

Diferencijacija fitopatogenih vrsta roda *Agrobacterium*

Nemanja Kuzmanović, Milan Ivanović, Anđelka Čalić, Katarina Gašić
i Aleksa Obradović

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Institut za fitomedicinu,
Nemanjina 6, 11080 Beograd, Srbija
(kuzmanovic1306@gmail.com)

Primljen: 27. jula 2011.
Prihvaćen: 22. avgusta 2011.

REZIME

Usled poteškoća u razlikovanju vrsta roda *Agrobacterium* i nedostatka standardizovanog protokola izvršena je procena i odabir pogodnih metoda u cilju njihove diferencijacije na osnovu fizioloških, genetskih i patogenih odlika. Diferencirani su sojevi *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* i *A. vitis* primenom standardnih bakterioloških i molekularnih metoda. Primenom diferencijalnih testova sojevi su ispoljili očekivane biohemijsko-fiziološke karakteristike. Izvedene su dve „duplex“ PCR metode sa 4 različita tipa prajmera. Kod proučavanih sojeva detektovano je prisustvo *virD2* i *virC* gena patogenosti, koji se nalaze na plazmidnoj DNK bakterije. Prisustvo hromozomskog gena *pehA*, odgovornog za sintezu enzima poligalakturonaze, utvrđeno je kod soja *A. vitis*. Patogenost je proverena na kriškama mrkve i mladim biljkama paradajza i suncokreta. Sojevi *A. tumefaciens* i *A. vitis* bili su tumorogeni na svim test biljkama, dok je soj *A. rhizogenes* ispoljio patogenost jedino na kriškama mrkve. Na osnovu dobijenih rezultata, proučavani sojevi diferencirani su kao tumorogeni (Ti) *Agrobacterium tumefaciens* i *A. vitis*, i kao rizogeni (Ri) *A. rhizogenes*.

Ključne reči: Bakteriozni rak; plazmid; *Agrobacterium*; „duplex“ PCR; patogenost

UVOD

Fitopatogene vrste roda *Agrobacterium* prouzrokuju bakteriozni rak mnogih dikotiledonih biljaka, pojedinih monokotiledonih, kao i nekih golosemenica (Mathysse, 2006). Od gajenih biljaka posebno su osetljive višegodišnje voćne vrste (Garret, 1987; Sobiczewski i sar., 1991), vinova loza (Schroth, 1988) i neke ukrasne biljke (Poncet i sar., 1996). Usled oboljenja dolazi do značajnih ekonomskih šteta, naročito u rasadničarskoj proizvodnji gde mogu iznositi više od 80% (Garret,

1987). Godišnji finansijski gubici nastali usled oboljenja koje prouzrokuju *Agrobacterium* spp. u SAD mere se desetinama miliona dolara (Kennedy i Alcorn, 1980).

Patološke promene ispoljavaju se u vidu tumora ili kosmatosti (Arsenijević, 1997). U najvećoj meri, bolest zahvata podzemne biljne delove – koren i korenov vrat, a u pojedinim slučajevima simptomi se ispoljavaju i na stablu. Međutim, uobičajene su i latentne zaraze, kada je patogen prisutan u biljnom materijalu bez vidljivih simptoma. Ukoliko se za sadnju koriste zaražene biljke, u kasnijim fazama razvoja može doći do usporenog

porasta i smanjenja prinosa, pa čak i do izumiranja biljaka (Poncet i sar., 1996; Schroth, 1988). U pojedinim slučajevima nije primećena značajna razlika u porastu između zdravih i zaraženih biljaka što je zabeleženo kod nekih sorti trešnje (Garret, 1987).

Patogenost predstavnika ovog roda uslovljena je prisustvom Ti plazmida (Tumor inducing – izazivač tumora) ili Ri plazmida (Root inducing – izazivač kosmatosti) u genomu bakterije. Nastanku tumora ili kosmatosti prethodi ugradnja dela plazmida bakterije u biljni genom, dovodeći do genetičke transformacije biljne ćelije (Zhu i sar., 2000). Geni bakterije ugrađeni u genom biljke domaćina kodiraju sintezu biljnih hormona auksina i citokinina, koji izazivaju proliferaciju tkiva i razvoj tumora, odnosno kosmatost korena. Ovi geni kontrolišu i proizvodnju specifičnih materija koje se nazivaju opini. Opini predstavljaju različite vrste molekula koji se sintetišu i izlučuju iz formiranih gala, a koriste ih bakterije u svom metabolizmu. Sposobnost vrsta roda *Agrobacterium* da koriste ove materije predstavlja njihovu kompetitivnu prednost u odnosu na druge bakterije koje se mogu naći u blizini gala (Burr i Otten, 1999).

Klasifikacija roda *Agrobacterium* ranije se zasnivala upravo na patogenim karakteristikama. Međutim, novija istraživanja ukazuju na to da se ovaj rod sastoji od najmanje pet genetički i fenotipski različitih grupa (Young i sar., 2005). Taksonomija ovog roda još uvek je u procesu revizije, a nedavno je predloženo pripajanje predstavnika roda *Agrobacterium* rodu *Rhizobium* (Young i sar., 2001). U ovom radu biće korišćena klasifikacija po kojoj je rod podeljen na vrste *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* i *A. rubi*. *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes*, ukoliko poseduju neki od plazmida nosioca patogenosti, imaju izuzetno širok krug domaćina, *A. vitis* pretežno parazitira vinovu lozu, dok *A. rubi* na osnovu dosadašnjih istraživanja parazitira isključivo *Rubus* spp. (Young i sar., 2005). Poslednja u nizu opisana je i izdvojena vrsta *A. larrymoorei* koja prouzrokuje bakteriوزni rak fikusa (Bouzar i sar., 1995a).

Diferencijacija *Agrobacterium* vrsta može se izvršiti primenom standardnih bakterioloških, automatizovanih i molekularnih metoda. Do sada je u literaturi opisan niz biohemijsko-fizioloških testova koji se mogu koristiti u njihovoj diferencijaciji (Tabela 1) (Bouzar i sar., 1995a, 1995b; Kerr i Gibb, 1997; Moore i sar., 2001). Takođe, razvijen je sistem kojim se u specijalnim mikrotitarskim pločama može analizirati veliki broj sojeva (Cubero i Lopez, 2001). Komercijalno dostupne automatizovane metode, kao što su analiza masnih kiselina i BIOLOG test, takođe su se pokazale pogodnim u diferencijaciji *Agrobacterium* vrsta (Bouzar i sar., 1993,

1995; Jarvis i sar., 1996). Do sada je korišćeno više različitih molekularnih metoda u detekciji, identifikaciji i diferencijaciji *Agrobacterium* spp. Među njima najširu primenu ima lančana reakcija umnožavanja fragmenata DNK (PCR). U ovu svrhu razvijeno je više prajmera specifičnih za plazmidnu DNK kojima se sojevi mogu diferencirati na osnovu patogenih karakteristika (Eastwell i sar., 1995; Haas i sar., 1995; Sawada i sar., 1995; Szegedi i Bottka, 2002; Suzaki i sar., 2004; Kawaguchi i sar., 2005; Pulawska i Sobiczewski, 2005; Bini i sar., 2008). Nedavno je razvijen „multiplex“ PCR pomoću koga se prajmerima specifičnim za hromozomski 23s rRNK gen mogu diferencirati sojevi roda *Agrobacterium* do nivoa vrste (Pulawska i sar., 2006). Pored gore navedenih tehnika neophodno je izvođenje testa patogenosti, kako bi se potvrdila patogena priroda proučavanih sojeva. U ovu svrhu mogu se koristiti kriške mrkve, klijanci ili mlade biljke paradajza, duvana, suncokreta, tatule itd. Imajući u vidu da se pojedini sojevi odlikuju veoma uskim krugom domaćina, neophodno je patogenost proveriti na više različitih test biljaka ili pak na vrsti iz koje je patogen izolovan.

Opsežnija istraživanja vezana za vrste roda *Agrobacterium* u našoj zemlji nisu izvođena više od trideset godina. Nedavno je objavljen prvi nalaz *A. tumefaciens* na malini iz okoline Valjeva (Milijašević i sar., 2007). Cilj ovog rada bio je da se izvrši izbor metoda pogodnih za diferencijaciju tri najznačajnije vrste roda *Agrobacterium* na osnovu dostupnih biohemijsko-fizioloških testova i molekularnih metoda, uz proveru patogenosti na nekoliko pogodnih test biljaka.

MATERIJAL I METODE

Sojevi korišćeni u radu

U istraživanju su korišćeni referentni sojevi *A. tumefaciens* (KFB 096), *A. rhizogenes* (KFB 098) i *A. vitis* (KFB 099) poreklom iz međunarodnih kolekcija. Sojevi su čuvani u hranljivom bujonu sa 30% glicerola (Schaad i sar., 2001), pri temperaturi od -80°C u kolekciji fitopatogenih bakterija (KFB) Instituta za fitomedicinu Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. U biohemijsko-fiziološkim testovima korišćene su kulture bakterija stare 24-48 h, gajene na KDA podlozi sa dodatkom 0,5% CaCO₃. Bakterijske kulture iz kojih je vršena ekstrakcija DNK gajene su na PYGA podlozi (pepton 3 g/l, kvašćev ekstrakt 5 g/l, glicerol 10 ml/l i agar 20 g/l).

Diferencijacija biohemijsko-fiziološkim testovima

Biohemijsko-fiziološke odlike izolovanih sojeva proučene su standardnim i diferencijalnim testovima. Reakcija po Gramu utvrđena je postupkom sa 3% KOH (Suslow i sar., 1982). Od odgajivačkih odlika proučen je razvoj bakterija pri 35°C i razvoj u podlozi sa 2% NaCl (Moore i sar., 2001). Proučena je aktivnost oksidaze; stvaranje 3-ketolaktoze; formiranje prosvetljenih zona na KDA podlozi sa CaCO₃; pokretljivost bakterija pri pH 7,0; pektolitička aktivnost pri pH 4,5; razvoj i pigmentacija u podlozi sa feriamonijum-citratom, korišćenje citrata i proizvodnja kiseline iz saharoze i baze iz tartarata (Bouzar i sar., 1995b; Kerr i Gibb, 1997; Moore i sar., 2001).

Diferencijacija molekularnim metodama

DNK je ekstrahovana iz čistih bakterijskih kultura pravljjenjem suspenzije bakterija, koncentracije 10⁸ CFU/ml (OD₆₀₀=0,2), koja je zatim izlagana temperaturi 95°C tokom 10 min u vodenom kupatilu. Ekstrakti bakterijske DNK dobijeni na ovaj način ohlađeni su

na ledu i korišćeni za analizu ili su čuvani pri temperaturi -20°C za kasnija proučavanja.

PCR metoda izvedena je korišćenjem četiri seta prajmera specifičnih za deo plazmidne, odnosno hromozomske DNK. Oznake prajmera, sastav sekvenci, veličina umnoženih PCR proizvoda kao i literaturni izvori navedeni su u tabeli 2. A/C' par prajmera specifičan je za plazmidni (Ti i Ri) *virD2* gen koji je prisutan kod širokog kruga patogenih *Agrobacterium* vrsta, dok se parom prajmera CYT/CYT' umnožava sekvenca na *ipt* genu koji je prisutan samo na tumorogenom (Ti) plazmidu. Kombinovanjem ova dva para prajmera u „duplex“ PCR-u, omogućava se istovremena detekcija oba gena i diferencijacija tumorogenih (sadrže Ti plazmid) i rizogenih (sadrže Ri plazmid) *Agrobacterium* vrsta (Haas i sar., 1995). VCF3/VCR3 parom prajmera amplifikuje se fragment DNK karakterističan za *virC* gen koji se nalazi na Ti ili Ri plazmidu, dok je par prajmera PGF/PGR komplementaran sekvenci hromozomskog gena *pehA* karakterističnog za vrstu *A. vitis*. VCF3/VCR3 i PGF/PGR prajmeri, primenjeni istovremeno u „duplex“ PCR metodi, omogućavaju diferenciranje patogenih *A. vitis* sojeva (Kumagai i Fabritius, 2008).

Tabela 1. Biohemijsko-fiziološke karakteristike fitopatogenih vrsta roda *Agrobacterium* (Bouzar i sar., 1995a, 1995b; Kerr i Gibb, 1997; Moore i sar., 2001)

Test	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. vitis</i>	<i>A. rubi</i>	<i>A. larrymoorei</i>
Bojenje po Gram-u	-	-	-	-	-
Aktivnost oksidaze	+	-/V	V	+	NP
Razvoj pri 35°C	+	-/V	V	V	-
Razvoj u 2% NaCl	+	-	+	+	+
3-ketolaktozni test	+	-	-/V	-	-
Reakcija u lakmus mleku	ALK	KIS	ALK	ALK	ALK
Formiranje prosvetljenih zona na KDA-CaCO ₃	-	+	-	-	V
Pokretljivost pri pH 7,0	+	+	-	NP	NP
Pektolitička aktivnost pri pH 4,5	-	-	+	NP	NP
Razvoj i pigmentacija u podlozi sa feriamonijum-citratom	+	-	-	-	-
Korišćenje citrata	-/V	+	+	-	-
Stvaranje kiseline iz:					
saharoze	+	-	V	NP	NP
eritritola	-	+	-	-	NP
melozitoze	+	-	-	-	NP
Stvaranje baze iz:					
L-tartarata	-/V	+	+	-	+
mucinska kiselina	-	+	-	NP	NP
malonske kiseline	-	+	+	+	-

+ = pozitivna reakcija kod više od 80% sojeva; V = 21-79% sojeva ispoljava pozitivnu reakciju; - = negativna reakcija kod više od 80% sojeva; NP = nema literaturnih podataka; ALK = alkalna reakcija; KIS = kisela reakcija

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za diferencijaciju *Agrobacterium* spp.

Ime	Sekvenca	Veličina umnoženog fragmenta	Literatura
A/ C'	5'- ATGCCCGATCGAGCTCAAGT - 3' 5'- TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA - 3'	224 bp	Haas i sar., 1995.
CYT/ CYT'	5'- GATCG(G/C)GTCCAATG(C/T)TGT - 3' 5'- GATATCCATCGATC(T/C)CTT - 3'	427 bp	Haas i sar., 1995.
VCF3/ VCR3	5'- GGCGGGCGYGCYGAAAGRAARACYT - 3' 5'- AAGAACGYGGNATGTTGCATCTYAC - 3'	414 bp	Suzaki i sar., 2004.
PGF/ PGR	5'- GGGGCAGGATGCGTTTTTGGAG - 3' 5'- GACGGCACTGGGGCTAAGGAT - 3'	466 bp	Herlache i sar., 1997; Szegedi i Bottka, 2002.

„Duplex“ PCR sa A/C' i CYT/CYT' prajmerima izveden je prema protokolu po Haas-u i sar. (1995). Reakciona smeša krajnje zapremine 50 μ l sadržala je: 1 *Taq* pufer (sadrži KCl i 15 mM MgCl₂); 0,2 mM dNTPs; 0,4 μ M prajmera; 1U *Taq* DNK polimeraze; 30,8 μ l vode (Fermentas, Litvanija) i 5 μ l DNK ekstrakta. PCR reakcija se odvijala po sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 94°C u trajanju 60 sekundi, 40 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 60 sekundi, vezivanja prajmera pri 50°C u trajanju 60 sekundi i ekstenzije pri 72°C u trajanju 60 sekundi. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C tokom 5 minuta.

U reakciji sa VCF3/VCR3 i PGF/PGR prajmerima primenjen je protokol po Kumagai i Fabritius (2008), uz manje modifikacije u pogledu sastava i koncentracije pojedinih komponenti reakcione smeše. Reakciona smeša finalne zapremine 25 μ l sadržala je: 1 *Taq* pufer (sadrži KCl i 15 mM MgCl₂); 0,2 mM dNTPs; 0,5 μ M prajmera; 0,5U *Taq* DNK polimeraze; 13,4 μ l vode (Fermentas, Litvanija) i 2 μ l DNK ekstrakta. Reakcija se odvijala po sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 94°C u trajanju 5 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 60 sekundi, vezivanja prajmera pri 56°C u trajanju 60 sekundi i ekstenzije pri 72°C u trajanju 60 sekundi. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 5 minuta.

Reakcije umnožavanja DNK su izvedene u aparatu Thermo Cycler 2240 (Applied Biosystem, USA). Produkti umnožavanja DNK razdvojeni su procesom elektroforeze u 2% agaroznom gelu, a zatim obojeni u rastvoru etidijum-bromida (1 μ g/ml) i posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru.

Test patogenosti

U cilju utvrđivanja patogenosti proučavanih sojeva korišćene su sledeće biljne vrste: mrkva (*Daucus carota*), suncokret (*Helianthus annuus*) i paradajz (*Solanum lycopersicum*). Koren mrkve dezinfikovao je u 1% rastvoru natrijum-hipohlorita, potom isečen na kriške i postavljen

u sterilne petri-kutije sa vlažnim filter papirom. Na ovako pripremljene kriške pipetirano je 100 μ l bakterijske suspenzije koncentracije 10⁸ CFU/ml. Kriške mrkve inkubirane su pri sobnoj temperaturi, a promene su praćene tokom 3 nedelje od inokulacije. Biljke paradajza i sunco-kreta, starosti 2-3 nedelje inokulisane su ubodom entomološkom iglom u stablo gde je prethodno naneto 20 μ l bakterijske suspenzije koncentracije 10⁸ CFU/ml. Inokulisane biljke gajene su u uslovima staklenika pri temperaturi od 24 \pm 3°C. Svi testovi patogenosti izvedeni su u najmanje tri ponavljanja. Biljke inokulisane sterilnom destilovanom vodom korišćene su kao negativna kontrola. U narednom periodu posmatrana je pojava i razvoj tumora na mestu inokulacije navedenih biljaka.

REZULTATI

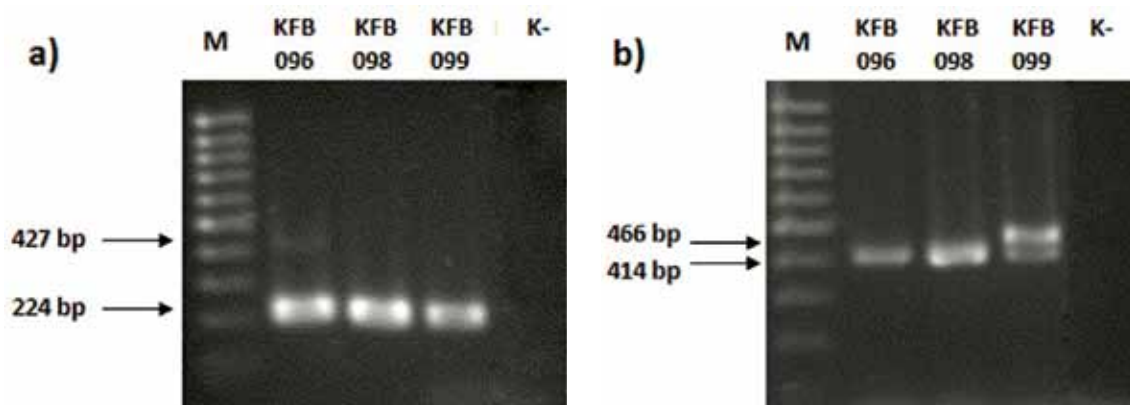
Diferencijacija sojeva

Svi proučavani sojevi pripadaju Gram-negativnim bakterijama. Sojevi *A. tumefaciens* (KFB 096) i *A. vitis* (KFB 099) stvaraju oksidazu, razvijaju se pri temperaturi 35°C i u podlozi sa 2% NaCl za razliku od soja *A. rhizogenes* (KFB 098) (Tabela 3). Soj *A. tumefaciens*, za razliku od ostalih, stvara 3-ketolaktozu i razvija se u podlozi sa feriamonijum-citratom uz stvaranje karakterističnog pigmenta, dok pri razvoju na KDA podlozi sa dodatkom CaCO₃ jedino soj *A. rhizogenes* indukuje čiste, prozirne zone. Sojevi *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* pokretljiviji su pri pH 7,0 za razliku od soja *A. vitis*, dok soj *A. vitis* jedini ispoljava slabu pektolititičku aktivnost pri pH 4,5. Sojevi *A. rhizogenes* i *A. vitis* razlažu citrate i stvaraju baze iz tartarata, ali ne i soj *A. tumefaciens*. Soj *A. tumefaciens* stvara kiselinu iz saharoze, dok je reakcija soja *A. vitis* slabo pozitivna a *A. rhizogenes* negativna. U poredenju sa literaturnim podacima proučavani sojevi u ovom radu ispoljili su očekivane biohemijско-fiziološke karakteristike u svim izvedenim testovima.

Tabela 3. Rezultati biohemijsko-fizioloških testova, PCR analize i testa patogenosti proučavanih sojeva

Test	<i>A. tumefaciens</i> (KFB 096)	<i>A. rhizogenes</i> (KFB 098)	<i>A. vitis</i> (KFB 099)
Bojenje po Gramu	-	-	-
Aktivnost oksidaze	+	-	+
Razvoj pri 35°C	+	-	+
Razvoj u 2% NaCl	+	-	+
3-ketolaktozni test	+	-	-
Formiranje prosvetljenih zona na KDA-CaCO ₃	-	+	-
Pokretljivost pri pH 7,0	+	+	-
Pektolitička aktivnost pri pH 4,5	-	-	(+)
Razvoj i pigmentacija u podlozi sa feriamonijum-citratom	+	-	-
Korišćenje citrata	-	+	+
Stvaranje kiseline iz saharoze	+	-	(+)
Stvaranje baze iz tartarata	-	+	+
<i>virD2</i>	+	+	+
<i>ipt</i>	(+)	-	-
<i>virC</i>	+	+	+
<i>pebA</i>	-	-	+
Test patogenosti mrkva	+	+	+
suncokret	+	-	+
paradajz	+	-	+

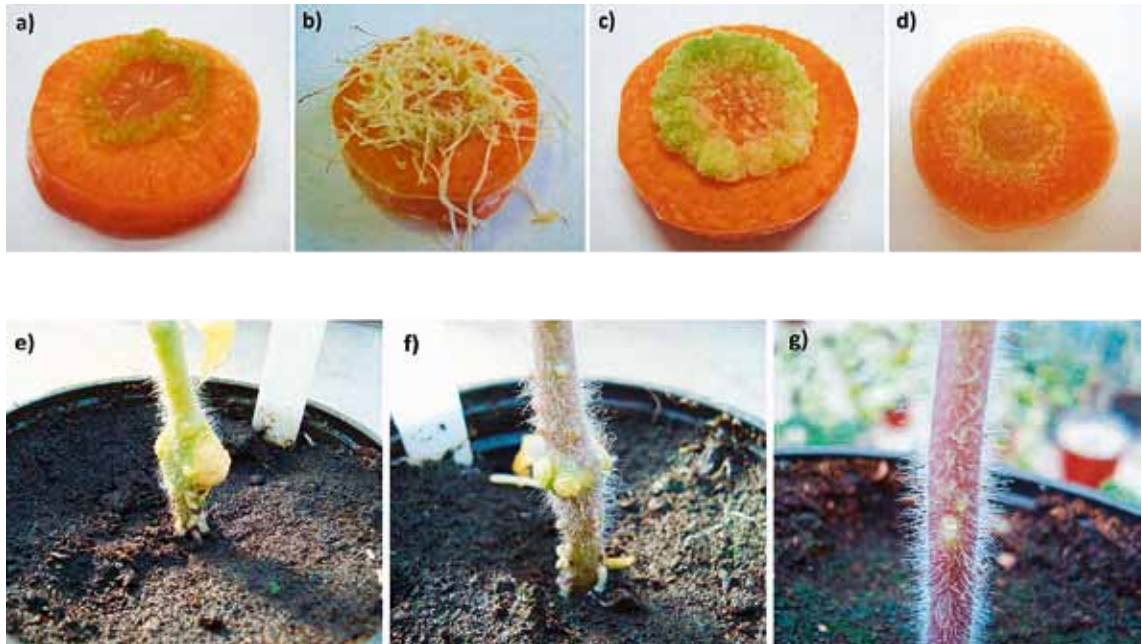
+ = pozitivna reakcija; (+) = slabo pozitivna reakcija; - = negativna reakcija



Slika 1. „Duplex“ PCR analiza proučavanih sojeva: a) parom prajmera koji odgovara *virD2* genu umnožen je fragment veličine 224 bp kod svih proučavanih sojeva. Parom prajmera za *ipt* gen dobijen je slab signal jedino kod soja KFB 096; b) *virC* prajmerima umnožena je sekvenca veličine 414 bp kod svih proučavanih sojeva. Parom prajmera za detekciju gena *pebA* umnožen je fragment veličine 466 bp kod svih proučavanih sojeva. Kolone: M – marker (MassRuler Low Range DNA Ladder, Fermentas, Litvanija); KFB 096 – *A. tumefaciens*; KFB 098 – *A. rhizogenes* i KFB 099 – *A. vitis*; K- – negativna kontrola

Parom prajmera A/C' umnožen je fragment veličine 224 bp kod svih proučavanih sojeva, čime je potvrđeno postojanje *virD2* gena, odnosno plazmida nosioca patogenosti u njihovom genomu (Slika 1a). Međutim, korišćenjem prajmera CYT/CYT' dobijen je izrazito slab signal jedino kod soja *A. tumefaciens*.

Parom prajmera VCF3/VCR3 umnožen je fragment veličine 414 bp kod sva tri proučavana soja (Slika 1b). Na ovaj način detektovan je *virC* gen u njihovom plazmidu. Korišćenjem PGF/PGR para prajmera, gen za poligalakturonazu (*pehA*) detektovan je jedino kod soja *A. vitis*.



Slika 2. Test patogenosti. Kriške mrkve inokulisane sa: *A. tumefaciens*, KFB 096 (a); *A. rhizogenes*, KFB 098 (b); *A. vitis*, KFB 099 (c); sterilnom destilovanom vodom (d). Biljke paradajza inokulisane sa: *A. tumefaciens*, KFB 096 (e); *A. vitis*, KFB 099 (f); sterilnom destilovanom vodom (g).

Test patogenosti

U testu patogenosti sva tri proučavana soja ispoljila su patogenost na kriškama mrkve. Sojevi *A. tumefaciens* i *A. vitis* označeni kao tumorogeni (Ti), prouzrokovali su stvaranje tipičnog tumoroznog tkiva (Slika 2a i 2c), dok je soj *A. rhizogenes* prouzrokovao simptome tipa kosmatosti (Slika 2b), što je ukazalo na prisustvo rizogenog (Ri) plazmida u njihovom genomu. Sojevi *A. tumefaciens* i *A. vitis* izazvali su tumore na stablu biljaka paradajza i suncokreta (Slika 2e i 2f). U slučaju soja *A. rhizogenes* nije došlo do razvoja simptoma na ovim test biljkama. Na kontrolnim biljkama tretiranim sterilnom destilovanom vodom nije došlo da razvoja simptoma (Slika 2d i 2g).

Zbirni rezultati dobijeni primenom molekularnih i biohemijsko-fizioloških metoda kao i izvođenjem testa patogenosti predstavljeni su u tabeli 3.

DISKUSIJA

Dugo vremena klasifikacija vrsta roda *Agrobacterium* zasnivala se samo na njihovim patogenim odlikama. Ove karakteristike, pre svega, zavise od prisustva Ti, odnosno Ri plazmida, mobilnih genetičkih elemenata koji većim delom kontrolišu procese patogeneze (Kerr i sar., 1977; Young i sar., 2005). Kao posledica razmene plazmida između različitih vrsta, koji se odigrava spontano u prirodi, sojevi *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* mogu biti tumorogeni (Ti) ili rizogeni (Ri), u zavisnosti od toga koji tip plazmida poseduju. Takođe, postoje i nepatogeni sojevi koji nemaju pomenute plazmide u svom genomu (Young i sar., 2005). Što se tiče vrsta *A. vitis* i *A. rubi*, do sada su u prirodi pronađeni tumorogeni (Ti) i nepatogeni sojevi. S obzirom da patogene karakteristike ne predstavljaju pouzdan osnov za klasifikaciju *Agrobacterium* vrsta, novija klasifikacija zasnovana je na jasnim i stabilnim

fiziološko-biohemijskim i genetičkim odlikama vrsta. Stoga su sojevi proučavani u ovom radu diferencirani do nivoa vrste na osnovu fenotipskih i pojedinih genetičkih odlika. Takođe su diferencirani i na osnovu patogenih odlika kao tumorogeni (Ti) ili rizogeni (Ri), u odnosu na to koji tip plazmida poseduju. Na osnovu rezultata dobijenih primenom biohemijsko-fizioloških i molekularnih metoda uz izvođenje testa patogenosti na različitim test biljkama, proučavani sojevi KFB 096 i KFB 099 diferencirani su kao tumorogeni (Ti) *A. tumefaciens* i *A. vitis*. Soj KFB 098 označen je kao rizogeni (Ri) *A. rhizogenes*.

Biohemijsko-fiziološkim testovima može se izvršiti pouzdana diferencijacija sojeva roda *Agrobacterium* do nivoa vrste, međutim ovi testovi najčešće su vremenski zahtevni. Usled genetskih mutacija i rekombinacija, koje se normalno događaju u prirodi, moguće je postojanje tzv. intermedijarnih sojeva čije fenotipske karakteristike variraju i ne odgovaraju uvek odlikama sojeva predstavjenim u ovom radu. Od nedavno je dostupna i metoda lančanog umnožavanja fragmenata DNK gde se na brz način mogu diferencirati sojevi roda *Agrobacterium* do nivoa vrste (Pulawska i sar., 2006). Ova metoda se bazira na detekciji regiona koji se nalaze na visoko konzerviranom 23s rRNK hromozomskom genu.

Molekularnim metodama utvrđene su genetske odlike patogenosti proučavanih sojeva kroz detekciju gena virulentnosti koji se nalaze na plazmidu. Jedan od korišćenih prajmera bio je par A/C' koji se navodi kao univerzalni u detekciji fitopatogenih *Agrobacterium* spp. (Hass i sar., 1995). Međutim, u kasnijim studijama, par prajmera A/C' nije pokazao specifičnost u detekciji svih patogenih *Agrobacterium* sojeva, prvenstveno onih koji su pripadali vrsti *A. vitis* (Bini i sar., 2008; Kumagai i Fabritius, 2008). CYT/CYT' parom prajmera kojim se detektuje *ipt* plazmidni gen uočen je slab signal jedino kod soja *A. tumefaciens*. S obzirom da se umnožavanje odgovarajućeg produkta očekivalo i kod soja *A. vitis*, izostanak signala može biti posledica nespecificnosti ovog para prajmera. VCF3/VCR3 prajmerima u ranijim studijama je detektovan širok krug fitopatogenih *Agrobacterium* vrsta (Suzaki i sar., 2004; Kawaguchi i sar., 2005; Kumagai i Fabritius, 2008). I u ovom radu pomoću njih uspešno je detektovan ciljani gen kod proučavanih sojeva. Takođe, molekularnim metodama, soj *A. vitis* je diferenciran do nivoa vrste korišćenjem prajmera PGF/PGR kojima se detektuje hromozomski gen za poligalakturonazu. Ovaj gen poseduju kako patogeni tako i nepatogeni sojevi *A. vitis*. Prema nekim autorima, ovaj par prajmera se samostalno može koristiti u rutinskoj detekciji patogenih *A. vitis* izolovanih iz biljnog soka jer oni čine većinu populacije u odnosu na nepatogene sojeve (Szegedi

i Bottka, 2002). Ipak, pouzdaniji rezultati dobijaju se kombinovanjem ovog para prajmera sa prajmerima koji za ciljaju sekvencu imaju neki od gena patogenosti. Na ovaj način istovremeno se vrši detekcija svih patogenih sojeva roda *Agrobacterium*, ali i diferencijacija sojeva *A. vitis*.

Provera patogenosti proučavanih sojeva izvršena je inokulacijom nekoliko test biljaka. Odabrane su mlade zeljaste biljke paradajza i suncokreta i kriške mrkve, s obzirom da na njima relativno brzo dolazi do razvoja simptoma. Tumorogeni (Ti) sojevi *A. tumefaciens* i *A. vitis* izazvali su simptome na svim test biljkama, za razliku od rizogenog (Ri) soja *A. rhizogenes* koji je bio patogen samo na kriškama mrkve. Kriške mrkve se i u literaturi navode kao najpogodnije za testiranje rizogenih (Ri) sojeva roda *Agrobacterium* (Lippincott i Lippincott, 1969; Moore i sar., 1979). Treba imati u vidu da postoje specijalizovani sojevi, koji imaju uži krug domaćina ili su patogeni samo na vrsti iz koje su izolovani (Panagopoulos i Psallidas, 1973; Anderson i Moore, 1979).

ZAKLJUČAK

Diferencijacija i identifikacija bakterija do nivoa vrste predstavlja jedan od prvih koraka u postavljanju pravilne dijagnoze oboljenja i donošenju adekvatnih mera zaštite. Od raspoloživih tehnika u ovom radu kombinovane su tradicionalne bakteriološke metode i savremeni molekularni testovi, sa ciljem da se pokaže kako se na brz i pouzdan način mogu diferencirati fitopatogene vrste roda *Agrobacterium*.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je rezultat aktivnosti u okviru projekta III46008 – Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane, koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

LITERATURA

- Anderson, A.R. and Moore, L.W.: Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 69: 320-323, 1979.
- Arsenijević, M.: Bakterioze biljaka (III izmenjeno i dopunjeno izdanje). S-Print, Novi Sad, Srbija, 1997.

- Bini, F., Geider, K. and Bazzi, C.:** Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel *virD2* gene-specific primers that discriminate two subgroups. *European Journal of Plant Pathology*, 122: 403-411, 2008.
- Bouzar, H., Jones, J.B. and Hodge, N.C.:** Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology*, 83: 733-739, 1993.
- Bouzar, H., Chilton, W.S., Nesme, X., Dessaux, Y., Vaudequin, V., Petit, A., Jones, J.B. and Hodge, N.C.:** A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 65-73, 1995a.
- Bouzar, H., Jones, J.B., and Bishop, A.L.:** Simple cultural test for identification of *Agrobacterium* biovars. In: *Methods in Molecular Biology*, vol 44: *Agrobacterium* Protocols (Garland K.M.A. and Davey M.R., eds.), Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 1995b.
- Burr, T.J. and Otten, L.:** Crown gall of grape: biology and disease management. *Annual Review of Phytopathology*, 37: 53-80, 1999.
- Cubero, J. and Lopez, M.M.:** An efficient microtiter system to determine *Agrobacterium* biovar. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 757-760, 2001.
- Eastwell, K.C., Willis, L.G. and Cavileer, T.D.:** A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 79: 822-827, 1995.
- Garrett, C.M.E.:** The effect of crown gall on growth of cherry trees. *Plant Pathology*, 36: 339-345, 1987.
- Haas, J.H., Moore, L.W. and Ream, W.:** Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2879-2884, 1995.
- Jarvis, B.D.W., Sivakumaran, S., Tighe, S.W. and Gillis, M.:** Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. *Plant and Soil*, 184: 143-158, 1996.
- Kawaguchi, A., Sawada, H., Inoue, K. and Nasu, H.:** Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains. *Journal of General Plant Pathology*, 71: 54-59, 2005.
- Kennedy, B.W. and Alcorn, S.M.:** Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease*, 64: 674-676, 1980.
- Kerr, A. and Gibb, K.:** Bacteria and phytoplasmas as plant parasites. In: *Plant Pathogens and Plant Diseases* (Brown J.F. and Ogle H.J., eds.), Rockvale Publications, NSW, Australia, 1997, pp. 86-102.
- Kerr, A., Manigault, P. and Tempé, J.:** Transfer of virulence *in vivo* and *in vitro* in *Agrobacterium*. *Nature*, 265: 560-561, 1977.
- Kumagai, L. and Fabritius, A.:** Detection and differentiation of pathogenic *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine using multiplex Bio-PCR. *Proceedings of National Viticulture Research Conference*, Davis, California, 2008, pp. 42-43.
- Lippincott, J.A. and Lippincott, B.B.:** Tumor initiating ability and nutrition in the genus *Agrobacterium*. *Journal of Genetic Microbiology*, 59: 57-75, 1969.
- Matthysse, A.:** The Genus *Agrobacterium*. In: *The Prokaryotes*, Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. and Stackebrandt E., eds.), Springer, New York, USA, 2006, pp. 91-114.
- Milijašević, S., Gavrilović, V., Živković, S., Trkulja, N. and Pulawska, J.:** First report of tumorigenic *Agrobacterium radiobacter* on raspberry in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 22: 113-119, 2007.
- Moore, L.W., Bouzar, H. and Burr, T.:** *Agrobacterium*. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd edn. (Schaad N.W., Jones J.B., and Chun W., eds.), APS Press, St Paul, MN, USA, 2001, pp.17-35.
- Moore, L., Warren, G. and Strobel, G.:** Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid*, 2: 617-626, 1979.
- Panagopoulos, C.G. and Psallidas, P.G.:** Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith & Townsend) Conn. *Journal of Applied Bacteriology*, 36: 233-240, 1973.
- Pulawska, J. and Sobiczewski, P.:** Development of a semi-nested PCR-based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 710-721, 2005.
- Pulawska, J., Willems, A. and Sobiczewski, P.:** Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 470-479, 2006.
- Poncet, C., Antonini, C., Bettachini, A., Hericher, D., Pionnat, S., Simonini, L., Dessaux, Y. and Nesme, X.:** Impact of the crown gall disease on vigour and yield of rose trees. *Acta Horticulturae*, 424: 221-225, 1996.
- Sawada, H., Ieki, H. and Matsuda, I.:** PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 828-831, 1995.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W.:** *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St Paul, MN, USA, 2001.

- Schroth, M.N., McCain, A.H., Foott, J.H. and Huisman, O.C.:** Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant Disease*, 72: 241-246, 1988.
- Sobiczewski, P., Karczewski, J. and Berczynski S.:** Biological control of crown gall *Agrobacterium tumefaciens* in Poland. *Fruit Science Report*, 18: 125-132, 1991.
- Suslow, T.V., Schroth, M.N. and Isaka, M.:** Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72: 917-918, 1982.
- Suzaki, K., Yoshida, K. and Sawada, H.:** Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *Journal of General Plant Pathology*, 70: 342-347, 2004.
- Szegedi, E. and Bottka, S.:** Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis*, 41: 37-42, 2002.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada, H.:** A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 89-103, 2001.
- Young, J.M., Kerr, A. and Sawada, H.:** Genus *Agrobacterium* Conn 1942, 359^{AL}. In: *The Proteobacteria, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd edn, vol. 2) (Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. and Garrity G., eds.), Springer, New York, USA, 2005, pp. 340-345.
- Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Farrand, S.K. and Winans S.C.:** The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*, 182: 3885-3895, 2000.

Differentiation of Phytopathogenic *Agrobacterium* spp.

SUMMARY

Due to the difficulties in differentiation of phytopathogenic *Agrobacterium* spp. and lack of a standardized protocol, we carried out selection and evaluation of suitable methods based on the bacterial physiological, genetic and pathogenic properties. Strains of *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* were differentiated using standard bacteriological and molecular methods. The biochemical and physiological tests confirmed authenticity of the strains. Two duplex PCR methods were conducted with four different primer pairs. In all strains, presence of plasmid *virD2* and *virC* pathogenicity genes was detected. Chromosomal *pehA* gene was determined in *A. vitis* strain. Pathogenicity was confirmed on carrot slices and young plants of tomato and sunflower. Strains of *A. tumefaciens* and *A. vitis* were pathogenic on all test plants, while strain of *A. rhizogenes* induced characteristic symptoms only on carrot slices. The tests used in this study provided reliable discrimination between the three species and confirmed their identity as tumorigenic (Ti) *Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis*, and rhizogenic (Ri) *A. rhizogenes*.

Keywords: Crown gall; Plasmid; *Agrobacterium*; „Duplex“ PCR; Pathogenicity