

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.64

ПЦР-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ АГРОБАКТЕРИЙ, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ВИНОГРАДНИКАХ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ, ПО ТИПУ СОДЕРЖАЩИХСЯ В НИХ Ti-ПЛАЗМИД**М.В. Макаркина*, Е.Т. Ильницкая, С.В. Токмаков***Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Россия, 350901, г. Краснодар, ул. имени 40-летия Победы, д. 39***e-mail: konec_citatu@mail.ru*

Agrobacterium vitis и некоторые штаммы *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* вызывают опасное хроническое заболевание на виноградных растениях — бактериальный рак. С использованием молекулярно-генетического метода проведена работа по идентификации и изучению разнообразия патогенных агробактерий, вызывающих бактериальный рак на виноградниках Краснодарского края. В качестве материала использовали 76 образцов молодых и одревесневших опухолевидных наростов бактериального рака винограда, собранных с растений в четырнадцати виноградарских хозяйствах Краснодарского края и имеющих различное происхождение посадочного материала (Италия, Франция, Австрия, Сербия, Болгария, Россия). Во всех исследуемых образцах, по данным ДНК-анализа с помощью тест-системы PGF/PGR, идентифицировано присутствие *A. vitis*. При изучении разнообразия агробактерий по типу содержащихся в них Ti-плазмид определены 4 группы, содержащие Ti-плазмиды: октопинового (59,5%), октопин/витопинового (13,5%), витопинового (13,5%) и нопалинового (13,5%) типов. На основе полученных данных сделан вывод, что на виноградниках Краснодарского края бактериальный рак винограда вызывается агробактериями *A. vitis*, преимущественно октопинового типа.

Ключевые слова: *Agrobacterium vitis*, бактериальный рак винограда, полимеразная цепная реакция, Ti-плазмида, типы опинов, тест-системы

Бактериальный рак винограда — хроническое заболевание виноградной лозы, возбудителем которого являются бактерии рода *Agrobacterium* spp. Агробактерии вызывают заболевание, если обладают крупной Ti- или Ri-плазмидой (от 200 до 800 тыс. п.н.) [1]. Визуально поражённые кусты определяются по опухолевидным наростам растительной ткани. Опухолеобразование инициируется интеграцией переданной ДНК в растительный ядерный геном, что приводит к активации экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза гормонов растения. Выработка огромного количества гормонов роста (ауксинов и цитокининов) приводит к неуправляемому делению и росту зараженных клеток растения, из которых образуется опухолевидный нарост. Особенностью протекания заболевания является наличие латентной стадии, что способствует

распространению возбудителя бактериального рака при заготовке посадочного материала с визуально здоровых растений [2, 3].

Систематика видов *Agrobacterium* spp. неоднократно пересматривалась. Исследования Керр и Панагопулос, а также результаты биохимических и ДНК-тестов, проведенных Офель и Керр, показали, что *Agrobacterium* spp., выделенные из виноградной лозы, образуют отдельную группу и отличаются от изолятов, выделенных из других растений (плодовых, ягодных и некоторых цветочных) [4, 5]. Долгое время была принята номенклатура, основывающаяся на классификации *Agrobacterium* spp. по биотипам: биотип-1, биотип-2 и биотип-3 — соответственно, *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* и *A. vitis* [4, 5]. Однако Мусави и др. по данным мультилокусного секвенирования (MLSA) доказали, что вид *A.*

vitis отличается от *Agrobacterium* и предложили его перенести в род *Allorhizobium* [6]. На то, что *A. vitis* не принадлежит к роду *Agrobacterium*, указывают и Рамирес-Вахена и др. [7]. Эти авторы определили, что члены рода *Agrobacterium* характеризуются наличием линейной хромосомы рядом с круговой хромосомой. В отличие от генома *Agrobacterium* spp. основным геном *A. vitis* состоит из двух круговых хромосом [8].

Онкогенные виды *Agrobacterium* классифицируют по типу бактериального рака, индуцируемого ими. Так агробактерии (*A. rhizogenes*), паразитирующие на корнях, обладают Ri-плазмидой и вызывают болезнь называемую «бородатые корни», а агробактерии (*A. tumefaciens*, *A. vitis*) имеют в своем составе Ti-плазмиду и вызывают опухолеобразования (корончатые галлы) на корнях и надземных частях растения. Ti-/Ri-плазмиды агробактерий различаются по типу синтезируемых ими опинов. Одна плазида не всегда индуцирует только один определенный тип опинов, чаще — несколько типов опинов в различных комбинациях связаны с единичной Ti-/Ri-плазмидой. *A. vitis* преимущественно синтезируют нопалин, витопин или октопин и редко — другие типы опинов [9].

Точная идентификация опухолегенных агробактерий — принципиальный вопрос по причине их большого разнообразия. Особенно это важно для вирулентных штаммов. Первые значимые результаты ПЦР-идентификации агробактерий опубликованы в 1995 г. Тогда были предложены универсальные маркеры для выявления патогенных агробактерий [10]. Далее последовала серия работ, направленных на точную видовую, а позже и штамм-специфичную идентификацию агробактерий. Были разработаны тест-системы для *Agrobacterium* spp. [11–14], *A. tumefaciens* и *A. vitis* [15–19]. Созданы ДНК-маркеры и для выявления различий агробактерий по типу содержащихся в них Ti-плазмид. Для идентификации изолятов, содержащих Ti-плазмиды октопинового, нопалинового и витопинового типа, были разработаны тест-системы детекции генов, определяющих синтез соответствующих опинов (OCTF/OCTR, NOPF/NOPR, VisF/VisR) [15, 20, 21]. Также были сконструированы праймеры (TF/TR, NF/NR, SF/SR) к последовательностям гена *bb*, который полиморфен в изолятах с различным типом Ti-плазмиды (октопиновой, нопалиновой и витопиновой) [15, 22]. В результате совместной работы итальянских и немецких ученых были разработаны ДНК-маркеры, позволяющие разделять штаммы *A. vitis* на две подгруппы по типу плазмид (октопин/нопалиновые и

витопиновые), основываясь на нуклеотидной последовательности гена *virD2* [23].

В настоящее время в разных районах виноградарства проводится изучение патогенных агробактерий. Турецкие ученые исследовали биоразнообразие агробактерий на виноградниках Турции в Центральной Анатолии [24]. Преобладающий вид онкогенных агробактерий, выделенных из опухолевидных наростов растений — *A. vitis*. Генетическое разнообразие изолятов оценивали путем сравнения ДНК-фингерпринтов межгенной спейсерной области гена 16S-23S рибосомальной ДНК, а также с использованием тест-систем к генам агробактерий *pehA*, *virA* [16]. Выделились две основные группы: содержащие Ti-плазмиду октопинового типа и нопалин/витопиновую Ti-плазмиду. В Словении из 80 изолятов *Agrobacterium* spp., отобранных в ходе фитопатологического исследования в 2006 г. [25], 75 изолятов были идентифицированы как *A. vitis*, 5 — как *A. tumefaciens* с помощью тест-системы к гену *pehA* [16] и мультиплексного ПЦР-анализа [12], позволяющему определять патогенные агробактерии, относящиеся к 3 видам — *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* и *A. vitis*. Изучение в Болгарии биоразнообразия агробактерий [26], выделенных из виноградной лозы, почвы и опухолей растений, проводили с помощью четырех тест-систем (PGF/PGR [17], *virD2A/virD2C* [10], *virE2PF/virE2PR* [27] и *visF/visR* [20, 21]) к генам *A. vitis* и *A. tumefaciens*. Из 75 опухолегенных образцов большинство (88 %) было идентифицировано как *A. vitis* и некоторое количество (12 %) — как атипичные изоляты *A. tumefaciens*. На виноградной лозе в Египте было выделено 12 изолятов агробактерий [28]. Генетическое разнообразие оценивали, используя мультиплексный ПЦР-анализ с тремя специфичными парами праймеров к генам *pehA*, *virF* и *virD2* [15]. Изоляты были разделены на три основные группы в зависимости от типа Ti-плазмиды — октопиновые, витопиновые и октопин-витопиновые. Так как ни один из изолятов не принадлежал к нопалиновому типу, авторы сделали предположение, что в египетских штаммах *A. vitis* отсутствует Ti-плазида этого типа. Исследование биоразнообразия *A. vitis* на виноградниках Вожводинской провинции Сербии проводили с помощью маркеров к гену *virC* [14], локализованному на Ti-/Ri-плазмидах, а также идентифицировали виды агробактерий с помощью универсальных маркеров [12]. Всего было определено пять штаммов, для которых подтвердили их патогенность и принадлежность к виду *A. vitis* [29]. На виноградниках в Иране также изучалось разнообразие агробактерий. В работе использовали маркеры к генам *virD2*,

pehA и к опинсинтазным генам (*OCT*, *NOP*, *Vis*). Из 105 собранных образцов 77 были идентифицированы как *A. vitis*, а 28 — как *A. tumefaciens*, 49 образцов были отнесены к штаммам октопиного типа, 35 — к витопиновому типу и 8 — к нопалиновому типу [30].

Актуальность изучения биоразнообразия агробактерий в различных зонах виноградарства определяется не только фундаментальными целями, но и практическим значением подобных работ для разработки биологических методов контроля развития бактериального рака, так как известен ряд штаммов-антагонистов, сдерживающих развитие опухолей, вызываемых определенными штаммами [31]. Таким образом, анализируя информацию о наличии тех или иных видов и штаммов в исследуемой зоне, можно подобрать соответствующие штаммы-антагонисты для борьбы с бактериальным раком. В настоящее время использование штаммов-антагонистов является перспективным направлением борьбы с бактериальным раком винограда.

В Краснодарском крае расположены основные площади промышленных виноградников Российской Федерации. Тем самым, изучение патогенов виноградной лозы в данном регионе — актуальная задача. Целью представляемой работы является исследование разнообразия по типу Ti-плазмиды агробактерий, вызывающих бактериальный рак, на виноградниках Краснодарского края с использованием молекулярно-генетических методов идентификации.

Материалы и методы

Сбор образцов. Сбор образцов производился в 2016–2017 гг. В качестве материала использовали молодые и частично одревесневшие опухоли, обнаруженные на надземных частях растений винограда в четырнадцати виноградарских хозяйствах различных зон Краснодарского края и имеющие различное происхождение посадочного материала (Италия, Франция, Австрия, Сербия, Болгария, Россия). Всего проанализировано 76 образцов.

Выделение ДНК. ДНК из опухолей выделяли с применением методики на основе ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид) с добавлением поливинилпирролидона поперечносшитого (PVPP) на этапе гомогенизации и с использованием изопропилового спирта в качестве осаждающего агента [32].

ПЦР-анализ. Для исследования изолятов агробактерий применяли классический метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). В работу были включены ДНК-маркеры к генам *pehA*, *virF* и *virD2*, *6b*, а также октопинсинтаз-

ному (*OCT*), нопалинсинтазному (*NOP*) и витопинсинтазному (*Vis*) генам [10, 15, 21, 22].

ПЦР-анализ проводили с предварительной оптимизацией таких параметров, как температура и длительность циклов отжига праймеров и элонгации, общее количество циклов, концентрация дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP), праймеров и т.д. В состав смеси для ПЦР общим объемом 20 мкл входило: 50–70 нг ДНК, ПЦР-буфер для Taq-полимеразы с сульфатом аммония и магнием, 0,125 мМ/мкл dNTP, 0,25 пМ/мкл каждого праймера, 0,05% БСА (бычий сывороточный альбумин), 0,125 е.а./мкл Taq-полимераза (ООО «Бигль», Россия). ПЦР осуществляли с использованием прибора «Терцик» («ДНК-технология», Россия) при условиях: 5 мин при 94°C — начальная денатурация; последующие 40 циклов — 18 с денатурация при 94°C, 40 с отжиг праймеров при температуре 60°C (для праймеров PGF/PGR, VIRFF1/VIRFR2, VIRD2S4F716/VIRD2S4R1036, NF/NR, TF/TR, SF/SR) или 55°C (для VIRD2A/VIRD2C, VIRD2A/VIRD2F; Visf/Visr, OCTF/OCTR, NOPF/NOPR), 1 мин — элонгация при 72°C; 4 мин — финальная элонгация при 72°C.

Разделение продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле («Helicon», Россия), содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. Визуализировали и анализировали размер амплифицированных фрагментов ДНК по интенсивности свечения в УФ-свете с использованием маркера молекулярного веса 100–1500 п.н. («СибЭнзим», Россия).

Исследования выполнены на оборудовании центра коллективного пользования «Геномные и постгеномные технологии» Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия.

Результаты и обсуждение

Для изучения агробактерий были выбраны тест-системы для детекции вирулентных генов *A. vitis* — *pehA*, *virF*, *virD2*, *6b*, витопинсинтазного, нопалинсинтазного и октопинсинтазного, а также ДНК-маркеры к высококонсервативным участкам *virD2* гена *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*, которые принято считать универсальными для идентификации патогенных *Agrobacterium* spp.

На первом этапе был произведен скрининг всех исследуемых образцов тест-системами VIRD2A/VIRD2C и VIRD2A/VIRD2F к высококонсервативным участкам гена *virD2*, который обнаруживается у *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Следует отметить, что указанные тест-системы дают не всегда воспроизводимые результаты [15]. Маркерной

системой VIRD2A/VIRD2C, согласно литературным данным, можно определить все патогенные агробактерии. В нашем случае удалось амплифицировать целевые фрагменты у 85% анализируемых изолятов. Считается, что тест-система VIRD2A/VIRD2F определяет штаммы, содержащие Ti-плазмиду витоинового типа. С помощью тест-системы VIRD2A/VIRD2F обнаружили целевые ПЦР-фрагменты у 28,5% образцов. Подобные нестабильные результаты были отмечены и в некоторых других работах по изучению патогенных агробактерий [15, 29]. Причиной этому может быть высокое генетическое разнообразие изучаемых образцов, а также вероятность того, что данная тест-система обнаруживает большей частью *A. tumefaciens*, а не все патогенные агробактерии.

Следующим шагом была проверка образцов с помощью мультиплексной тест-системы PGF/PGR/VIRFF₁/VIRFR₂/VIRD2S4F₇₁₆/VIRD2S4R₁₀₃₆ к основным генам *A. vitis* — *pehA*, *virF* и *virD2* [15]. *PehA* — полигалактуроназный ген, присутствующий во всех агробактериях вида *A. vitis* и отсутствующий в агробактериях *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*; ген *virF* присутствует в агробактериях с Ti-плазмидой октопинового и нопалинового типа, ген *virD2* — только в агробактериях с Ti-плазмидой витоинового типа. Указанная тест-система была нами апробирована ранее [33]. По результатам проведенного исследования было определено, что возбудителем бактериального рака в Краснодарском крае являются агробактерии вида *A. vitis*, различающиеся по типу Ti-плазмиды.

В настоящей работе мы расширили выборку и географию сбора образцов. Получены следующие результаты: целевой фрагмент (466 п.н.) гена *pehA* *A. vitis* выявлен нами во всех проанализированных образцах, что говорит о присутствии агробактерий вида *A. vitis* в опухолевидных тканях растений (рис. 1). Целевой фрагмент гена *virF* (382 п.н.) отмечен в 92% образцов (в 13 хозяйствах из 14) — эти образцы несут Ti-плазмиды октопинового или нопалинового типа. Целевой фрагмент гена *virD2* (320 п.н.) идентифицирован в 28,5 % образцов (в 4 хозяйствах из 14). Кроме того, в 13,5 % образцов (в двух хозяйствах) обнаружены одновременно целевые фрагменты генов *pehA* и *virF*, и *virD2*. Это свидетельствует о наличии двух типов Ti-плазмид в данных образцах (рис. 1, образцы 1 и 10).

Следует отметить, что мультиплексную тест-систему PGF/PGR/VIRFF₁/VIRFR₂/VIRD2S4F₇₁₆/VIRD2S4R₁₀₃₆ можно успешно использовать для идентификации возбудителя

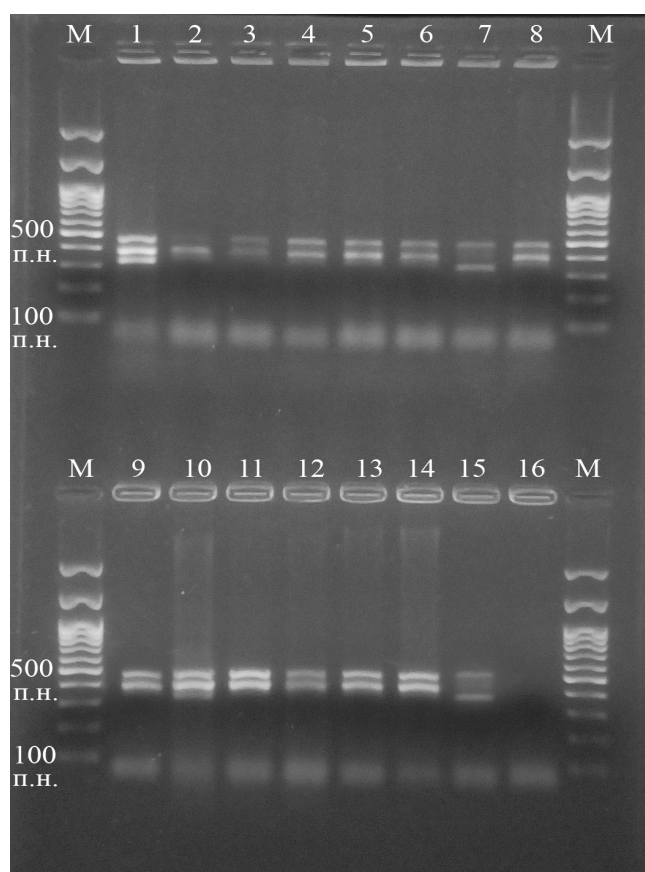


Рис. 1. Результаты мультиплексного ПЦР-анализа: PGF/PGR (целевой фрагмент 466 п.н.), VIRFF₁/VIRFR₂ (382 п.н.) и VIRD2S4F₇₁₆/VIRD2S4R₁₀₃₆ (320 п.н.). Анализируемые образцы из: 1 — поселок Абрау-Дюрсо; 2 — село Молдаванское; 3 — поселок Сенной; 4 — станица Старотитаровская; 5 — хутор Копанской; 6 — хутор Усатова балка; 7 — город Горячий ключ; 8 — станица Красносельская; 9 — станица Гастагаевская; 10 — станица Наухаевская; 11 — станица Старовеличковская; 12 — хутор Колосистый; 13 — хутор Северный; 14 — село Тамань; 15 — хутор Северный. 16 — отрицательный контроль (ПЦР-смесь без ДНК). М — маркер веса

бактериального рака в латентной стадии в посадочном материале винограда [34].

При изучении агробактерий по типу содержащихся в них Ti-плазмид (октопиновой, витоиновой, нопалиновой) проводили параллельные анализы всех образцов и другими, более специфичными, тест-системами. Так, точная принадлежность к конкретному типу Ti-плазмиды (октопиновому или нопалиновому) изучалась ДНК-маркерами (OCTF/OCTR, NOPF/NOPR) к октопинсинтазному и к нопалинсинтазному гену, а также тест-системами (TF/TR, NF/NR) к различным участкам гена *bb*, характерным для агробактерий с октопиновой и нопалиновой Ti-плазмидой.

С помощью тест-системы OCTF/OCTR удалось детектировать целевые фрагменты (475 п.н.) у 73% исследуемых образцов (в 11 из 14 хозяйств) (рис. 2А). Проведенные анализы с маркером TF/TR к гену *bb* подтвердили

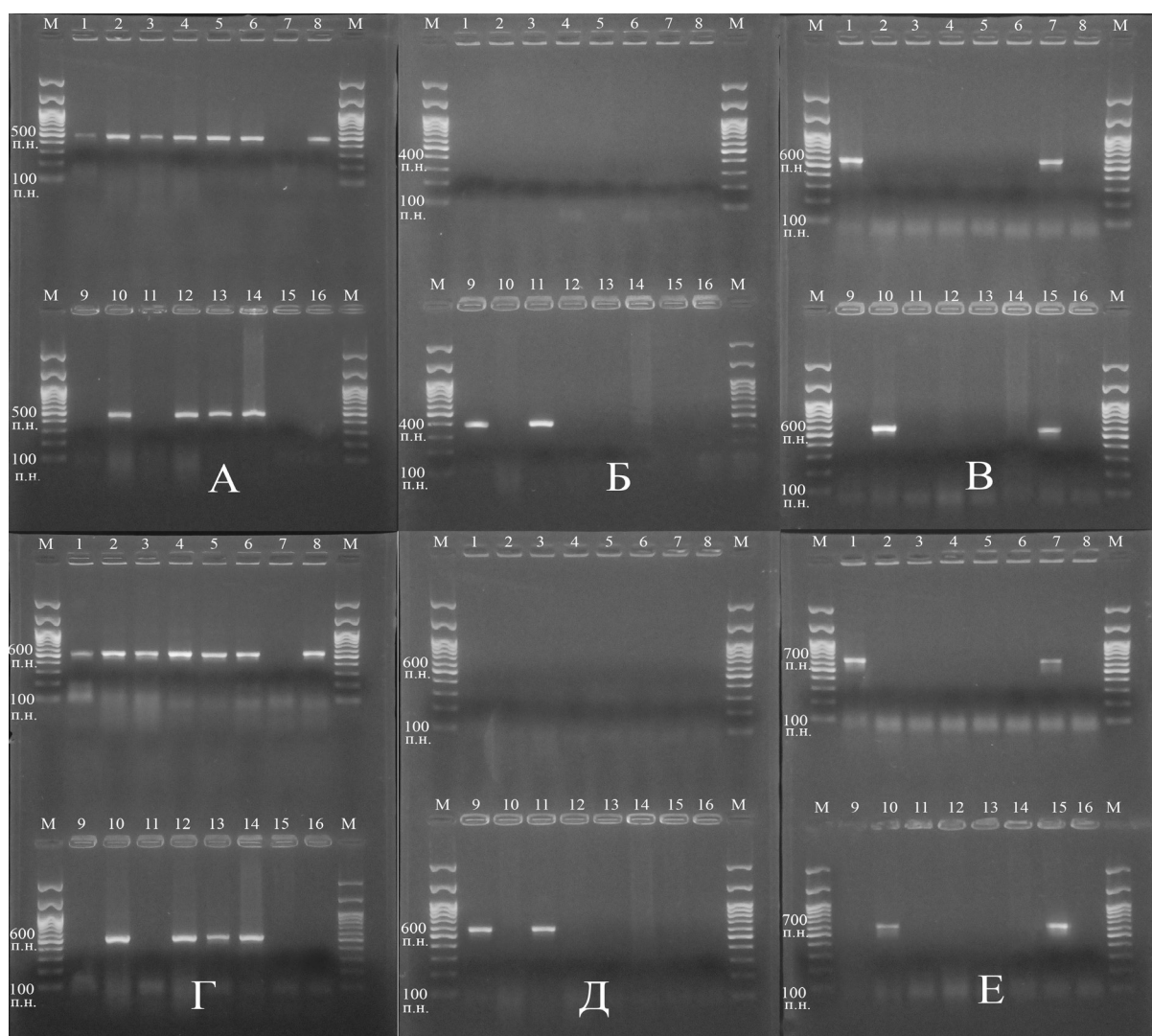


Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов *A. vitis* тест-системами по определению типа Ti-плазмиды: **А** – OCTF/OCTR (целевой фрагмент 475 п.н.); **Б** – NOPF/NOPR (394 п.н.); **В** – VisF/VisR (561 п.н.); **Г** – TF/TR (520 п.н.); **Д** – NF/NR (570 п.н.); **Е** – SF/SR (620 п.н.). Анализируемые образцы из: 1 – поселок Абрау-Дюрсо, 2 – село Молдаванское; 3 – поселок Сенной; 4 – станица Старотитаровская; 5 – хутор Копанской; 6 – хутор Усатова балка; 7 – город Горячий ключ; 8 – станица Красносельская; 9 – станица Гастагаевская; 10 – станица Натухаевская; 11 – станица Старовеличковская; 12 – хутор Колосистый; 13 – хутор Северный; 14 – село Тамань; 15 – хутор Северный. 16 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь без ДНК). М – маркер веса

полученные результаты, был амплифицирован целевой продукт (520 п.н.) в тех же образцах (рис. 2Г).

С помощью тест-системы NOPF/NOPR целевой фрагмент (394 п.н.) идентифицирован в 13,5% исследуемых образцов, в этих же вариантах маркером NF/NR также выявили целевые фрагменты (570 п.н.), что подтверждает наличие Ti-плазмиды нопалинового типа (рис. 2Б, рис. 2Д).

С использованием тест-систем VisF/VisR к *Vis*-гену и SF/SR к *6b*-гену *A. vitis*, согласно литературным данным, могут быть идентифицированы патогенные агробактерии, несущие витопиновую Ti-плазмиду. Указанными тест-системами были проанализированы все 76 образцов (рис. 2В, 2Е). В образцах, собранных в четырех хозяйствах, обнаружили целевые

фрагменты данных генов по результатам ПЦР-анализа (27% образцов). Кроме того, 10 образцов (13,5%) из двух хозяйств (поселок Абрау-Дюрсо и станица Натухаевская) показали наличие целевых фрагментов всех исследуемых генов, т.е. они несут Ti-плазмиды октопинового и витопинового типа.

Таким образом, в девяти из четырнадцати хозяйств образцы содержат целевые фрагменты генов *virF*, *6b* и октопинсинтазного гена, характерные для штаммов *A. vitis* с Ti-плазмидой октопинового типа. В образцах из двух хозяйств (станция Натухаевская и поселок Абрау-Дюрсо) обнаружены агробактерии с фрагментами генов *virD2*, *6b*, а также витопинсинтазного гена витопиновой Ti-плазмиды *A. vitis* вместе с фрагментами генов *virF*, октопинсинтазного и *6b*, что говорит о наличии

Таблица

Генетическая характеристика агробактерий, паразитирующих на виноградниках Краснодарского края

Анализируемые образцы				Тест-системы									
Место сбора	Кол-во, год отбора	Сорт	Происхождение посадочного материала	VirD2A/VirD2F	PG	VIRF	VIRDS4	T	N	S	OCT	NOP	Vis
Образцы, содержащие Ti-плазмиду октопинового типа													
Темрюкский район, станица Старотитаровская	4, 2016	Совиньон блан, Каберне-Совиньон	Сербия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Темрюкский район, поселок Сенной	4, 2016	Аттика	Италия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Темрюкский район, село Тамань	4, 2017	Цвайгель, Алиготе, Ркацителы, Молдова	Австрия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Анапский район, хутор Усатова балка	5, 2016	Молдова, Бархатный	Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Крымский район, село Молдаванское	4, 2017	Рислинг, Шардоне, Совиньон блан, Коломбар	Франция	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Динской район, станица Красносельская	4, 2016	Преображение, Тасон, Низина	Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
город Краснодар, хутор Копанской	6, 2016	Каберне-Совиньон, ТАНА	Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
город Краснодар, поселок Колосистый	5, 2017	Аттика, Марадона	Италия, Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
город Краснодар, поселок Северный	4, 2017	Кишмиш молдавский, Страшенский	Россия	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Образцы, содержащие Ti-плазмиду нопалинового типа													
Анапский район, станица Гастагаевская	6, 2017	Мерло, Каберне-Совиньон	Австрия	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Калининский район, станица Старовеличковская	10, 2016	Мерло, Шардоне, Каберне Фран, Каберне-Совиньон, Морава	Сербия	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Образцы, содержащие Ti-плазмиду витопинового типа													
Горячий ключ	5, 2017	Баклановский, Восторг идеальный	Россия	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
город Краснодар, поселок Северный	4, 2017	Ромулус, Августин	Болгария	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Образцы, содержащие Ti-плазмиду октопин-витопинового типа													
Анапский район, станица Натухаевская	6, 2017	Мерло, Сира	Сербия	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
город Новороссийск, поселок Абрау-Дюрсо	5, 2017	Пино Нуар	Австрия	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+

Ti-плазмиды витопин/октопинового типа у данных агробактерий. В образцах из хозяйства в городе Горячий ключ и в окрестностях города Краснодар были обнаружены целевые фрагменты генов *virD2*, *6b* и витопинсинтазного, но не обнаружены фрагменты генов *virF*

и октопинсинтазного, что указывает на наличие Ti-плазмиды только витопинового типа (таблица). ДНК-анализ образцов из станицы Гастагаевская и станицы Старовеличковская выявил в них наличие всех исследуемых генов

(*virF*, нопаинсинтазный, *bb*), относящихся к нопаинового типу Ti-плазмиды.

Согласно полученным данным, все исследуемые нами образцы агробактерий, обнаруженные на пораженных бактериальным раком растениях винограда, можно разделить на 4 группы по типу содержащихся в них Ti-плазмид: октопиновые (59,5 %), октопин-витопиновые (13,5%), витопиновые (13,5%) и нопаиновые (13,5%).

В 100% изученных образцов ДНК, выделенных из опухолевидных наростов бактериального рака винограда, был выявлен фрагмент гена *pehA*, встречающийся только у агробактерий вида *A. vitis*. Полученные нами данные свидетельствуют о принадлежности агробактерий, паразитирующих на виноградниках Краснодарского края, к виду *A. vitis*, что согласуется с результатами исследований ученых из Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, которые занимались подобной проблемой в Крыму [35].

Результаты проведенных ДНК-анализов показывают преобладание *A. vitis*, содержащей плазмиду октопинового типа (59,5%), над изо-

лятами, содержащими плазмиды витопин-октопинового (13,5%), витопинового (13,5%), нопаинового (13,5%) типов на виноградниках Краснодарского края.

Анализ происхождения посадочного материала растений винограда, на которых были обнаружены опухоли бактериального рака, не выявил четких зависимостей в различии выявленных типов агробактерий и страны происхождения посадочного материала. Можно отметить незначительное превалирование агробактерий, несущих плазмиды октопинового типа, в насаждениях из посадочного материала из Италии и Сербии, витопинового и октопин-витопинового типов — из Болгарии и Австрии, нопаинового типа — из Сербии и Австрии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-34-00827 мол_а).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gelvin S.B. Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. Vol. 67. N 1. P. 16–37.
2. Tarbah F.A., Goodman R.N. Rapid detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis for an efficient indexing system // Plant Dis. 1986. Vol. 70. P. 566–568.
3. Бурдинская В.Ф., Арестова Н.О. Латентная зараженность винограда бактериальным раком // Защ. карант. раст. 2010. № 10. С. 38–39.
4. Kerr A., Panagopoulos C.G. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control // J. Phytopathol. 1977. Vol. 90. N 2. P. 172–179.
5. Ophel K., Kerr A. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines // Int. J. Syst. Bacteriol. 1990. Vol. 40. N 3. P. 236–241.
6. Mousavi S.A., Osterman J., Wahlberg N., Nesme X., Lavire C., Vial L., Paulin L., de Lajudie P., Lindstrom K. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. // Syst. Appl. Microbiol. 2014. Vol. 37. N 3. P. 208–215.
7. Ramírez-Bahena M.H., Vial L., Lassalle F., Diel B., Chapulliot D., Daubin V., Nesme X., Muller D. Single acquisition of protelomerase gave rise to speciation of a large and diverse clade within the *Agrobacterium/Rhizobium* supercluster characterized by the presence of a linear chromid // Mol. Phylogenet. Evol. 2014. Vol. 73. P. 202–207.
8. Slater S.C., Goldman B.S., Goodner B. et al. Genome sequences of three agrobacterium biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria // J. Bacteriol. 2009. Vol. 191. N 8. P. 2501–2511.
9. Szegedi E. Opines in naturally infected crown gall tumors // Vitis. 2003. Vol. 42. N 1. P. 39–41.
10. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. N 8. P. 2879–2884.
11. Матвеева Т.В., Богомаз Д.И., Лутова Л.А. Способ диагностики биоматериалов на наличие в них агробактерий. Патент РФ на изобретение № 2458142. Дата публ.: 10.08.12. Бюл. №22/12.
12. Puławska J., Willems A., Sobiczewski P. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex

PCR // Syst. Appl. Microbiol. 2006. Vol. 29. N. 6. P. 470–479.

13. Sawada H., Ieki H., Matsuda I. PCR detection of Ti and Ri plasmid from phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. N 2. P. 828–831.

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. Vol. 70. N 6. P. 342–347.

15. Bini F., Kuczmog A., Putnoky P. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens* // Vitis. 2008. Vol. 47. N 3. P. 181–190.

16. Eastwell K.C., Kenneth C., Leslie Willis G., Cavileer D.T. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction // Plant Dis. 1995. Vol. 79. N 8. P. 822–827.

17. 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.

18. Kawaguchi A., Sawada, H., Inoue, K., Nasu H. Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains // J. Gen. Plant Pathol. 2005. Vol. 71. N 1. P. 54–59.

19. Lim S.H., Kim J.G., Kang H.W. Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains // Microbiol. Res. 2009. Vol. 164. N. 4. P. 451–460.

20. 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.

21. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // Vitis. 2002. Vol. 41. N 1. P. 37–42.

22. 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.

23. Bini F., Geider K., Bazzi C. Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel *virD2* gene-specific primers that discriminate two subgroups // Eur. J. Plant Pathol. 2008. Vol. 122. N 3. P. 403–411.

24. Argun N., Momol M.T., Maden S., Momol E.A., Reid C.L., Celek H., Burr T.J. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from Turkish grape cultivars in the

Central Anatolia region // Plant Dis. 2002. Vol. 86. N 2. P. 162–166.

25. Lamovšek J., Zidarič I., Pleško I.M., Urek G., Trdan S. Comparative study of diagnostic methods used for monitoring of common grape vine (*Vitis vinifera* L.) crown gall (*Agrobacterium vitis* Ophel & Kerr) in Slovenia // Acta Agric. Slov. 2015. Vol. 103. N 2. P. 313–321.

26. Genov I., Atanassov I., Tsvetkov I., Atanassov A. Isolation and characterization of *Agrobacterium* strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes, *V. vinifera* ssp. *Silvestris* // Vitis. 2015. Vol. 45. N 2. P. 97–101.

27. Winans S.C., Allenza P., Stachel S.E., McBride K.E., Nester E.W. Characterization of the *virE* operon of the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 // Nucleic Acids Res. 1987. Vol. 15. N 2. P. 825–837.

28. Tolba I.H., Zaki M.F. Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt // Ann. Agric. Sci. 2011. Vol. 56. N 2. P. 113–119.

29. Kuzmanović N., Gašić K., Ivanović M., Prokić A., Obradović A. Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia. Arch. Biol. Sci. 2012. Vol. 64. N 4. P. 1487–1494.

30. Rouhrazi K., Rahimian H. Characterization of Iranian grapevine isolates of *Rhizobium* (*Agrobacterium*) spp. // J. Plant Pathol. 2012. Vol. 94. N 3. P. 555–560.

31. Filo A., Sabbatini P., Sundin G.W., Zabadal T.J., Safe G.R., Cousins P.S. Grapevine crown gall suppression using biological control and genetic engineering: a review of recent research // Am. J. Enol. Vitic. 2013. Vol. 64. N. 1. DOI 10.5344/ajev.2012.12038.

32. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue // Phytochem. Bull. 1987. Vol. 19. P. 11–15.

33. Makarkina M.V., Il'nitskaya E.T., Stepanov I.V. Identification of *Agrobacteria* on grape plants with symptoms of crown gall lesions in ampelocenoses of Krasnodar Territory using the PCR method // Russ. Agric. Sci. 2017. Vol. 43. N 5. P. 402–405.

34. Макаркина М.В., Ильницкая Е.Т. Определение латентной стадии бактериального рака винограда методом полимеразной цепной реакции // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. Т. 13. Краснодар, 2017. С. 100–104.

35. Ignatov A.N., Khodykina M.V., Vinogradova S.V., Polityko V.A., Kornev K.P., Mazurin E.S. First report of *Agrobacterium vitis*

causing crown galls of wine grape in Russia // Plant Dis. 2016. Vol. 100. N. 4. P. 853.

Поступила в редакцию

27.09.2018

Поступила после доработки

14.01.2019

Принята в печать

18.01.2019

RESEARCH ARTICLE

PCR IDENTIFICATION OF PATHOGENIC AGROBACTERIES DETECTED ON VINEYARDS OF KRASNODAR TERRITORY BY THE TYPE OF CONTAINED Ti PLASMIDS

M.V. Makarkina*, E.T. Ilnitskaya, S.V. Tokmakov

North-Caucasian federal scientific center of horticulture, viticulture, wine-making, 40 years of Victory street, 39, Krasnodar, 350901, Russia

**e-mail: konec_citatu@mail.ru*

Agrobacterium vitis and some strains of *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes* cause a dangerous chronic disease on grape plants — crown gall. Using molecular genetic methods, work has been carried out to identify and study the diversity of pathogenic agrobacteria that cause crown gall in the vineyards of the Krasnodar Territory. 76 samples of young and lignified tumor-like outgrowths of crown gall of grapes collected from plants in fourteen vineyards of the Krasnodar Territory and having a different origin of planting material (Italy, France, Austria, Serbia, Bulgaria, Russia) were used as material. In all studied samples, the presence of *A. vitis* was identified using the PGF/PGR test-system for DNA analysis. When studying the diversity of agrobacteria by the type of Ti plasmids contained therein, four groups were identified: containing octopine-type Ti plasmids (59.5%), octopine/vitopine (13.5%), vitopine (13.5%) and nopaline type (13.5%). The obtained data indicate that in the vineyards of the Krasnodar Territory crown gall of grapes is caused by agrobacteria *A. vitis*, mainly of the octopine type.

Keywords: *Agrobacterium vitis*, crown gall of grape, polymerase chain reaction, Ti plasmid, opine-types, test-systems

Сведения об авторах

Макаркина Марина Викторовна — мл. науч. сотр. лаборатории сортоизучения и селекции винограда Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. Тел.: 8-861-252-70-74; e-mail: konec_citatu@mail.ru

Ильницкая Елена Тарасовна — канд. биол. наук, зав. лабораторией сортоизучения и селекции винограда Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. Тел.: 8-861-252-70-74; e-mail: ilnitskaya79@mail.ru

Токмаков Сергей Вячеславович — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории генетики и микробиологии Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. Тел.: 8-861-252-70-74; e-mail: ad-a-m@mail.ru