

DOI: 10.55505/sa.2024.1.05
UDC: 634.8:632.35



IMPLEMENTAREA METODEI PCR PENTRU IDENTIFICAREA TULPINILOR PATOGENE *ALLORHIZOBIVM VITIS* CE PROVOACĂ CANCERUL BACTERIAN AL VIȚEI-DE-VIE

Marcela DUBCEAC*, ORCID: 0000-0002-7112-6802,
Evghenii HAUSTOV, ORCID: 0000-0003-3109-8760,
Victor BONDARCIUC, ORCID: 0009-0007-8328-828X

Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, Republica Moldova

*Correspondență: Marcela DUBCEAC - e-mail: dubceacm@gmail.com

Abstract. In the process of obtaining grapevine clones free from viral diseases and bacterial cancer, there are often cases where protoclonal, seemingly healthy, well-developed, and with high yields, are found to be latently infected with bacterial cancer. This disease is most caused by agrobacteria from the genus *Allorhizobium vitis* and sometimes by *Agrobacterium tumefaciens*, and it is one of the most destructive diseases for grapevines from an economic perspective. The bacterial pathogen exists systemically in grapevines and spreads through infected propagation material. In the present study the Triplex End-Point PCR method was used for accurate and rapid identification of pathogenic strains of agrobacteria. One-year-old mature vines from 6 varieties and forms of grapevines were taken for the research. Microbiological testing on Roy & Sasser semi-selective medium showed that five of the six plants tested were positive for *Agrobacterium* spp. infection. The positive tested samples were subjected to PCR testing. The presence of PehA gene, which is used to identify *Allorhizobium vitis* and to differentiate it from *Agrobacterium tumefaciens*, was confirmed in all tested samples. The virF and virD regions associated with the production of nopalins, octopins and vitopins were also detected. The test results suggested that the method allows for the reliable detection of pathogenic cultures carrying the tumor-inducing plasmid. The obtained results contribute to the development of strategies to combat bacterial cancer infections and improve phytosanitary selection practices for grapevine propagation material.

Keywords: Grapevines; Bacterial cancer; *Allorhizobium vitis*; *Agrobacterium tumefaciens*; PCR.

Rezumat. În procesul de obținere a clonelor de viță de vie libere de boli virale și de cancer bacterian, adesea se observă cazuri în care plantele, aparent sănătoase, bine dezvoltate și cu o producție ridicată, se dovedesc a fi infectate latent cu cancer bacterian. Această boală este cauzată cel mai des de agrobacterii din genul *Allorhizobium vitis* și uneori de *Agrobacterium tumefaciens* și este una dintre cele mai distructive boli, din perspectivă economică, pentru vița de vie. Patogenul bacterian există sistemic în vița de vie și se răspândește prin materialul de propagare infectat. În prezentul studiu a fost utilizată metoda PCR Triplex End-Point pentru identificarea precisă și rapidă a tulpinilor patogene de agrobacterii. Pentru realizarea cercetărilor au fost prelevate vițe mature de un an de la 6 soiuri și forme de viță de vie. Testarea microbiologică pe mediul semiselectiv Roy & Sasser a demonstrat că cinci dintre cele 6 plante testate au prezentat rezultate pozitive pentru infecția cu *Agrobacterium* spp. Loturile testate pozitiv au fost

transferate la etapa investigației prin metoda PCR. În toate probele testate a fost confirmată prezența genei PehA (466 bp), care servește pentru identificarea bacteriei *Allorhizobium vitis* și pentru diferențierea ei de *Agrobacterium tumefaciens*. De asemenea s-au detectat regiunile virF (382 bp) și virD (320 bp) asociate cu producția de nopaline, octopine și vitopine, ce servesc drept sursă de nutrienți pentru bacterii. Rezultatele testărilor au sugerat că metoda permite detectarea fiabilă a culturilor patogene purtătoare de plasmida inductoare de tumori. Rezultatele obținute contribuie la dezvoltarea strategiilor de combatere a infecțiilor cu cancer bacterian și la îmbunătățirea practicilor de selecție fitosanitară a materialului de multiplicare viticol.

Cuvinte-cheie: Vița de vie; Cancer bacterian; *Allorhizobium vitis*; *Agrobacterium tumefaciens*; PCR.

INTRODUCERE

Bacteriile fitopatogene reprezintă un pericol permanent pentru sănătatea plantelor, producând boli care duc la diminuări importante ale producției. Cancerul bacterian este o boală cronică a viței-de-vie, fiind cauzată de bacterii din genurile *Allorhizobium*, uneori din *Agrobacterium* și, mai rar, din *Rhizobium* (Mousavi et al., 2015). Vița-de-vie poate fi infectată atât de tulpini patogene, fără să manifeste simptome până la momentul afectării plantei (*Allorhizobium vitis*+Ti, unele tulpini de *Agrobacterium tumefaciens*+ Ti), cât și de tulpini nepatogene (*All. vitis* și *A. tumefaciens* libere de plasmida pTi) (Mousavi et al., 2015). Formele patogene pot cauza daune care perturbă sistemul vascular al viței-de-vie (Kawuguchi, 2013; Bini et al., 2008), iar simptomele cancerului bacterian sunt identificate ca supracreșteri ce apar sub forma „galelor” (tumorilor) pe părțile aeriene ale plantei, care se manifestă, în general, pe lemnul multianual (Figurile 1A, 1B). Cancerul bacterian este o boală sistemică, astfel încât toate organele plantei sunt infectate (Kuzmanovic et al., 2018). Plantele afectate de cancerul bacterian au o producție de fructe scăzută, colorare clorotică sau roșie a frunzelor, creșterea și dezvoltarea întârziată și, în condiții climatice nefavorabile (ierni geroase, secete), pot pieri, cauzând rădăcirea prematură a plantațiilor (Figura 1C). În Republica Moldova, boala afectează vița-de-vie în toate zonele de cultivare.

Patogenitatea tulpinilor este determinată de o plasmidă mare inductoare de tumori, numită pTi, care, în timpul infecției, transferă o parte din ADN-ul pTi în celula gazdei, unde devine integrată stabil în genomul plantei (Schell & Montagu, 1977). Plasmida pTi conține gene pentru exprimarea tumorii și gene care codifică formarea de opine, cum ar fi nopaline, vitopine, octopine, ce servesc drept sursă de nutrienți pentru bacterii (Burr et al., 1988; Dessaux & Faure, 2018). În Republica Moldova, până recent, identificarea tulpinilor era efectuată prin metoda microbiologică, timp de 5-7 zile, până la nivel de gen, iar natura patogenă a culturii obținute, adică prezența sau absența plasmidei pTi, era confirmată printr-un biotest pe plantele indicator – discuri de morcovi (*Daucus carota*), plante tinere de *Kalanchoe* (*Bryophyllum daigremontianum*), cu durată de 3-5 săptămâni (Paulus et al., 1989). Aceste metode sunt puțin eficiente, necesitând mult timp pentru cultivare și identificare. De asemenea, confirmarea naturii patogene a organismului selectat prin biotestele pe plante poate fi complicată și supusă erorilor de interpretare. În prezent, la nivel global, identificarea exactă a prezenței plasmidei pTi se face prin aplicarea metodei numită reacția în lanț a polimerazei (PCR), bazată pe tehnici de biologie moleculară, care oferă sensibilitate și specificitate crescute în comparație cu tehnicile microbiologice tradiționale și care are o durată scurtă, de doar 2 zile (Haas et al., 1995; Bini et al., 2008; Eastwell et al., 1995).



Figura 1. Simptomele cancerului bacterian: A, B – pe tulpini de viță-de-vie; C – plantă moartă; D – pe butaș altoit în școala de viță-de-vie

În procesul de obținere a clonelor de viță-de-vie libere de boli virale și de cancer bacterian sunt frecvente cazurile în care protoclonele, care par sănătoase din punct de vedere vizual, bine dezvoltate și cu producție mare, sunt de fapt infectate, latent, cu cancer bacterian. Testele efectuate în perioada 2006-2013, prin metoda microbiologică, arată că procentul plantelor afectate de cancerul bacterian a crescut anual și a variat de la 0,2 la 12% pentru soiul Sauvignon și de la 0,6 la 18% pentru Cabernet Sauvignon (Бондарчук et al., 2014). În perioada 2019-2023 au fost testate 118 plante, rezultate pozitive înregistrându-se la 26-44% din cazuri (Dubceac, 2023). Lipsa simptomelor vizibile ale cancerului bacterian la vița-de-vie infectată poate fi constatată în două cazuri: fie agrobacteriile care au infectat planta nu sunt patogene, fie condițiile pentru formarea tumorilor nu au fost îndeplinite. Este de menționat că boala se manifestă în special în urma unor condiții meteorologice specifice, cum ar fi temperaturile scăzute în timpul înghețurilor și căderea de grindină, care pot provoca răni la nivelul plantelor de viță-de-vie. Schimbările climatice observate în ultimele decenii au dus la o reducere a frecvenței înghețurilor în Republica Moldova, rezultând în absența manifestărilor evidente ale bolii în aceste condiții. Cu toate acestea, este important de subliniat că boala rămâne prezentă într-o formă latentă, ceea ce înseamnă că agenții patogeni pot persista în plantele de viță-de-vie fără a provoca simptome evidente. Aceasta poate reprezenta o amenințare latentă și poate apărea în mod activ atunci când condițiile devin favorabile. De aceea, reproducerea vegetativă a plantelor bolnave duce la producerea de material săditor infectat și înființarea de plantații deja afectate, contribuind astfel la răspândirea ulterioară a bolii (Figura 1D). Pentru a preveni răspândirea cancerului bacterian este necesar ca toamna, după căderea frunzelor, să se efectueze inspectarea plantației și să fie marcate și înlăturate tufele cu simptome vizibile ale bolii. Starea fitosanitară a plantelor rămase trebuie verificată prin testarea pentru prezența cancerului bacterian. Astfel, se reduce numărul de plante bolnave care intră în procesul de multiplicare și se stabilește o strategie pentru manipularea cu coardele colectate în vederea producerii butașilor altoiți de viță-de-vie (Lehoczky, 1968; Леманова & Бепер, 1976). Prin urmare, gestionarea și monitorizarea continuă a cancerului bacterian al viței-de-vie rămân esențiale pentru a preveni apariția și răspândirea bolii, chiar și în condiții climatice în schimbare.

Scopul lucrării este de a implementa și valida metoda PCR pentru identificarea precisă și rapidă a tulpinilor patogene, inclusiv *All. vitis* și *A. tumefaciens*, în cadrul selecției fitosanitare a viței-de-vie. Obiectivele includ obținerea culturilor de agrobacterii din vița-de-vie infectată, detectarea ADN-ului patogen din probele obținute, precum și diferențierea între tulpinile patogene și nepatogene.

MATERIALE ȘI METODE

Prelevarea probelor. Probele au fost prelevate în perioada 2022-2024. Au fost analizate 6 probe. Materialul de prelevare l-au constituit vițe maturate de un an din următoarele soiuri/forme: Basarabia A 36(37), 112-13-66 (CC-IV-3), IV-32-75 (V 26), BU-24-6-4, Apiren roz (CC-IV-21), Meleag II-19-7.

Izolarea ADN-ului. ADN-ul a fost izolat din colonii de bacterii din *Agrobacterium* spp selectate pe mediul Roy & Sasser (Roy & Sasser, 1983) timp de 7 zile la 27°C. Coloniile au fost suspendate cu o buclă sterilă într-un ml de apă ultra-purificată, iar suspensia a fost transferată într-o eprubetă de 1,5 ml. ADN-ul a fost izolat prin lizarea probelor la 95°C timp de 10 minute.

Analiza PCR. Izolatele agrobacteriene au fost studiate prin metoda clasică de reacție în lanț a polimerazei (PCR). Lucrarea a fost efectuată cu markeri ADN pentru genele *pehA*, *virF* și *virD*. Studiul pentru identificarea moleculară a agrobacteriilor a fost realizat folosind kitul comercial „PCR *Agrobacterium vitis*”. Acest kit de diagnostic, dezvoltat de QualiPlante, permite distingerea între *All. vitis* și *A. tumefaciens* și identificarea tulpinilor nevirulente. Diagnosticarea PCR a fost efectuată conform protocolului furnizat de producător (Kawuguchi, 2013) disponibil pe website-ul QualiPlante.

Markeri de ADN. Au fost utilizați trei markeri (M) de ADN cu lungimi cuprinse între 100 și 10.000 de perechi de baze.

Gel de agaroză. Electroforeza a fost realizată în gel de agaroză cu o concentrație de 2%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În cadrul lucrărilor fitosanitare au fost evidențiate 6 soiuri și forme de viță-de-vie din plantațiile experimentale de soiuri ale Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, cu o vârstă de peste 30 de ani. Plantele selectate, vizual bine dezvoltate, cu o creștere anuală bogată și fără simptome ale cancerului bacterian, au fost incluse în procesul de selecție clonală și fitosanitară și, respectiv, au fost testate pentru infecții latente cu boli virale și cancer bacterian. Pentru realizarea studiului au fost prelevate vițe în vârstă de un an. Compoziția soiurilor, adresele în câmp și rezultatele testării sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Rezultatele testărilor la prezența bacteriei din *Agrobacterium* spp prin metoda microbiologică

Nr.	Soi, elită	Adresa în câmp	Rezultatele testării microbiologice
1	Basarabia A	36(37)	Pozitiv
2	112-13-66	CC-IV-3	Pozitiv
3	IV-32-75	V -26	Pozitiv
4	BU-24-6-4	IV -32	Negativ
5	Apiren roz	CC-IV-21	Pozitiv
6	Meleag	II-19-7	Pozitiv

Materialul vegetal a fost testat prin metoda microbiologică pe mediul semiselectiv Roy & Sasser (1983). Izolatele au fost incubate timp de 7 zile la 27°C, dezvoltând colonii albe, convexe, lucioase, cu un centru roșu (Figura 2).

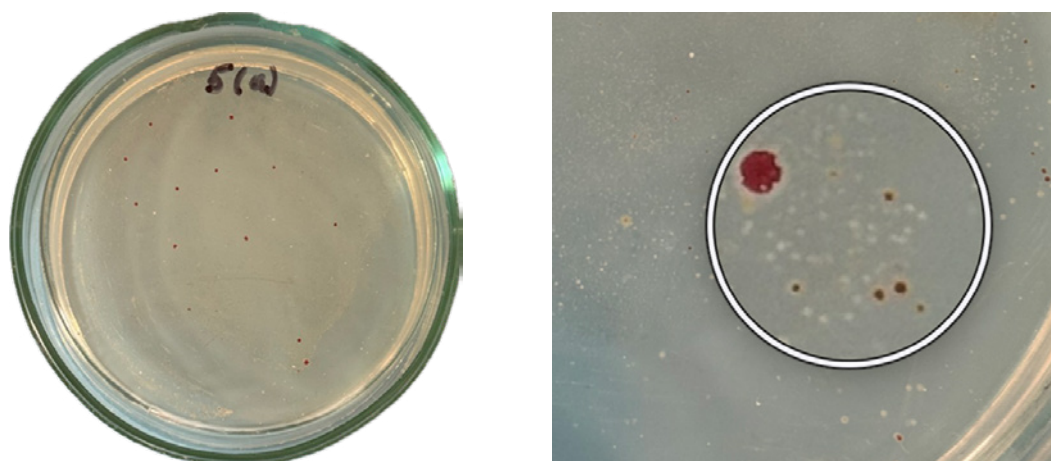


Figura 2. Coloniile de bacterii de tip *Agrobacterium spp* pe mediul semiselectiv Roy, Sasser

După cum se poate observa din tabelul 1, cinci dintre cele șase plante testate au prezentat rezultate pozitive pentru infecția cu *Agrobacterium spp*. Plantele infectate au fost cele ale soiurilor Basarabia, Apiren roz, Meleag și ale formelor de selecție 112-13-66 și IV-32-75. Forma de selecție BU-24-6-4 a arătat rezultat negativ pentru *Agrobacterium spp*. Cu toate acestea, așa cum s-a menționat anterior, la momentul colectării coardelor nu s-au observat formațiuni de tip gale sau urme ale acestora pe tufe. Absența simptomelor ar putea fi explicată fie prin nepatogenitatea agrobacteriilor, fie prin absența condițiilor care să declanșeze formarea tumorilor. Loturile testate pozitiv au fost transferate la etapa de testare prin metoda PCR.

Pentru studiul agrobacteriilor a fost ales un sistem de test pentru detectarea genelor care determină virulența la *All. vitis* și *A. tumefaciens*. Folosind metoda PCR Triplex End-Point este posibilă identificarea genelor *pehA*, care sunt utilizate pentru identificarea *All. vitis* și pentru diferențierea lor de *A. tumefaciens* printr-un fragment de ADN de 466 bp. La fel este posibilă detectarea regiunii genei *virF* (382 bp), care codifică producția de nopaline și octopine, și a unei regiuni a genei *virD* (320 bp), care codifică producția de vitopine. Rezultatele testării a 5 izolate de *Agrobacterium spp*. sunt prezentate în figura 3, numerotate de la 1 la 6.

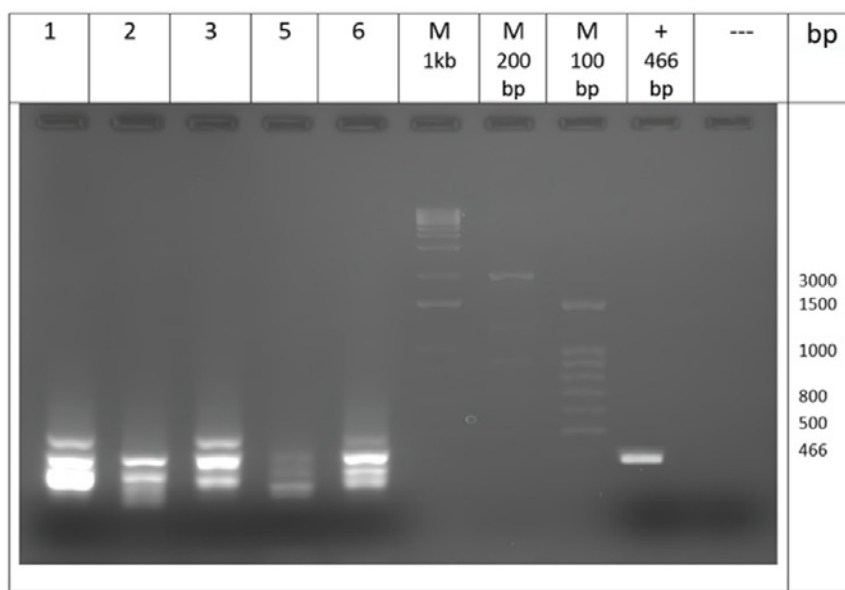


Figura 3. Electroforegrama obținută în urma analizei izolatelor cu primere în gel de agaroză de 2%

În rezultatul testării a fost confirmată prezența genei PehA (466 bp) în toate probele testate, fapt care a demonstrat că toate speciile sunt *All. vitis*, iar agrobacteriile *A. tumefaciens* lipsesc. Astfel, în trei (Nr 1,5,6) din cele cinci izolate studiate a fost identificat fragmentul-țintă al genei pehA și două fragmente ale genei pTi, care codează nopalina, octopina și vitopina, indicând patogenitatea tulpinilor. Celelalte două izolate sunt, de asemenea, patogene, dar diferă de tipul plasmidei pTi. Izolatul nr. 2, în afară de gena PehA, conține gena virF cu plasmida pTi de tip octopină și nopalină, iar izolatul nr. 3 conține gena virD și aparține tipului vitopină. Prin urmare, agrobacteriile izolate din vița-de-vie fără simptome de cancer bacterian sunt clasificate ca *Allorhizobium vitis*, cu regiunile asociate cu producția de nopaline, octopine și vitopine pe plasmidele pTi, adică sunt patogene și pot manifesta simptomele cancerului bacterian al viței-de-vie în condiții optime (Tabelul 2).

Tabelul 2. Rezultatele diagnosticării PCR a izolatelor extrase prin metoda microbiologică

Nr	All.vitis (466 bp.)	A. tumefaciens	Napoline, octopine (pTi 382 bp.)	Vitopine (pTi 320 bp.)	Patogenitatea
1	+	-	+	+	+
2	+	-	+	-	+
3	+	-	-	+	+
5	+	-	+	+	+
6	+	-	+	+	+

Astfel, atunci când există suspiciuni cu privire la infecția cu cancerul bacterian în forma latentă în materialul săditor de viță-de-vie devine crucial să se identifice specia de agrobacterii și gradul ei de patogenitate. În situația în care un lot de butași este infectat cu o tulpină nononcogenică, acesta trebuie tratat termic și după aceasta poate fi utilizat pentru a înființa o plantație de viță-de-vie. Dacă butașii sunt infectați cu tulpini patogene de *All. vitis* sau *A. tumefaciens*, este necesar ca acest material săditor să fie supus unui proces de asanare, fie prin tratament termic cu apă fierbinte, fie prin utilizarea substanțelor chimice active care să inactiveze aceste bacterii și, în mod obligatoriu, să fie retestat pentru confirmarea absenței agrobacteriilor patogene.

CONCLUZII

Rezultatele obținute în urma testării cu PCR indică faptul că această metodă permite diagnosticarea fiabilă a patogenității agrobacteriilor din genurile *All. vitis* și *A. tumefaciens* în termen scurt, prin detectarea prezenței plasmidei pTi ca indicator al virulenței, și poate fi aplicată cu succes pentru accelerarea procesului de selecție fitosanitară și pentru obținerea clonelor sănătoase de viță-de-vie. Rezultatele obținute contribuie la dezvoltarea strategiilor de combatere a infecțiilor cu cancer bacterian și la îmbunătățirea practicilor de selecție fitosanitară a materialului de multiplicare viticol.

RECUNOAȘTERI

Lucrarea a fost realizată în cadrul proiectului Oficiului Național al Viei și Vinului „Vițe certificate – asigurarea producerii vițelor libere de bolile virotice, bacteriene și fitoplasmice” și al programului instituțional Nr 200101 „Crearea soiurilor și clonelor

pomicole, viticole și legumicole, perfecționarea procedeelor agrotehnice de cultivare și elaborarea tehnologiilor de producere a vinurilor din soiuri de struguri locale și produselor alimentare de ultimă generație” al Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. BINI, F., KUCZMOG, A., PUTNOKY, P. (2008). Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Vitis*, vol. 47, no. 3, pp. 181-189. ISSN 2367-4156. Available: <https://doi.org/10.5073/vitis.2008.47.181-189>
2. BURR, T.J., BAZZI, C., SULE, S., OTTEN, L. (1998). Crown gall of grape: Biology of *A. vitis* and the development of disease control strategies. In: *Plant Disease*, vol. 82, pp. 1288-1297. ISSN 1943-7692. Available: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS.1998.82.12.1288>
3. DESSAUX, Y., FAURE, D. (2018). Niche construction and exploitation by *Agrobacterium*: How to survive and face competition in soil and plant habitats. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology Agrobacterium Biology*, pp. 55-86. Available: https://doi.org/10.1007/82_2018_83
4. DUBCEAC, M. (2023). Establishment of the nuclear stock (pre-base) of the *V. vinifera* genus through phytosanitary selection in the Republic of Moldova. In: *The 20th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like diseases of the Grapevine (ICVG)*, Porto Palace Hotel, Thessaloniki, Greece, 25-29 September 2023, pp. 167-169.
5. EASTWELL, K. C., KENNETH, C., LESLIE, G., CAVILEER, D. T. (1995) A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction, *Plant Disease*, vol. 79, no. 8, pp. 822-827. Available: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1995Articles/PlantDisease79n08_822.pdf
6. HAAS, J. H., MOORE, L. W., REAM, W., MANULIS, S. (1995). Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. In: *Applied and environmental microbiology*, vol. 61, no. 8, pp. 2879-2884. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167564/pdf/612879.pdf>
7. KAWUGUCHI, A. (2013). Biological control of crown gall on grapevine and root colonization by non-pathogenic *R. vitis* strain ARK-1. In: *Microbes and Environments*, vol. 28(3), pp. 306-311.
8. KUZMANOVIC, N., PULAWSKA, J., HAO, L., BURR, T. J. (2018). The ecology of *Agrobacterium vitis* and management of crown gall disease in vineyards. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology Agrobacterium Biology*, vol. 418, pp. 15-53. DOI 10.1007/82_2018_85.
9. LEHOCZKY, J. (1968). Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection. In: *Journal of Phytopathology*, vol. 63(3), pp. 239-246. Available: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1968.tb02389.x>
10. ЛЕМАНОВА, Н.Б., БЕРБЕР, П.Ф. (1976). Методы борьбы с бактериальным раком винограда. В: *Садводство, виноградарство и виноделие Молдавии*, №12, с. 37-38.
11. MOUSAVI, S. A., WILLEMS, A., NESME, X., de LAJUDIE, P., LINDSTRÖM, K. (2015). Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. In: *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 38, pp. 84-90. Available: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003>
12. PAULUS, F., HUSS, B., BONNARD, G. et al. (1989). Molecular systematics of biotype III Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Molecular plant-microbe interactions*, vol. 2(2), pp. 64-74. Available: https://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1989Articles/Microbe02_064.pdf
13. ROY, M. A., SASSER, M. (1983). A medium selective for *A. tumefaciens* biotype 3. In: *Phytopathology*, vol. 73.
14. SCHELL, J., VAN MONTAGU, M. (1977). Transfer, maintenance, and expression of bacterial Ti-plasmid DNA in plant cells transformed with *A. tumefaciens*. In: *Brookhaven symposia in biology*, vol. 29, 36-49.
15. БОНДАРЧУК, В., СУЛТАНОВА, О., ХАУСТОВ, Е., ДАДУ, Д. (2014). Оздоровление виноградной лозы от *Agrobacterium vitis* (var *tumefaciens*) методом термотерапии. In: *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, nr. 6 (54), pp. 27-29. Disponibil: https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/27-29_14.pdf

Conflict of interests

No competing interests were disclosed.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Paper history

Received 13.04.2024 Accepted 23.05.2024

Copyright: © 2024 by the author(s). This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).