

**МІНІСТЕРСТВО НАУКИ І ОСВІТИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

СИВОДЕД ЄВГЕНІЯ ВАЛЕРІЇВНА

УДК 623.4:633.854.78

**ОСОБЛИВОСТІ ПАТОГЕНЕЗУ ФОМОПСИСУ СОНЯШНИКА
ТА БІОЛОГО-ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ЗБУДНИКА ХВОРОБИ
DIAPORTHE (PHOMOPSIS) HELIANTHI MUNT. – СВЕТ. ET AL.**

06.01.11 «Фітопатологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник доктор біологічних наук,
професор, академік НААН
Кирик Микола Миколайович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
професор кафедри фітопатології
імені академіка В. Ф. Пересипкіна

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Слюсаренко Олександр Миколайович,
Одеський національний
університет імені І. І. Мечникова,
директор ботанічного саду

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Ковбасенко Василь Михайлович,
Національний науковий центр
«Інститут механізації та електрифікації
сільського господарства» НААН,
провідний науковий співробітник
відділу науково-технічного забезпечення
біоенергетичних культур та овочів

Захист відбудеться «27» червня 2019 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.02 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «26» травня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

М. С. Мороз

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Ураження рослин різними патогенами залежить від екологічних умов вирощування, видової і сортової стійкості рослин та агресивності патогену. Ґрунтово-кліматичні умови південного регіону України сприятливі для росту й розвитку такої цінної олійної культури, як соняшник однорічний (*Helianthus annuus* L.) (Никитчин, Рябота, 1989). Водночас, у процесі росту та розвитку ця культура може уражатися вірусними, бактеріальними та грибними хворобами. Серед них найбільшу шкоду завдають грибні захворювання, які порушують життєві функції рослин, що призводить до зниження обсягів та якості врожаю (Оверченко, 1999). Нині відомо понад 70 видів грибів, що паразитують на соняшнику (Асімовіч, 1983).

Нині в Україні використовують значну кількість насінневого матеріалу сортів і гібридів соняшнику вітчизняної та закордонної селекції. У зв'язку з цим, із насінневим матеріалом можливе потрапляння значно агресивніших рас шкідливих видів патогенів, які у нових екологічних умовах здатні спричиняти спустошливі епіфітотії та призводити до втрат урожаю соняшнику, аж до повного його знищення (Петренкова та ін., 2012). Глобалізація світової економіки спонукає приділяти особливу увагу аналізу фітосанітарного стану імпортованого насінневого матеріалу, що може стати джерелом поширення небезпечних захворювань рослин (Капустін та ін., 2001).

До найбільш шкідливих грибних захворювань соняшнику належить фомопсис. Він поширений у багатьох європейських країнах (колишній Югославії, Угорщині, Румунії, Франції й Австрії), а також в Аргентині та Бразилії (Mathew et al., 2018). Однак, в Італії, де кліматичні умови сприятливі для розвитку згаданої інфекції, хвороба практично відсутня. На думку С. М. Томсона зі співавторами (2018), це може бути пов'язано з генетичною мінливістю патогену.

У зв'язку з цим всеохоплюючі дослідження патогенезу фомопсису соняшнику з метою вивчення перебігу процесів ураження рослин на молекулярному, клітинному та тканинному рівнях видається надзвичайно важливим. Особливо вони актуальні у зв'язку з ідентифікацією нових видів *Diaporthe*, які здатні викликати захворювання соняшнику (Thompson, 2011, 2015, 2018).

Не менш важливим і актуальним завданням слід вказати розроблення експресних методів визначення грибних хвороб, які знаходяться у прихованій формі. Це дозволить своєчасно ідентифікувати та провести захисні заходи з мінімізації їх шкідливих наслідків.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано на кафедрі фітопатології імені академіка В. Ф. Пересипкіна Національного університету біоресурсів і природокористування України, часткові дослідження проведено в Херсонській обласній фітосанітарній лабораторії та на кафедрі землеробства Державного вищого навчального закладу «Херсонський державний аграрний університет». Дисертаційні дослідження на кафедрі землеробства Державного вищого

навчального закладу «Херсонський державний аграрний університет» проводили у рамках науково-дослідних тем: «Розробити і впровадити у виробництво ресурсозберігаючі технології вирощування соняшнику спеціального призначення в умовах півдня України» (номер державної реєстрації 01044010372, 2003–2006 рр.), «Селекція і насінництво основних сільсько-господарських культур (озима, яра і дворучка пшениці, соняшник, кукурудза) для умов південного регіону України та впровадження створених сортів і гібридів у виробництво» (номер державної реєстрації 01064009483, 2006–2008 рр.), до виконання яких автор залучалася як виконавець окремих підрозділів.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було встановлення особливостей патогенезу фомопсису соняшнику на молекулярному, клітинному й тканинному рівнях та біолого-екологічних властивостей його збудника *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

- визначити фітосанітарний стан насінневого матеріалу соняшнику вітчизняної і закордонної селекції у південному регіоні України;
- проаналізувати шляхи поширення фомопсису у специфічних ґрунтово-кліматичних умовах району проведення досліджень;
- встановити особливості перебігу процесів патогенезу фомопсису в умовах культури *in vitro* та *in vivo*;
- визначити основні біологічно активні сполуки, що продукуються чистою культурою *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M.;
- здійснити аналіз фітотоксичності вторинних метаболітів міцелію *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. та визначити їх вплив на процеси обміну речовин;
- дослідити вплив фунгіцидів на ріст і розвиток міцелію в культурі *in vitro* з метою зменшення пестицидного навантаження;
- визначити зміни функціонального стану фотосинтетичного апарату рослин соняшнику за умов ураження *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M.

Об'єкт дослідження – патогенез фомопсису соняшнику, біолого-екологічні, токсикологічні, мутагенні та біохімічні властивості збудника хвороби *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M.

Предмет дослідження – розвиток, поширення та діагностика фомопсису соняшнику, токсичність патогену на молекулярному, клітинному й тканинному рівнях.

Методи дослідження: загальнонаукові (спостереження, аналіз, синтез, системний підхід); спеціальні (фітопатологічні, світлової та люмінесцентної мікроскопії, цитологічні, біотехнологічні, гістологічні, спектрофотометричні, біохімічні, термолюмінесцентні, хроматографічні); польові методи та бібліографічний пошук. Регресійний аналіз і підбір математичних моделей здійснено з використанням програми SigmaPlot 12.0. У процесі статистичної обробки результатів досліджень використано програми Statistica 6.0, 7.0.

Наукова новизна одержаних результатів. Основні положення дисертації, полягають у наступному:

вперше:

– в південному регіоні України проведено багаторічний аналіз ураження фомопсисом насіння сортів і гібридів соняшнику вітчизняної та сортозразків закордонної селекції. Виявлено на насінинах соняшнику строми з перитеціями та аскоспорами *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M., з'ясовано роль цих морфологічних структур у поширенні хвороби;

– в Україні досліджено вплив екологічних чинників на формування і життєздатність асків та аскоспор *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M.;

– ідентифіковано вторинні метаболіти міцелію *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M.: фомозин, фомопсоліди та цитоспори, що за низьких концентрацій здатні виявляти антиоксидантну активність та інтенсифікувати процеси поділу клітин тест-рослин *Allium cepa* L. Збільшення концентрації екзометаболітів гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. призводить до порушень мітотичного циклу поділу клітин і розподілу ДНК, змін морфометричних показників ядер та ядерець, тотальному або частковому диспергуванню хроматину клітин тест-рослин *Allium cepa* L.;

– розроблено експресний метод виявлення фомопсису у прихованій формі на основі змін фотоіндукції флуоресценції та кольору люмінесцентного зображення шляхом попереднього температурного впливу на листки соняшнику.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертації мають теоретичне і практичне значення для розуміння патологічного процесу хворих рослин соняшнику, біолого-екологічних особливостей гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. та шляхів обмеження його поширення в агроценозах.

Вивчення токсичності патогену та дослідження впливу на нього фунгіцидів у різних концентраціях дозволяє уточнити їх оптимальну дозу, що, у свою чергу, зменшить пестицидне навантаження на агроценози.

За впровадження безінвазійного експресного методу діагностики прихованої грибної інфекції на основі змін фотоіндукції флуоресценції та люмінесцентного зображення з'являється можливість своєчасно визначити патоген і з мінімальною кількістю фунгіцидів провести заходи боротьби з ними.

Одержані результати виступають фундаментальною і методологічною основою для подальших досліджень механізмів діагностики наявності прихованої інфекції у різних сільськогосподарських рослинах.

Наукові основи і результати дослідження використовуються для визначення прихованої форми фомопсису на полях Науково-виробничої фірми «Дріада» та в навчальному процесі Державного вищого навчального закладу «Херсонський державний аграрний університет».

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним дослідженням автора, виконаним протягом 2004–2008 рр. та 2011–2018 рр. Спільно з науковим керівником доктором біологічних наук, професором, академіком НААН М. М. Кириком розроблено науковий напрям досліджень, висунуто робочі гіпотези та обґрунтовано методологію експериментів.

Здобувачем особисто здійснено літературний пошук, збір фактичного матеріалу під час польових досліджень та його опрацювання в лабораторних умовах, апробовано методики, виконано запланований обсяг експериментальних

робіт, проведено статистичне опрацювання одержаних результатів та їх інтерпретацію, написано тексти публікацій. Наукові результати, що викладені в дисертації, отримано автором особисто та у співавторстві. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, здобувачу належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. У спільних публікаціях права співавторів не порушено.

Визначення показників цитотоксичної й мутагенної дії вторинних метаболітів *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. виконано в Інституті еволюційної екології НАН України спільно з кандидатом біологічних наук, старшим науковим співробітником А. Ф. Ліхановим. Ідентифікацію вторинних метаболітів фомопсису проведено у Центрі колективного використання обладнання НАН України спільно з доктором біологічних наук Р. В. Іванніковим. Розроблення експресного методу діагностики фомопсису виконано у лабораторії фізіології рослин та мікробіології Інституту садівництва НААН спільно з кандидатом біологічних наук, старшим науковим співробітником О. І. Китаєвим.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційних досліджень доповідалися на: Міжнародній науково-практичній конференції «Аграрна наука та освіта в умовах євроінтеграції» (м. Кам'янець-Подільський, 2018 р.); VII Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, 2019 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових праць, з яких 4 статті у наукових фахових виданнях України, 6 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 тези наукових доповідей.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація складається з анотацій, вступу, семи розділів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації викладено на 197 сторінках. Робота містить 44 рисунки та 16 таблиць. Список використаних джерел налічує 245 найменувань, у тому числі 127 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОСОБЛИВОСТІ ПОШИРЕННЯ ТА ПАТОГЕНЕЗ ФОМОПСИСУ НА РОСЛИНАХ *HELIANTHUS ANNUUS* L.

Наведено узагальнення результатів досліджень вітчизняних і закордонних науковців щодо поширення фомопсису соняшнику та його збудника *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. в Україні та світі. Визначено й проаналізовано біологічні властивості гриба, а саме: стадії розвитку останнього, особливості ураження хворобою у взаємозв'язку з фазами розвитку рослин соняшнику, вплив екологічних чинників на розмноження патогену. Особливу увагу приділено аналізу інфікування рослин та насіння, вивчено можливість поширення хвороби з насіннєвим матеріалом. Проаналізовано відомості зарубіжних дослідників щодо токсичної дії вторинних метаболітів закордонних штамів збудника фомопсису та первинних змін біохімічних процесів у рослин під впливом різних

видів інфекції (вірусні, бактеріальні та грибні патогени). Результати опрацьованих досліджень вітчизняних і закордонних авторів стали основою для поглибленого аналізу перебігу патогенезу на клітинному рівні, визначення токсичної дії окремих вторинних метаболітів збудника хвороби на зміни процесів поділу клітин.

ОБ'ЄКТИ, УМОВИ, ПРОГРАМА І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження виконано впродовж 2004–2008 рр. та 2011–2018 рр. на зрошуваних землях господарства Науково-виробничої фірми «Дріада» Генічеського району Херсонської області, а також на базі Херсонської обласної фітосанітарної лабораторії, проблемної науково-дослідної лабораторії мікології і фітопатології кафедри фітопатології імені академіка В. Ф. Пересипкіна Національного університету біоресурсів і природокористування України, кафедри землеробства Державного вищого навчального закладу «Херсонський державний аграрний університет», лабораторії фізіології рослин і мікробіології Інституту садівництва НААН, Інституту еволюційної екології НАН України та Центру колективного використання обладнання при Національному ботанічному саду імені М. М. Гришка НАН України.

Вплив основних абіотичних чинників на розвиток патогену з'ясовували протягом вегетаційних періодів 2011–2015 рр., порівнюючи отримані показники із середньо-багаторічними чинниками. Кліматичні показники відбирали у найближчій метеорологічній станції – «Асканія-Нова».

Спостереження за поширенням хвороби та ураженням рослин соняшнику фомопсисом у польових умовах вивчали протягом вегетаційного періоду (березень – жовтень). Утворення стром *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. на стеблах соняшнику визначали між четвертим і п'ятим листками на площі 10 см² у десятиразовій повторності.

Зараження насінневого матеріалу досліджували на сортах і гібридах соняшнику, що надходив на експертизу до Херсонської обласної фітосанітарної лабораторії із шести областей України, а також сортозразків закордонної селекції, що були імпортовані з 10 країн. Експертизу насінневого матеріалу з виявлення та ідентифікації некротрофних збудників проводили за загальноприйнятими методиками (Визначник грибів України, 1971; Методи мікологічної експертизи, 2003). Ізоляцію гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthy* М. у чисту культуру та його ідентифікацію здійснювали за загальноприйнятими методиками. Зокрема, відбирали стебла соняшнику із симптомами фомопсису, нарізали їх на фрагменти 5–10 мм, стерилізували в 96° спирті та вносили у чашки Петрі на поверхню картопляно-глюкозного середовища. Надалі підготовлений матеріал інкубували в термостаті за температури 23–25 °С протягом двох тижнів. Живильні середовища готували за загальноприйнятою методикою (Дудка и др., 1982; Бётхер и др., 1987).

У процесі вивчення біології *Diaporthe (Phomopsis) helianthy* Munt. – Svet. et al. відбирали проби уражених стебел рослин. Утворення стром *Diaporthe*

(*Phomopsis*) *helianthy* M. вивчали методом мікроскопіювання поздовжніх мікророзрізів через строми. Особливості будови перитеціїв з'ясовували під мікроскопом за $\times 200$.

Вихід асків із перитеціїв фіксували кожні 3 хв, підраховуючи вивільнені аски у 10 полях зору мікроскопа за $\times 400$.

Вплив компонентного складу живильного середовища на ріст і розвиток *Diaporthe* (*Phomopsis*) *helianthi* M. визначали у культурі гриба, яку вирощували на картопляно-глюкозному агарі, соняшниковому, вівсяному, морквяному, квасолевому, голодному агарах та середовищі Чапека.

Вплив температури на ріст і розвиток міцелію *Diaporthe* (*Phomopsis*) *helianthi* M. вивчали на чистих культурах 2-тижневого віку. Міцелій гриба інкубували в термостаті за температури 0 °С; +5; +10; +15; +20; +25; +30 та +35 °С.

Фітотоксичність культурального фільтрату фомопсису встановлювали методом біопроб (Дудка и др., 1982) із використанням як тест-культури зернівок пшениці *Triticum aestivum* L. Дослідження проводили у трьох варіантах концентрацій: без розведення стерильною водою, з розведенням 1:1, з розведенням 1:2 стерильною водою.

Для сумарного визначення фенольних сполук застосовували метод Фоліна-Чікольтеу (Singleton, Rossi, 1965). Концентрацію фенольних антиоксидантів у екстрактах виявляли спектрофотометрично за Бренд-Вільямсом із використанням вільного стабільного радикала 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (ДФПГ) (Brand-Williams, 1995). З метою з'ясування цитотоксичних і мутагенних властивостей вторинних метаболітів гриба застосовували метод твердофазної екстракції. Пропускання культуральної рідини через картридж із сорбентом C18 (Chromabond C18, 200 mg) дозволило збільшити концентрацію фенольних сполук у 2,5 раза.

Біологічну активність фільтрату *Phomopsis helianthi* M. визначали за його впливом на поділ клітин апікальної меристеми тест-рослини *Allium cepa* L. сорту «Штутгарт» (*Allium-test*). Цибулини *Allium cepa* пророщували у стерильній воді з додаванням фільтрату *Phomopsis helianthi* M. на 7 добу, 14, 17 і 21 добу культивування. Зміни морфометричних показників ядерного апарату клітин тест-рослин та аномалій у його будові в процесі їх поділу під впливом різних концентрацій фомопсису виявляли з використанням мікроскопа Nikon Eclipse E-200.

Фотодокументацію та обробку цифрових зображень виконували в спеціалізованій програмі Image-Pro Premier 9.0. Профілювання вторинних метаболітів здійснювали методом обернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії на хроматографічній системі Agilent 1100 із 4-канальним насосом, вакуумним дегазатором, автосамплером, термостатом колонок та діодно-матричним детектором.

Кількість і функціональний стан хлорофілу визначали спектрофотометричним методом за довжиною хвиль, за яких спектри поглинання хлорофілів *a* і *b* пересікаються (остання довжина хвилі).

Зміни фотосинтетичних процесів виявляли вимірюванням інтенсивності прямої флуоресценції хлорофілу з використанням портативного хронофлуометра «Флоратест», розробленого в Інституті кібернетики імені В. М. Глушкова НАН України (Китаєв та ін., 2005). Наявність захворювань встановлювали з використанням спеціального лабораторного приладу – мікроспектрофлуориметра СМФ-2р, створеного на базі люмінесцентного мікроскопа МЛ-4 за термолюмінесцентною методикою О. І. Китаєва із співавторами (2009).

З метою визначення наявності прихованої форми грибною хвороби методику, що застосовували, модифікували. Зокрема, листки соняшнику попередньо нагрівали до температури 60 °С й аналізували під люмінесцентним мікроскопом МЛ-4 з фотофіксацією змін кольору свічення. Наявність грибною хвороби та оцінку її впливу як стрес-чинника визначали порівнянням інформативних показників індукції флуоресценції хлорофілу дослідних рослин. Надалі патоген ідентифікували за загальноприйнятими методиками з використанням мікроскопів *Karl Zeiss* і *Primo Star Zeiss* та виведенням зображення на монітор комп'ютера (Кирай та ін., 1974).

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ВПЛИВ АБІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ НА РОЗВИТОК І ПОШИРЕННЯ ФОМОПСИСУ СОНЯШНИКУ В УМОВАХ ПІВДЕННОГО СТЕПУ УКРАЇНИ

У Миколаївській області ураження соняшнику фомопсисом було виявлено на 17 сортах та гібридах у 8 районах на площі 4064 га, з них в умовах зрошення – 2539 га. У Херсонській області площа вогнищ фомопсису при вирощуванні соняшнику на зрошенні становила 863,6 га, що у 2,8 раза більше, ніж у богарних умовах. Аналогічна тенденція у превалюванні ураження рослин соняшнику цією хворобою спостерігалася і в Запорізькій області. У Дніпропетровській області на площах, де було виявлено фомопсис, соняшник вирощували виключно в умовах зрошення. Таким чином, розвиток хвороби за умов зрошення методом дощування відбувався майже вдвічі інтенсивніше, ніж у богарних умовах (Лисенко, 2009). Поширення фомопсису на рослинах соняшнику однорічного у географічному аспекті спостерігалася у східному (Миколаївська → Херсонська області) та північно-східному (Херсонська → Запорізька → Дніпропетровська області) напрямках. Аналіз кліматичних чинників району дослідження свідчить, що влітку на вітровий режим впливають баричні формування й фронти, які переміщуються із заходу та півдня. Згідно з отриманими даними щодо біології розвитку гриба *D. helianthi* M., виліт аскоспор розпочинався, залежно від метеорологічних умов, на початку другої-третьої декади травня. У третій декаді червня відзначено масовий вихід аскоспор з перитеціїв. Цей період тривав і весь липень. На нашу думку, західні та південно-західні вітри, які переважають у літній період під час вильоту аскоспор, стали одним із первинних чинників поширення фомопсису на півдні України.

Аски, які вивільнилися з перитеціїв, мали овально-приплюснуту форму, однак, відрізнялися за ступенем свого розвитку (рис. 1). Частина асків була

життєздатною, мала оливковий колір, вони були виповнені, а аскоспори займали весь об'єм аски (рис. 1, а). Інші аски були нежиттєздатними (рис. 1, б). Деякі з них виявилися невиконаними і аскоспори становили тільки частину їх об'єму (рис. 1, в, г). Ретельний аналіз цих асків дозволив встановити, що спори в них розміщені полярно у верхній частині й відділені від іншої частини аски вигнутим меніском (рис. 1, д). Наявність вигнутого меніска може свідчити про зміни осмотичного тиску в середині аски, що пов'язано зі зниженням у них вмісту вологи. За результатами проведених досліджень встановлено, що за умов низької відносної вологості повітря у період масового виходу асків (34,2 %) частка життєздатних асків зменшувалася в 1,8 раза порівняно з травнем із середньою відносною вологістю повітря (64,5 %). У подальшому аскоспори збудника вивільнялися з асків, потрапляли на рослини соняшнику, де після їх проростання й проникнення міцелію в тканини уражених органів відбувався розвиток хвороби.

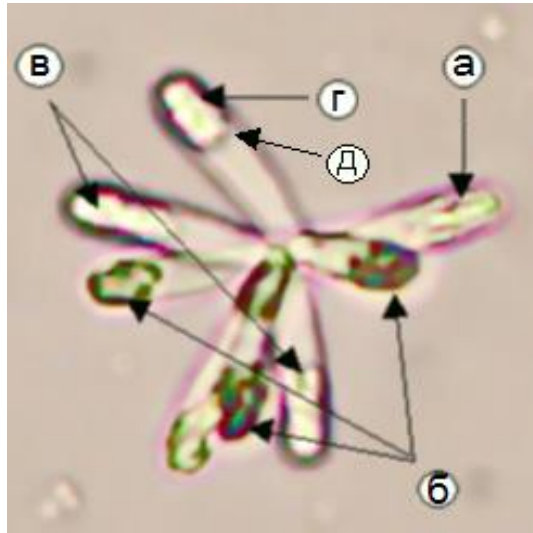


Рис. 1. Скупчення асків *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М.: а – життєздатна аска з аскоспорами; б – нежиттєздатні аски; в – аски зі спорами, що займають половину їх об'єму; г – аска зі спорами, що займають третину її об'єму; д – вигнутий меніск аски ($\times 400$)

Перші ознаки симптомів захворювання на рослинах соняшнику на полях НВФ «Дріада» були зафіксовані на початку другої декади липня через 8–10 діб після поливу. На стеблах між 4–7 парами листків формувалися темно-сірі плями. З часом некроз поширювався по довжині стебла від місця його первинного прояву. Розмір плям, спричинених патогеном, коливався від 2,5–3 до 12,7–14,0 см.

Пікніди на уражених фомопсисом стеблах соняшнику формувалися під епідермісом, були овальної, округлої або приплюснutoї форми з отвором. При цьому в одній пікніді можна було спостерігати формування як α -, так і β -спор, у деяких пікнідах утворювалися тільки β -спори (рис. 2).

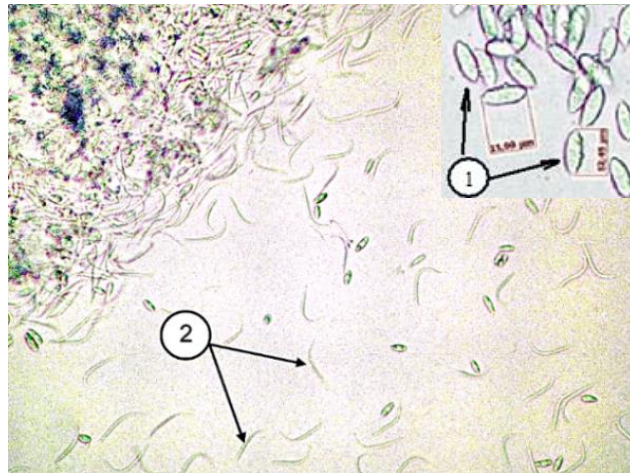


Рис. 2. Пікноспори *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М.: 1 – α -спори; 2 – β -спори ($\times 800$)

За формою α -спори були овальної форми, одноклітинні, без перетинок із невеликими краплинами жиру, розміром $12,15 \pm 0,2 \times 6,0 \pm 0,1$ мкм; β -спори – видовжені, злегка зігнуті, без крапельок жиру, розміром $25,20 \pm 0,65 \times 2,0 \pm 0,20$ мкм.

ОСОБЛИВОСТІ ПАТОГЕНЕЗУ ФОМОПСИСУ СОНЯШНИКУ ПРИ УРАЖЕННІ НАСІННЯ

Насінневий матеріал надходив на фітосанітарну експертизу до Херсонської обласної фітосанітарної лабораторії з ряду областей України та багатьох країн світу. Вперше на території України на насінні соняшнику було виявлено збудника фомопсису у зразках, що надійшли на експертизу в 1990 р. із Миколаївської, Херсонської (1991 р.), Запорізької (1994 р.) та Дніпропетровської (1998 р.) областей.

При цьому інтенсивність ураження насінневого матеріалу соняшнику фомопсисом з різних регіонів України значно відрізнялася (рис. 3).

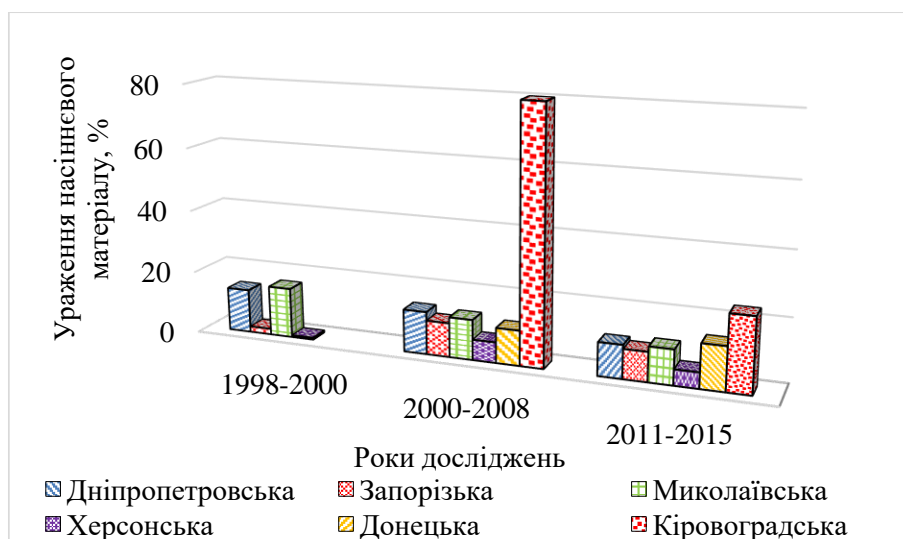


Рис. 3. Ураження фомопсисом насінневого матеріалу соняшнику, отриманого з різних регіонів України

Максимальна частка партій зараженого насіння зафіксована у 1998–2000 рр. з Миколаївської області – 15,9 %, на території якої вперше було зареєстровано цю хворобу. Значні рівні зараження фомопсисом соняшнику були виявлені щодо насінневого матеріалу, отриманого з Дніпропетровської області – 13,9 %. Мінімальна кількість зараженого насіння надійшла з господарств Херсонської (0,6 %) та Запорізької (1,83 %) областей.

У подальші роки досліджень ситуація з ураженням насінневого матеріалу в регіонах, з яких надходили зразки на експертизу, суттєво змінилася. Так, у 2000–2008 рр. встановлено значну частку інфікованого насіння соняшнику, отриманого з Кіровоградської області.

Серед партій імпортованого у 2002–2007 рр. насінневого матеріалу соняшнику особливу небезпеку становили зразки, отримані з Іспанії, де частка матеріалу, зараженого фомопсисом, досягала 78,8 % (рис. 4). Високі показники зараження фомопсисом виявилися у насіння, імпортованого з Росії та Туреччини (відповідно 33,3 та 12,8 %).

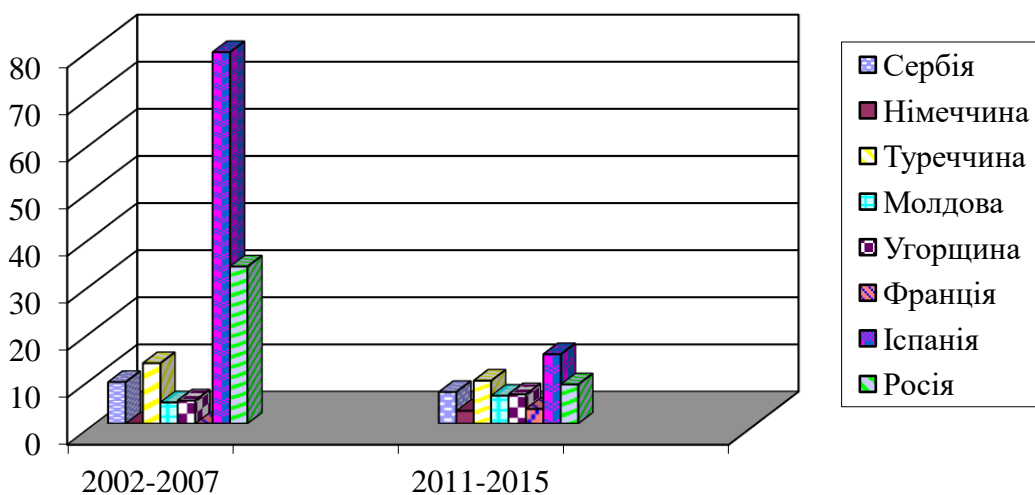


Рис. 4. Ураження фомопсисом насінневого матеріалу соняшнику закордонної селекції

У насінневому матеріалі, імпортованому протягом 2011–2015 рр., частка уражених фомопсисом зразків, отриманих з Іспанії, Росії та Туреччини була теж найбільшою, незважаючи на зниження порівняно з минулими роками (відповідно 14,7 %, 9,1 та 8,3 %). Водночас, із США та Італії протягом усіх років спостережень насіння надходило вільне від фомопсису.

У процесі експертизи насінневого матеріалу було встановлено, що ураження насінин фомопсисом розпочинається з появи пікнідальної стадії на насінневій шкірці та приквітнику. За ураження приквітника проростання насінин соняшнику у вологих камерах не відбувалося. Патоген, який на початку культивування знаходився на насінневій шкірці, був здатний поступово заражати корінці під час проростання насінини. Через 2–4 доби корінці темнішали, ставали зморшкуватими, а сім'ядольні листочки не розривали насінневу шкірку. У подальшому спостерігали суцільне ураження насінини фомопсисом та загибель корінця. Крім цього було встановлено, що насінневий

матеріал містить не тільки анаморфну (*Ph. helianthi* М.), а й телеоморфну (*Diaporthe helianthi* М.) стадію гриба (рис. 5).

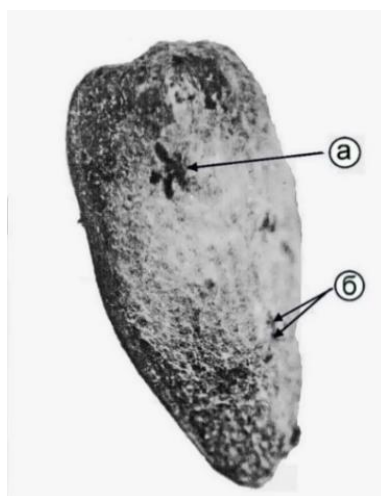


Рис. 5. Спорношення гриба *Diaporthe helianthi* М. на насінині соняшнику: а – верхівки перитеціїв *D. helianthi*; б – пікніди *Phomopsis helianthi* М. ($\times 70$)

Усе це вказує на наявність фомопсису у насінні не лише у прихованій формі, тобто існує можливість передачі захворювання з насіннєвим матеріалом до інших регіонів, де ця хвороба ще не була виявлена.

БІОЛОГО-ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РОЗВИТКУ *DIAPORTHE (PHOMOPSIS) HELIANTHI* М.

Виділення грибів у чисту культуру та спостереження за ними *in vitro* є першим етапом щодо подальших досліджень з вивчення характеру їх росту і розвитку, особливостей морфогенезу, встановлення екологічних аспектів.

Наявність чистих культур патогену уможливорює визначення біосинтетичної активності продуктів метаболізму, виявлення ступеня їх паразитизму й стійкості проти фунгіцидів, здійснення популяційних і порівняльних досліджень різних ізолятів. Живлення гриба впливає на зміни розмірів й інтенсивність зростання його вегетативного тіла, споруляцію та продукування вторинних метаболітів.

У проведених дослідженнях вегетативний ріст гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. визначено на різних живильних середовищах: картопляно-глюкозному агарі, соняшниковому агарі, вівсяному агарі, середовищі Чапека, морквяному агарі, квасолевому агарі, голодному агарі. Початок росту мікроміцета на наведених вище субстратах зафіксовано на другу добу культивування (рис. 6).

Найінтенсивніше збільшення площі колонії *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. встановлено на картопляно-глюкозному, вівсяному та соняшниковому агарах. Водночас, найінтенсивніший процес утворення пікнід гриба відбувався на морквяному агарі – $12,3 \pm 0,54$ шт./см². На голодному агарі формування цих морфологічних структур не виявлено.

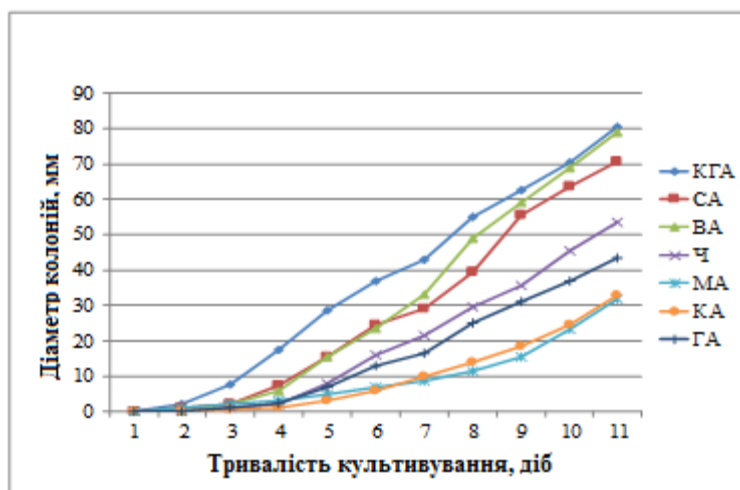


Рис. 6. Динаміка росту гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. на різних живильних середовищах: картопляно-глюкозному агарі (КГА), соняшковому агарі (СА), вівсяному агарі (ВА), середовищі Чапека (Ч), морквяному агарі (МА), квасолевому агарі (КА), голодному агарі (ГА)

Вирощування патогену на різних за складом живильних середовищах супроводжувалося змінами морфолого-культуральних ознак його міцелію. Картопляно-глюкозний агар забезпечував утворення щільної, повітряної, оливкової за кольором грибниці (рис. 7, а). На морквяному середовищі гриб формував добре розвинений, білий, щільний міцелій (рис. 7, б). На усіх інших досліджуваних субстратах останній мав біле забарвлення і характеризувався більшою щільністю.

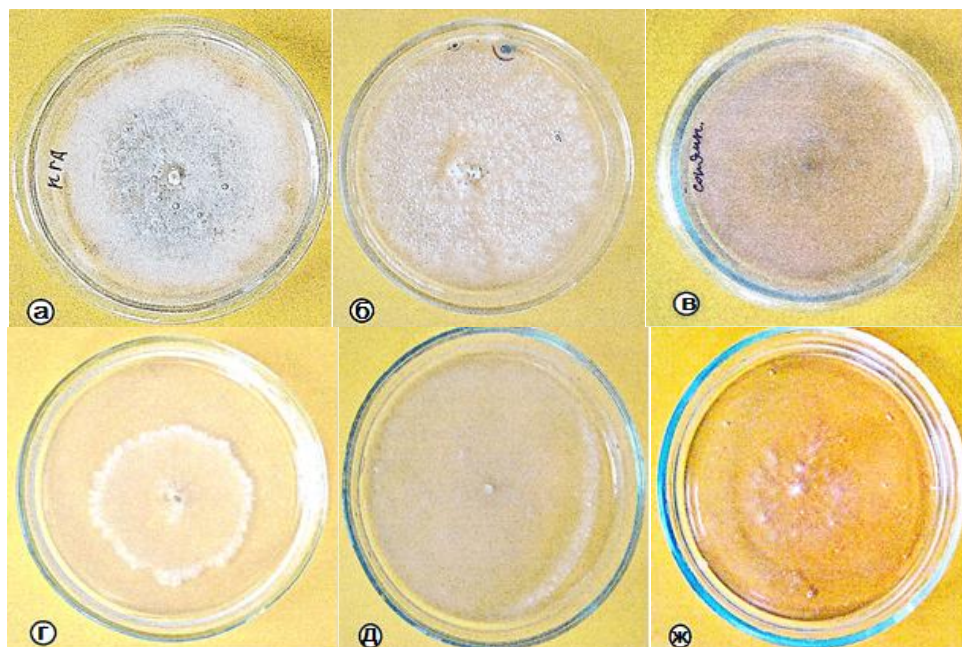


Рис. 7. Утворення міцелію *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. на різних живильних середовищах: а – картопляно-глюкозний агар; б – морквяний агар; в – соняшковий агар; г – вівсяний агар; д – квасолевий агар; ж – Чапека (15 діб культивування)

Варто зазначити, що пікніди гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. на морквяному агарі мали округлу й овальну форми та частково були занурені у субстрат.

Особливий вплив на ріст та розвиток гриба виявляють температурні умови, що мають сезонний і добовий характер коливань.

У проведених дослідженнях в умовах культури вегетативний ріст гриба відбувався у широкому температурному діапазоні – від +5 до +30 °С (рис. 8).

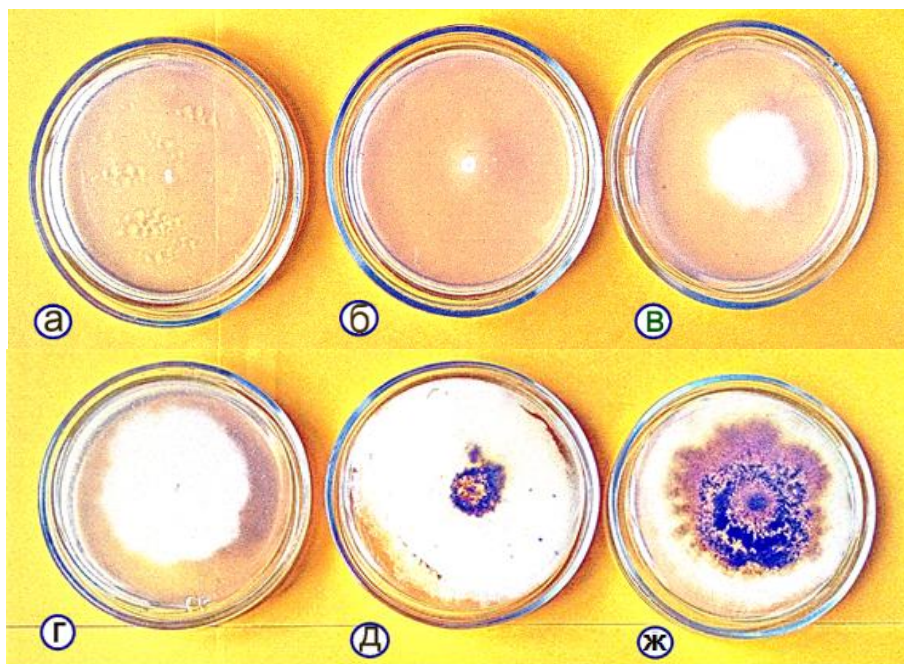


Рис. 8. Ріст гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. за умов дії різних температур: а – 5 °С; б – 10 °С; в – 15 °С; г – 20 °С; д – 25 °С; ж – 30 °С на 10 добу культивування

Найінтенсивніший ріст колоній гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. відзначено за температурних умов +25 та +30 °С.

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ УРАЖЕННЯ РОСЛИН СОНЯШНИКУ ГРИБОМ *DIAPORTHE (PHOMOPSIS) HELIANTHI* М.

Першим етапом розвитку патологічних процесів, викликаних *Phomopsis helianthi* на рослинах соняшнику, є виділення токсинів, що спричиняють пошкодження тканин і відіграють значну роль у патогенезі, а сприятливі для патогену умови зовнішнього середовища визначають успіх інвазії.

Під час аналізу токсичності гриба як тест-об'єкт було вибрано зернівки *Triticum aestivum* L. У дослідженнях використовували 7-добовий фільтрат фомопсису у різних концентраціях: із розведенням дистильованою водою 1:1, 1:2 та без розведення. За результатами досліджень встановлено, що найінтенсивніше розвивалися зернівки на контрольному варіанті дослідів: картопляно-глюкозному агарі (рис. 9, а).

У цьому варіанті дослідів через 6 діб проросло $78,3 \pm 2,4$ % зернівок (табл. 1).

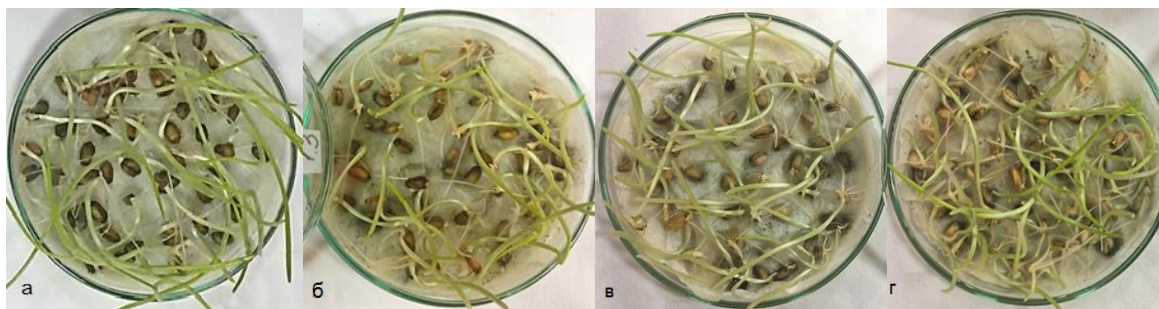


Рис. 9. Вплив культурального фільтрату фомопсису різної концентрації на пророщування зернівок пшениці: *a* – контроль (картопляно-глюкозний агар); *б* – фільтрат фомопсису без розведення; *в* – фільтрат фомопсису у розведенні 1:1; *г* – фільтрат фомопсису у розведенні 1:2. Тривалість культивування – 6 діб

Таблиця 1

Динаміка проростання зернівок пшениці за різних концентрацій культурального фільтрату *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M., %

Варіант досліду	Тривалість культивування, діб			$t_{0,05}$
	2	4	6	
Картопляно-глюкозний агар (контроль)	36,4±2,8	54,2±2,2	78,3±2,4	–
Культуральний фільтрат без розведення	28,6±1,5	50,4±1,8	63,5±1,5	3,2
Культуральний фільтрат у розведенні 1:1	31,7±2,2	52,3±3,1	71,6±2,3	2,4
Культуральний фільтрат у розведенні 1:2	35,6±2,0	55,0±2,5	76,1±2,4	1,6

Мінімальні результати пророщування зернівок тест-рослин пшениці отримані на фільтраті гриба без розведення дистильованою водою – 63,5±1,5 %, що на 14,8 % менше, ніж у контрольному варіанті досліду ($t_{0,05}=3,2$).

На фільтраті, розведеному дистильованою водою 1:1, частка пророслого насіння зростає до 71,6±2,3 % ($t_{0,05}=2,4$). Використання фільтрату у розведенні дистильованою водою 1:2 не виявило достовірної різниці із контрольним варіантом дослідів ($t_{0,05}=1,6$).

Аналіз отриманих результатів свідчить, що токсична дія фільтратів фомопсису змінюється залежно від їх концентрації у живильному середовищі.

Визначення ступеня токсичності культуральної рідини фомопсису може бути використано у біологічному методі вивчення його патогенних властивостей. Тому у подальших дослідженнях було проаналізовано особливості росту і розвитку зернівок пшениці на фільтратах *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. з різними термінами культивування: 7 діб, 14 та 17 діб.

У контрольному варіанті досліду середня довжина проростків становила 4,9±0,26 см (табл. 2).

Використання для пророщування 7-добових фільтратів *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. не виявило достовірних різниць у рості та розвитку проростків тест-культури порівняно з контрольним варіантом. Пророщування зернівок тест-рослини на фільтраті 14-добової чистої культури *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. призвело до зменшення розмірів проростків тест-культури порівняно з контролем у 2,6 раза. У разі використання фільтрату і *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. із 17-добовим терміном культивування

зафіксовано значну частку непророслих зернівок та ще більш суттєве сповільнення процесів росту і розвитку проростків тест-культури. Середня довжина проростків становила $1,4 \pm 0,06$ см, що у 3,5 раза менше, ніж у контрольному варіанті досліду.

Таблиця 2

Довжина проростків пшениці при пророщуванні зернівок пшениці у фільтраті гриба *D. (Phomopsis) helianthi* М. із різним терміном культивування, см

Варіант досліду	Термін культивування, діб		
	2	4	6
Картопляно-глюкозний агар	$0,6 \pm 0,07$	$3,3 \pm 0,11$	$4,9 \pm 0,26$
Фільтрат фомопсису (7 діб культивування)	$0,4 \pm 0,05$	$2,5 \pm 0,15$	$4,6 \pm 0,21$
Фільтрат фомопсису (14 діб культивування)	$0,3 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,06$	$1,9 \pm 0,08$
Фільтрат фомопсису (17 діб культивування)	$0,2 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,04$	$1,4 \pm 0,06$

Отримані результати дозволяють припустити, що на першому етапі взаємодії тест-рослин із збудником фомопсису соняшнику низькі концентрації токсичних речовин патогену не превалюють над вторинними метаболітами, які виконують захисні та антиоксидантні функції. Водночас, збільшення терміну культивування міцелію *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. призводить до накопичення мікотоксинів та вторинних метаболітів, які пригнічують ріст і розвиток тест-рослин грибом-патогеном.

Враховуючи, що *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. є фітопатогеном, за мету було поставлено з'ясувати, яким чином продукти його вторинного синтезу впливають на ядерний апарат рослинних клітин і, зокрема, на процеси їхнього поділу.

За допомогою спеціалізованої програми Image-Pro Premier 9.0 було встановлено, що у разі обробки корінців *Allium cepa* розведеним екстрактом фомопсису (1/200, концентрація фенольних сполук – 1,5 мкг/мл) у меристемі підвищувалася мітотична активність клітин (рис. 10, г). Пришвидшене утворення ядерців спостерігали вже на початку телофази. Прискорення процесів поділу клітин вказує на високу біологічну активність екзаметаболітів *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. та їхню здатність проникати у рослинні клітини, долаючи тканинні бар'єри. Однак, їхня стимулююча дія фіксувалася за умов доволі низьких концентрацій.

В умовах підвищення концентрацій фенольних сполук екстракту міцелію фомопсису у воді вдвічі (v/v – 1/100; 3,0 мкг/мл) при пророщуванні цибулин *Allium cepa* в клітинах апікальних меристем коренів відзначено збільшення діаметра ядер ($14,7 \pm 0,39$) порівняно з контрольними ($12,7 \pm 0,45$) рослинами на 16 %. Водночас, діаметр ядерців збільшувався на 32 %. Внаслідок нерівномірного зростання об'єму ядра та ядерців індекс співвідношення їх діаметрів зменшився від 2,41 у контролі до 2,07. Необхідно відмітити, що прискорене утворення ядерців спостерігалось вже на початку телофази. Реконструкція ядерця в дочірніх ядрах може свідчити про активну деспіралізацію хромосом, наявність залишків попередніх ядерців та активного

синтезу в дочірніх клітинах рибонуклеопротейдів. На це вказує й абсолютне збільшення розмірів ядерця у клітинах після обробки.

За такої концентрації екзометаболітів гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. в ядрах клітин порушувався розподіл ДНК, спостерігалось тотальне або часткове диспергування хроматинового матеріалу (рис. 10, в). В анафазах було помітно утворення мостів, формування пікнотичних ядер і мікроядер (рис. 10, б). Останні утворюються з хромосом або їх фрагментів внаслідок унеможливлення їхнього розходження до полюсів дочірніх ядер.

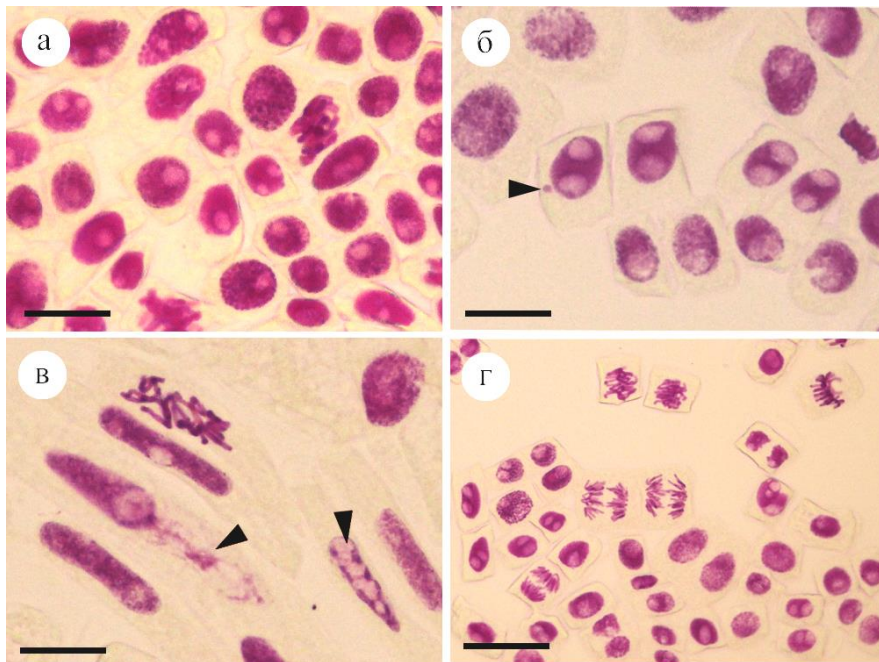


Рис. 10. Стан ядерного апарату в клітинах апікальної меристеми кореня *Allium cepa* за дії різних концентрацій культуральної рідини *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М.: а – контроль; б – утворення мікроядер (позначено стрілкою); в – деградація ДНК в ядрах за умов концентрації культуральної рідини *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М.: v/v – 1/100; г – підвищення мітотичної активності клітин під впливом вторинних метаболітів після ТФ екстракції (v/v – 1/200)

Подібні аномалії викликаються мітотичними отрутами, що призводять до К-мітозів. За спостереженнями, екстракт культуральної рідини з вмістом фенольних сполук 3,0 мкг/мл порушував (у окремих клітин) формування типової екваторіальної пластинки, внаслідок чого хромосоми хаотично розсіювалися по цитоплазмі. Враховуючи виникнення аномалій подібного типу, а також наявність порушень мітозів з утворенням мікроядер, можна стверджувати про наявність в культуральній рідині *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. мікотоксинів із високою біологічною активністю.

У зв'язку з цим, у подальших дослідженнях визначали біологічно-активні сполуки, що продукуються чистою культурою *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. За результатами обернено-фазової вискоефективної рідинної хроматографії ідентифіковано такі вторинні метаболіти: фомозин, фомосоліди та цитоспори (рис. 11).

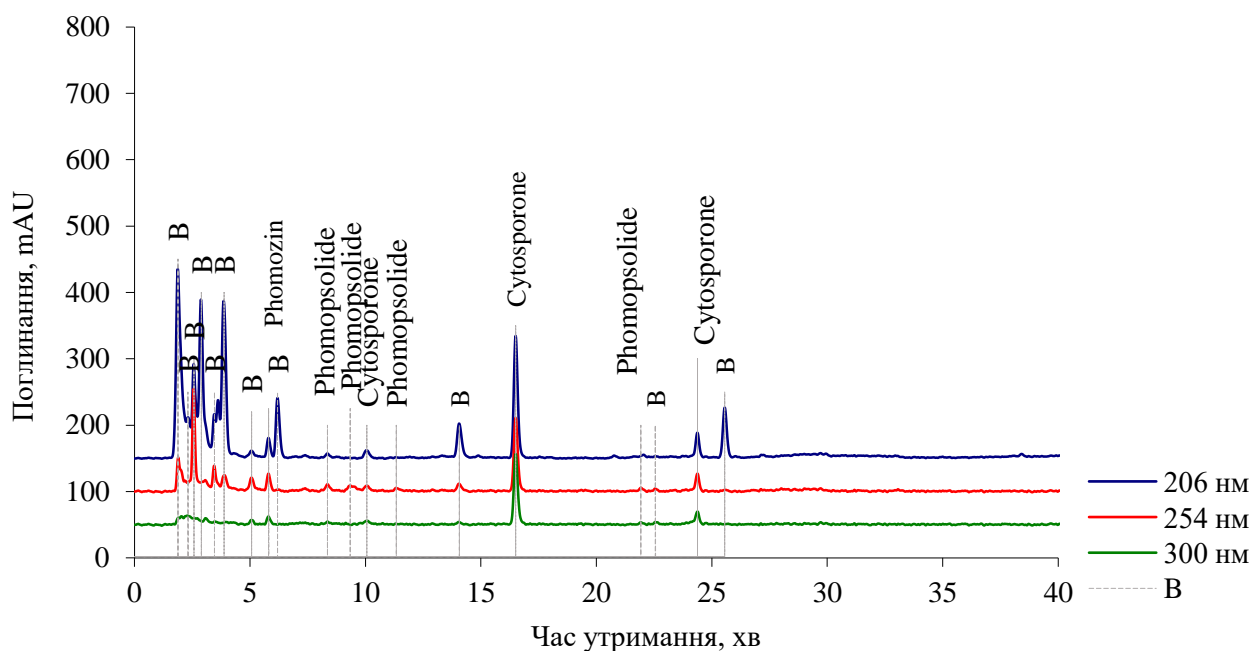


Рис. 11. Вміст окремих класів сполук у культурі *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М.: В – похідні бензолу, фенолу, тiazолу та ін.

Одним із продуктів фенольного синтезу гриба з фітотоксичними властивостями є фомозин ($C_{13}H_{16}O_7 \times H_2O$). Фомопсолідам притаманна загальнобіологічна пригнічувана та протипухлинна дія (Vasudeva, 2015).

Крім згаданих вище сполук ідентифіковано групу цитоспоронів, що відносяться до фенольних ліпідів. Вони є класом біоактивних сполук, що відзначаються фунгіцидною, алелопатичною, бактерицидною, протівірусною та цитотоксичною активністю.

З метою виявлення токсичної дії препаратів захисту рослин на культуру гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. у процесі досліджень використовували препарати Супрім ЕВ, Капітал та Піктор к. с.

Найбільш значимі результати одержали за застосування препарату Капітал, де вже при концентрації 0,01 мг/мл спостерігалось пригнічення розвитку міцелію гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. – $89,0 \pm 1,0$ % (рис. 12).

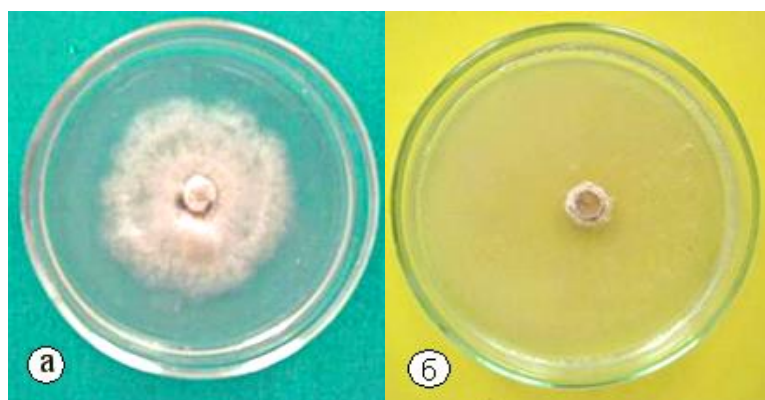


Рис. 12. Вплив фунгіцидів на пригнічування росту колоній *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М.: а – контроль; б – препарат Капітал (діюча речовина: азоксистробін, 150 г/л + ципроконазол, 60 г/л + епоксіконазол, 50 г/л)

За умов дії концентрації препарату 0,1 мкг/мл міцелій гриба не розвивався.

ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ФОТОСИНТЕТИЧНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН СОНЯШНИКУ ПІД ВПЛИВОМ ЗБУДНИКА ФОМОПСИСУ *DIAPORTHE (PHOMOPSIS) HELIANTHI M.*

Основні методи діагностики захворювань дозволяють визначати грибні патогени виключно після початку захворювання рослин, що не завжди сприяє здійсненню своєчасних заходів із їх захисту.

Ураження листків рослин соняшнику грибом *Diaporthe (Phomopsis) helianthii M.* починається із клітин паренхіми, які є надзвичайно чутливими до інфекції. Встановлено, що перші зміни у цих клітинах відбуваються в хлоропластах, що полягає у підвищенні їх щільності (Heller, Gierth, 2001). У подальшому було встановлено, що присутність бактеріальної або вірусної інфекції призводять до змін у перебігу фотосинтетичних процесів і їх можливо зафіксувати на ранніх стадіях захворювання (Корнеєв, 2002). Основним показником такого методу є крива індукції флуоресценції хлорофілу, яка показує залежність інтенсивності флуоресценції від часу після початку освітлення. Встановлено, що певні ділянки цієї кривої виступають індикаторами відповідних фізіологічних процесів у ланцюгу фотосинтезу.

Однак, даний метод повною мірою не адаптований для ранньої діагностики грибних захворювань сільськогосподарських культур.

Під час вивчення питання щодо фомопсису соняшнику підґрунтям слугувало вимірювання змін інтенсивності прямої флуоресценції хлорофілу. За допомогою портативного хронофлуорометра для експрес-діагностики фотосинтезу «Флоратест» досліджували взаємозв'язок між змінами параметрів індукції флуоресценції хлорофілу та наявністю грибних захворювань у рослин.

Початок відмінностей у рівнях флуоресценції між рослинами зафіксовано у першій декаді червня (рис. 12).

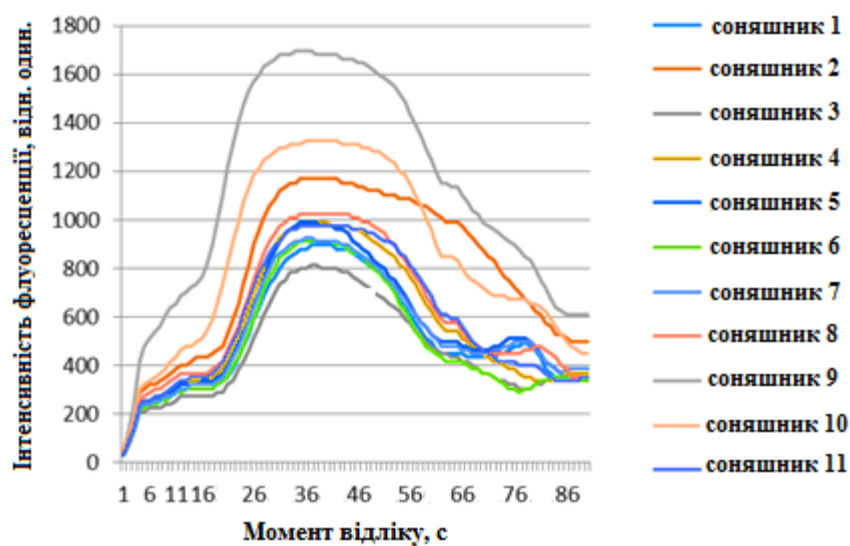


Рис. 12. Індукційні зміни флуоресценції хлорофілу листків рослин соняшнику

Насамперед, це стосується графіка кривих досліджуваних рослин, які позначені сірим (3), жовтим (4) та червоним (2) кольором. Для цих індукційних кривих зафіксовано збільшення F_0 на 46 %, які є ознакою відносного зростання кількості неактивних хлорофілів, що не передають енергію на реакційні центри фотосистеми 2 (FS 2).

На окремих ділянках цього зниження рівень флуоресценції хлорофілу виявився вдвічі вищим, що також може бути викликано впливом інфекції на швидкість перебігу темнових фотохімічних процесів.

Однак, у процесі експерименту виявлено, що усім досліджуваним рослинам притаманна наявність рівномірної за інтенсивністю емісії флуоресценції червоного кольору, що може свідчити про вплив паразитичних організмів різної природи (бактерії, віруси, гриби та ін.). З метою виявлення прихованої грибної інфекції листки рослин піддавали дії різних температур з одночасним спостереженням за змінами кольору флуоресценції. Емпіричним шляхом було встановлено, що за дії температури $+60\text{ }^\circ\text{C}$ під час дослідження методом люмінесцентного зображення на окремих зразках змінився колір флуоресценції, а саме було зафіксовано появу спалахів жовто-зеленої флуоресценції (рис. 13, а).

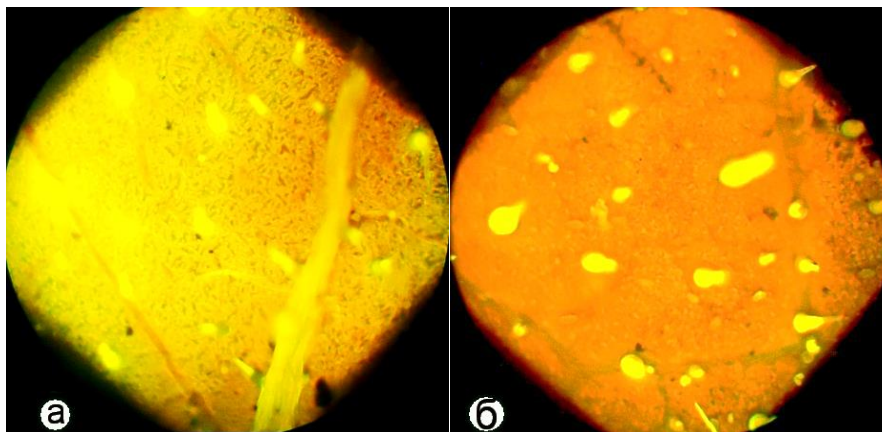


Рис. 13. Листки соняшнику однорічного за люмінесцентної мікроскопії: *а* – листок соняшнику з ранніми ознаками ураження грибними патогенами; *б* – без симптомів ураження ($T=60\text{ }^\circ\text{C}$)

Листки у рослин соняшнику з відсутніми ознаками хвороби після температурного впливу не змінили світло-червоний колір флуоресценції (див. рис. 13, б).

Зростання емісії флуоресценції, як відомо, є наслідком накопичення прихованих окиснених речовин. Жовта флуоресценція притаманна окисненим ліпідам, які утворюються в процесі росту грибів.

Використання індукованих температурою змін флуоресценції рослинних тканин у різних спектральних ділянках методами спектрального аналізу та люмінесцентного зображення дозволило виявити порушення клітинних структур, які були викликані патогенною мікобіотою на найбільш ранніх стадіях її розвитку.

У подальших польових дослідженнях проводили спостереження за станом відібраних рослин соняшнику. Через 12–18 діб було зафіксовано перші прояви грибної хвороби у тих рослин, листки яких раніше мали жовто-зелену флуоресценцію. Методом мікроскопіювання хвороба була ідентифікована як фомопсис.

Таким чином, за аналізом індукційних змін флуоресценції хлорофілу та люмінесцентного зображення після дії температури можливо діагностувати наявність грибної інфекції у дослідних зразках соняшнику однорічного *Helianthus annuus* L.

ВИСНОВКИ

Дисертацію присвячено дослідженню патогенезу фомопсису соняшнику на молекулярному, клітинному й тканинному рівнях *in vivo* та *in vitro*, а також біолого-екологічних аспектів збудника хвороби. На основі вивчення змін фізіолого-біохімічних показників уражених рослин *Helianthus annuus* L. удосконалено методику експрес-діагностики прихованих форм захворювання. На підставі проведених експериментальних досліджень установлено:

1. За багаторічним аналізом фітосанітарного стану насінневого матеріалу соняшнику фомопсисом інфіковано 8,7 % насінневого матеріалу сортів і гібридів вітчизняної селекції та 7,7 % партій іноземних сортозразків, імпортованих з 10 країн світу.

2. Перші симптоми хвороби на насінні виявляються при його проростанні у вигляді посвітління уражених тканин оболонки, появи пікнід на її поверхні. В окремих випадках зафіксовано формування стром *Diaporthe helianthi* з перитеціями та аскоспорами, що підтверджує можливість поширення телеоморфної стадії збудника хвороби з насінневим матеріалом. Особливу загрозу для агроценозів становить насінневий матеріал закордонної селекції, який може виявитися носієм відсутньої в районі проведення досліджень небезпечної аборигенної раси патогену.

3. Встановлено, що поширенню фомопсису сприяють абіотичні чинники (вітровий і температурний режими вегетаційного періоду та вологість повітря). Основним джерелом виникнення фомопсису соняшнику у польових умовах виступають аскоспори, які формуються в перитеціях. Поширення хвороби може відбуватися через перенесення аскоспор патогену вітром в умовах зростання середньодобової температури повітря до +15 – +20 °С та високої відносної вологості повітря (>80 %). Зниження цього показника внаслідок посухи у травні-червні (<30 %), яке припадає на період формування асків гриба, призводить до порушень у формуванні їх структури та зниження життєздатності асків й аскоспор.

4. Відзначено відмінності у формуванні та будові пікноспор *Phomopsis helianthi* М. У деяких пікнідах виявлено як α -, так і β -спори, в інших – тільки β -спори.

5. Встановлено, що оптимальна для росту міцелію *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. в культурі *in vitro* температура +25 °С. Нижньою межею, за якої

спостерігався ріст міцелію, стала температура +5 °С, верхньою – +30 °С; за температури 0 та +35 °С росту міцелію не виявлено. Таким чином, середні температури повітря у літні місяці (+20–23,8 °С) разом із зрошенням можуть сприяти розвитку гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. на рослинах соняшнику однорічного.

6. В умовах *in vitro* ріст і розвиток міцелію гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. залежить від компонентного складу живильного середовища. Найінтенсивніша динаміка росту колоній патогену відзначена на картопляно-глюкозному, утворення пікнід – на морквяному агарі. У зв'язку з цим біохімічні, популяційні та порівняльні дослідження найприйнятніше проводити на картопляно-глюкозному агарі, тоді як при вивченні морфолого-культуральних ознак міцелію гриба, у тому числі процесів споруляції, доцільно використовувати морквяний агар, на якому спостерігали найвищу інтенсивність формування пікнід.

7. Встановлено зміни токсичності фільтрату міцелію *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. залежно від терміну його культивування та концентрації у живильному середовищі. Інтенсивне пригнічення процесів формування коренів і проростків зернівок тест-об'єкта *Triticum aestivum* L. зафіксовано на 14-добовому фільтраті міцелію без зменшення його концентрації.

8. Визначено цитотоксичну й мутагенну дію фенольних сполук *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. стосовно поділу клітин. Максимальну концентрацію фенолів зафіксовано на 17 добу культивування гриба (0,41 мг/мл).

9. Встановлено, що антиоксидантна активність вторинних метаболітів *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. тісно корелює ($r=0,96$) із вмістом його фенольних сполук.

10. Досліджено токсичну дію різних концентрацій екстрагованих фенольних сполук міцелію *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. на цитогенетичні процеси. Встановлено, що при концентрації згаданих сполук 3 мкг/мл зафіксовано збільшення діаметра ядер ($14,7\pm 0,39$ мкм) та ядерець у клітинах апікальних меристем коренів тест-культури *Allium cepa* порівняно з контролем відповідно на 16,0 та 32 %. В ядрах клітин тест-культури порушувався синтез ДНК, спостерігалось тотальне або часткове диспергування хроматину, з'являлися пікнотичні ядра та мікроядра. Зниження концентрації екстракту фенольних сполук *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. вдвічі (1,5 мкг/мл) спонукало до підвищення мітотичної активності клітин меристеми, тобто прискорення утворення ядерець вже на початку телофази. Отримані результати свідчать про наявність у культуральній рідині *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. вторинних метаболітів із високою біологічною активністю.

11. Ідентифіковано основні класи вторинних метаболітів, які продукує міцелій *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М., а саме: фомозин, фомопсоліди та цитоспори. Співвідношення цих сполук за умов дії різних концентрацій екстрактів *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* М. здатне впливати на процеси розвитку хвороби.

12. Встановлено, що найвища ефективність щодо пригнічення росту гриба в умовах *in vitro* була у препарата Капітал.

13. Розроблено експрес-методику виявлення грибної інфекції у рослин соняшнику в прихованій формі на основі змін процесів їх фотосинтетичної діяльності шляхом модифікації методу фотоіндукції флуоресценції та люмінесцентного зображення.

Результати дослідження фотоіндукції флуоресценції та люмінесцентного зображення листків соняшнику доцільно використовувати для своєчасного виявлення фомопсису соняшнику у польових умовах.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Капустін О. І., Рафальська О. В., Колесніченко Є. В. (Сиводед Є. В.) Фітокарантинний стан соняшнику. *Захист рослин*. 2001. № 5. С. 26–28. (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

2. Капустин О. И., Колесниченко Е. В. (Сиводед Є. В.) Мониторинг фитосанитарного состояния подсолнечника и зерновых культур на юге Украины. *Информационный бюллетень Восточнопалеарктической региональной селекции Международной организации по биологической борьбе с вредными животными и растениями*. 2004. № 34. С. 219–224. (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

3. Лисенко Є. В. (Сиводед Є. В.) Фітокарантинний стан культури соняшнику вітчизняної та іноземної селекції у південному регіоні України. *Зрошувальне землеробство*. 2009. Вип. 51. С. 219–225.

4. Лисенко Є. В. (Сиводед Є. В.) Ефективність захисту соняшнику проти фомопсису на зрошуваних землях південного регіону України. *Зрошувальне землеробство*. 2010. Вип. 53. С. 168–173.

Статті у наукових фахових виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних:

5. Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф. Цитотоксична і мутагенна дія вторинних метаболітів *Phomopsis helianthi* M. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2018. № 6 (76). Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovid/article/view/12264/10640> (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

6. Сиводед Є. В., Кирик М. М., Китаєв О. І., Кривошопка В. А., Грисюк С. М., Пелехатий В. М. Експресний метод діагностики грибних захворювань соняшника (*Helianthus annuus* L.). Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2018. № 5 (75). Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovid/article/view/dopovid2018.05.006/10127> (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

7. Сиводед Є. В., Рафальська О. В. Варіабельність зараження збудниками *Phomopsis helianthi* і *Plasmopara halstedii* насінневого матеріалу соняшника однорічного вітчизняної та закордонної селекції. Біоресурси і природо-

користування. 2018. Т. 10. № 1–2. С. 24–28. (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

8. Сиводед Є. В., Кирик М. М., Колесніченко О. В., Мельник В. І. Особливості біології гриба *Phomopsis helianthi* М. та патогенезу фомопсису соняшника. Біоресурси і природокористування. 2018. Т. 10. № 3–4. С. 41–48. (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

9. Сиводед Є. В., Кирик М. М., Колесніченко О. В., Мельник В. І. Ріст і розвиток гриба *Phomopsis helianthi* М. на різних живильних середовищах. Біоресурси і природо-користування. 2018. Т. 10. № 5–6. С. 45–51. (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

10. Сиводед Є. В., Кирик М. М. Вплив температури на ріст та розвиток гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi*. Біоресурси і природокористування. 2019. Т. 11. № 1–2. (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

Тези наукових доповідей:

11. Сиводед Є. В. Зараження збудником *Phomopsis helianthi* М. насіннєвого матеріалу *Helianthus annuus* L. вітчизняної та закордонної селекції. Аграрна наука та освіта в умовах євроінтеграції: Міжнародна науково-практична конференція, м. Кам'янець-Подільський, 20–22 березня 2018 року: тези доповіді. Тернопіль, 2018. С. 138–139.

12. Сиводед Є. В., Кирик М. М. Ріст і розвиток гриба *Phomopsis helianthi* М. на різних живильних середовищах. Біотехнологія: звершення та надії: VII Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, м. Київ, 29–30 листопада 2018 року: тези доповіді. К., 2018. С. 62–64. (Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).

АНОТАЦІЯ

Сиводед Є. В. Особливості патогенезу фомопсису соняшника та біолого-екологічні аспекти збудника хвороби *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* Munt. – Svet. et al. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 06.01.11 «Фітопатологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2019.

Дисертацію присвячено дослідженню патогенезу фомопсису соняшнику на молекулярному, клітинному й тканинному рівнях *in vivo* та *in vitro*. Досліджено вплив абіотичних чинників на розвиток хвороби та поширення її збудника у південному регіоні України. Зафіксовано морфологічні зміни у будові органів розмноження збудника хвороби під впливом кліматичних чинників. Експериментально підтверджено цитотоксичну й мутагенну дію фенольних

сполук *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M., що мають виражену токсичність відносно процесів поділу клітин. Досліджено особливості впливу продуктів вторинного синтезу на ядерний апарат рослинних клітин та процеси їхнього поділу. Встановлено, що патологічний процес у інфікованих рослин залежить від концентрації токсичних речовин патогену.

Визначено, що фенольні сполуки вторинних метаболітів фомопсису за низьких концентрацій здатні виявляти антиоксидантну активність та інтенсифікувати процеси поділу клітин. Зростання концентрацій екзометаболітів гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. призводять до порушень розподілу ДНК, тотальному або частковому диспергуванню хроматину та порушень мітотичного циклу клітин тест-рослин *Allium cepa* L. Визначено, що значну роль у розвитку цих процесів відіграють вторинні метаболіти: фомозин, фомопсоліди та цитоспори. Досліджено ефективність пригнічувальної дії фунгіцидів на ріст гриба в умовах *in vitro*. На основі вивчення змін фізіолого-біохімічних показників у процесі ураження *Helianthus annuus* L. збудником хвороби удосконалено методику експрес-діагностики прихованих форм захворювання на основі змін індукції флуоресценції хлорофілу.

Ключові слова: соняшник однорічний, *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M., патогенез, абіотичні чинники, міцелій, вторинні метаболіти, токсичність, індукція флуоресценції хлорофілу, діагностика захворювання.

АННОТАЦІЯ

Сиводед Е. В. Особенности патогенеза фомопсиса подсолнечника и биолого-экологические аспекты возбудителя болезни *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* Munt. – Svet. et al. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.01.11 «Фитопатология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2019.

Диссертация посвящена исследованию патогенеза фомопсиса подсолнечника на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях *in vivo* и *in vitro*. Исследовано влияние абиотических факторов на развитие болезни и распространение ее возбудителя в южном регионе Украины. Зафиксированы морфологические изменения в строении органов размножения возбудителя болезни под влиянием климатических факторов.

На семенах подсолнечника выявлено стромы *Diaporthe helianthi* с перитециями и аскоспорами, что подтверждает возможность распространения телеоморфной стадии возбудителя болезни с семенным материалом.

Наиболее интенсивная динамика роста колоний патогена обнаружена на картофельно-глюкозном, а образование пикнид – на морковном агаре. В связи с этим биохимические, популяционные и сравнительные исследования лучше осуществлять на картофельно-глюкозном агаре, а при изучении морфолого-культуральных признаков мицелия гриба, целесообразно использовать морковный агар, на котором зафиксирована максимальная интенсивность формирования пикнид.

Экспериментально подтверждено цитотоксическое и мутагенное действия фенольных соединений *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M., обладающих выраженной токсичностью по отношению к процессам деления клеток. Установлено, что патологический процесс у инфицированных растений зависит от концентрации токсичных веществ патогена.

Определено, что фенольные соединения вторичных метаболитов фомопсиса при низких концентрациях способны проявлять антиоксидантную активность и интенсифицировать процессы деления клеток. Исследованы особенности влияния продуктов вторичного синтеза на ядерный аппарат растительных клеток и процессы их деления. Рост концентраций экзометаболитов гриба *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. приводят к нарушениям распределения ДНК, тотальному или частичному диспергированию хроматина и нарушениям митотического цикла клеток тест-растений *Allium cepa* L. Установлено, что значительную роль в развитии этих процессов играют вторичные метаболиты: фомозин, фомопсолиды и цитоспороны.

Исследована эффективность угнетающего действия фунгицидов на рост гриба в условиях *in vitro*.

На основе изучения изменений физиолого-биохимических показателей в процессе поражения *Helianthus annuus* L. возбудителем болезни усовершенствована методика экспресс-диагностики скрытых форм заболевания на основе изменений индукции флуоресценции хлорофилла.

Ключевые слова: подсолнечник однолетний, *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M., патогенез, абиотические факторы, мицелий, вторичные метаболиты, токсичность, индукция флуоресценции хлорофилла, диагностика заболевания.

ANNOTATION

Syvoded Ye. V. Features of the Pathogenesis of Sunflower Phomopsis and Biology-Ecological Aspects of the Pathogen *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* Munt. – Cvet. et al. – The Manuscript.

Thesis for a candidate of biological sciences degree in the specialty 06.01.11 «Phytopathology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

The thesis is devoted to the study of the sunflower phomopsis pathogenesis at the molecular, cellular and tissue levels *in vivo* and *in vitro*. The influence of abiotic factors on the disease development and spread of its pathogen in the southern region of Ukraine has been studied. Morphological changes in the structure of the pathogen reproductive organs caused by climatic factors were recorded. The cytotoxic and mutagenic actions of phenolic compounds *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. with toxicity to cell division process have been experimentally confirmed. The features of the effect of secondary synthesis products on nuclear apparatus of plant cells and the processes of their separation have been investigated. It has been established that pathological process in infected plants depends on the concentration of toxic pathogen substances.

It was determined that phenolic compounds of the secondary metabolites of fomopsis at low concentrations are able to identify antioxidant activity and intensify cell division processes. An increase in the concentrations of *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M. exometabolites of the fungus leads to impaired DNA distribution, total or partial dispersion of chromatin and impaired mitotic cycle of *Allium cepa* L. test plants.

It is determined that development of these processes are affected by secondary metabolites: fomozine, fomopsolidides and cytosporons.

Investigated the effectiveness of the inhibitory effect of fungicides on the growth of the fungus *in vitro*.

Based on the study of changes in physiological and biochemical parameters in the process of *Helianthus annuus* L. lesions by the pathogen, an improved method for the rapid diagnosis of latent forms of the disease based on changes in the induction of chlorophyll fluorescence.

Key words: sunflower, *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* M., pathogenesis, abiotic factors, mycelium, secondary metabolites, toxicity, fluorescence induction of chlorophyll, diagnosis of the disease.