

УДК 579.25:632.35:634.8.03/05

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ РАК ВИНОГРАДА И БОРЬБА С НИМ (НА ПРИМЕРЕ ЮГА УКРАИНЫ)

© 2016 г. Л.А. Конуп¹, В.В. Власов¹

Аннотация. Возбудитель бактериального рака винограда – *Rhizobium vitis* (*Agrobacterium vitis*), подобно большинству агробактерий, способен сохраняться в почве и выживать в ней. Изучена роль почвы как первичного источника инфекции, проведена диагностика штаммов *Agrobacterium vitis* на участках, предназначенных для посадки виноградников, а также на зараженных участках с целью изучения распределения возбудителя и динамики развития микробной популяции.

Представлены результаты по диагностике *Agrobacterium vitis* в почвах с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Установлено, что патогенные агробактерии сохранялись в почве исследуемого участка в течение двух лет. При помощи метода ПЦР с использованием пар праймеров к последовательностям *vir D2* и *ipt* Ti-плазмиды проведено тестирование 171 штамма агробактерий, выделенных из лозы винограда и почвы виноградника. Изучены их антагонистические свойства в отношении возбудителя бактериального рака винограда. Выделенные штаммы *Rhizobium vitis* проявили бактериоциногенную активность по отношению к близкородственным штаммам.

Ключевые слова: *Agrobacterium vitis*, почва, полимеразная цепная реакция (ПЦР), бактериальный рак винограда.

CROWN GALL OF GRAPE AND AGENTS AGAINST IT (THE SOUTH OF UKRAINE BEING EXEMPLIFIED)

L.A. Konup¹, V.V. Vlasov¹

Abstract. The pathogen vine crown gall – *Rhizobium vitis* (*Agrobacterium vitis*), like most of the agrobacteria, is able to remain in the soil and survive in it. We studied the role of soil as the primary source of infection, diagnosed *Agrobacterium vitis* strains in areas designated for planting vineyards, as well as on contaminated sites in order to study the pathogen distribution and development dynamics of microbial population.

The paper presents the results of the diagnosis of *Agrobacterium vitis* in soils using the polymerase chain reaction (PCR) method. It has been ascertained that the pathogen agrobacteria remained in the soil of the surveyed area for two years. Using the PCR method applying pairs of primers to sequences of *vir D2* and *ipt* Ti-plasmid, the testing of 171 agrobacteria strains, isolated from a vine and vineyard soil, was conducted. Their antagonistic properties towards the crown gall of grape were studied. Isolated *Rhizobium vitis* strains indicated bacteriocinogenic activity regarding closely-related strains.

Keywords: *Agrobacterium vitis*, soil, polymerase chain reaction (PCR), crown gall of grape.

¹ Национальный научный центр «Институт виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова» (National Scientific Centre “The V.E. Tairov Institute of Viticulture and Winemaking”, Odessa, urban-type settlement of Tairovo, Ukraine), 65496, г. Одесса, пгт. Таирово, ул. 40 лет Победы, 27, Украина, тел./факс: +38 (048) 740-36-45, e-mail: lkmicrobiol@ukr.net

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время распространенный во всем мире бактериальный рак является одной из наиболее вредоносных болезней винограда. Фитопатогенная бактерия *Rhizobium vitis*, которая обитает в почве, вызывает опухоли у более чем 1000 видов растений, как двудольных, так и ряда однодольных. Третий биотип *Agrobacterium tumefaciens*, который в настоящее время называется *Rhizobium vitis* (*R. vitis*) [1–3]), поражает в основном виноград, хотя из ризосферы винограда можно выделить и другие виды агробактерий. При этом потери урожая от этого заболевания в мире составляют 75–80% [4; 5]. Бактериальный рак часто обнаруживают на штамбах кустов, особенно после повреждения морозами. Именно на штамбе и реже на рукавах и проявляется заболевание (рис. 1). Опасность бактериального рака заключается и в том, что бактерия заражает почву, что в дальнейшем может вызвать заражение корней у вновь посаженных саженцев [6–8]. На виноградниках Украины бактериальный рак поражает отдельные сорта до 25%.



Рис. 1. Симптомы бактериального рака винограда на штамбе, сорт «каберне-совиньон» (Одесская обл., 2012 г.)

Fig. 1. Symptoms of crown gall of grape on trunks, Cabernet Sauvignon variety (Odessa Region, 2012)

В связи с возросшей потребностью в производстве здорового посадочного материала необходимо найти методы борьбы с бактериальным раком винограда. До настоящего времени эффективные меры по борьбе с бактериальным раком винограда отсутствуют. Способы противодействия связаны в основном с усовершенствованием методов проверки винограда и производства посадочного материала,

свободного от патогенов. Разрабатывались и биологические меры борьбы [9; 10]. Единственный путь биологического противодействия бактериальному раку на других культурах – использование неопухолеобразующего штамма *Agrobacterium rhizogenes* 84 (*A. rhizogenes* 84) (ранее он относился к *Agrobacterium radiobacter* 84). На основе этого штамма методами генной инженерии был получен штамм K1026. Оба штамма производят антибиотик агроцин 84. Однако многие штаммы *A. tumefaciens* нечувствительны к штаммам K84 и 1026, особенно штаммы *Rhizobium vitis*, которые вызывают бактериальный рак на винограде [11; 12]. В результате исследований в Южной Африке был выделен штамм F2/5, который оказался неопухолеобразующим штаммом *Rhizobium vitis*. Штамм F2/5 производит антибиотик, который подавляет рост многих опухолеобразующих штаммов.

Объектом нашего исследования были агробактерии-антагонисты возбудителя бактериального рака винограда. Цель исследований состояла в выявлении, диагностике и идентификации непатогенных агробактерий винограда, которые имели антагонистические свойства по отношению к опухолеобразующим штаммам возбудителя бактериального рака винограда *Rhizobium (Agrobacterium) tumefaciens (vitis)*.

В последние годы изучались возможности термотерапии для удаления *Agrobacterium vitis* из черенков винограда в состоянии покоя [13; 14]. Эксперименты, проведенные Burr et al. [5], подтвердили, что температура 50 °C не опасна для полностью вызревшей лозы, однако более высокая температура вызывает гибель глазков и, следовательно, не рекомендуется для термотерапии.

Одним из способов получения сортов винограда, устойчивых к бактериальному раку, является метод генной инженерии. В связи с тем что бактериальный рак очень опасное заболевание и способы борьбы с ним очень ограничены, использование достижений методов генной инженерии весьма привлекательно. Основная цель заключается в создании с помощью указанных выше методов высококачественных сортов винограда, устойчивых к бактериальному раку, которые в настоящее время восприимчивы к этому заболеванию. Один из подходов, который практикуется ныне, включает использование экспрессии стирания мутанта гена *virE2 Ti* плазмиды растения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в аккредитованной лаборатории вирусологии и микробиологии ННЦ «Институт виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова» (ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 (ISO/IEC 17025:2005) согласно аттестованной методике

МВВ 002-85/3-2006 «Выявление возбудителя бактериального рака (*Agrobacterium tumefaciens* (vitis) винограда методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)»). Для проведения исследований использовали спецоборудование ПЦР-лаборатории, которое прошло калибровку в ГП «Одессастандартметрология» и ННЦ «Институт метрологии» (г. Харьков).

Отбор проб. Образцы почвы для выделения патогенных агробактерий отбирали на сортах «мерло», «мускат Александрийский» и «каберне-совиньон». Согласно данным фитосанитарной селекции, на этих участках отмечался высокий процент зараженности растений бактериальным раком. Почву отбирали на глубине 30 см. Пробы транспортировали в лабораторию в целлофановых пакетах и исследовали в тот же день или хранили сутки при 4 °С.

Тестировали как пробы почвы ризосферы кустов винограда, так и пробы почвы междурядий. Кроме того, для выделения агробактерий отбирали корни растений с глубины 30–40 см, а также черенки виноградных растений.

Выделение культур агробактерий. Образец почвы весом 100 г помещали в стеклянный стакан и заливали стерильной дистиллированной водой таким образом, чтобы уровень воды над навеской составил 1 см. Образцы оставляли на сутки при 4 °С. Суспензию, образовавшуюся над осадком почвы, использовали для выделения патогенных агробактерий на полуселективной среде Рой и Сассера (RSM) [15]. На одну чашку Петри высевали «газоном» 100 мкл почвенной вытяжки.

Из корней и черенков виноградной лозы бактерии выделяли по Лехоцки [2]. Корни и черенки тщательно мыли под проточной водой, ополаскивали стерильной дистиллированной водой и измельчали на отрезки длиной около 5 мм. Заливали стерильную дистиллированную воду таким же образом, как и в случае с навеской почвы. Через сутки выдерживания при 4 °С суспензию высевали на среду RSM.

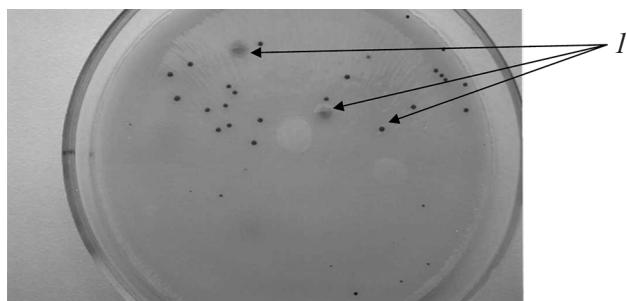


Рис. 2. Колонии выросших агробактерий (1) с характерной для возбудителя бактериального рака окраской

Fig. 2. Colonies of grown agrobacteria (1) with a characteristic crown gall of grape pathogen colour

После 5–7 дней инкубации при 25–27 °С производили учет и пересев выросших колоний агробактерий в пробирки на скошенный картофельный агар (рис. 2). Для тестирования при помощи ПЦР использовали одно- и двухсуточные культуры.

Проведение полимеразной цепной реакции. Для тестирования в ПЦР готовили смешанную пробу из всех колоний, выросших на чашке при посеве образца. Этот способ облегчал диагностику, уменьшая время, которое бы понадобилось для тестирования каждой из колоний, и делал метод экономически более оправданным при исследовании большого числа образцов.

Отбор почвы осуществляли летом и осенью 2014 г., весной и летом 2015 г. Исследовали виноградники 1999-го и 2000-го годов посадки.

Использовали *ipt*-праймеры, позволяющие отличить опухолевые штаммы агробактерий от патогенных *Agrobacterium rhizogenes* и непатогенных *Agrobacterium radiobacter*.

Бактериальную суспензию в концентрации 10^8 кл/мл [3] подвергали тепловому лизису в течение 10 мин при 95 °С в деионизированной воде, содержащей тритон X-100 и азид натрия. Пробы центрифугировали 5 мин при 5700 об/мин и надосадочную жидкость использовали для проведения ПЦР [7].

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала по 10 пмоль каждого из праймеров, 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 2 U (Ед.) Taq-полимеразы («АмплиСенс», Россия), 2 mM MgSO₄, 4 мкл буфера для проведения ПЦР (5×, «АмплиСенс», Россия).

В реакционную смесь вносили по 5 мкл надосадочной жидкости подготовленного образца. Амплификацию проводили согласно параметрам Naas et al. [16], увеличив время начальной денатурации до 3 мин, а время элонгации в последнем цикле – до 7 мин.

Отжиг осуществляли при 52 °С. Для амплификации использовался программируемый термоциклер «Терцик» фирмы «ДНК-Технология» (Россия).

Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 1,5%-ном агарозном геле. Трисборатный буфер (pH 7,2) для электрофореза содержал бромид этидия («АмплиСенс», Россия). При помощи видеосистемы гель фотографировали под УФ-излучением.

Положительным контролем в ПЦР служил патогенный штамм *Agrobacterium vitis* FA2, отрицательным контролем – деионизированная вода. В качестве маркера молекулярного веса применяли маркер 800–100 пар оснований нуклеотидов («АмплиСенс», Россия).

В работе использовали 15 штаммов *R. vitis*, выделенных из почвы, и в качестве контроля штамм *A. rhizogenes* 84. Агробактерии-антагонисты, а также

лабораторные образцы биопрепаратов на их основе культивировали на твердых питательных средах (среда Рой и Сассера и картофельный агар) при 25–27 °С.

У всех лабораторных образцов биопрепаратов определяли титр – количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 мл. Для этого 1,0 мл препарата стерильной пипеткой переносили в колбу с 99,0 мл стерильной воды и ставили на качалку на 10 мин. Из полученной суспензии готовили разведение от 1 : 10 до 1 : 1 000 000 000. Суспензию из соответствующего разведения закапывали по 1,0 мл в 3 чашки Петри. Затем заливали в чашки по 15–20 мл среды, расплавленной и остуженной до +45...+50 °С, и смешивали питательную среду с посевным материалом легкими вращательными движениями. Чашки Петри ставили в термостат с оптимальной температурой и через 5–7 дней считали среднее число колоний в 3 чашках Петри. Титр вычисляли по формуле

$$T = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

где T – количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 мл; a – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения; V – объем суспензии, взятый для посева; 10^n – коэффициент разведения.

Титр лабораторных образцов бактериальных биопрепаратов составлял 10^{10} КОЕ/мл. Антагонистические свойства выделенных агробактерий проверяли по зонам лизиса на газонах референтных тест-культур.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обследование виноградников Одесской, Николаевской и Херсонской областей показало значительное поражение кустов возбудителем бактериального рака. Бактериальным раком поражаются как молодые насаждения, так и многолетние плодородные виноградники. Обследовались различные привойные сорта винограда: «каберне-совиньон», «мерло», «шардоне», «пино минье», «пино черный», «рислинг», «голубок», «ранний Магарача», «Молдова», «мускат Таировский», «Одесский сувенир», «королева виноградников», «Италия», «мускат Александрийский», «кардинал», «оригинал», «альфонс Лавалле», «мускат янтарный», «рубин Таировский», «кобзарь», «смена», «кричунел», «лианка». Из подвойных сортов: «рипария» × «рупестрис 101-14», «берландиери» × «рипария СО4», «берландиери» × «рипария кобера 5ББ».

Установлено, что бактериальным раком поражаются все сорта винограда, однако среди привойных сортов винограда наиболее чувствительными к этому заболеванию являются сорта «каберне-со-

виньон», «мерло», «мускат Александрийский», «кардинал», «Молдова»; из подвойных – «берландиери» × «рипария кобера 5ББ».

Визуальный фитосанитарный контроль не позволяет распознать кусты с латентной формой инфекции.

Применяя метод ПЦР для выявления патогенных штаммов *Agrobacterium vitis*, мы получили данные о степени инфицированности почвы виноградников и виноградных растений (рис. 3).

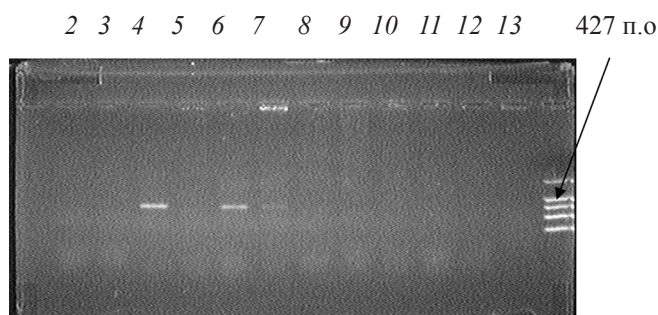


Рис. 3. Электрофорез продуктов амплификации ДНК штаммов агробактерий с праймерами ipt в агарозном геле: 3, 6 – ipt-положительные штаммы *Agrobacterium* sp., выделенные из почвы виноградника; 1, 2, 4, 7–12 – образцы винограда, не содержащие ipt-положительные штаммы агробактерий; 5 – патогенный штамм *Agrobacterium tumefaciens* Fa2; 13 – маркер молекулярного веса (200–800 пар основ, «АмплиСенс», Россия)

Fig. 3. Electrophoresis of the amplification products of agrobacteria strains DNA with ipt primers in agarose gel: 3, 6 – ipt-positive strains of *Agrobacterium* sp., isolated from vineyard soil; 1, 2, 4, 7–12 – grape samples that do not contain ipt-positive strains of *Agrobacterium*; 5 – pathogenic strain of *Agrobacterium tumefaciens* Fa2; 13 – molecular weight marker (200–800 pairs of bases, “AmpliSens”, Russia)

В образцах почвы, отобранных в ризосфере, наблюдалось большое число положительных проб (табл. 1). Реже патогенные агробактерии выявлялись в пробах почвы, отобранной в междурядьях виноградника, что свидетельствует о том, что возбудитель не распространился на значительное расстояние от инфицированных растений. Присутствие *Agrobacterium vitis* в 11,8% проб почвы междурядий, по-видимому, является следствием роста корней инфицированных кустов, результатом сельскохозяйственных работ, дождей и т.д.

Исследование почвы ризосферы показало присутствие *Agrobacterium vitis* в 22,4% образцов. Пробы отбирались из ризосферы больных и внешне здоровых кустов, что позволяло судить об общей инфицированности участка. При тестировании проб корней 21% образцов оказался ipt-положительным, при тестировании образцов виноградных растений 15% были ipt-положительными.

Таблица 1. Тестирование образцов почвы виноградников на наличие патогенных агробактерий при помощи метода ПЦР**Table 1.** Testing of vineyards' soil samples for the presence of pathogenic agrobacteria using PCR

Источник пробы	Общее число исследованных проб	Число проб патогенных агробактерий	
		абс.	%
Почва из ризосферы больных и внешне здоровых кустов	58	13	22,4
Почва из ризосферы выкорчеванных в 2002 г. кустов	40	9	22,5
Почва междурядий	34	4	11,8
Корни	19	4	21
Почва участка, где виноградник был выкорчеван в 2000 г.	25	5	20
Черенки виноградных растений	180	27	15

Установленная в результате скрининга образцов почвы междурядий и ризосферы доля проб, содержащих патоген (11,8% и 22,4%, соответственно), является очень высокой и дополняет данные фитосанитарной селекции о значительном распространении бактериального рака на обследованных участках.

Метод ПЦР позволил провести скрининг большого количества образцов почвы и образцов лозы виноградных растений на наличие опухолеобразующих агробактерий.

В результате ПЦР-диагностики виноградной лозы и почвы нами было выделено значительное количество непатогенных агробактерий (рис. 3, 4), которые были исследованы на наличие у них антагонистических свойств.

Выделенные агробактерии, которые не содержали *ipt*-гена, проверяли на наличие у них антагонистических свойств по отношению к патогенным штаммам *R. vitis*: Fa-2, A-271; 1D1; FACU; Ag20; 8994; 229 по зонам лизиса (табл. 2).

Как видно из табл. 2, наибольшую антагонистическую активность проявили выделенные изоляты *R. vitis* 1, *R. vitis* 2, *R. vitis* 7, *R. vitis* 9, *R. vitis* 11. Они будут использоваться для дальнейших исследований предупреждения вторичного заражения здоровых растений винограда из почвы. Этот метод представляется нам очень важным и должен быть включен в технологию посадки саженцев винограда на постоянное место. При выявлении растений с опухолями этот материал уничтожается, а внешне здоровые растения необходимо профилактически обрабатывать суспензией бактериальных клеток, в концентрации 10^8 КОЕ/мл в виде глиняной болтушки, это поможет предотвратить вторичное заражение растений из почвы.

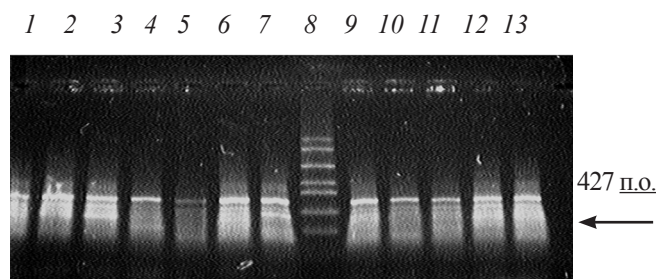
**Рис. 4.** Электрофорез продуктов амплификации ДНК штаммов агробактерий с праймерами *ipt* в агарозном геле: 1–7, 11–13 – штаммы агробактерий, выделенные из образцов виноградных растений, не содержащих *ipt*-ген; 9, 10 – положительный контроль *R. vitis*; 8 – маркер молекулярной массы (200–800 п.о.). Полоской отмечен фрагмент амплификации (427 п.о.)

Fig. 4. Electrophoresis of the amplification products of agrobacteria strains DNA with *ipt* primers in agarose gel: 1–7, 11–13 – agrobacteria strains isolated from samples of vine plants without *ipt*-gene; 9, 10 – *R. vitis* positive control; 8 – molecular weight marker (200–800 bp). A strip marks a fragment of amplification (427 bp)

Таблица 2. Антагонистические свойства выделенных культур агробактерий *R. vitis* по отношению к патогенным референтным штаммам

Референтные тест-культуры	Выделенные штаммы										
	<i>R. vitis</i> 1	<i>R. vitis</i> 2	<i>R. vitis</i> 3	<i>R. vitis</i> 4	<i>R. vitis</i> 5	<i>R. vitis</i> 6	<i>R. vitis</i> 7	<i>R. vitis</i> 8	<i>R. vitis</i> 9	<i>R. vitis</i> 10	<i>R. vitis</i> 11
Fa-2	+	+	–	+	–	–	+	–	+	–	+
A-271	+	+	–	–	+	–	+	–	+	–	+
1D1	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–	+
FACU	+	+	+	–	–	–	+	–	+	+	+
Ag20	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–
8994	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
229	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Для определения эффективности оздоровления виноградной лозы от возбудителя бактериального рака использовалась методика прогрева лозы горячей водой (50 °С) в течение 30 мин в сочетании с вакуум-инфильтрацией и без нее. Изучалось влияние этих условий на агробиологические показатели черенков: распускание почек, образование каллуса и корней.

Нами была проведена термотерапия черенков винограда, заготовленных с кустов, пораженных бактериальным раком, сорта «мускат Александрийский», а также черенков сортов «каберне-совиньон», «мерло» и «рипария × Рупестрис 101-14», предварительно искусственно зараженных патогенным штаммом *A. tumefaciens* Fa-2. Изучение проводилось на лабораторном оборудовании (при этом моделировались промышленные условия обработки), а также на производственной установке после отработки условий эксперимента.

В результате исследования установлено, что наиболее оптимальными условиями является термообработка черенков всех сортов винограда в течение 30 мин при 50 °С, также установлено, что такие условия обработки ведут к снижению концентрации возбудителя бактериального рака винограда (рис. 5).

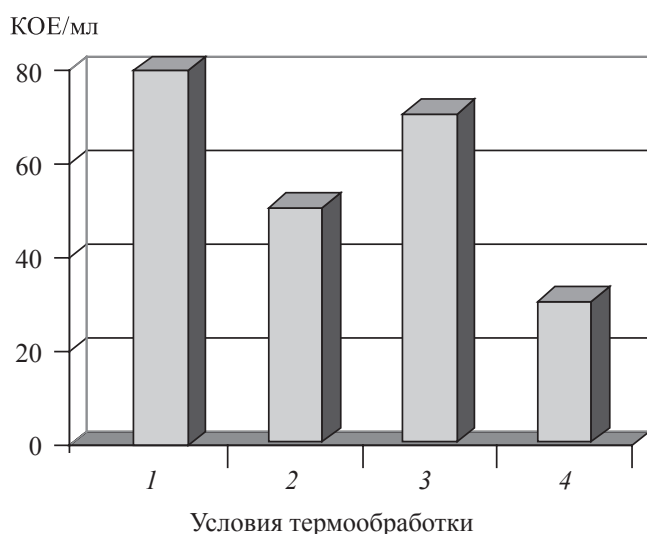


Рис. 5. Влияние термообработки на концентрацию возбудителя бактериального рака винограда: 1 – концентрация *A. vitis* до термообработки; 2 – концентрация *A. vitis* при 7-минутной вакуум-инфильтрации + 7-минутном прогревании лозы водой 50 °С; 3 – концентрация *A. vitis* при 7-минутной вакуум-инфильтрации + 7-минутном прогревании лозы водой 50 °С; 4 – концентрация *A. vitis* при 30-минутной обработке водой 50 °С

Fig. 5. Effect of heat treatment on the concentration of pathogen vine crown gall: 1 – *A. vitis* concentration before heat treatment; 2 – *A. vitis* concentration at 7 min vacuum + 7 min 50 °C infiltration; 3 – *A. vitis* concentration at 7 min vacuum + 30 min 50 °C infiltration; 4 – *A. vitis* concentration at 30 min 50 °C

Вакуум-инфильтрация в сочетании с термообработкой для оздоровления винограда от возбудителя бактериального рака и других инфекций до сих пор в литературе не описана.

Полученные нами данные свидетельствуют о неэффективности использования вакуум-инфильтрации в борьбе с бактериальным раком и другими бактериозами. Полученные данные, а также данные работы [14] свидетельствуют о том, что термотерапия не позволяет оздоровить виноград от возбудителя бактериального рака. Она лишь снижает количество бактериальных клеток, не вызывая полной гибели патогена.

Бактериальный рак винограда является опасным заболеванием, которое наносит существенный ущерб сельскому хозяйству. Регулярное фитосанитарное обследование виноградников, диагностика и идентификация возбудителя бактериального рака винограда, разработка профилактики и мер борьбы – залог успешного развития промышленного виноградарства.

ВЫВОДЫ

1. Было проведено фитосанитарное обследование виноградников Одесской, Николаевской и Херсонской областей на общей площади 150 га на заражение возбудителем бактериального рака. Установлено, что в разных хозяйствах Одесской области поражение бактериальным раком составляет от 5 до 25%, в Николаевской – от 2 до 10%, в Херсонской – от 5 до 20%.

2. Для выявления непатогенных агробактерий было протестировано 157 чубуков виноградной лозы, 58 образцов из ризосферы почвы виноградников. Установлено, что из всего количества протестированных образцов выделены 208 непатогенных штаммов агробактерий и 5 из них имели антагонистические свойства, что было проверено в лабораторных и полевых условиях.

3. Метод ПЦР позволил провести скрининг большого количества образцов почвы и растений на присутствие опухолеобразующих агробактерий. Полученные в результате подобных исследований данные могут быть использованы в практике сельского хозяйства для борьбы с бактериальным раком на инфицированных участках и при закладке виноградников.

4. На основе полученных данных разработана технология применения микробов-антагонистов для профилактики заражения растений возбудителем бактериального рака винограда.

5. Разработана технология термотерапии виноградных саженцев и лозы для профилактики распространения возбудителя бактериального рака винограда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (REFERENCES)

1. Ophel K., Kerr A. 1990. *Agrobacterium vitis*, new species for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 236–241.
2. Lehoczy J. 1978. Root system of the grapevine as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* cells. In: *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bacteriol. (Angers, France, 1978)*. P. 239–243.
3. Pu X.-A., Goodman R.N. 1993. Tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grape plants. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 249–254.
4. Burr T.J., Bazzi C., Süle S., Otten L. 1998. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis.* 82: 1288–1297.
5. Burr T.J., Katz B.H. 1984. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Dis.* 68: 976–978.
6. Burr T.J., Katz B.H. 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology*. 73: 163–165.
7. Burr T.J., Katz B.H., Bishop A.L. 1987. Population of *Agrobacterium* in vineyard and nonvineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Dis.* 71: 617–620.
8. Manulis S., Chalupowicz L., Dror O., Kleitman F. 2002. Molecular diagnostic procedures for production of pathogen – free propagation material. *Pest Manag. Science*. 58: 1126–1131.
9. Bouzar H., Oudah D., Krime Z., Jones J.B., Trovato M., Petit A., Dessaux Y. 1993. Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. *Appl. Environm. Microbiol.* 59: 1310–1317.
10. Cha R.S., Thilly W.G. 1995. Specificity, efficiency and fidelity of PCR. PCR primer: a laboratory manual. In: *PCR Methods Appl.* Cold Spring Harbour laboratory press: 37–53.
11. Krime Z., Petit A., Mougel P., Dessaux Y., Nesme X. 2002. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils. *Appl. Environm. Microbiol.* 68: 3358–3365.
12. Xie X.M., You J.F., Chen P.M., Guo J.M. 1993. On strain MI 15 of *Agrobacterium radiobacter* for the biological control of grapevine crown gall. *Acta Phytopathol. Sin.* 23: 137–141.
13. Szegedi E., Bottka S. 2002. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis*. 41: 37–42.
14. Goussard P.G. 1977. Effect of hot-water treatments on vine cuttings and one-year-old grafts. *Vitis*. 16: 272–278.
15. Roy M., Sasser M. 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Phytopathology*. 73: 810.
16. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environm. Microbiol.* 61: 2879–2884.

Поступила 04.03.2016