

УДК 577.29

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ АГРОБАКТЕРИЙ В ПОРАЖЕННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫМ РАКОМ АМПЕЛОЦЕНОЗАХ АНАПО-ТАМАНСКОЙ ЗОНЫ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

М.В. Макаркина¹, И.А. Владимиров², Е.Т. Ильницкая¹, Т.В. Матвеева²

¹Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства, Краснодар, Россия, kubansad@kubannet.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, radishlet@gmail.com

Целью исследования являлось изучение видового состава и разнообразия штаммов агробактерий на виноградниках Анапо-Таманской зоны Краснодарского края. В качестве материала использовали опухоли с виноградных растений различных сортов, собранные на виноградниках Анапо-Таманской зоны. ДНК из опухолей выделяли ЦТАБ-методом с некоторыми дополнениями [Doyle et al., 1987; Tamari et al., 2013]. Для видовой идентификации агробактерий применяли метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием прибора АНК-32. Для исследования тонкого полиморфизма 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 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). В результате работы был определен видовой состав агробактерий и разнообразие изолятов на виноградниках Анапо-Таманской зоны Краснодарского края. Установлена принадлежность исследуемых патогенных агробактерий, к виду *Agrobacterium vitis* и близость их к штамму Ag57.

Ключевые слова: бактериальный рак винограда, *A. vitis*, ПЦР в режиме реального времени, *pehA* ген, *virF* ген, патогенные штаммы *Agrobacterium*.

Бактериальный рак – одно из наиболее вредоносных хронических заболеваний виноградной лозы. Возбудитель бактериального рака – бактерии рода *Agrobacterium*. Известно, что на винограде виды *Agrobacterium* представлены как вирулентными, так и авирулентными штаммами; выделяют штаммы, проявляющие различную патогенность или наоборот – даже антагонистическое действие на опухолеобразующие штаммы бактерии. Достоверная идентификация патогенных штаммов агробактерий – актуальная проблема, как для фундаментальных аспектов микробиологии, фитопатологии, так и для прикладных задач отрасли виноградарства.

На основе проанализированных комбинаций праймеров к различным генам агробактерий нами были выбраны 2 тест-системы, наиболее приемлемые для анализа биоматериала на предмет заражения *Agrobacterium vitis* Ophel and Kerr. С помощью праймеров и зонда для ПЦР в реальном времени к гену *pehA* (F:TGAAGAGCGGTGTCGTGCTG; R: AATCAGCGGCTTGCAGGTCT; Pr: TGAAGAGCGGTGTCGTGCTG) удалось обнаружить присутствие ДНК *A. vitis* во всех анализируемых образцах ДНК, выделенных из опухолей.

Тест-система на основе гена *virF* [Bini et al., 2008] предназначена для амплификации более протяженных фрагментов, пригодных для секвенирования и последующего более тонкого типирования изолятов на основе SNP. Секвенирование фрагментов гена *virF* двух образцов и последующее их сравнение с базой данных NCBI показало, что уровень их сходства с данным геном из *A. vitis* существенно выше, чем из *Agrobacterium tumefaciens* Conn и их соответствие фрагменту гена штамма *A. vitis* Ag57.

Из всего выше сказанного, можно заключить, что в ампелоценозах Краснодарского края паразитируют агробактерии вида *A. vitis* близкие к штамму Ag57. Для ответа на вопрос о степени сходства бактерий вызвавших заболевание в различных хозяйствах требуются дополнительные исследования, включающие секвенирование фрагментов генов, характерных для *A. vitis* и поиск полиморфизмов в них.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-34-51131 с использованием оборудования РЦ СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Библиографический список (References)

- Bini F., Kuczmog A., Putnoky P., et al. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis Journal of Grapevine Research*, 2008. V.47 (3). P.181–190.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987. V. 19. P. 11–15.
- Tamari F., Hinkley C.S., Ramprashad N. A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues. *Journal of biomolecular techniques*, 2013. V. 24(3): P. 113–118.

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 100–101

IDENTIFICATION OF *AGROBACTERIUM* STRAINS IN THE CROWN GALL AFFECTED AMPELOCENOSES OF ANAPA-TAMAN ZONE OF KRASNODAR REGION

M.V. Makarkina¹, I.A. Vladimirov², E.T. Ilitskaya¹, T.V. Matveeva²

¹*North Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, kubansad@kubannet.ru*

²*Saint Petersburg State University, spbu@spbu.ru*

The aim of the research was to study the species composition and diversity of *Agrobacterium* strains in the vineyard area of the Anapa-Taman area of Krasnodar region. The used material was tumors from different varieties of grape plants collected in the vineyards of Anapa-Taman area. DNA was isolated from tumors with CTAB-method with some additions [Doyle et al., 1987; Tamari et al., 2013]. Real time polymerase chain reaction (carried out in the ANK-32) was used for identification of species of *Agrobacterium*. To study the thin polymorphism of isolates of *Agrobacterium* was used the classic method of polymerase chain reaction within the “Tertsik” device and the followed evaluation of the results by agarose gel electrophoresis and sequencing of DNA fragments by Sanger. The sequences of DNA fragments were analyzed in the NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As a result of the work we determined *Agrobacterium* species composition in the vineyards Anapo-Taman area of Krasnodar region. We identified that investigated pathogenic *Agrobacterium* belongs to the species *Agrobacterium vitis* similar to the strain Ag57.