

УДК 632.3:632.911.2

**ДИАГНОСТИКА
БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА ВИНОГРАДА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
МЕТОДОВ**

Макаркина Марина Викторовна
аспирант

*Федеральное Государственное бюджетное
научное учреждение
«Северо Кавказский зональный
научно-исследовательский институт
садоводства и виноградарства»,
Краснодар, Россия*

Владимиров Иван Артемьевич
аспирант

*Федеральное Государственное
бюджетное образовательное учреждение
«Санкт-Петербургский государственный
университет»
Санкт-Петербург, Россия*

Ильницкая Елена Тарасовна^{*}
канд. биол. наук
зав. лабораторией
сортоизучения и селекции винограда

*Федеральное Государственное бюджетное
научное учреждение
«Северо Кавказский зональный
научно-исследовательский институт
садоводства и виноградарства»,
Краснодар, Россия*

Матвеева Татьяна Валерьевна^{*}
д-р биол. наук, профессор
профессор кафедры генетики
и биотехнологии

*Федеральное Государственное
бюджетное образовательное учреждение
«Санкт-Петербургский
государственный университет»
Санкт-Петербург, Россия*

Бактериальный рак винограда – наиболее
опасное и распространенное заболевание
винограда по всему миру. В Краснодарском

UDC 632.3:632.911.2

**DIAGNOSIS
OF GRAPES CROWN GALL
WITH APPLICATION
OF MOLECULAR AND GENETIC
METHODS**

Makarkina Marina
Post-graduate student

*Federal State Budget
Scientific Institution
"North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture",
Krasnodar, Russia*

Vladimirov Ivan
Post-graduate student

*Federal State
Budgetary Educational
Institution
"St. Petersburg State University"
St. Petersburg, Russia*

Ilitskaya Elena
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Variety's Study
and Breeding of Grapes

*Federal State Budget
Scientific Institution
"North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture",
Krasnodar, Russia*

Matveyeva Tatyana
Dr. Sci. Biol., Professor
Professor of Genetics
and Biotechnology Faculty

*Federal State
Budgetary Educational
Institution
"St. Petersburg State University"
St. Petersburg, Russia*

Crown gall of grapes is the most
dangerous and wide spread disease
of grapes in a world. In the Krasnodar

^{*} Научный руководитель

крае в настоящее время гибель виноградных насаждений винограда от данного заболевания увеличилась в 2-2,5 раза. Возбудитель заболевания часто распространяется в новых районах с бессимптомным посадочным материалом, поэтому диагностика бактериального рака является важной задачей в отрасли виноградарства. Именно этому вопросу посвящена данная статья.

Для исследования нами были взяты опухолевидные наросты бактериального рака, обнаруженные на растениях сортов винограда различного эколого-географического происхождения (Италия, Франция, Сербия, Россия) в насаждениях Краснодарского края.

Всего проанализировано 22 образца.

ДНК из опухолей выделяли модифицированным СТАВ-методом.

Для исследования изолятов агробактерий использовали два метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) – классическую ПЦР и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Методом ПЦР-РВ с использованием тест системы к *pehA* гену обнаружено наличие ДНК *A. vitis* во всех анализируемых образцах исследуемых сортов винограда.

Выборочная амплификация шести образцов ДНК классическим методом ПЦР с использованием тест системы к *virF* гену выявила целевые фрагменты во всех изучаемых образцах. В данных образцах опухолевидных наростов, обнаруженных на виноградных растениях на территории Краснодарского края, в качестве возбудителя бактериального рака винограда выявлена агробактерия вида *A. vitis*. По результатам проведенных исследований сделан вывод, что использование методов молекулярно-генетической идентификации позволяет быстро и точно диагностировать возбудителя заболевания бактериального рака у виноградных растений.

Ключевые слова: ВИНОГРАД, БАКТЕРИАЛЬНЫЙ РАК, ПАТОГЕННЫЕ АГРОБАКТЕРИИ, ПЦР, ГЕНЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Region now the death of grapes plantings from this disease has increased in 2-2,5 times. The causative agent of a disease often extends in new areas with landing material without symptoms of disease; therefore the diagnosis of crown gall of grapes is an important task of wine growing branch.

This article is devoted to this question.

For research we have taken the tumorous outgrowths of crown gall of grapes found on grapes plants of various ecological-geographical origin (Italy, France, Serbia, Russia) on vineyards of Krasnodar Region.

In total 22 grapes samples are analysed. DNA from tumors is defined using the modified CTAB method.

For research of isolates of *Agrobacterium* we used two methods of the polymerase chain reaction (PCR) – classical PCR and PCR in real time (PCR-RV). By PCR-RV method with use the test-system to *pehA* gene the presence of DNA in all analyzed samples of the studied grapes varieties is detected. Selective amplification of six DNA samples by PCR classical method with the use of test-system to *virF* gene has revealed the target fragments in all studied grapes samples. In these samples of the tumorous gall outgrowths found on grapes plants in the territory of Krasnodar Region the agrobacterium of *A. vitis* type is revealed as the causative agent of crown gall of grapes of grapes. According to the results of the carried out research we came to a conclusion that the use of methods of molecular and genetic identification allows us to give a diagnosis quickly and precisely of the causative agent of crown gall of grapes disease for grapes plants.

Key words: GRAPES, CROWN GALL OF GRAPES, PATHOGENIC AGROBACTERIUM, PCR, VIR GENES

Введение. Бактериальный рак винограда, одно из наиболее опасных и распространенных бактериальных заболеваний винограда по всему миру, преимущественно вызывается онкогенными штаммами *Agrobacterium vitis*, реже – *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* [1, 2]. Бактериальный рак винограда – разрушительное заболевание, которое уменьшает силу и урожайность зараженных растений до 40 % [3]. За последние несколько десятилетий очаги инфекции были зарегистрированы в Китае, Японии, Южной Африки, на Ближнем Востоке, в Северной и Южной Америке, а также в ряде европейских стран [4]. Бактериальный рак особенно опасен в странах Восточной Европы, в том числе в России, Украине, Молдавии, где экологические условия возделывания характеризуются экстремальными перепадами температур зимой, поздней весной и ранней осенью [5, 6]. Так в Молдавии, по многолетним наблюдениям, на плодоносящих виноградниках количество инфицированных кустов за один год увеличивается в среднем на 6 %. За пятилетний период на 10-летних насаждениях выпадает вследствие гибели кустов от бактериального рака составляют 8-19 % в зависимости от сорта [7]. В Краснодарском крае в настоящее время гибель насаждений от данного заболевания увеличилась в 2-2,5 раза по сравнению с уровнем конца восьмидесятых-начала девяностых годов двадцатого века. [8].

Типичными симптомами бактериального рака винограда являются опухоли и пролиферации тканей на нижних участках штамба. Начальные симптомы обычно остаются незамеченными, поскольку молодые опухоли образуются под корой. Онкогенная ткань быстро разрастается и может полностью опоясывать ствол. Молодые опухоли мягкие, белого, светло-коричневого или розового цвета. Позже, поверхность опухоли становится темно-коричневой, сухой и опробковевает [9].

Агробактерии заражают виноградное растение в основном через раны, вызванные морозобоинами или прививкой. Сигнальные молекулы, высвобождаемые из раны, привлекают бактерии, которые прикрепляются к

раневым участкам. Заражение происходит путем перемещения онкогенного фрагмента плазмиды (Т-ДНК) из бактерии в геном растения [10]. Это приводит к синтезу растением таких гормонов как ауксин и цитокинин, которые вызывают неконтролируемое размножение растительных клеток и в конечном итоге приводят к формированию опухолей [1].

Важной характеристикой агробактериальной инфекции является её системное распределение в виноградном растении [11]. Кроме того бактерия может латентно жить в сосудистой системе виноградного растения не вызывая никаких видимых симптомов заболевания до возникновения благоприятных условий для инфекции, таких как ранения средствами агротехники, морозобоины, резкие температурные перепады и тому подобное [12]. По этой причине возбудитель часто распространяется в новых районах с бессимптомным посадочным материалом.

Используя информацию о наличии тех или иных видов и штаммов в исследуемой зоне, можно подобрать соответствующие штаммы-антагонисты для борьбы с бактериальным раком. Это стало возможно благодаря популяризации молекулярно-генетических методов в диагностике возбудителей различных заболеваний. Так, изучение агробактерий на молекулярно-генетическом уровне в мире началось еще в конце прошлого века. Первые публикации об успехах молекулярно-генетической идентификации агробактерий появились в 1995 году [13]. Позже последовала серия работ, направленных на точную видовую, а позже и штамм-специфичную идентификацию агробактерий.

Праймеры для ПЦР-идентификации были разработаны на гены *virA*, *pehA* и *6a* [14, 15], *virD2* и *ipt* [13], *virE2* [16], *visF* и *visR* [17], а также на гены *virC* [17], *virF* [18], *iaa* [19] и *AVS* [20], которые присутствуют в штаммах фитопатогенных *Agrobacterium*.

Цель исследования – разработка методики диагностики бактериального рака винограда с применением молекулярно-генетических подходов.

Объекты и методы исследований. В качестве материала использовали опухолевидные наросты бактериального рака, обнаруженные на растениях винограда сортов Баклановский, Восторг идеальный, Каберне АЗОС, Бархатный, Преображение, Тасон, Низина, Сира, Кломбар, Рислинг, Совиньон, Аттика, Шардоне, Каберне Совиньон различного происхождения (Италия, Франция, Сербия, Россия) на виноградниках Краснодарского края – Крымска, Горячего ключа, Анапы, Темрюкского района и окрестностей Краснодара. Всего проанализировано 22 образца.

ДНК из опухолей выделяли модифицированным СТАВ-методом [21, 22]. Для исследования изолятов агробактерий использовали два метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) – классическую ПЦР [23] и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) [24].

ПЦР проводили в 25 мкл смеси, содержащей 1х ПЦР-буфер для Taq-полимеразы с сульфатом аммония, 0,125 мМ/мкл dNTP, 0,25 пМ/мкл праймер прямой, 0,25 пМ/мкл праймер обратный, 0,05% БСА, 0,125 е.а/мкл Taq-полимераза (ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия). Реакцию ПЦР в режиме реального времени проводили в 20 мкл смеси, содержащей 1х ПЦР-буфер для Taq-полимеразы, 0,125 мМ/мкл dNTP, 0,25 пМ/мкл праймер прямой, 0,25 пМ/мкл праймер обратный, 0,05 % БСА, 0,125 е.а/мкл Taq-полимераза, 0,125 пМ/мкл гидролизный зонд (ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия).

ПЦР-РВ проводили при следующих условиях: 5 мин при 94 °С, 40 циклов – 18 сек при 94 °С, 40 сек при 55 °С, 40 сек при 72 °С, с использованием прибора АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия). Классическую ПЦР ставили по программе: 5 мин при 94 °С., 40 циклов – 18 сек при 94 °С, 40 сек при 60 °С, 60 сек при 72 °С, далее 4 мин при 72 °С с использованием прибора Eppendorf «Mastercycler Gradient» (Eppendorf, Гамбург, Германия).

Относительное количество фрагментов ДНК оценивали методом электрофореза в 1% агарозном геле («Helicon», Москва, Россия) по интенсивности свечения спектров в УФ свете, после нанесения 3 мкл ПЦР-продукта, смешанного с 0,5 мкл 0,125% раствора ксиленцианола в 30% глицерине и разгона в 1xSB-буфере при напряженности электрического поля 5В/см. В качестве маркера молекулярного веса использовали 100bp+1,5kb ladder (Лаборатория генной и клеточной инженерии, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия).

Секвенирование ДНК методом Сенджера проводили на базе РЦ СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Полученные последовательности фрагментов ДНК анализировали в базе данных NCBI [25].

Обсуждение результатов. Молодые, свежие и активно растущие опухоли являются наиболее подходящим растительным материалом для изоляции *Agrobacterium* SPP. ПЦР – удобный метод для быстрой идентификации патогенных видов *Agrobacterium* и дифференциации их от непатогенных. В данной работе для видовой идентификации использовали метод ПЦР-РВ с применением праймеров и гидролизного зонда к *pehA* гену – тест система для обнаружения *A. vitis* [26], и к *virD2* гену – тест система для обнаружения *A. tumefaciens* [27], а также классический метод ПЦР с использованием праймеров к *virF* гену для более точной идентификации. Были отработаны тест-системы к генам *virD2*, *6b* и *iaaH*, однако, в этом случае получен отрицательный результат. Это может быть связано со значительным генетическим разнообразием среди штаммов *Agrobacterium*.

Методом ПЦР-РВ с использованием тест системы к *pehA* гену удалось обнаружить наличие ДНК *A. vitis* во всех анализируемых образцах, в то же время тест системой к *virD2* гену *A. tumefaciens* не был обнаружен ни в одном из образцов.

Следующим этапом было выборочное изучение шести образцов классическим методом ПЦР с использованием тест системы к *virF* гену. Удалось амплифицировать целевой фрагмент (~ 400 п.н.) во всех образцах.

Последующее секвенирование показало их 100 % соответствие фрагменту гена *virF* *A. vitis* и абсолютную идентичность между собой (рис.):

```
A   GAGTTTGCATGATGCATCTGGGAACGACGATGCACAGGTACCCACAAAACAGAATTGCT
B   GAGTTTGCATGATGCATCTGGGAACGACGATGCACAGGTACCCACAAAACAGAATTGCT
C   GAGTTTGCATGATGCATCTGGGAACGACGATGCACAGGTACCCACAAAACAGAATTGCT
D   GAGTTTGCATGATGCATCTGGGAACGACGATGCACAGGTACCCACAAAACAGAATTGCT
E   GAGTTTGCATGATGCATCTGGGAACGACGATGCACAGGTACCCACAAAACAGAATTGCT
F   GAGTTTGCATGATGCATCTGGGAACGACGATGCACAGGTACCCACAAAACAGAATTGCT
    *****
A   TGATCTGCCAGACCTTGTGCTGACGGAAGTTGCCAAACGTCTAGCGACTGACAATCCAGT
B   TGATCTGCCAGACCTTGTGCTGACGGAAGTTGCCAAACGTCTAGCGACTGACAATCCAGT
C   TGATCTGCCAGACCTTGTGCTGACGGAAGTTGCCAAACGTCTAGCGACTGACAATCCAGT
D   TGATCTGCCAGACCTTGTGCTGACGGAAGTTGCCAAACGTCTAGCGACTGACAATCCAGT
E   TGATCTGCCAGACCTTGTGCTGACGGAAGTTGCCAAACGTCTAGCGACTGACAATCCAGT
F   TGATCTGCCAGACCTTGTGCTGACGGAAGTTGCCAAACGTCTAGCGACTGACAATCCAGT
    *****
```

Рис. Выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *virF* шести изолятов *A. vitis* (A-F) относительно друг друга.

Выводы. Таким образом, в исследуемых образцах опухолевидных наростов, обнаруженных на территории Краснодарского края, в качестве возбудителя бактериального рака винограда выявлена агробактерия вида *A. vitis*. Использование методов молекулярно-генетической идентификации позволяет быстро и точно диагностировать возбудителя заболевания бактериального рака у виноградных растений.

Литература

1. 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.
2. Knauf, V.C. Comparison of Ti Plasmids from Three Different Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* Isolated from Grapevines / V.C. Knauf, C.G. Panagopoulos, E.W. Nester // Journal of bacteriology. – 1983. – V. 153, №3. – P. 1535-1542.
3. Schroth, M.N. Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease / M.N. Schroth, A.H. McCain, J.H. Foott, O.C. Huisman // Plant Disease. – 1988. – V. 72. – P. 241-246.
4. Kuzmanović, N. Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia / N. Kuzmanović, K. Gašić, M. Ivanović, A. Prokić, A. Obradović // Archives of Biological Sciences. – 2012. – V. 64, №. 4. – P. 1487-1494.
5. Леманова, Н.Б. Бактериальные опухоли винограда на виноградниках континентальной Европы / Н.Б. Леманова // Микробиология. Изв. АН МССР. – 1979. – № 2. – С. 26-33.
6. Султанова, О.Д. Бактериальные заболевания винограда и изучение их распространения в Молдавии / О.Д. Султанова, Н.Б. Леманова // Защита винограда и плодовых культур от вредителей и болезней. – Кишинев, 1979. – С. 84-87.
7. Леманова, Н.Б. Биологический контроль бактериального рака *Agrobacterium tumefaciens* / Н.Б. Леманова, М.К. Магер // Защита и карантин растений. – 2011. - №6. – С. 25-27.

8. 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(02) – С. 96-108. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/11/02/11.pdf>
9. Burr, T.J. A root-specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* biovar 3 / T.J. Burr, A.L. Bishop, B.H. Katz, L.M. Blanchard, C. Bazzi // Phytopathology. – 1987. – V.77. – P. 1424-1427.
10. Zhu, J. The bases of crown gall tumorigenesis / J. Zhu, P.M. Oger, B. Schrammeijer, P.J.J. Hooykaas, S.K. Farrand, S.C. Winans // Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 182. – P. 3885-3895.
11. Lehoczký, J. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection / J. Lehoczký // Phytopath. – 1968. – V. 63, №3. – P. 239-246.
12. Бурдинская, В.Ф. Латентная зараженность винограда бактериальным раком / В.Ф. Бурдинская, Н.О. Арестова // Защита и карантин растений. – №10. – 2010. – С. 38-39.
13. Haas, J.H. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains / J.H. Haas, L.W. Moore, W. Ream, S. Manulis // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – T. 61. – №. 8. – С. 2879-2884.
14. Eastwell, K.C. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction / K.C. Eastwell, C. Kenneth, G. Leslie Willis, D.T. Cavileer // Plant Disease. – 1995. – V.79, №8. – P. 822-827.
15. Herlache, T.C. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologous enzymes from *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum* / T.C. Herlache, A.T. Hotchkiss, T.J. Burr, A. Collmer // Applied and environmental microbiology. – 1997. – V.63, №1. – P. 338-346.
16. Szegedi, E. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium / E. Szegedi, S. Bottka // Vitis-Journal of Grapevine Research. – 2002. – V. 41, №. 1. – P. 37-42.
17. Suzuki, K. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers / K. Suzuki, K. Yoshida, H. Sawada // Journal of General Plant Pathology. – 2004. – V. 70, №. 6. – P. 342-347.
18. 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.
19. Puławska, J. Development of a semi nested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil / J. Puławska, P. Sobiczewski // Journal of Applied Microbiology. – 2005. – V. 98, №.3. – P. 710-721.
20. Lim, S.H. Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains / S.H. Lim, J.G. Kim, H.W. Kang // Microbiological research. – 2009. – V.164, №4. – P. 451-460.
21. 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. – P. 11-15.
22. Tamari, F. A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues / F. Tamari, C.S. Hinkley, N. Ramprasad // Journal of biomolecular techniques. – 2013. – V. 24(3). – P. 113-118.
23. Шибата, Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов / Д.К. Шибата // Молекулярная клиническая диагностика. – М: Мир, 1999. – С. 395-427.

24. Владимиров, И.А. ПЦР в реальном времени для изучения распространения агробактерий / И.А. Владимиров, Т.В. Матвеева, Л.А. Лутова. – СПб: Галаника, 2014. – 68 с.
25. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
26. Chebil, S. Occurrence of *Agrobacterium Vitis* Carrying Two Opine-Type Plasmids in Tunisian Vineyards / S. Chebil, R. Fersi, S. Chenenaoui, E. Abdellatif, G. Durante, E. Zacchi, A. Mliki // Journal J Plant Pathol. Microbiol. – V. 4, №4. – P. 1-4
27. Пат. 2458142 РФ, МПК C12Q 1/68, C12R 1/00. Способ диагностики биоматериалов на наличие в них агробактерий / Т.В. Матвеева, Д.И. Богомаз, Л.А. Лутова; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет. – № 892; заявл. 31.05.2011; опубл. 10.08.2012, Бюлл. № 22. – 17 с.

References

1. 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.
2. Knauf, V.C. Comparison of Ti Plasmids from Three Different Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* Isolated from Grapevines / V.C. Knauf, C.G. Panagopoulos, E.W. Nester // Journal of bacteriology. – 1983. – V. 153, №3. – P. 1535-1542.
3. Schroth, M.N. Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease / M.N. Schroth, A.H. McCain, J.H. Foott, O.C. Huisman // Plant Disease. – 1988. – V. 72. – P. 241-246.
4. Kuzmanović, N. Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia / N. Kuzmanović, K. Gašić, M. Ivanović, A. Prokić, A. Obradović // Archives of Biological Sciences. – 2012. – V. 64, №. 4. – P. 1487-1494.
5. Lemanova, N.B. Bakterial'nye opuholi vinograda na vinogradnikah kontinental'noj Evropy / N.B. Lemanova // Mikrobiologija. Izv. AN MSSR. – 1979. – № 2. – С. 26-33.
6. Sultanova, O.D. Bakterial'nye zabojevanija vinograda i izuchenie ih rasprostraneniya v Moldavii / O.D. Sultanova, N.B. Lemanova // Zashhita vinograda i plodovykh kul'tur ot vreditelej i boleznej. – Kishinev, 1979. – S. 84-87.
7. Lemanova, N.B. Biologicheskij kontrol' bakterial'nogo raka *Agrobacterium tumefaciens* / N.B. Lemanova, M.K. Mager // Zashhita i karantin rastenij. – 2011. – №6. – S. 25-27.
8. Jurchenko, E.G. Prichiny rasprostraneniya bakterial'nogo raka vinograda v ampelocenoze Zapadnogo Predkavkaz'ja i vozmozhnost' ispol'zovaniya biologicheskikh sredstv zashhity dlja snizheniya ego vredonosnosti / E.G. Jurchenko, P.V. Kurilo // Plodovodstvo i vinogradarstvo Juga Rossii [Elektronnyj resurs]. – Krasnodar: SKZNIISiV, 2011. – № 8(02) – S. 96-108. – Rezhim dostupa: <http://journal.kubansad.ru/pdf/11/02/11.pdf>
9. Burr, T.J. A root-specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* biovar 3 / T.J. Burr, A.L. Bishop, B.H. Katz, L.M. Blanchard, C. Bazzi // Phytopathology. – 1987. – V. 77. – P. 1424-1427.
10. Zhu, J. The bases of crown gall tumorigenesis / J. Zhu, P.M. Oger, B. Schrammeijer, P.J.J. Hooykaas, S.K. Farrand, S.C. Winans // Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 182. – P. 3885-3895.
11. Lehoczy, J. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection / J. Lehoczy // Phytopath. – 1968. – V. 63, №3. – P. 239-246.

12. Burdinskaja, V.F. Latentnaja zarazhennost' vinograda bakterial'nym rakom / V.F. Burdinskaja, N.O. Arestova // Zashhita i karantin rastenij. – №10. – 2010. – S. 38-39.
13. Haas, J.H. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains / J.H. Haas, L.W. Moore, W. Ream, S. Manulis // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – T. 61. – №. 8. – S. 2879-2884.
14. Eastwell, K.C. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction / K.C. Eastwell, C. Kenneth, G. Leslie Willis, D.T. Cavileer // Plant Disease. – 1995. – V. 79, №8. – P. 822-827.
15. Herlache, T.C. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologous enzymes from *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum* / T.C. Herlache, A.T. Hotchkiss, T.J. Burr, A. Collmer // Applied and environmental microbiology. – 1997. – V. 63, №1. – P. 338-346.
16. Szegedi, E. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium / E. Szegedi, S. Bottka // Vitis-Journal of Grapevine Research. – 2002. – V. 41, №. 1. – P. 37-42.
17. Suzuki, K. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers / K. Suzuki, K. Yoshida, H. Sawada // Journal of General Plant Pathology. – 2004. – V. 70, №. 6. – P. 342-347.
18. 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.
19. Puławska, J. Development of a semi nested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil / J. Puławska, P. Sobiczewski // Journal of Applied Microbiology. – 2005. – V. 98, №.3. – P. 710-721.
20. Lim, S.H. Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains / S.H. Lim, J.G. Kim, H.W. Kang // Microbiological research. – 2009. – V. 164, №4. – P. 451-460.
21. 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. – P. 11-15.
22. Tamari, F. A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues / F. Tamari, C.S. Hinkley, N. Ramprasad // Journal of biomolecular techniques. – 2013. – V. 24(3). – P. 113-118.
23. Shibata, D.K. Polimeraznaja cepnaja reakcija i molekularno-geneticheskij analiz bioplatov / D.K. Shibata // Molekularnaja klinicheskaja diagnostika. – M: Mir, 1999. – S. 395-427.
24. Vladimirov, I.A. PCR v real'nom vremeni dlja izuchenija rasprostraneniya agrobakterij / I.A. Vladimirov, T.V. Matveeva, L.A. Lutova. – SPb: Galanika, 2014. – 68 s.
25. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [jelektronnyj resurs]. – Rezhim dostupa: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
26. Chebil, S. Occurrence of *Agrobacterium Vitis* Carrying Two Opine-Type Plasmids in Tunisian Vineyards / S. Chebil, R. Fersi, S. Chenenaoui, E. Abdellatif, G. Durante, E. Zacchi, A. Mliki // Journal J Plant Pathol. Microbiol. – V. 4, №4. – P. 1-4
27. Pat. 2458142 RF, MPK C12Q 1/68, C12R 1/00. Sposob diagnostiki biomaterialov na nalichie v nih agrobakterij / T.V. Matveeva, D.I. Bogomaz, L.A. Lutova; zajavitel' i patentoobladatel' Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego professional'nogo obrazovanija Sankt-Peterburgskij gosudarstvennyj universitet. – № 892; zajavl. 31.05.2011; opubl. 10.08.2012, Bjull. № 22. – 17 s.