шарі тканини, яка знаходиться безпосередньо під корою [7]. Також онкогенні *R. vitis* можуть потрапити у ґрунт із залишками лози хворої рослини, де зберігаються, як сапрофіт, протягом декількох років [3]. *Martins G. et al.* (2013) вивчали екосистему двох виноградників. За допомогою аналізу послідовності 16S РНК встановлено наявність бактерій *R. vitis* та *R. radiobacter* у корі винограду та ґрунті [10].

Метою даної роботи було вивчення чисельності ризобій у тканинах пухлин із виноградників півдня України та виявлення патогенних штамів *R. vitis*.

Матеріали і методи. Матеріалом дослідження слугували тканини пухлин, відібрані з рослин винограду сорту Каберне Совіньон з двох господарств Одеської та Миколаївської областей. Усього досліджено по 10 зразків пухлин з кожного виноградника.

Відбирали пухлини, які утворилися на місці щеплення та на штампі біля основи куща. Пухлини ретельно мили під проточною водою, ополіскували стерильною дистильованою водою, після чого бактерії з пухлин виділяли двома способами.

Для підрахунку чисельності ризобій тканини новоутворень розтирали у стерильній дистильованій воді, потім суспензії, що отримали, висівали на середовище Рой і Сасера [1, 11]. Посіви культивували впродовж 5 днів за температури 28 °С.

Для підрахунку загальної чисельності бактерій здійснювали висіви з серійних розведень суспензій із розтертих пухлин на середовище LB. Культивували 24 години за температури 28 °С.

Результати дослідів обраховували за допомогою статистичного пакету Microsoft Word Excel. Чисельність бактерій виражали як середнє значення з 5 повторностей із конфіденційним інтервалом на рівні 95 %.

Для виділення патогенних ризобій великі пухлини подрібнювали на фрагменти розмірами 5x5 мм і поміщали зрізами донизу на тверде середовище Рой і Сасера [1, 11]. Колонії *R. vitis* виростали під фрагментами пухлини.

Колонії ризобій виявляли за характерною для них морфологією: розмір 3–5 мм у діаметрі, слизові, білі, мають рожеву середину за рахунок відновлення тетразоліумхлориду, доданого у середовище. З колоній здійснювали пересів на скошений картопляний агар і накопичену біомасу використовували для виділення ДНК.

© Н.В. Коротаєва, Н.В. Ліманська, 2015

Патогенні штами ризобій виявляли методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для тестування в ПЛР використовували одно-дводобові культури бактерій, які виростили на картопляному агарі [5]. ДНК виділяли методом теплового лізису бактеріальних суспензій згідно з J. Naas et al. [5] і E. Szegedi and S. Bottka [13]. Для цього до бактеріальної суспензії концентрацією 10^8 кл/мл додавали азид натрія (0,25 %) і Тритон X-100 (1 %). Надалі суспензії прогрівали 10 хв за температури 95 °С, центрифугували 5 хв при 5700g. Надосадову рідину, яка містила ДНК, в об'ємі 5 мкл вносили до реакційної суміші для ПЛР як зразок. Використовували реакційну суміш та протокол проведення ПЛР згідно з методикою, запропонованою J. Naas et al. [5].

У роботі використовували праймери до ділянок генів ізопентенилтрансферази *ipt*, ендонуклеази *virD₂* [5] та генів вірулентності *virC* Ті-плазмиди [13] (таб. 1).

Ампліфікацію проводили на термальному циклері «MyCycler» (BioRad, США).

Методом ПЛР було досліджено 41 ізолят з виноградику Одеської області і 32 ізоляти з виноградику Миколаївської області.

Таблиця 1

Праймерні послідовності, використані у роботі

Назва	Послідовність	Довжина амплікона	Температура відпалу	Автор
<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'	427 п.о.	50-54 °С	Haas et al., 1995
<i>virD₂</i> (A/C ⁺)	5' – ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT - 3' 5' – TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA - 3'	224 п.о.	50-54 °С	Haas et al., 1995
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.	414 п.о.	52 °С	Suzaki et al., 2004
VCF ^b / VCR ^b	5' – ATC ATT TGT AGC GAC T - 3' 5' – AGC TCA AAC CTG CTT C - 3'	730 п.о.	52 °С	Suzaki et al., 2004

За позитивний контроль слугував патогенний штам *Rhizobium radiobacter* C58 (*штам було люб'язно надано доктором біологічних наук Ф.І. Товкачем*).

Облік результатів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу. Для цього готували 1,5 % агарозний гель у трисборатному буфері (ТБЕ). Гелеву платівку забарвлювали окремо після завершення електрофорезу бромистим етидієм (0,5 мкг/мл). Результати ПЛР враховували за наявності поодиноких ампліконів певних розмірів (табл. 1).

Гель фотографували в ультрафіолетовому світлі за допомогою відеосистеми “GelDoc” (BioRad, США). Використовували маркери молекулярної маси pBR322 DNA/Alul Marker, 20 та pUC19 DNA / MspI (Hpa II) Marker, 23 (Fermentas, Литва).

Результати та їх обговорення. Загальна чисельність усіх представників мікробіоти пухлин, що здатні до росту на середовищі LB, складала від $(2,3 \pm 0,8) \times 10^3$ до $(7,3 \pm 0,4) \times 10^5$ КУО/г (табл. 2).

Така різниця могла бути обумовлена різним станом досліджуваних рослин. У рослин, де вже спостерігали здерев'яніння пухлинної тканини внаслідок старіння, а також підсихання через посушливу погоду, чисельність мікроорганізмів у внутрішніх тканинах пухлин була меншою. Таких рослин було більше у господарстві Миколаївської області, отже саме тому у зразках, відібраних на даному виноградику, загальна чисельність мікробіоти була менше на 1-2 порядки від такої на виноградику Одеської області, де пухлини були більш молодими.

Відомо, що чисельність *Rhizobium* у пухлинах рослин складає від 10^2 кл/г до 10^4 кл/г, а загальна чисельність представників мікробіоти зазвичай сягає 10^4 кл/г – 10^5 кл/г [2]. Як ми бачимо у табл. 2, щільність популяцій ризобій у дослідних зразках складала 10^2 – 10^4 КУО/г.

З літературних даних відомо, що переважна більшість ризобій у пухлинних тканинах є авірулентними [2]. Відрізнити патогенні та непатогенні штами можна було за допомогою ПЛР-аналізу.

Загальна чисельність гетеротрофних бактерій (КУО/г) та ризобій (КУО/г)
у тканинах пухлин винограду

№	Господарство Одеської області		Господарство Миколаївської області	
	Загальна чисельність бактерій	Ризобії	Загальна чисельність бактерій	Ризобії
1	$(1,8 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,2 \pm 0,1) \times 10^3$	$(0,8 \pm 0,1) \times 10^2$
2	$(2,8 \pm 1,1) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^3$	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^2$
3	$(3,2 \pm 0,9) \times 10^5$	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^4$	$(4,8 \pm 0,3) \times 10^5$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^2$
4	$(7,3 \pm 0,4) \times 10^5$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,2 \pm 1,1) \times 10^5$	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^3$
5	$(5,4 \pm 0,8) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^4$	$(3,4 \pm 1,1) \times 10^5$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^2$
6	$(2,1 \pm 0,7) \times 10^5$	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^4$	$(2,3 \pm 0,8) \times 10^3$	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^2$
7	$(6,2 \pm 1,7) \times 10^5$	$(2,1 \pm 0,4) \times 10^3$	$(3,4 \pm 1,7) \times 10^5$	$(1,5 \pm 0,5) \times 10^2$
8	$(4,2 \pm 2,1) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,2 \pm 0,5) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^2$
9	$(5,8 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,8 \pm 0,3) \times 10^4$	$(4,0 \pm 0,8) \times 10^5$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^2$
10	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(6,1 \pm 0,4) \times 10^5$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^3$

У ролі первинних праймерів для виявлення патогенності досліджуваних штамів за даними літератури було рекомендовано використовувати праймери до послідовності *virC* [7]. Продукти генів *virC* беруть участь у вирізанні Т-ДНК з Ті-плазмиди і володіють здатністю стимулювати цей процес. Праймери VCF3/VCR3 [14] було обрано через те, що вони були визнані кращими для виявлення патогенних *R. vitis* і *R. radiobacter* згідно з дослідженням Kumagai et al. [7]. Надалі проводили ПЛР з праймерами *virD*₂, специфічними для ДНК патогенних *R. radiobacter*; *R. vitis* та *R. rhizogenes*, і з праймерами *ipt*, що не зв'язуються з ДНК виду *R. rhizogenes*, який не являє загрози для винограду [1].

Серед 41 ізолята, виділеного із зразків, відібраних із винограднику Одеської області, патогенними виявилися 2 штами (*R. vitis* ONU388 та *R. vitis* ONU389 – 4,9 % від кількості усіх штамів), а серед 32 ізолятів, що утворювали ризобієподібні колонії, відібраних із рослин винограднику Миколаївської області, – 1 штама (*R. vitis* ONU390 – 3,1 % від кількості усіх досліджених штамів) (рис. 1).



Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами VCF3/ VCR3 до послідовності гена *virC*: 1, 2, 4, 6-11 – ДНК непатогенних ізолятів; 3 – ДНК штаму *R. vitis* 390; 5 – ДНК контрольного штаму *R. radiobacter* C58; М – маркери молекулярної маси (908 п.о.; 659 п.о.; 521 п.о.; 403 п.о.; 281 п.о.; 257 п.о.; 226 п.о.; 100 п.о.; 90 п.о.).

Одержані результати збігаються 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 [2].

У подальшому патогенні штами тестували у ПЛР з використанням праймерів до послідовностей гена *ipt*, гена *virC* (праймери VCF^b3/VCR^b3) та *virD*₂ плазмиди патогенності (рис. 2).

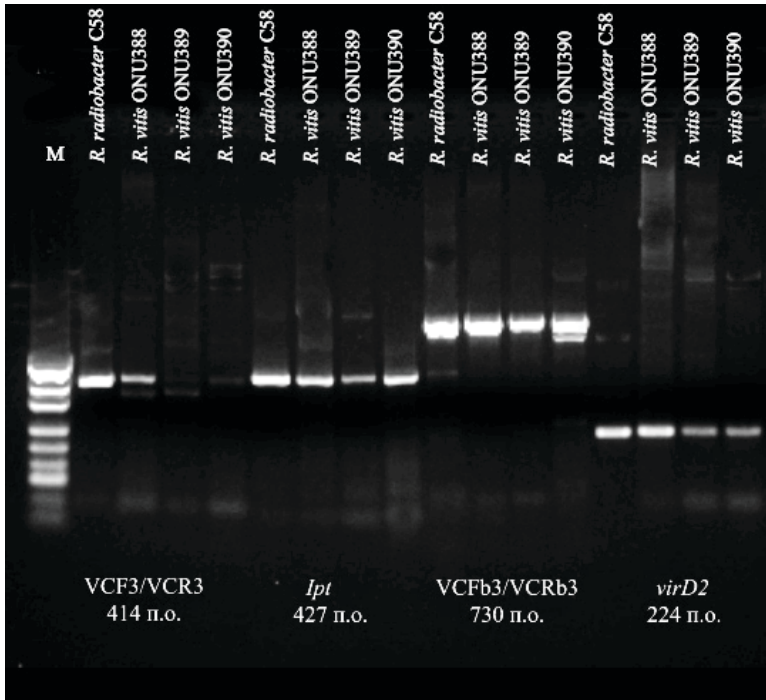


Рис. 2. Электрофореграма продуктів ПЛР штамів *R. radiobacter* C58, *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 та *R. vitis* ONU390 з праймерами до послідовностей генів *virC*, *virD₂* та *ipt*: М – маркери молекулярної маси (501 п.о.; 404 п.о.; 331 п.о.; 242 п.о.; 190 п.о.; 147 п.о.; 111 п.о.; 110 п.о.; 67 п.о.).

Дослідження показали, що штами *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 та *R. vitis* ONU390, крім фрагмента гена *virC* Ті-плазміді, несли у геномі такі послідовності, властиві патогенним штамом: ген *virD₂*, який кодує сайт-специфічну ендонуклеазу, що відповідає за утворення одноланцюгової Т-ДНК [15], та ген *tmr* (*ipt*) – ізопентенилтрансферази, відповідального за синтез цитокинінів у рослинних клітинах, внаслідок чого відбувається неконтрольована проліферація рослинних клітин і утворення корончатого галу [15].

У результаті проведеної роботи було встановлено, що загальна чисельність мікробиоти пухлинних тканин винограду складала від $(2,3 \pm 0,8) \times 10^3$ до $(7,3 \pm 0,4) \times 10^5$ КУО/г. Показано, що кількість бактерій роду *Rhizobium* у пухлинних тканинах коливалася від $(1,2 \pm 0,2) \times 10^2$ до $(2,1 \pm 0,2) \times 10^4$ КУО/г залежно від дослідженої рослини. Визначено, що патогенні штами *R. vitis* склали незначну частку (3,1–4,9%) від кількості штамів ризобій, виділених із пухлинних тканин, та виявлено у геномах досліджених штамів плазмідні гени патогенності *virC*, *ipt* та *virD₂*.

Коротяева Н.В., Лиманская Н.В.

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова
Шампанский переулок, 2, Одесса, 65058, Украина

ВЫЯВЛЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *RHIZOBIUM VITIS* НА ВИНОГРАДНИКАХ ЮГА УКРАИНЫ

Резюме

Установлено, что общая численность микробиоты опухолевых тканей винограда составляла от $(2,3 \pm 0,8) \times 10^3$ до $(7,3 \pm 0,4) \times 10^5$ КОЕ/г. Количество бактерий рода *Rhizobium* колебалось от $(1,2 \pm 0,2) \times 10^2$ до $(2,1 \pm 0,2) \times 10^4$ КОЕ/г в зависимости от исследуемого растения. Выявлено, что незначительный процент (3,1–4,9%) штаммов являются онкогенными. Выделены новые патогенные штаммы (*R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 и *R. vitis* ONU390), которые несут плазмидные гены патогенности *virC*, *ipt* и *virD₂*.

Ключевые слова: *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, виноградники, юг Украины, бактериальный рак.

DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA *RHIZOBIUM VITIS* IN VINEYARDS OF THE SOUTH OF UKRAINE

Summary

The total number of microbiota from grape crown gall tissues ranged from $(2,3 \pm 0,8) \times 10^3$ to $(7,3 \pm 0,4) \times 10^5$ CFU/g. The amount of bacteria from *Rhizobium* genus reached from $(1,2 \pm 0,2) \times 10^2$ to $(2,1 \pm 0,2) \times 10^4$ CFU/g depending on a tested plant. It was found out that only a small percentage of the strains (3,1 – 4,9%) were oncogenic. New pathogenic strains (*R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 and *R. vitis* ONU390) possessing plasmid genes of pathogenicity *virC*, *ipt* and *virD₂* were isolated.

Key words: *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, vineyards, the south of Ukraine, crown gall.

1. Лиманська Н.В., Серков С.А., Сергеева Ж.Ю., Іваниця В.О. Виявлення штамів *Rhizobium vitis* і *R. radiobacter* методом ПЛІП з використанням праймерів до різних послідовностей геному // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – 2, № 14. – С. 48–55.
2. Belanger C., Canfield M., Moore L.W., Dion P. Genetic analysis of nonpathogenic *Agrobacterium tumefaciens* mutants arising in crown tumors // J. Bacteriol. – 1995. – 177, № 13. – P. 3752–3757.
3. Burr T.J., Bazzi C., Süle S., Otten L. Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies // Plant Disease. – 1998. – 82, № 12. – P. 1288–1297.
4. Cubero J., Lastra B., Salcedo C.I., Piquet J., Lopez M.M. Systemic movement of *Agrobacterium tumefaciens* in several plant species // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – 101. – P. 412–421.
5. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. – 1995. – 61, № 8. – P. 2879–2884.
6. Jager J., Lorenz D., Plapp R., Eichhorn K.W. Latent occurrence of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in grapevine (*Vitis vinifera* L.) // Vitic. Enol. Sci. – 1989. – 44. – P. 14–20.
7. Kumagai L., Fabritius A.–L. Detection and differentiation of pathogenic *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* in grapevine using multiplex Bio-PCR // 2nd Annual National Viticulture Research Conference (Davis, University of California, 9 – 11 July 2008): Proc. – Davis: 2008. – P. 42–43.
8. Kuzmanović N., Katarina Gašić, Ivanović M., Anđelka Prokić and Obradović A. Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia // Arch. Biol. Sci. – Belgrade. – 2012. – 64, № 4. – P. 1487–1494.
9. Lehoczyk J. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection // Phytopath. – 1968. – 63, №3. – P. 239–246.
10. Martins G., Lauga B., Miot-Sertier C., Mercier A., Lonvaud A., et al. Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations // PLoS ONE 8(8): e73013. doi:10.1371/journal.pone.0073013. – 2013.
11. Roy M., Sasser M. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 // Phytopathology. – 1983. – 73. – P. 810.
12. Sawada H., Ieki H., Matsuda I.I. PCR Detection of *Ti* and *Ri* plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – 61, № 2. – P. 828–831.
13. Szegedi E., Bottka S., Mikulás J., Otten L., Sule S. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine // Vitis. – 2005. – 44, № 1. – P. 49–54.
14. Suzuki K., Yoshida K., Sawada H. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers // J. Gen. Plant Pathol. – 2004. – 70. – P. 342–347.
15. Tzfira T., Citovsky V. *Agrobacterium*: From Biology to Biotechnology. – Springer, 2008. – P. 396–425.

Отримано 25.09.2014