Національний Аграрний Університет

На правах рукопису

ГАЙДАЙ Олександр Євгенович

БАКТЕРІАЛЬНИЙ РАК ВИНОГРАДУ, ДІАГНОСТИКА І ЗАХОДИ ЩОДО ЗАХИСТУ ВІД ЗАХВОРЮВАННЯ

03.00.21. - фітопатологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ - 1995

Дисертація є рукопис

Роботу виконано в Інституті виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таірова

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
Мілкус Борис Наумович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор Гвоздяк Ростіслав Ільич
кандидат біологічних наук,
Мінько Миколай Дорофійович

Провідна установа: Одеський сільськогосподарський інститут

Захист дисертації відбудеться "8" грудня 1995 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.05.13. в Національному аграрному університеті за адресою: 252041, м.Київ - 41, вул. Героїв Оборони, 15, учбовий корпус 3, аудиторія 68.

Просимо взяти участь в обговоренні дисертації під час її захисту або вислати відгук на автореферат у 2-х примірниках, завірених печаткою, за адресою 252041, м.Київ-41, вул. Героїв Оборони, 15, сектор захисту дисертацій.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного аграрного університету.

Автореферат розісланий "4" листопада 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради, кандидат
сільськогосподарських наук А. Г. Бабич

I. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

1.1. Актуальність теми. Бактеріальний рак, що спричиняє фітопатогенна, пухлиноутворююча бактерія Agrobacterium tumefaciens є одним з найбільш небезпечних захворювань винограду. Обстеження насаджень в зоні промислового виноградарства України показало шкідливу дію його як на молодих, так і на родючих виноградниках, яка виявляється в ослабленні росту кущів, зниженні стійкості до несприятливих умов зовнішнього середовища, врожайності та якості продукції. Ураження бактеріальним раком винограду сорта Каберне становить 53,8 - 93,0% (Л. Г. Панфілова, 1982; П. М. Штеренберг, 1979). Урожайність таких виноградників знижується в середньому на 20% (Ж. А. Нагапетян, 1973; І. Маленін, 1971). Сахаристість падає на 1-2%.

Проведені дослідження (Lehoczky, 1969, 1971) показали, що збудник знаходиться в судинах ксілеми уражених рослин разом з іншими спорідненими і неспорідненими до нього мікроорганізмами. При цьому симптоми захворювання на кущах можуть і не виявлятися (Lehoczky, 1968; Burr and Katz, 1984). Таким чином, існує ймовірність того, що лоза, яку заготовлено на хворих материнських кущах, може містити A. tumefaciens, отже захворювання може розповсюдитися на нові насадження винограду.

Існуючі методи тестування прищепних і підщепних сортів винограду мають багато суттєвих недоліків, які пов'язані з тривалістю проведення досліджень, а також отриманням невірогідних даних. В зв'язку з цим, важливого значення набуває розроблення методів діагностики і боротьби з бактеріальним раком, починаючи з індексації і сертифікації садивного матеріалу

з метою закладення насаджень здоровими саджанцями.

1.2. Мета і завдання досліджень. Мета роботи полягала у вдосконаленні існуючих і розробленні нових методів діагностики бактеріального раку винограду, і отриманні садивного матеріалу вільного від збудника. Завданням досліджень було:

вдосконалити мікробіологічний і серологічний методи діагностики бактеріального раку винограду;

розробити генно-інженерний метод діагностики A. tumefaciens;

випробувати нові хімічні препарати у боротьбі з бактеріальним раком винограду.

1.3. Наукова новизна. Вдосконалено методи відбору пасоки та екстрагування бактерій із здеревенілих живців виноградної рослини. Для виявлення патогенності A.tumefaciens запропонован метод використання в якості індикаторів рослин винограду і каланхое, що вирощені в культурі in vitro. Вперше в виноградарстві розроблено генно-інженерний метод діагностики A.tumefaciens з використанням радіоактивного та нерадіоактив - ного зондів. На цей метод діагностики отримано авторське свідоцтво N 1687617 від першого липня 1991 року. Випробувано нові препарати: хлортіазід і купролон, які успішно можна застосовувати у питомниководстві з метою запобігти перезараженню живців під час їх вимочування, а також для боротьби з пухлинами на виноградних кущах.

1.4. Практична цінність. Розроблений генно-інженерний метод діагностики широко використовується під час масового тестування винограду на приховане ураження A. tumefaciens. Отримано

маточні рослини прищепних і підщепних сортів винограду, вільні від збудника бактеріального раку. Цим матеріалом у 1988 - 1994 роках закладено маточники здорових клонів підщепних сортів Ріпарія х Рупестріс 101 - 14, Берландієрі х Ріпарія СО4, Берландієрі х Ріпарія Кобера5 ББ у господарствах Одеської, Херсонської і Закарпатської областей України площею 51 гектар.

1.5. Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідалися на конференції "Фітонциди. Бактеріальні хвороби рослин". (Львів, 1990 р.), в 1987 - 1990 роках на засіданнях міжфакультетської проблемної НДЛ ім. Д.Н. Білозерського МГУ в зв'язку з виконанням завдання 5.1.1.3. КП НТП СЕВ "Отримати препарати вірусів і бактерій винограду, антисироваток до них, створити діагностикуми для виявлення вірусів і бактерій винограду та організувати їх виробництво".

1.6. Структура та обсяг роботи. Робота складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів проведення досліджень, результатів власних досліджень, висновків, бібліографічного списку літератури (112 джерел, в тому числі - 83 іноземних). та додатку. Дисертацію викладено на 111 сторінках машинопису, ілюстровано 12 рисунками та 19 таблицями.

1.7. Декларація особистого внеску дисертанта у розробку наукових результатів, що виносяться на захист. Автором особисто, а також в співавторстві під безпосереднім його керівництвом, проведені эксперементальні дослідження, обгрунтовані пояснення висновків і практичних рекомендацій.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводилися в лабораторії вірусології і мікробіології Інституту виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таірова в період з 1988 по 1994 рік. Польові досліди проведено на виноградних насадженнях дослідного господарства "Таіровський".

Для проведення досліджень нами використані ізоляти A. tumefaciens, A. rubi, A. rhisogenes, Pseudomonas aureofaciens, Xanthomonas ampelina, одержані з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту вірусології і мікробіології ім. Д.К. Заболотного, Молдавського НІІ виноградарства і виноробства, наукових закладів відповідного профілю Болгарії, Іспанії та США.

A. tumefaciens виділяли з пасоки під час весняного руху соків, а також із здеревенілої лози і галлів винограду за загальноприйнятими методіками (Маленін, 1974; Lehoczky, 1971; Goodman et al., 1987).

Морфологію і структуру колоній вивчали на селективних поживних середовищах Рой і Сассера (Roy and Sasser, 1983).

Для визначення патогенних властивостей виділених ізолятів використовували індікаторні рослини каланхоє, виноград, соняшник, томати, діски моркви та ін.

Для отримання діагностичних антисироваток проводили імунізацію кролів. Проби крові відбирали перед кожною імунізацією, а також через тиждень після останнього введення антігену.

Специфічність антисироваток визначали в реакції аглютинації на склі і в пробірках з гомологічними і гетерологічними культурами цього роду, а також представниками агробактерій інших родів.

Під час розроблення генно-інженерного методу діагностики хромосомну ДНК виділяли за методом, описаним в роботі Dall (1985).

Електрофорез в агаровому гелі проводили згідно з загальноприйнятими методами (Aai J.C., 1972; Sharp P.A. et al., 1973).

Плазмідну ДНК виділяли за методикою, описаною Гловер (1988). Плазміди мітили ^{32}P за допомогою нік - трансляції (Rigby et al., 1987).

Гібридизацію ДНК з міченим зондом проводили за Грунштейном і Хогнесом (1975) з використанням апарату фірми "Bio Rad" (США), що дозволяє одночасно наносити на фільтр і обробляти 96 зразків.

Для боротьби з бактеріальним раком винограду вивчали нові хімічні препарати, синтезовані в Інституті хімічних засобів захисту рослин (м. Москва) і науково - виробничому об'єднанні "НІОПІК" (м. Москва). Проведено лабораторні і виробничі випробування препаратів Об - 166 - 85 (мідний комплекс тіадізінона) і купролона (мідний комплекс ціглона). Випробування антимікробних властивостей проводили згідно з загальноприйнятими методами, що застосовуються у мікробіологічних дослідженнях (Ведьміна С.А. та ін., 1964; Черкес та ін., 1986).

Фітотоксичність препаратів вивчали шляхом оброблення трьохвічкових живців винограду сорту Ранній Магарача, Одеський Сувенір, Янтар ОСХІ, Ювілейний 70, Ріпарія х Рупестріс 101 - 14, Берландієрі х Ріпарія СО4. Вимочували їх протягом 12 годин у розчинах різної концентрації: купролон - 0.05, 0.025, 0.012 і 0.006 % д.р., хлортіазід - 0.1, 0.05 і 0.025 % д.р. Облік результатів проводили через 2 - 3 тижні після оброблення. При цьому відмічали утворення калусу, кореней і проростання вічок.

Інгібіруючу дію купролону і хлортіазіду на пухлини досліджували, оброблюючі галли винограду пастою, яка містила 1, 2, 4, 8, 16 і 32 % д.р. При цьому зважували на стан пухлинної та здорової тканин після оброблення на протязі 7 - 10 днів.

Статистичну обробку отриманих результатів провели на комп'ютері ІВМ-РС при допомозі програм багатомірного статистичного аналізу "Варпет".

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Виділення Agrobacterium tumefaciens з здеревенілих живців виноградної лози.

Нами вдосконалено метод Lehoczky (1968) виділення бактерій з живців виноградної лози під час перевірки матеріалу в осінньо - зимовий період.

Сутність методу полягає в екстрагуванні бактерій з ксілеми за допомогою води, яка пропускається через живець під тиском. Для цього змонтовано прилад, який дозволяє виділяти бактерії з живців винограду за дуже короткий проміжок часу. Нами

тановлено, що для вимивання максимальної кількості бактерій сить пропустити через судини воду в кількості 1.0 - 1.5 мл.

3.2. Відбір пасоки для діагностики Agrobacterium tumefaciens.

Нами модифіковано метод Маленіна (1974), запропонований я збирання виноградної пасоки. Модифікація методу полягає в ому, що замість звичайної пробірки і вати, що використовується ля ущільнення, ми застосували резиновий корок з вмонтованими неї колючками для відбору крові у великих тварин. Через одну з них в пробірку надходить пасока, через другу виходить надлишок повітря. Застосування цього приладу дає можливість виключити вторинне забруднення пасоки бактеріями. Крім того, відбір проб можна проводити в будь-яку погоду (дощ, туман). Пробірки можна оставляти на ніч, що є дуже важливим під час масового збирання пасоки. Використання гнучкого сполучення пробірки з пагоном дає можливість відбирати пасоку з підрізаних кущів.

3.3. Сортова сприйнятливість томатів до зараження A. tumefaciens

Одним з найбільш ефективних індикаторів для визначення патогенних властивостей A. tumefaciens є томати. Проте в процесі роботи ми відмітили, що не всі сорти томатів в однаковій мірі реагують на штучне зараження патогеном. Багато сортів реагують

незначним по обсягу утворенням пухлин, що ускладнює проведення обліків. Це явилося підставою для вивчення пухлиноутворної здатності деяких сортів томатів.

Отримані нами результати свідчать про різну сприйнятливість сортів томатів і необхідності вибору чутливого до захворювання сорту як індикатора. Такими сортами є Ранній - 83 і Київський ранній.

3.4. Використання тест - рослин in vitro.

Нами розроблено метод визначення патогенних властивостей ізолятів з використанням мікросадженців винограду, вирощених в культурі in vitro. Випробувано сорти Молдова, Русалка, Мічта, Кобзар. Встановлено, що перші ознаки зараження рослин виявляються на 10 - 12 день, що вдвічі скорочує час діагностики порівняно з використанням горшечної культури винограду. Найбільш чутливим до штучного зараження виявився сорт Кобзар. При цьому більш ефективним є метод зараження в рану на пагоні. При декапітації рослин пухлина утворюється менших розмірів, проте в ті ж самі строки, що й у першому варіанті.

3.5. Серологічний метод діагностики бактеріального раку винограду.

З метою вивчення антигенних властивостей бактеріальної клітини A.tumefaciens і її компонентів були виготовлені 5 типів антигенів: О - антиген; Н - антиген; глікопротеїновий

антиген; культура, вбита формаліном; жива культура. Встановлено, що найбільша активність притаманна антисироваткам, що були отримані на введення кролям живої культури та обробленої формаліном. Титр антисироваток, отриманих на введення таких антигенів, складав 1 : 512 - 1 : 1024. Самий низький титр, 1 : 32 - 1 : 64, спостерігався у антисироваток, отриманих на введення глікопротеїнів, виділених з A. tumefaciens. Подальші дослідження специфічності отриманої поліштамової антисироватки показали, що в структурі бактеріальної клітини є антигени, спільні з іншими видами бактерій роду Agrobacterium. Так, відмічено позитивну реакцію з непатогенними штамами A. radiobacter і A. rubi (табл.1), що підтверджує результати досліджень інших авторів, які відмічають неможливість серологічно відокремити патогенні штами від непатогенних.

В зв'язку з тим, що реакції агглютинації не притаманна достатня чутливість, ми оптимізірували умови виявлення A. tumefaciens за допомогою непрямого методу імуноферментного аналізу (ІФА). Оптимальними умовами для проведення ІФА є : розведення антисироватки 1 : 64 000 - 1 : 128 000, культури агробактерій 10 кое/мл і коньюгату антикролячої антисироватки, міченої пероксідазою, 1 : 500.

Проте недоліком серологічного методу є неможливість відокремити патогенні і непатогенні штами роду Agrobacterium. Тому подальший етап наших досліджень полягав у розробленні біотехнологічного методу діагностики бактеріального раку винограду на базі генної інженерії.

Таблиця 1.

СПЕЦИФІЧНІСТЬ ПОЛІШТАМОВОЇ АНТИСИРОВАТКИ
ДО РІЗНИХ ВИДІВ БАКТЕРІЙ

Вид бактерій	Номер штама	Вірулентність	Результат реакції аглютинації
A. tumefaciens	229	+	+
A. tumefaciens	227	+	+
A. tumefaciens	B	+	+
A. tumefaciens	8628	+	+
A. tumefaciens	1D1	+	+
A. radiobacter	55	-	+
A. rhisogenes		-	-
A. rubi		-	+
Pseudomonas aureofaciens		+	-
Xanthomonas ampelina	162	+	-

Умовні позначки: " + " - позитивна реакція
" - " - негативна реакція

3.6. Біотехнологічний метод діагностики бактеріального раку винограду.

Перспективним напрямом використання генно - інженерної технології у рослинництві є розроблення методів діагностики різних патогенів і вибракування уражених хворобою рослин. Основою багатьох генно-інженерних методів діагностики є гібридизація нуклеїнових кислот. Явище комплементарності дозволяє з досить високою точністю, у певних експериментальних умовах, виявляти послідовності нуклеотидів ДНК, спільні (або дуже близькі) у двох зразків.

Технологія гібридизації нуклеїнових кислот для виявлення чужерідного геному (для діагностики захворювань, що викликаються патогенними бактеріями), може виявитися більш ефективною, ніж існуючі методи. Важливим моментом у розробленні методу виявлення патогену є створення зонду, комплементарного певній ділянці ДНК патогену. Для цього необхідно детальне вивчення організації геному бактерії і характеристика його взаємодії з генетичним матеріалом клітини рослини. Одним з найбільш добре вивчених у цьому відношенні є бактеріальний рак рослин.

Для розроблення методу діагностики бактеріального раку винограду є важливим конструювання зонду, який містить ділянку ДНК, специфічну тільки Т - ділянці Ті - плазміди A. tumefaciens. Для пошуку фрагмента нами досліджені плазміди pGV 0361, pGV 0414, pGV 0415, що містять різні фрагменти Т - області Ті - плазміди.

Головну увагу ми приділяли вивченню двох останніх плазмід pGV 0414 і pGV 0415. Для визначення можливості створення зонду на базі цих плазмід необхідно було перед цим виявити можливості їх гібридизації з ДНК різних штамів грунтових бактерій. Нами встановлено, що плазміда pGV 0415 не гібридизується з ДНК A. radiobacter, Rhisobium meliilloti і тому може бути використана як матеріал для пошуку фрагменту, що гібридизується з Ti - плазмідою із A. tumefaciens.

Одержаний нами фрагмент гібридизувався з тотальними ДНК, виділеними з різних штамів A. tumefaciens і не давав гібридизацію з непатогенними штамами A. rubi і A. radiobacter. Одержаний фрагмент мітили за допомогою нік - трансляції. Оптимальна кількість зонду для реакції складало 50 - 100 нг і 20 - 30 мкКи одного з ^{32}P dNTP. Одержану конструкцію ми назвали pBCV I.

При визначенні чутливості генно-інженерного методу було встановлено, що концентрація бактерій 10 кое/мл є оптимальною і забезпечує одержання сигналу нормальної інтенсивності.

Для визначення специфічності розробленого нами методу проведено гібридизацію з ДНК різних штамів бактерій. Результати, наведені в таблиці 2, показують, що метод є високоспецифічним, тому що гібридизація відбувалася тільки з патогенними штамами A. tumefaciens, які характеризуються наявністю Ti-плазміди і не відбувалася з бактеріями, у яких плазміда відсутня. Встановлено, що метод ефективний для виявлення A. tumefaciens не тільки на винограді, а також на інших рослинах які сприйнятливі до бактеріального раку (табл. 3).

Таблиця 2

ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОСТІ ЗОНДУ ШЛЯХОМ ТЕСТУВАННЯ РІЗНИХ ВИДІВ БАКТЕРІЙ

Вид бактерій	Номер штама	Результат гібридизації
A. tumefaciens	A6	+
	Ag-20	+
	Ag-57	+
	Ag-63	+
	Ag-158	+
	121-Б	+
	151-Б	+
	B6	+
	1D1	+
	C-58	+
	FACH	+
	FA-2	+
	271	+
	8628	+
A. rubi		-
A. radiobacter	55	-
Rhisobium melliloti	425-A	-
Pseudomonas aureofaciens	35	-
A. rhisogenes		-

Умовні позначки " + " - позитивна реакція

" - " - негативна реакція

Таблиця 3

СПЕЦИФІЧНІСТЬ ЗОНДУ ПРИ ТЕСТУВАННІ A. TMEFACIENS ВИДІЛЕНОЇ ІЗ РІЗНИХ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ РОСЛИН

N п. п.	Вид бактерій	Походження культури	Результат гібридизації
I.	A. tumefaciens:		
	9054	плодові	+
	8628	плодові	+
	9052	хризантема	+
	Ag-20	міндаль	+
	271	виноград	+
II.	A. radiobacter:		
	55	виноград	-

Умовні позначки " + " - позитивна реакція
" - " - негативна реакція

Приведені в таблиці данні показують, що гібридизація проходить із A. tumefaciens виділеними із хворих рослин другого походження. Це ще раз підтверджує про специфічність полученого нами зонду. Позитивна реакція проходить із усіма культурами A. tumefaciens в яких є наявність Ti-плазміди.

В зв'язку з тим, що генно-інженерний метод базується на застосуванні радіоактивних ізотопів, нами розроблено неізотопний варіант діагностики бактеріального раку винограду. Його сутність полягає в тому, що ДНК мітили за допомогою методу випадкового праймірування шляхом включення в неї дезоксіуридінфосфату, до якого приєднано стероїдний гаптен дігоксігенін.

ДНК гібридизували з патогенними і непатогенними культурами, нанесеними на фільтр у різних концентраціях. Паралельно проводили контрольну гібридизацію з радіоактивним зондом. Як результат, усі патогенні штами дали позитивний сигнал після гібридизації, як в контролі, так і після мічення дігоксігеніном.

Встановлено, що чутливість неізотопного методу така ж, як і метода з використанням ізотопів.

Таким чином, нами вперше в виноградарстві показана можливість використання нерадіоактивно міченої ДНК для виявлення патогенних штамів A. tumefaciens. Використання дігоксигеніну замість ^{32}P не знижує високу чутливість детекції і водночас підвищує безпечність експерімейту, що дає можливість проводити його в лабораторіях, які не мають ізотопного блоку.

Не менш важливо й те, що мічена дігоксигеніном ДНК може зберігатися необмежено довгий час, тоді як ДНК, мічена ^{32}P, швидко розпадається.

3.7. Хімічні засоби захисту від бактеріального раку.

Проведені лабораторні і виробничі випробування препаратів хлортіазіду і купролону показали, що їм притаманна бактеріцид-

на дія по відношенню до A. tumefaciens. Купролон в концентрації 0.006 % д.р. і хлортіазід, що містив 0.025 % д.р., викликають повну загибель бактерій при експозиції 30 хвилин.

Обидва препарати були використані нами під час вимочення виноградної лози для запобігання перезараження. Лозу було заготовлено з 5 прищепних (Ранній Магарача, Одеський Сувенір, Янтар , Кримська жемчужина, Ювілейний 70) і двох підщепних сортів (Ріпаріа х Рупестріс 101 - 14, Берландієрі х Ріпаріа С04).

Лозу нарізали на трьохвічкові живці і вимочували протягом 8 годин. Одержані результати свідчать про те, що оптимальною концентрацією для купролона є 0.006 % д.р., для хлортіазіду 0.025 % д.р. Під час вимочування у розчинах вказаних концентрацій затримання у проростанні вічків не спостерігалося, утворювалися добрі корені і калус.

Випробування пастоподібної форми препаратів на кущах винограду, що росли в дослідному господарстві "Таїровський" показало, що оброблення пухлин пастою купролона, яка містила 8 % д.р., викликає 100 % їх загибель через 5 - 7 днів після оброблення. Паста хлортіазіду виявилася менш ефективною. Максимальна концентрація (32 % д.р.) тільки частково викликала некроз поверхневих шарів пухлинної тканини і не впливала на їх подальший розвиток.

При визначенні залишкової кількості хлортіазіду і купролону, в оброблених пастою кущах винограду, в будь-якій з досліджених проб не було виявлено наявності препарату, що свідчить про їх нешкідливість і можливість застосування для

оброблення кущів, уражених бактеріальним раком.

3.8. Виробництво кущів клонів винограду, вільного від бактеріального раку.

Для виробництва кущів клонів винограду, вільного від бактеріального раку на клонодослідній ділянці Інституту виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова спочатку проводилася фітосанітарна селекція. Результати обстежень показали відсутність кущів винограду з наявністю пухлин на штамбі і рукавах. В зв'язку з тим, що збудник бактеріального раку може знаходитися у рослині винограду в прихованому стані, ми застосували генно-інженерний метод для виявлення латентної інфекції. З цією метою навесні, на кущах клонів відбирали пасоку, наносили на капронові фільтри і проводили гібридизаціонний аналіз. Одержані результати, наведені в таблиці 4, свідчать про те, що сорти підщеп латентно уражені на 4,3 - 6,9%. Європейські сорти уражені в значно меншій мірі. Максимальна ураженість деяких сортів не перевищує 3,1%. В зв'язку з тим, що вказані сорти винограду раніш були тестовані на вірусні хвороби, одержаний матеріал є суперелітою, яка надалі повинна бути розмножена у лабораторно-тепличному комплексі Інституту виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова.

Після цього садивний матеріал передається у господарства України для закладення базових маточників, з яких потім заготовляється лоза для виробництва здорових саджанців. Як бачимо з таблиці 5, в період з 1988 р. по 1994 р., в господарствах

Таблиця 4

РЕЗУЛЬТАТИ ТЕСТУВАННЯ КУЩІВ КЛОНІВ ПІДЩЕПНИХ І ПРИЩЕПНИХ СОРТІВ НА ПРИХОВАНЕ ЗАРАЖЕННЯ A. TUMEFACIENS

N п.п.	Сорт винограду	Кількість досліджених кущів (шт.)	Кількість здорових кущів (шт.)	Кількість заражених кущів (%)
	I. Підщепні сорти: (середнє за 1991-1992 р.р.)			
1.	Ріпаріа Глуар	213	202	5,2
2.	Берландієрі х Ріпаріа 41Б	236	226	4,3
3.	Берландієрі х Ріпаріа Кобера 5ББ	468	436	6,9
4.	Ріпаріа х Рупестріс 101-14	414	390	5,8
5.	Берландієрі х Ріпаріа С04	126	120	4,8
	Всього:	1457	1374	5,7
	II. Прищепні сорти: (середнє за 1991-1992 рр.)			
1.	Італія	320	310	3,1
2.	Мускат янтарний	130	126	3,0
3.	Трамінер рожевий	225	225	-
4.	Ркацітелі	236	229	3,0
5.	Восторг	195	195	-
6.	Шасла	229	224	2,2
7.	Рієлінг	175	175	-
8.	Жемчуг Саба	79	79	-
	Всього:	1589	1563	1,7

Одеської, Херсонської і Закарпатської областей закладено 51 гектар підщепних сортів винограду.

Таблиця 5

ЗАКЛАДЕННЯ БАЗОВИХ МАТОЧНИКІВ ПІДЩЕПНИХ СОРТІВ ВИНОГРАДУ В ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ

N п/п	Область, господарство	Сорт винограду	Рік посадки	Площа насаджень (га)
1.	Херсонська обл.			
	р-п "Білозерський"	Ріпарія х Рупестріс 101 - 14	1988	5
	р-п "Каменський"	Ріпарія х Рупестріс 101 - 14	1989	3
2.	Одеська обл.			
	Д. В. Г. ім. Суворова	Ріпарія х Рупестріс 101 - 14	1988-1989	15
	р-п "Придунайський"	Ріпарія х Рупестріс 101-14	1991-1992	13
	р-п "Лиманський"	Ріпарія х Рупестріс 101 - 14	1991-1992	7
	Д. В. Г. "Кучурганське"	Ріпарія х Рупестріс 101 - 14	1994	5
3.	Закарпатська область			
	р-п ім. Шевченко	Берландієрі х Ріпарія СО4	1989	1,6
		Берландієрі х Ріпарія Кобера 5 ББ	1989	1,4
	ВСЬОГО:			51

4. ВИСНОВКИ

1. В результаті проведених досліджень вдосконалено і розроблено нові методи діагностики бактеріального раку винограду, які дозволяють одержувати здоровий садивний матеріал , вільний від збудника.

2. Вдосконалено метод виділення бактерій з живців виноградної лози під дією тиску повітря. Встановлено, що максимальне вимивання бактерій із судин виноградної рослини досягається шляхом пропускання крізь живець рідини в кількості 1,0 - 1,5 мл під тиском 0,1 МРа.

3. Запропонований прилад для відбору пасоки під час весняного руху соків дозволяє отримувати діагностичний матеріал, не забруднений сторонньою мікрофлорою.

4. Встановлена сортова специфічність томатів при штучному їх зараженні A. tumefaciens. Це дає можливість використання чутливих сортів при визначенні патогенності. Найбільш сприйнятливими виявилися сорти Київський ранній і Ранній - 83.

5. Випробувані різні сорти винограду і каланхое, вирощені in vitro. Інокуляція таких рослин дозволяє в короткі строки (10 - 12 днів) і з найбільшою ймовірністю виявляти A. tumefaciens. Найбільша чутливість притаманна сорту Кобзар селекції Інституту виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таірова. При цьому більш ефективним методом зараження є метод проколювання стебла порівняно з декапітацією.

6. Одержано і випробувано антисироватки до різних антигенів A. tumefaciens. Найбільший тітр (1: 512) виявився у

антисироваток, отриманих після імунізації кролів живою культурою A. tumefaciens і культурою, обробленою формаліном.

7. Встановлено, що в бактеріальній клітині є спільні антигени з іншими видами рода Agrobacterium. Так, відмічено позитивну реакцію з непатогенними штамами A. radiobacter і A. rubi.

8. Вперше в виноградарстві розроблено генно-інженерний метод діагностики A. tumefaciens з використанням радіоактивного і нерадіоактивного зондів, яким притаманна висока чутливість і специфічність, що дозволяє відокремлювати патогенні штами A. tumefaciens від непатогенних A. radiobacter. Метод використовується для виявлення прихованої інфекції бактеріального раку європейських і підщепних сортів винограду .

9. Встановлено, що підщепи латентно заражені A. tumefaciens в середньому на 5,7 %, а європейські сорти на 1,7 %.

10. Використання дігоксігеніну замість ^{32}P не знижує високу чутливість детекції і водночас підвищує безпечність експерименту, що дає можливість проводити його в лабораторіях, які не мають ізотопного блоку.

11. З метою захисту винограду від бактеріального раку випробувано два нових препарати (купролон і хлортіазід). Результати досліджень показали, що указані препарати в концетраціях 0,006% д.р. і 0,025% д.р. відповідно, можуть бути використані під час вимочення живців замість хінозолу. Для оброблення свіжих пухлин на кущах винограду можна використовувати пастоподібну форму купролону в концетрації 8% д.р..

12. В результаті тестування кущів клонів підщепних сортів Рiпарiа x Рупестріс 101 - 14, Берландієрі x Рiпарiа С04,

Берландієрі х Ріпарія Кобера 5 ББ одержано садивний матеріал винограду, вільний від збудника бактеріального раку, який використано для закладення сертифікованих маточників у господарствах Закарпатської, Одеської і Херсонської областей на на площі 51,0 га.

5. Рекомендації виробництву

Матеріали проведених досліджень дають підставу рекомендувати:

1. Проводити діагностику бактеріального раку винограду в весняний період під час активного руху соків, використовуючи пасоку винограду для мікробіологічного, серологічного і генно-інженерного методів дослідження;

2. В питомниководчиських господарствах препарати купролон і хлортіазід в концетраціях 0,006% д.р і 0,025% д.р. відповідно можуть бути використані під час вимочки живців замість хінозолу;

3. Обробка свіжих пухлин на кущах винограду, уражених бактеріальним раком, пастоподібною формою купролону в концетрації 8% д.р. викликає їх відмирання;

4. Організація і проведення указаних заходів дасть змогу получати здоровий, вільний від збудника бактеріального раку, садивний матеріал винограду для закладки здорових насаджень.

Список опублікованих робіт по темі дисертації:

1. Сиволап Ю. М., Дьяченко Л. Ф., Милкус Б. Н., Кензиор А. Л., Гайдай А. Е. Биотехнологический метод диагностики бактериального рака винограда // Биотехнология. - 1991. - N 5. - с. 82 - 85.
2. Дьяченко Л. Ф., Сиволап Ю. М., Гайдай А. Е., Милкус Б. Н. Неизотопный вариант биотехнологического метода диагностики бактериального рака // Бюллетень селекционно-генетического Института. - Одесса, 1991. - N 3. - 4 с.
3. Милкус Б. Н., Гайдай А. Е. Диагностика бактериального рака винограда // Информ. листок о передовом производственно-техническом опыте. - Одесса, 1990. - 3 с.
4. Сиволап Ю. М., Милкус Б. Н., Кензиор А. Л., Дьяченко Л. Ф., Гайдай А. Е. Способ диагностики бактериального рака винограда // Авторское свидетельство N 1687617& - 1991. - 2 с.
5. Гайдай А. Е., Гончаренко Л. В., Милкус Б. Н. Бактериальный рак винограда на Украине и методы его диагностики// // Тез. докл. конф. "Фитонциды. Бактериальные болезни растений". - Львов, 1990. - с. 89.

Гайдай А. Е. Бактериальный рак винограда, диагностика и мероприятия по защите от заболевания.

Диссертация (рукопись) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.21 - фитопатология. Национальный аграрный университет, Киев, 1995.

Усовершенствованы существующие и разработаны новые методы диагностики бактериального рака винограда.

Испытание препаратов хлортиазид и купролон показало, что их с успехом можно применять в питомниководстве с целью предупреждения перезаражения черенков во время их вымочки, а также для борьбы с опухолями на виноградных кустах.

Организация профилактических мероприятий дает возможность получать здоровый посадочный материал винограда, свободный от возбудителя бактериального рака.

Gaiday A. E. Bacterial cancer of grapevine, diagnostics and protective measures.

Dissertation (manuskript) for the competition of agricultural sciences degree candidate by the speciality 03.00.21 - Phytopathology. National Agricultural University, Kiev, 1995.

Methods of diagnostics were improved and the new methods were elaborated.

Trials of chlortiazid and cuprolon showed that these preparates can be applyed successfully in nursery practice with the purpose of prevention of cuttings re-infection during the grafts manufacture and for the struggle with grapevine bushes tumors.

The organization of prophylactic measures give the possibility to obtaine grapevine healthy planting material free from bacterial cancer agent.

Ключеві слова: виноград, бактеріальний рак, діагностика, захист, питомніководство, купролон, хлортіазід, профілактика.

ОГУ. Ротапринт. Зак. N 67. т. 100. 1995г.