

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННОГО ВИДА АГРОБАКТЕРИЙ,
ПАРАЗИТИРУЮЩИХ НА ВИНОГРАДНИКАХ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ,
НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА**

**IDENTIFICATION OF PATHOGENS SPECIES
OF AGROBACTERIUM ON THE VINEYARDS OF KRASNODAR
REGION, USING MOLECULAR-GENETIC APPROACH**

М.В. Макаркина, Е.Т. Ильницкая

M.V. Makarkina E.T. Ilnitskaya

ФГБНУ Северо-Кавказский зональный
научно-исследовательский институт
садоводства и виноградарства,
Краснодар, Россия,
e-mail: kubansad@kubannet.ru

North-Caucasian Zonal Research Institute of
Horticulture and Viticulture, Krasnodar,
Russia, e-mail: kubansad@kubannet.ru,

И.А. Владимиров, Т.В. Матвеева

I.A. Vladimirov, T.V. Matveeva

Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: spbu@spbu.ru

St. Petersburg State University,
St. Petersburg, Russia,
e-mail: spbu@spbu.ru

Аннотация. Представлены результаты изучения агробактерий, вызывающих бактериальный рак на виноградниках Краснодарского края. Определена принадлежность исследуемых агробактерий к виду *Agrobacterium vitis* Ophel and Kerr.

Summary. The results of the study of agrobacterium causing crown gall in the vineyards of the Krasnodar Region are presented. The belonging of the studied agrobacterium to the species *Agrobacterium vitis* Ophel and Kerr is determined.

Ключевые слова: бактериальный рак винограда, *A. vitis*, *virF* ген, полимеразная цепная реакция, секвенирование, патогенные агробактерии.

Keywords: crown gall of grape, *A. vitis*, *virF* gene, polymerase chain reaction, sequencing, pathogenic agrobacterium.

Введение. Бактериальный рак – одно из наиболее вредоносных хронических заболеваний виноградной лозы. Экономический ущерб от бактериального рака значительно варьирует в зависимости от области возделывания винограда. В Краснодарском крае это заболевание является одним из наиболее экономически значимых. Если в конце восьмидесятых – начале девяностых годов ежегодно погибало до 20 га закладываемых виноградников от этого заболевания, то в последние годы гибель насаждений увеличилась в 2–2,5 раза [1].

Возбудитель бактериального рака – бактерии рода *Agrobacterium*. Известно, что на винограде виды *Agrobacterium* представлены как

вирулентными, так и авирулентными штаммами [2]. Вредоносные штаммы принадлежат к двум видам: *Agrobacterium tumefaciens* Conn и *Agrobacterium vitis* Ophel and Kerr [3]. Точная идентификация возбудителя может быть положена в основу разработки биологического метода контроля бактериального рака на основе применения штаммов-антагонистов [4].

Целью исследования являлось определение видового состава патогенных агробактерий на виноградниках Краснодарского края.

Объекты и методы исследований. В качестве материала использовали опухолевидные наросты бактериального рака, обнаруженные на растениях винограда различных сортов на виноградниках Краснодарского края (табл. 1).

Таблица 1.

Характеристика образцов опухолей с зараженных растений винограда

№ образца	Сорт	Происхождение посадочного материала	Место произрастания
1, 2, 3, 4	Баклановский	ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, Россия	ИП Коваль А.И, г. Горячий ключ,
5, 6, 7	Восторг идеальный	ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, Россия	ИП Коваль А.И, г. Горячий ключ
8	Каберне АЗОС	Анапская ЗОСВиВ, Россия	Российская ампелографическая коллекция ФГБНУ СКЗНИИСиВ, г. Анапа
9	Бархатный	Анапская ЗОСВиВ, Россия	Российская ампелографическая коллекция ФГБНУ СКЗНИИСиВ, г. Анапа
10	Преображение	Любительская селекция, В.Н. Крайнов	КФХ Фисюра Т.Б., Краснодарский край, Динской р-н, с. Красносельское
11	Тасон	ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, Россия	КФХ Фисюра Т.Б., Краснодарский край, Динской р-н, с. Красносельское
12	Низина	Любительская селекция, В.Н. Крайнов,	КФХ Фисюра Т.Б., Краснодарский край, Динской р-н, с. Красносельское
13	Сира	Франция	ООО «Новокрымское», Краснодарский край, Крымский р-н, с. Молдаванское
14	Рислинг	Франция	ООО «Новокрымское», Краснодарский край, Крымский р-н, с. Молдаванское

№ образца	Сорт	Происхождение посадочного материала	Место произрастания
15	Шардоне	Франция	ООО «Новокрымское», Краснодарский край, Крымский р-н, с. Молдаванское
16	Совиньон	Франция	ООО «Новокрымское», Краснодарский край, Крымский р-н, с. Молдаванское
17	Коломбар	Франция	ООО «Новокрымское», Краснодарский край, Крымский р-н, с. Молдаванское
18	Совиньон	Сербия	ООО АФ «Кубань», Краснодарский край, Темрюкский р-н, ст. Старотитаровская
19, 20, 21	Каберне-Совиньон	Сербия	ООО АФ «Кубань», Краснодарский край, Темрюкский р-н, ст. Старотитаровская
22	Аттика	Италия	ООО «Фанагория-Агро», Краснодарский край, Темрюкский р-н, п. Сенной

ДНК из опухолей выделяли ЦТАБ-методом с некоторыми дополнениями [5, 6]. Для исследования изолятов агробактерий применяли классический метод полимеразной цепной реакции с использованием прибора «Терцик» с последующей оценкой результатов методом электрофореза в агарозном геле и секвенированием фрагментов ДНК методом Сенджера. Полученные последовательности фрагментов ДНК анализировали в базе данных NCBI [7].

Обсуждение результатов. Исследования проводили в два этапа. На первом этапе методом ПЦР определяли патогенность и видовую принадлежность агробактерий, выявляемых в поражённых виноградных растениях. На втором – подтверждали видовую принадлежность исследуемых агробактерий методом секвенирования амплифицированных на первом этапе последовательностей и последующим анализом результатов в базе данных NSBI.

Для определения патогенности агробактерий, были выбраны тест-система на основе генов *virD2* и *virF* [8, 9]. Данные гены располагаются в Ti-плазмидах вирулентных штаммов *A. tumefaciens* и *A. vitis*, соответственно. С помощью маркерных систем к этим генам можно амплифицировать протяженные фрагменты, пригодные для

секвенирования. При изучении образцов тест-системой на *A. tumefaciens* не было получено целевых продуктов, при использовании тест-системы на *A. vitis* получены положительные результаты.

На рисунке представлены результаты ПЦР, детектированные методом гель-электрофореза. Визуализация амплифицированных фрагментов проведена в УФ-свете, при предварительном вымачивании гелевых пластин в растворе бромистого этидиума. В случае большинства изученных образцов реакция проходила с образованием целевого продукта (~400 п.н.), согласно литературным данным.

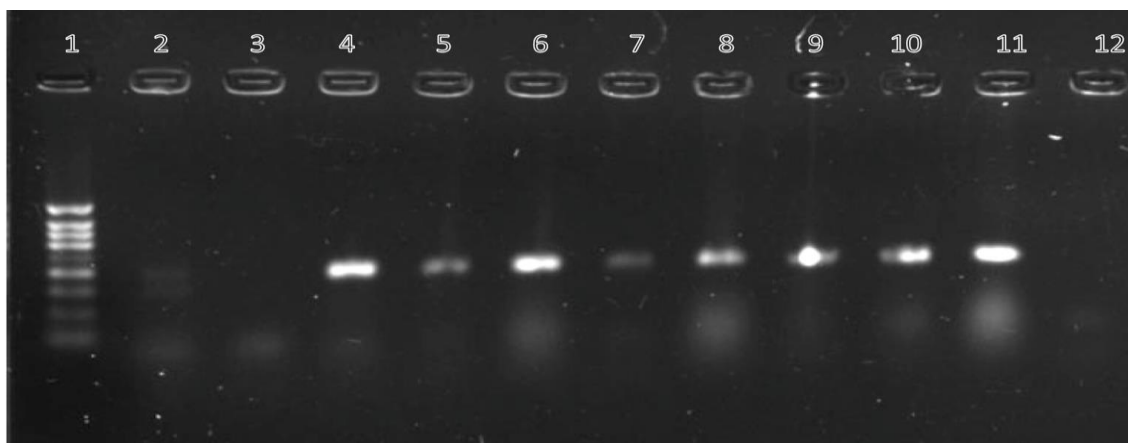


Рис. Результаты электрофореза ПЦР-продуктов *virF* гена в агарозном геле

Примечание: 1 – маркер молекулярного веса (шаг 100 п.н.); 2 – образец № 2; 3 – образец № 5; 4 – образец № 8; 5 – образец № 10; 6 – образец № 11; 7 – образец № 12; 8 – образец № 15; 9 – образец № 18; 10 – образец № 19; 11 – образец № 22; 12 – контроль (ПЦР-смесь без ДНК).

Далее амплифицированные фрагменты гена *virF* из исследуемых образцов были секвенированы. Последующий анализ полученных результатов показал, что по уровню сходства нуклеотидных последовательностей ген *virF* анализируемых образцов соответствует исследуемому гену *A. vitis* в базе данных NCBI.

Таким образом, в качестве патогенного агента, вызывающего развитие опухолевидных образований бактериального рака в исследуемых образцах, нами определена агробактерия вида *A. vitis*. Представленные данные отличаются от информации, полученной ранее отечественными учеными, которые изучали распространение возбудителя бактериального рака винограда в Краснодарском крае с использованием микробиологического метода. Ими было определено, что опухоли на виноградных растениях вызываются агробактериями вида *A. tumefaciens* [10]. Увеличение выборки изучаемых образцов из разных зон Краснодарского края расширит имеющуюся информацию и уточнит данный вопрос.

Выводы. На исследованных пораженных бактериальным раком растениях винограда в ампелоценозах Краснодарского края в качестве вредоносного патогена определены агробактерии, принадлежащие к виду *A. vitis*.

Литература

1. Юрченко, Е.Г. Причины распространения бактериального рака винограда в ампелоценозах Западного Предкавказья и возможность использования биологических средств защиты для снижения его вредоносности / Е.Г. Юрченко, П.В. Курило // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ. – 2011. - №8(2). – С. 96-108. Шифр Информрегистра: 0421100126/0028. – URL: <http://journal.kubansad.ru/pdf/11/02/11.pdf>
2. Burr, T.J. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies / T.J. Burr, C. Bazzi, S. Süle, L. Otten // Plant Disease. – 1998. – V. 82(12). – P. 1288-1297.
3. Süle, S. The effect of resistance of rootstocks to crown gall (*Agrobacterium spp.*) on the susceptibility of scions in grape vine cultivars / S. Süle, T. J. Burr // Plant pathology. – 1998. – V. 47(1). – P. 84-88.
4. Filo, A. Grapevine crown gall suppression using biological control and genetic engineering: a review of recent research / A. Filo, P. Sabbatini, G.W. Sundin, T.J. Zabadal, G.R. Safir, P.S. Cousins // Am. J. Enol. Vitic. – 2013. – V. 64(1). – P. 1-14.
5. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochem. Bull. - 1987. –V. 19. – С.11-15.
6. Tamari, F. A comparison of DNA extraction methods using *Petunia* hybrid a tissues / F. Tamari, C.S. Hinkley, N. Ramprashad // Journal of biomolecular techniques. – 2013. – V. 24(3). – P. 113-118.
7. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). – [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
8. Bini, F. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens* / F. Bini, A. Kuczmog, P. Putnoky // Vitis Journal of Grapevine Research. – 2008. – V.47 (3). – P.181-190.
9. Матвеева, Т.В. Способ диагностики биоматериалов на наличие в них агробактерий / Т.В.Матвеева, Д.И. Богомаз, Л.А. Лутова // Бюллетень «Изобретение. Полезные модели». Роспатент РФ. – 2012. - № 22/12.
10. Бурдинская, В.Ф. Латентная заражённость винограда бактериальным раком/ В.Ф. Бурдинская, Н.О. Арестова // Защита и карантин растений. – 2010. –Т. 10. – С. 38-39.