

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

**Завідувач кафедри фітопатології
імені академіка В.Ф. Пересипкіна
_____ Гентош Д.Т.**

« ____ » _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА РОБОТА

на тему «Оцінка ефективності методів діагностики бактеріозів плодових культур (на прикладі насаджень груші)»

Спеціальність 202 «Захист і карантин рослин»
(код і назва)

Гарант освітньої програми
професор кафедри фітопатології
ім. В.Ф. Пересипкіна, доктор
сільськогосподарських наук,
професор

_____ Мирослав ПІКОВСЬКИЙ
(підпис)

Керівник бакалаврської роботи
доктор сільськогосподарських наук,
професор, академік НААН

_____ Микола ПАТИКА
(підпис)

Виконав

_____ Олександр МАЗУР
(підпис)

КИЇВ-2025

**Національний університет біоресурсів
і природокористування України**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології
Кафедра фітопатології імені академіка В.Ф. Пересипкіна
Освітній ступінь «Бакалавр»
Спеціальність 202 «Захист і карантин рослин»
Освітня програма «Захист і карантин рослин»

ЗАТВЕРДЖУЮ

**Завідувач кафедри фітопатології
імені академіка В.Ф. Пересипкіна**
кандидат сільськогосподарських наук

Гентош Д.Т.

“ ___ ” _____ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ
НА ВИПУСКНУ
БАКАЛАВРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Мазуру Олександрю Олеговичу**

1. Тема роботи «Оцінка ефективності методів діагностики бактеріозів плодових культур (на прикладі насаджень груші)»

Керівник бакалаврської роботи **Патика Микола Володимирович**,
затверджена наказом ректора НУБіП України від 14.11.2024р. №2040 «С»

Строк подання студентом завершеної роботи до 09.06.2025р.

2. Вихідні дані до бакалаврської роботи літературні джерела за актуальною проблематикою досліджень, власні експериментальні дані, одержані в результаті виконання роботи

3. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

- Систематизувати діагностичні методи досліджень бактеріальних збудників хвороб плодових культур та провести обстеження агроценозу груші щодо зараження бактеріозами.

- Визначити особливості розвитку фітопатогенних бактерій, які впливають на стан зерняткових культур та провести лабораторну діагностику патогенів у рослинному матеріалі (на прикладі рослин груші *Pyrus communis* L.).

• Оцінити діагностичні методи виявлення бактеріозів плодових культур, базуючись на процедурах валідації методів діагностики, гармонізації протоколів.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів випускної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Інформаційний пошук за темою досліджень (аналіз літературних джерел з публікацій вітчизняних та закордонних авторів-вчених, інших інтернет-ресурсів).	Вересень 2024 р. – червень 2025 р.	
2.	Вибір методик дослідження, розроблення плану проведення досліджень відповідно до визначених завдань. Постановка експериментів з оцінки ефективності діагностичних методів досліджень бактеріозів груші. Обробка та інтерпретація результатів.	Вересень 2024 р. – травень 2025 р.	
3.	Аналіз одержаних даних, підготовка розділів роботи та оформлення висновків за кожним етапом.	Травень-червень 2025 р.	

4. Дата видачі завдання «01» _____ 07 _____ 2024 р.

Студент _____
(підпис)

Мазур О.О.
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Патика М.В.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Бакалаврська робота як кваліфікаційне дослідження на тему «Оцінка ефективності методів діагностики бактеріозів плодових культур (на прикладі насаджень груші» виконана в обсязі 62 сторінок друкованого тексту формату А4, ілюстрована 6 таблицями та 11 рисунками. Список використаних джерел нараховує 51 найменування. Робота складається з наступних розділів:

1. Розділ 1. Огляд літератури.
2. Розділ 2. Матеріали та методи досліджень.
3. Розділ 3. Результати досліджень та їх обговорення.
4. Загальні висновки.
5. Список використаних джерел.

Дослідження проведено на базі кафедри фітопатології імені академіка В.Ф. Пересипкіна Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України).

Мета роботи – виявлення та діагностичне тестування бактеріозів в насадженнях зерняткових плодових культур, зокрема на дослідних майданчиках груші (*Pyrus communis* L.), та вивчення розвитку фітопатогенних бактерій, які впливають на стан рослин.

Об'єкт досліджень – розвиток фітопатогенних бактерій на рослинах груші, ефективність діагностики бактеріозів.

Предмет досліджень – виявлення сезонних бактеріальних хвороб, диференційна діагностика фітопатогенних бактерій.

Завдання досліджень:

1. Систематизувати діагностичні методи досліджень бактеріальних збудників хвороб плодових культур та провести обстеження агроценозу груші (*Pyrus communis* L.), щодо зараження бактеріозами.

2. Визначити особливості розвитку фітопатогенних бактерій, які впливають на стан зерняткових культур та провести лабораторну діагностику патогенів у рослинному матеріалі (на прикладі рослин груші *Pyrus communis* L.).

3. Оцінити діагностичні методи виявлення бактеріозів плодових культур, базуючись на процедурах валідації методів діагностики, гармонізації протоколів.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1. Фітопатогенні бактерії у патології плодових культур	12
1.2. Методи виявлення та ідентифікації бактеріозу плодових культур	19
1.3. Контроль бактеріозів плодових насаджень	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	28
2.1. Об'єкт, предмет та умови проведення досліджень.....	31
2.2. Методи проведення досліджень.	34
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	42
3.1. Обстеження агроценозу груші (<i>Pyrus communis</i> L.) на наявність ознак прояву бактеріозів	42
3.2. Лабораторна діагностика ізолятів фітопатогенних бактерій, виділених з рослинних зразків <i>Pyrus communis</i> L.....	46
3.3. Оцінка діагностичних методів виявлення бактеріозів плодових культур	51
ВИСНОВКИ	55
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	57

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

мл. – мілілітр

% – відсоток

млрд. – мільярд

P. syringae – *Pseudomonas syringae*

E. amylovora – *Erwinia amylovora*

м – метр

г – грам

API 20 E – комерційна тест-система для ідентифікації фітопатогенних бактерій

PB – фосфатний буфер

PBS - фосфатно-сольовий буфер

кл./мл – клітин на один мілілітр

МПА – м'ясо-пептонний агар

КА – картопляний агар

LB – поживне середовище Luria Bertani Broth, Miller.

ВСТУП

Сьогодні стрімко розвиваються технології органічного виробництва сільськогосподарської продукції на основі відмови від використання пестицидів та агрохімікатів або їх раціонального обмеження. Ємність світового ринку екологічно безпечної продукції перевищила 30 млрд. доларів США, зокрема в країнах ЄС – 17 млрд. доларів США та має тенденцію до збільшення.

У продовольчому забезпеченні населення важлива роль відводиться плодам, як високовітамінним продуктам харчування з лікувально-профілактичними властивостями. Головними тенденціями на світовому ринку плодової продукції є збільшення обсягів її виробництва та реалізації, доступність протягом року, розвиток логістики та післязбиральної доробки, але водночас значне підвищення вартості ручної праці та собівартості плодів, у тому числі зерняткових. Впровадження технологій органічного виробництва в нашій країні надзвичайно актуально. Пріоритетним є вирощування плодових культур на основі екологічно збалансованого агровиробництва [1–3], де передбачається застосування природних, біологічних і відновлюваних ресурсів, а також відтворення родючості ґрунту переважно завдяки реутилізації органічних залишків, сівозмінному чиннику та обробітку ґрунту. Боротьба з паразитами, збудниками хвороб і бур'янами здійснюється здебільшого через застосування механічного обробітку ґрунту та біологічних засобів. До сучасного переліку біологічних препаратів належать біостимулятори, серед яких мікробні, амінокислотні, гумати і фульвові кислоти, фітогормони та інше. Ці продукти та метаболіти зазвичай здатні підвищити ефективність використання поживних речовин рослиною та її стійкість до біотичних і абіотичних стресів [4].

Впродовж останніх років відбувається розвиток садівничої галузі та збільшення площ насаджень плодових культур інтенсивного типу в різних регіонах України. Для підтримання стабільної урожайності та одержання високоякісної товарної продукції велике значення має ефективний і своєчасний захист садів від шкідливих організмів, у тому числі збудників бактеріальних

захворювань, основними з яких є збудник бактеріального опіку плодових (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.) та збудник бактеріального раку (некрозу) кори (*Pseudomonas syringae* van Hall).

Враховуючи широкий спектр сприйнятливих до бактеріозів рослин, можливість перенесення патогенів з посадковим матеріалом, а також те, що кліматичні умови областей України сприятливі для розвитку цих хвороб, потрібен постійний моніторинг присутності збудників в агроценозах.

В Україні вирощуються майже всі плодові та ягідні культури помірного клімату, але в структурі садів і ягідників найбільшу питому вагу займають зерняткові – 130,7 тис. га, або 58%, з них яблуня – 88,1 та груша – 10,9, айва – 0,5%. В останні роки в Україні як і в інших державах спостерігається тенденція до збільшення виробництва плодів зерняткових культур на основі застосування сучасних технологічних досягнень. Проте найбільш важливими проблемами функціонування вітчизняного садівництва залишаються зношеність матеріально-технічної бази, дефіцит інвестиційних ресурсів тощо.

До зерняткових порід плодових культур, що в переважній більшості вирощуються в Україні, відносять яблуню, грушу, айву плодову. Яблуня посідає перше місце серед плодових культур в Україні і займає близько 65% їх площі, у тому числі близько 92% серед зерняткових порід. На другому місці за площею закладених садів зерняткових порід стоїть груша, а потім айва [5, 6].

Груша (*Pyrus communis* L.) вимоглива культура до умов вирощування. Росте на багатьох різновидах ґрунтів, але найкраще плодоносить і дає високоякісні плоди на родючих, дренажних ґрунтах легкого гранулометричного складу, що добре прогриваються. Крім того, культура груші відноситься до світло- та теплолюбних культур, що в значній мірі обумовлює ареал її поширення. За господарсько-біологічними ознаками найбільш цінними сортами груші вважаються потенційно скороплідні, урожайні, з високими смаковими та товарними якостями, без періодичного плодоношення, схильні до слаборослості, стійкі проти хвороб, шкідників та абіотичних умов. Проте значна кількість сортів не відповідає повному комплексу цих ознак. На сьогодні зниження пестицидного навантаження на садовий агроценоз, в якому за період

вегетації проводять, залежно від району, 6–18-ти разові обробки інсектофунгіцидами, може бути реалізовано за наявності сортів і гібридів з підвищеною стійкістю до шкідників та хвороб.

Серед численних хвороб сільськогосподарських рослин, що спричиняються збудниками різної природи, бактеріальні інфекції є найбільш проблемним фактором зниження продуктивності культур, товарності та якості продукції. Таким чином, актуальність питання розповсюдженості фітопатогенних бактерій у навколишньому середовищі та використання сучасних діагностичних методів досліджень бактеріозів плодових полягає як у його фундаментальності, так і в практичному значенні.

Для досягнення поставленої мети передбачалось вирішення наступних завдань:

- систематизувати діагностичні методи досліджень бактеріальних збудників хвороб плодових культур та провести обстеження агроценозу груші (*Pyrus communis* L.), щодо зараження бактеріозами;
- визначити особливості розвитку фітопатогенних бактерій, які впливають на стан зерняткових культур та провести лабораторну діагностику патогенів у рослинному матеріалі (на прикладі рослин груші *Pyrus communis* L.);
- оцінити діагностичні методи виявлення бактеріозів плодових культур, базуючись на процедурах валідації методів діагностики, гармонізації протоколів.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Фітопатогенні бактерії у патології плодових культур

Важливе значення для характеристики основних шкідливих організмів у садових агроценозах має інтегрована система заходів, а також інформація щодо обмеження їх поширеності та шкідливості. На сьогодні відомо шість основних складових інтегрованого захисту рослин [7 – 9]:

- моніторинг – регулярне спостереження за шкідливими організмами з метою визначення рівнів пошкодження шкідниками, ураження хворобами чи засміченості бур'янами;
- облік – систематичне ведення та зберігання записів, що має важливе значення для встановлення тенденцій і моделей спалахів чисельності шкідників, бур'янів чи розвитку хвороб. Інформація, отримана при кожному огляді, повинна включати дані щодо ідентифікації шкідливих організмів, їхньої щільності популяції, чисельності, поширеності, розвитку, розподілу, рекомендації щодо профілактики у майбутньому, а також повну інформацію про прийняті заходи щодо захисту;
- визначення рівня пошкодження чи ураження чи засмічення. Практично неможливо повністю позбутися шкідливих організмів, тому треба визначити рівні їх чисельності, які вимагають застосування захисних дій для виправлення становища виходячи з необхідності захисту людського здоров'я, економічних або естетичних міркувань;
- профілактика. Вже застосовані технології та розроблювані нові заходи повинні включати в себе профілактичні заходи, оскільки саме профілактика є основним засобом боротьби з шкідливими організмами в програмі інтегрованого захисту рослин;
- прийняття тактичного рішення. При використанні підходу інтегрованого захисту рослин хімічні речовини повинні використовуватися лише в крайньому випадку, а при їх використанні треба вибирати речовини з мінімальною

токсичністю з метою мінімізувати вплив на людину і всі нецільові біологічні об'єкти;

– оцінювання. Програма регулярного оцінювання має важливе значення для визначення успішності стратегій боротьби з шкідливими організмами.

Використання у господарстві всіх зазначених елементів інтегрованого захисту рослин дає можливість забезпечити належну продуктивність і одночасно усунути або різко скоротити використання пестицидів і звести до мінімуму токсичний вплив будь-яких речовин, які використовуються, тобто значно зменшити шкоду довкіллю і здоров'ю людей.

Поширення збудників бактеріальних хвороб зерняткових культур істотно збільшилися. Це пов'язують, насамперед, з активізацією торгових взаємин, зміною кліматичних умов, активним розселенням фітопатогенів-переносників, а також змінами у географії їх поширення.

На сьогодні моніторинг поширення збудників хвороб і фітосанітарний контроль насаджень вкрай необхідні для оптимізації всіх ланок інтегрованого захисту рослин, що дасть змогу забезпечити стійке виробництво якісного врожаю рослин.

За оцінками вчених фітопатогенні бактерії наносять значних економічних збитків сільському господарству. Збудники хвороб постійно супроводжують як культурні, так і дикі види рослин, уражують насіння і всі органи рослин протягом вегетації. Вони порушують нормальний перебіг фізіологічних процесів у рослинах, викликають некрози і в'янення рослин, гнилі плодів, що призводить до часткової або повної загибелі рослин. В уражених фітопатогенними бактеріями рослинах зменшується кількість плодів і ягід, погіршується якість продукції та падає урожайність. Часто спостерігається недозрівання урожаю [10].

Аналіз збудників бактеріальних хвороб рослин свідчить, що на одному виді рослин можуть паразитувати, в основному, від двох до тринадцяти видів фітопатогенних бактерій. В залежності від умов навколишнього середовища, сорту рослин, системи землеробства, внесення пестицидів, а далі відбувається перерозподіл і домінування збудників бактеріозів.

Головним збудником хвороб плодових є бактерії роду *Pseudomonas*. Особлива увага приділяється дослідженням поширення, симптоматики та шкідливості бактеріального опіку плодових (збудник *Erwinia amylovora*), а також опису переносників хвороби і умов ураження та розвитку патологічного процесу [11].

Складність проблеми поширення бактеріальних хвороб в Україні полягає не лише в обмеженості засобів, які дають змогу ефективно контролювати фітопатогенні бактерії, а й у недостатній теоретичній та практичній підготовці спеціалістів рослинництва України у питаннях діагностування та контролю фітопатогенних бактерій. Більшість відкритих на сьогодні бактеріальних хвороб рослин спочатку відносили до абіотичних факторів, грибних, вірусних захворювань, і тільки згодом встановлювали дійсного збудника захворювань – бактерії [12, 13].

Згідно з даними Європейської та Середземноморської організації карантину і захисту рослин вогнища бактеріального опіку плодових зафіксовано в Бельгії, Болгарії, Данії, Франції, Німеччині, Греції, Італії, Люксембурзі, Нідерландах, Норвегії, Польщі, Швеції, Великобританії (включаючи Північну Ірландію); в Азії – в Ізраїлі, Лівані, Туреччині та Ірані; на Африканському континенті – в Єгипті [14 – 16].

Бактеріальний некроз кори (*Pseudomonas syringae*) широко розповсюджений в багатьох країнах, що знаходяться в помірному кліматичному поясі від Середземномор'я до Скандинавії, а також майже в усіх регіонах України і відомий переважно як збудник захворювання кісточкових порід, серед зерняткових хворобою частіше уражуються груша та яблуня [17, 18].

На корі дерева утворюються тріщини, з яких витікає гнильна рідина. Тріщини збільшуються, захоплюють дедалі більше простору. Якщо вчасно не розпочати лікування, рослина може загинути.

Це одне з найбільш шкідливих захворювань плодових насаджень, оскільки щорічно завдає шкоди розплідникам, садівницьким господарствам та

присадибним ділянкам по всьому світу: обмежує термін життя дерев, а також суттєво знижує врожайність та якість деревини [19].

Збудник захворювання вперше було виділено М. Бейєрінком (M.W. Beijerinck) у 1899 р. з хворих рослин бузку (*Syringa vulgaris* L.) [20]. У 1902 р. патоген був охарактеризований ван Халлом (C.J.J. van Hall) і отримав назву *Pseudomonas syringae* van Hall.

Мікроорганізми *P. syringae* являють собою флюоресцентні грамнегативні аеробні рухливі паличкоподібні бактерії з полярними джгутиками, поширення та епіфітотійні властивості яких мають важливе значення.

Активно накопичуються дані про шкідливість бактерій *P. syringae*, різноманітність симптомів, що викликаються ними, і, таким чином, збільшується перелік сприйнятливих культур, що призводить до появи умовного позначення – «комплекс бактерій *P. syringae*» (*P. syringae sensu lato*) [21, 22].

На сьогодні питання таксономії комплексу, що широко обговорюється науковою спільнотою останні 40 років, досі залишається відкритим та актуальним. В даний час комплекс включає 15 споріднених видів фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* і більше 60 патоварів *P. syringae* (*sensu stricto*) [23]. Поділ на патологічні варіанти (патовари) також є предметом дискусій та визначається, в основному, діапазоном рослин-господарів та симптоматикою.

Збудник бактеріального опіку (*Erwinia amylovora*) здатний викликати ураження багатьох видів плодових і декоративних культур підродина *Maloideae* родини *Rosaceae*. Основними господарями є плодові дерева зерняткових порід – груша, яблуня (включаючи декоративні види яблунь і карликові підщепи), айва та декоративні кущі і дерева – глід (майже всі види роду *Crataegus*), кизильник (*Cotoneaster*), пір аканта (*Pyracantha*) та японська мушмула (*Eriobotrya japonica*). Бактеріальний опік виявляється на стадії цвітіння. Листя груші чорніють і скручуються, ніби обпалені, квіти засихають і опадають, на стовбурі можуть з'являтися вологі виразки. За опублікованими відомостями, у сильно заражених садах опік плодових дерев може вражати 20-50% насаджень, у тому

числі 10-20% повністю гинуть; сильно вражені дерева можуть загинути протягом одного сезону, рис. 1.1 [24].



а)



б)

Рисунок 1.1. Симптоми бактеріального опіку на пагоні груші, характерні ознаки (а); бактеріальний ексудат на молодому пагоні зерняткових (б) [24]

За даними фахівців, ознаки опіку квіток проявляються у зміні їхнього забарвлення від коричневого до чорного. Інфекція поширюється на квітконіжку, яка змінює своє забарвлення на темно-зелене, а потім й на коричневе або чорне. За теплої, вологої погоди із квітконіжки виділяються

крапельки бактеріального ексудату. За зниження вологості і незначного розвитку хвороби ексудат відсутній. Уражені квіти висихають і залишаються на дереві, рис. 1.2 [24].



Рисунок 1.2. Фітопатоген *Erwinia amylovora* на зерняткових [24]

На листках спостерігається почорніння по краю і згортання їх до середини в разі проникнення інфекції через природні отвори та серединну жилку листка – в разі проникнення інфекції від пагона. Листки стають чорними. Після цвітіння найбільш сприйнятливими до інфекції стають молоді пагони. Верхівкові молоді пагони в'януть, утворюючи характерний гачкоподібний згин у вигляді пастушої палиці. Кора стає водянистою, на ній виступають крапельки молочно-білого ексудату.

На гілках та стовбурі утворюються клиноподібні виразки із різним характером межі здорової і мертвої тканини. У більш стійких сортів спостерігається чітке відмежування здорової тканини, у чутливих відмежувань немає.

Erwinia amylovora (Burrill) Winslow et al. – бактеріальний опік плодових внесено до списку А-2 – регульовані карантинні організми, обмежено поширені в Україні, тому слід приділяти особливу увагу запобіганню поширення цього бактеріального організму, вживаючи карантинні заходи.

Отже, важливо, що з 2020 року бактеріальний опік вже не вважається карантинним захворюванням, а регульованим некарантинним організмом. За погодженням, відповідні служби із захисту рослин виокремлюють території (сади, високостовбурні сади, розплідники дерев, рідкісні плодові сорти), в яких частота виникнення бактеріального опіку на рослинах-господарях (поширеність) повинна бути низькою. У «районах з низькою поширеністю» обов'язковими залишаються моніторинг (не рідше одного разу на сезон), оповіщення (служба захисту рослин) і контроль (обрізка або обламування). За межами «зон низької поширеності» та безпечних зон, бактеріальний опік не підлягає ані повідомленню, ані контролю (детальніше за постійним посиланням: [orgprints.org/id/eprint/54515/ https://www.fibl.org/de/shop/1795-pflanzenschutz-kernobst-ua](https://www.fibl.org/de/shop/1795-pflanzenschutz-kernobst-ua)).

Подібність симптомів бактеріального опіку та некрозу плодових культур обумовлює необхідність детального вивчення властивостей їх збудників. А моніторингові спостереження за фітосанітарним станом садових агроценозів є важливою складовою у комплексі заходів, які спрямовані на контроль та захист від бактеріальних патогенів. Кожен рік проводяться обстеження, які дають можливість оцінювати локальні зони ризику поширення захворювань на насадженнях зерняткових, виявляти тенденції розвитку і змін фітопатологічної ситуації в агроценозах.

1.2. Методи виявлення та ідентифікації бактеріозу плодкових культур

Зовнішні ознаки прояву бактеріозів дуже різноманітні. Розрізняють декілька основних типів:

1) паренхіматозні ураження, до яких належать гнилі і некрози; для некрозів характерні опіки і плямистості (пігментована, незграбна, округла, розпливчаста та ін.);

2) судинні та судинно-паренхіматозні захворювання, що призводять до в'янення всієї рослини або окремих її частин;

3) змішані типи ураження, коли на одній рослині є кілька ознак захворювання, наприклад в'янення, розтріскування стебел і плямистість плодів;

4) пухлини або новоутворення, які можуть бути на надземних і підземних органах рослин у вигляді ракових і туберкульозних утворень [25].

За дослідженнями вчених показано, що зазвичай зовнішнього огляду рослини буває недостатньо; для встановлення причини захворювання вдаються до складніших методів дослідження – виділення збудника з уражених частин і визначення його видової приналежності. Для цього необхідно відбирати уражені рослини і проводити комплекс мікробіологічних (бактеріологічних) аналізів. Точна діагностика захворювання у рослин тільки на основі тих чи інших симптомів неможлива, через що виникає необхідність виділення патогенів в чисті культури і подальше їх вивчення.

Ураженість рослин фітопатогенними бактеріями визначають двічі за час вегетації рослин: в період кущіння – виходу в трубку і цвітіння – молочної стиглості (перед збиранням урожаю). У результаті встановлюють ступінь ураження посівів фітопатогенними бактеріями, кількість уражених рослин, а також ступінь ураження продуктивних стебел. Отримані дані використовують для оцінки ефективності захисних заходів і визначення втрат урожаю внаслідок хвороб. За неможливості візуально встановити природу збудника бактеріозу здійснюють його ідентифікацію [26].

Для попередньої діагностики захворювання та встановлення наявності бактерій в органах рослин використовують макроскопічні та мікроскопічні

методи. Отже, макроскопічні методи, як правило, базуються на симптомах тієї чи іншої (інфекційної, не інфекційної) патології, які виявляють неозброєним оком, іноді із застосуванням лупи різного збільшення. Ознаки патології у рослин (органах рослин) різні. Зокрема, це може бути зміна забарвлення листя, покривних частин пагонів та стовбурів або на всій рослині, або в будь-якій її частині. Наявність некротичних ділянок, плямистостей, тріщин та інше, у тому числі недорозвиненість листків, падіння приросту тощо також свідчить про певну патологію. При бактеріальному ураженні макроознаками бактеріозу можуть служити різні за забарвленням і консистенцією виділення (ексудат), наявність мокрої гнилі тощо.

Діагностику бактеріозів деревних рослин зазвичай проводять на загальному патологічному фоні. При цьому враховують, що зовнішньо грибні (мікозні) хвороби симптоматично подібні чи навіть повністю співпадають з бактеріальними, особливо при хронічних інфекційних патологіях.

Бактеріологічний аналіз рослини проводять різними методами, що залежить від ураженого органу, типу хвороби, стану аналізованого зразка (свіжий або гербарний матеріал) і ряду інших умов.

Для виявлення опіку (*Erwinia amylovora*) проводять обстеження насаджень плодових насіння, а також декоративних рослин-господарів. Обстеження проводять не менше двох разів протягом вегетаційного періоду: кінець травня – червень (у період масового цвітіння та утворення зав'язей) та липень – серпень – з пагонів. Для зразка беруть пагони, уражені зав'язі, гілки, частини кори з добре вираженими ознаками захворювання. На одній рослині можуть бути взяті зразки з кількох уражених частин [27]. Зразок повинен містити достатньо здорової тканини, що межує з ураженими органами. При переході від одного дерева до іншого інструменти та руки ретельно обробляють 70% спиртом. Зразки упаковують у поліетиленові пакети, перекладаючи фільтрувальним папером для виключення утворення конденсату, або паперові конверти, поміщаючи їх у загальний поліетиленовий пакет для виключення висихання. Зберігають не більше 10 днів у холодильнику, уникаючи заморожування. Якщо немає можливості організувати зберігання в

холодильнику, необхідно висушити зразки, перекладаючи пагони 2-3 рази на день сухим папером.

За різними дослідженнями вчених встановлено, що бактеріози мають певні відмінності від інших збудників інфекційних хвороб, які слід враховувати при їхній діагностиці (табл. 1.1) [28].

Таблиця 1.1 – Легкі та середні форми вірусного ураження рослин

<i>Особливості бактеріозів</i>	<i>Поширення бактеріального збудника</i>
1. Системний характер.	1. По судинній системі рослин, одночасно заселяє практично всі її частини і проникає в насіння.
2. Фітопатогенні бактерії зазвичай не мають форм стану спокою.	2. Залежність від рослинного субстрату. Навіть при переважанні сапротрофної фази їхня здатність виживати на неживому субстраті обмежена.
3. Масове утворення інфекційного початку, зокрема поява бактеріального слизу (ексудату) на уражених ділянках рослин, можливе зазвичай лише за високої вологості повітря.	3. Наявність краплинної вологи (опадів або роси за високої вологості повітря), а перенесення патогенів вітром на значні віддалі (порівняно зі спорами грибів) має обмежене значення.
4. На противагу грибам, бактерії не можуть безпосередньо проникати через клітинні оболонки.	4. У бактерій переважає пасивне поширення, оскільки у них відсутній активний ріст клітин (на противагу мікозам), і активне поширення можливе лише на короткі відстані.

Для діагностики бактеріальних фітопатогенів у рослинному матеріалі користуються загальноприйнятими методиками лабораторного дослідження морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних та патогенних властивостей бактерій, у тому числі: вивчення морфології колоній на різних поживних та

діагностичних середовищах, мікроскопіювання бактеріальних клітин у живому стані та на фіксованих і фарбованих препаратах, дослідження засвоєння поживних речовин та утворення продуктів обміну за допомогою кольорових реакцій, визначення патогенності шляхом штучного зараження сприйнятливих рослин у лабораторних умовах (рис. 1.3, 1.4). Всі дослідження виконуються з дотриманням правил роботи з карантинними об'єктами [29, 30].



1)



2)

Рисунок 1.3. Ранні симптоми бактеріального опіку плодових на рослинах яблуні (1) [Van der Zwet T. and Beer S.V.]; Типовий прояв симптомів опіку зерняткових на листках та зав'язях груші (2)

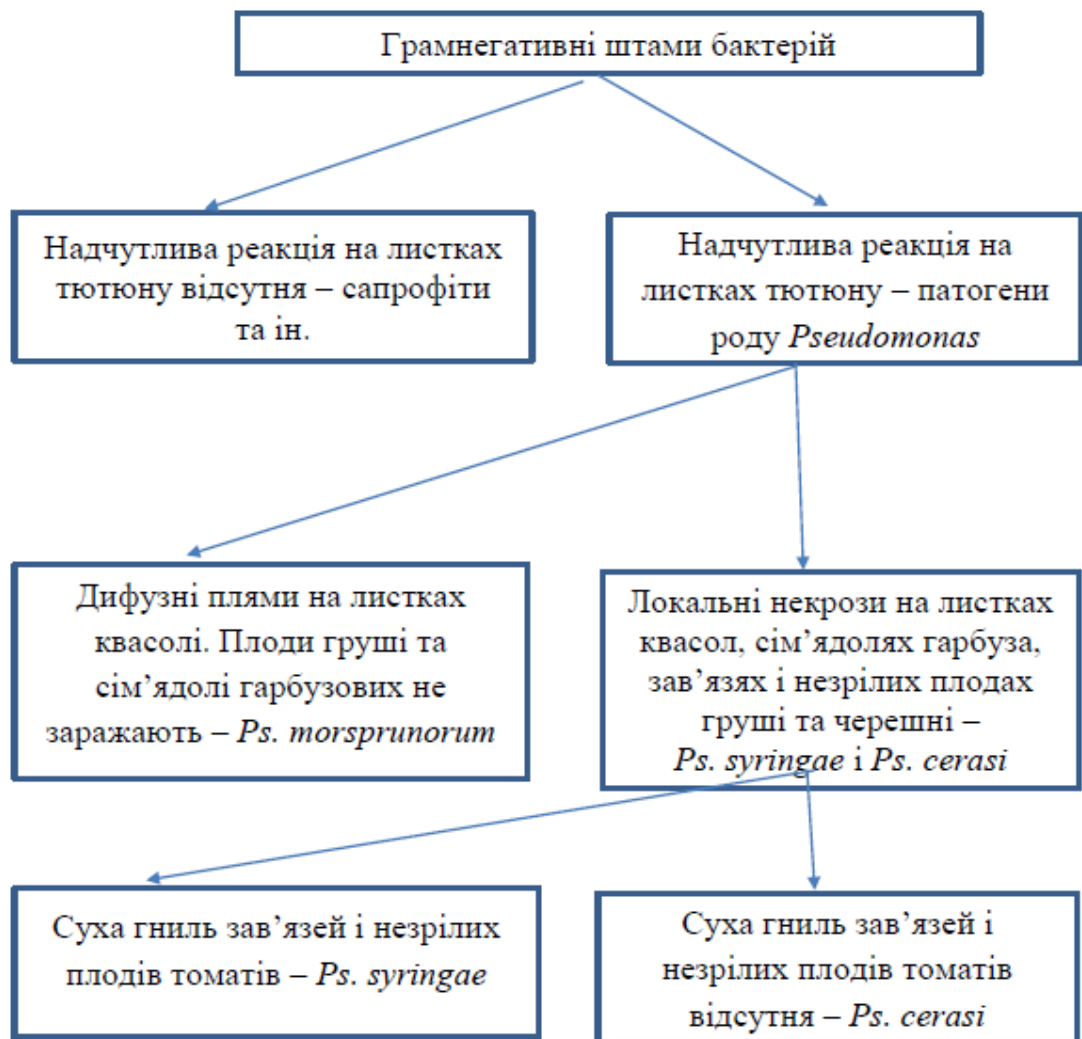


Рисунок 1.4. Схема діагностики збудника *Pseudomonas* за допомогою рослин-індикаторів [11, 25]

На сучасному етапі розвитку наукових досліджень бактеріозів рослин ефективно використовуються молекулярно-біологічні підходи ідентифікації фітопатогенних бактерій (наприклад, *E. amylovora*), включаючи аналізи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та методи секвенування ДНК, а також фітопатологічні, мікробіологічні аналізи з використанням різних поживних середовищ. Ці методи мають більш високу специфічність і чутливість, що дозволяє точно виявляти і диференціювати збудника. Ефективний комплекс діагностичних процедур ДНК-ДНК-гібридації, ERIC PCR, BOX PCR, MLST та RFLP аналізу.

Можна проводити діагностику в польових умовах, зокрема за допомогою пересувних автолабораторій, які оснащені боксом ПЛР (процес аналізу скорочується до 2-3 годин).

Найпростішим і найнадійнішим методом ідентифікації патогенних бактерій *E. amylovora* в лабораторних умовах залишаються методи ідентифікації бактерій вирощуванням на діагностичних поживних середовищах, рис. 1.5. Широко використовуються імунофлуоресцентний та імуноферментний аналізи з комерційними наборами фірм, а також комплекс біохімічних тестувань.

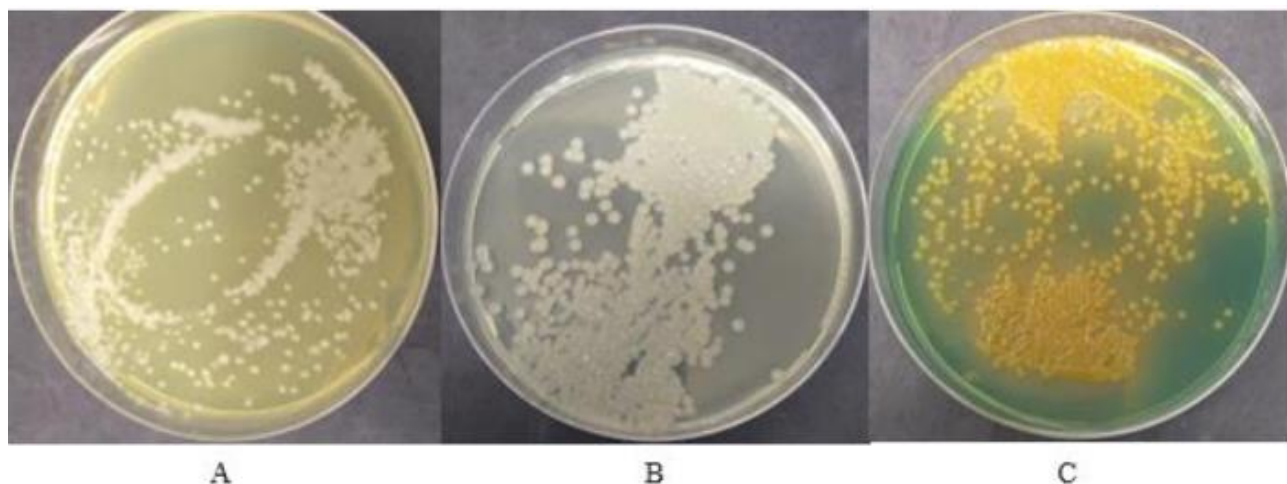


Рисунок 1.5. Розвиток бактерій *E. amylovora* на різних поживних середовищах: (А) Кінга Б; Левановому; (С) Miller-Schroth [31]

Фізіолого-біохімічна характеристика виділених штамів за допомогою серії тестів LOPAT використовується для ідентифікації патогенних бактерій *P. syringae* від інших видів флюоресціюючих псевдомонад. Тести GATTa (G – розрідження желатину, А – гідроліз аескуліну, Т – тирозиназна активність, Та – утилізацію тартрату) застосовують для диференціації патоварів (наприклад, *Pss* і *Psm*) [32]. Цей ряд тестів вважається досить достовірним способом визначення належності виділених бактерій до збудника бактеріального раку, проте деякі дослідження виявляють гетерогенність штамів *Pss* за цими показниками [33, 34], у зв'язку з чим їх проводять не у діагностичних цілях, а для характеристики фенотипів патогенних штамів.

Діагностику бактерій *P. syringae* (*Pss*) доцільно проводити шляхом штучного зараження рослин різних видів, оскільки, на думку деяких дослідників, характер взаємовідносин патогену з рослиною-господарем дозволяє диференціювати патоварну приналежність [32].

Таким чином, не дивлячись на обширний перелік засобів діагностики, переважна більшість вчених, дослідників сходяться на тому, що визначення фітопатогенних бактерій ускладнено гетерогенністю фенотипів (як у фізіолого-біохімічних, так і в молекулярно-біологічних тестах), а також схожістю симптомів бактеріозів з іншими патогенами різної етіології та епіфітототійним потенціалом. При дослідженнях бактеріозів необхідно порівнювати отримані лабораторні дані з результатами польових досліджень (наприклад, облік симптомів, характеру та часу їх прояву, уражені види рослин, сорти та органи, погодні та інші супутні умови) та обов'язко дотримуватись постулатів Коха.

1.3. Контроль бактеріозів плодкових насаджень

Шкідливість бактеріозів потребує дотримання традиційного комплексу профілактичних та захисних заходів з урахуванням циклу розвитку захворювання, а також можливості епіфітно існувати у філосфері рослин, які не є господарями даного фітопатогенна [35]. З урахуванням ймовірної латентної інфекції важливим завданням є контроль чистоти посадкового матеріалу (насіння, живців, саджанців). На думку деяких авторів, посадковий матеріал є одним з основних джерел інфекції [36, 37].

Традиційно для контролю бактеріозів у плодкових насадженнях використовували препарати на основі сполук міді (бордоську рідину, сульфат міді та інші фунгіциди, що містять мідь). Ці речовини демонстрували ефективність як проти бактеріального некрозу (збудник – *Pseudomonas syringae*), так і проти бактеріального опіку (*Erwinia amylovora*). Однак у сполук міді виявлено фітотоксичні властивості. Багатократні обробки цими препаратами також призводили до погіршення якості плодів. Отже, контактний характер дії мідівмісних препаратів передбачає контроль лише епіфітної стадії

розвитку захворювання. Застосування ж антибіотиків, не дивлячись на контактну-системну дію, нині регламентується законодавством. Як альтернатива препаратам міді та антибіотикам для боротьби зі збудником бактеріального раку на сьогоднішній час вивчається ефективність хімічних сполук з доведеною фунгіцидною активністю.

Згідно з рекомендаціям і-RAC (Міжнародний Комітетз фунгіцидної резистентності) основним шляхом зниження ризику утворення резистентних форм є зменшення селективної дії препаратів на популяцію патогенна шляхом скорочення тривалості контакту популяції і фунгіциду та кратності обробок. Тому дані препарати слід використовувати тільки для перших двох-трьох обробок, але не пізніше фази цвітіння, після чого переходити до обробок фунгіцидами з інших хімічних груп.

Актуально застосовувати біологічний контроль бактеріозів плодкових культур. Наприклад, за опублікованими науковими працями використовують в як антагоністи до бактерій *Pss* розглядаються епіфітні мікроорганізми, які мають значний конкурентний потенціал, а також продукують протигрибні, антибактеріальні речовини та гідролітичні ферменти. Такі властивості відмічені для непатогенних бактерій роду *Pseudomonas*, *Bacillus* та *Arthrobacter*, виділених з філосфери сприйнятливих до фітопатогенів рослин та бур'янів плодкових садів, а також ґрунту [38, 39].

Повідомляється про біодеградабельні нетоксичні поверхнево-активні речовини мікробного походження, які є препаратами мультифункціонального призначення та завдяки антимікробній активності є перспективними для використання у рослинництві для боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами [40, 41].

Перспективними заходами вважається створення трансгенних рослин, що володіють стійкістю до комплексу фітопатогенних бактерій, а також індукція стійкості рослин до збудників бактеріозів за допомогою синтетичних сполук, що розпоршуються на листя, впорскуються ін'єкціями всередину рослини або поглинаються через кореневу систему (саліцілова та ізонікотинова кислота) [39]. Незважаючи на дослідження, що проводяться, досить ефективною сполукою,

здатної повністю викоренити бактеріози, досі не знайдено, і більшість дослідників звертають увагу на необхідності впровадження найбільш перспективного та екологічного способу боротьби із бактеріальними захворюванням, а саме виведення та культивування стійких сортів та гібридів плодових культур.

Таким чином, необхідно здійснювати моніторингові дослідження фітопатогенних бактерій, які уражують рослини в умовах України та проводити комплексний контроль їх наявності у сортах вітчизняної та іноземної селекції. Такі дослідження нададуть змогу детально вивчити властивості виявлених патогенів, шляхи їх розповсюдження, розробити ефективні методи захисту цінних плодових культур та зберегти їх генофонд шляхом відбору стійких до фітопатогенів сортів. Вченими рекомендується попередньо проводити перевірку дії препаратів на вибірку штамів із певної популяції, що дозволить прогнозувати зміни, які можуть відбутися в її складі при використанні певних препаратів та послідовності їх застосування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Науково-дослідна робота виконана на кафедрі фітопатології імені академіка В.Ф. Пересипкіна Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України).

В комплексі досліджень щодо оцінки ефективності методів діагностики бактеріозів плодових культур використано рослинний матеріал, відібраний з експериментальних майданчиків зерняткових культур Інституту садівництва НААН України (насадження груші *Pirus communis* L.).

Сорти груші селекції Інституту садівництва НААН України, зокрема: Вежа мускатна (осінній сорт), Деканка мускатна (пізньозимовий сорт, високотолерантність до бактеріозу, викликаному збудником *Pseudomonas syringae*).

Обрані сорти відзначаються скороплідністю, високою і стабільною врожайністю і товарністю, стійкістю до хвороб і фітофагів з видів листоблішки *Psylla piri* L. Крім цього вони досить привабливі зовнішнім виглядом плодів, тривалим терміном їх зберігання в нерегульованому газовому середовищі (так звані «плоди для супермаркету»), придатністю для інтенсивного енергозберігального виробництва з екологічним спрямуванням.

Вежа мускатна – відзначається скороплідністю, високою врожайністю (20-25 т/га на п'ятий рік плодоношення, на третій рік – 10 кг/дер. при схемі 4x3 м), відмінними смаковими якостями і товарністю плодів, практично не уражується грибними хворобами (парша – *Venturia pirina*, септоріоз – *Septoria piricola*, бура плямистість – *Phyllosticta pirina* Sacc).

Дерево швидкоросле, утворює широкопірамідальну високу сильно загущену крону. Плодоносить з трьох- чотирьохрічного віку, швидко нарощуючи товарну врожайність. Переважаючий тип плодоношення – прості і складні кільчатка, коп'єця, шпорці. Пагони середньої товщини, прямі, довгі з середнім опушенням, сіро-бурого забарвлення з великою кількістю сочевичок. Бруньки середніх розмірів, конічні не притиснуті до осі пагона [42].

Характерним для сорту є колір пагона, який візуально здається весь покритим сизим нальотом по всій поверхні. Плоди (200-230 г) подовженогрушевидної форми, одномірні, основне забарвлення зелене, при досяганні жовте. Період споживання з фазою дозрівання – це третя декада вересня.

Деканка мускатна – відзначається скороплідністю, високою врожайністю (30-35 т/га на п'ятий рік плодоношення, на третій рік – 8 кг/дер. при схемі садіння 4x3 м), добрими смаковими якостями і товарністю плодів, практично не уражується грибними хворобами (парша, септоріоз і борошниста роса), високостійкий до бактеріозів і майже не пошкоджується грушовою листоблішкою.

Дерево швидкоросле, утворює високопірамідальну, сильно загущену крону. Плодоносить з трьох-чотирьохрічного віку, швидко нарощуючи товарну врожайність. Переважаючий тип плодоношення – прості і складні кільчатка, коп'єця, шпорці. Пагони прямі, середньої товщини, довгі, світло-коричневого кольору з середнім числом сочевичок. Бруньки середнього розміру, конічні, сильно відхилені від осі пагона. Плоди (200-250 г) деканковидної форми, одномірні, основне забарвлення зелене при досяганні та зберіганні. Знімальна зрілість настає у другій-третьій декадах жовтня. Період споживання з січня по березень-квітень практично без погіршення структури м'якоті і смаку.

Цінною ознакою сорту є те, що в умовах північної частини Лісостепу та Полісся плоди при досяганні завжди набувають доброго смаку і цукристості м'якоті. Основне призначення – споживання свіжими.

Фітосанітарні обстеження з метою виявлення присутності бактеріальних патогенів – збудників бактеріозів плодових культур проводили впродовж вегетаційного періоду зерняткових (груша) з подальшим спостереженням за розвитком хвороб у виявлених ділянках.

У ході спостережень та обстежень відбирали зразки рослинного матеріалу для лабораторних досліджень, опису і фіксації симптомів ураження. Склали графік відповідних обстежень (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Графік проведення обстежень насаджень груші *Pirus communis* L.

Насадження	Кількість обстежень	Строки проведення обстежень
Підщепи та саджанці плодових культур	2	✓ Через 10-12 діб після розгортання бруньок та у період активного росту пагонів.
Насадження плодоносного віку	4	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Через 10-14 діб після розгортання бруньок. ✓ Під час проходження фенофази «зав'язування плодів». ✓ Через 2 тижні після початку активного приросту пагонів.

Для оцінки ефективності методів діагностики бактеріальних фітопатогенів у рослинному матеріалі користувались загальноприйнятими методиками лабораторного дослідження, а саме: морфолого-культуральних, біохімічних, фізіологічних, патогенних властивостей бактерій.

В експериментальному блоці проведено вивчення морфологічних ознак колоній ізолятів на різних поживних та диференційно-діагностичних середовищах, послідовне мікроскопіювання бактеріальних клітин у живому стані та фіксованих препаратах, рис. 2.1.

Визначення патогенності шляхом штучного зараження сприйнятливих рослин у лабораторних умовах.



Рисунок 2.1. Ізоляти мікроорганізмів, виділені із свіжого рослинного матеріалу *Pirus communis* L. з ознаками прояву бактеріозу (за методом Дригальського)

2.1. Об'єкт та предмет дослідження

За об'єкт досліджень обрано розвиток фітопатогенних бактерій на рослинах груші, ефективність діагностики бактеріозів.

За предмет досліджень обрано виявлення сезонних бактеріальних хвороб, диференційна діагностика фітопатогенних бактерій.

Розширення лабораторних практик і методів діагностики бактеріозів плодових культур за рахунок використання нових методологічних прийомів не знижує значимості максимально достовірних бактеріологічних методів ідентифікації фітопатогенних мікроорганізмів, тому розробка прискореної схеми виділення та бактеріологічної ідентифікації бактерій, їх апробація є актуальним та в перспективі дозволить проводити скринінгові дослідження об'єктів фітосанітарного нагляду на наявність фітопатогенів, і, таким чином, розширити, підібрати колекцію «польових» бактеріальних штамів.

Шкідливість бактеріальних хвороб плодових культур може варіювати в залежності від патогенних властивостей його збудника, стану сприйнятливих рослин та умов навколишнього середовища [43].

Вхідними воротами для інфекції є рани, отримані в результаті обрізки, сильного вітру, граду та інше, і природні отвори – продихи, чечевички та листові рубці.

До факторів вірулентності, що визначає стратегію взаємодії фітопатогенних бактерій з сприйнятливими рослинами, відносяться токсини, сидерофори, білки енуклеації льоду, екзополісахариди, екзоферменти, фітогормони [44].

Наразі у класифікації бактеріальних хвороб деревних рослин є різні підходи з урахуванням симптоматики бактеріозів, їхніх збудників, особливостей патологічного процесу при бактеріальній інфекції тощо. На цих засадах виділено основні типи бактеріальних хвороб і зосереджено на них основну увагу при дослідженні:

– Бактеріальний опік (в'янення). Виявляється на вегетативних (гілки, пагони, листки, хвоя) та генеративних (квітки, зав'язь) органах зміною їхнього забарвлення на оливкове, помаранчево-червоне, чорне. Бактеріальному опіку передують раптове в'янення листків, обвисання пагонів, загинання їх гачком. Зовнішньо уражена рослина виглядає наче обпалена вогнем (рис. 2.2).

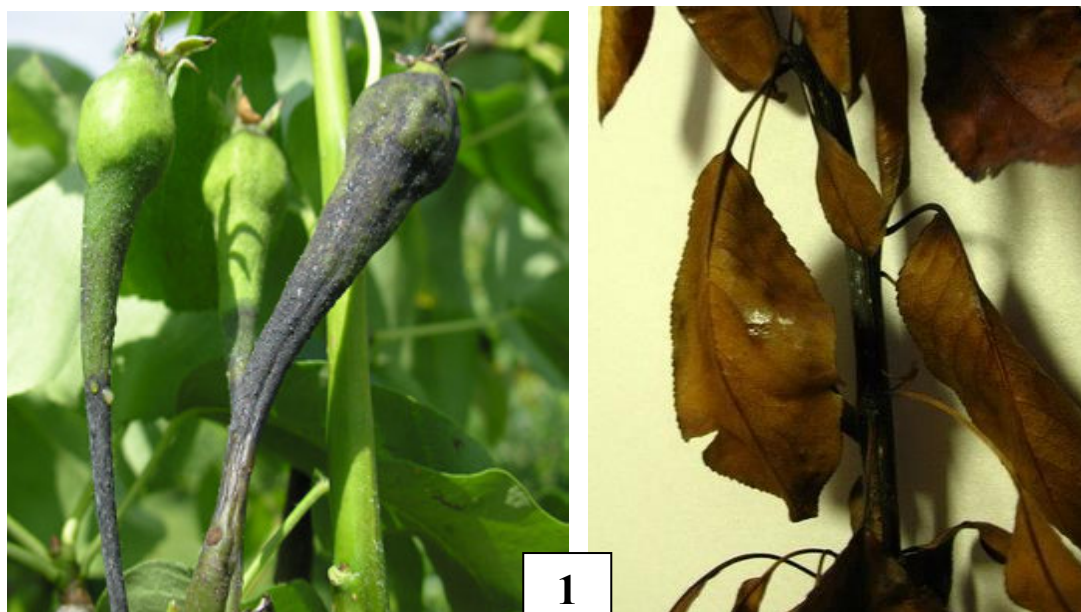


Рисунок 2.2. Обстеження рослин груші з ознаками розвитку інфекційного бактеріального агента

– Бактеріальний некроз. Виявляється в утворенні на стовбурах (гілках) повздожньо-вертикальних відмежованих сухобочин окільцьовок (особливо у зоні кореневої шийки) та напівокільцьовок, плям (некротичних ділянок біля сучків чи інших пошкоджень). Кора в цих місцях западає, камбій відмирає, відмежована ділянка обростає валиком калюсу.

– Виразка (ракові рани і тріщини). Даний бактеріоз пов'язаний з розривом тканин ксилеми під дією механічного внутрішнього тиску газів, що продукується бактеріями і накопиченою рідиною (при мінусових температурах розширення рідини призводить до розриву тканин ксилеми).

– Плямистості та некроз листків, хвої. Плямистість зазвичай має концентричну структуру плями за принципом реакції надчутливості. При цьому відмерла частина центру плями може випадати, утворюючи отвори (дірчаста плямистість). Плями можуть зливатися, некротизуючи повністю або частково поверхню листової пластинки або хвої. Некроз також може поширюватись по жилках листка, або починається з краю, охоплюючи повністю або частково всю поверхню.

– Бактеріальна гниль плодів супроводжується утворенням на їхній поверхні некротичних плям, часто покритих краплинами чи плівкою ексудату (рідини), склоподібного ендосперму, м'якої гнилі з мацерацією тканин.

При плануванні науково-дослідної роботи та подальшого проведення обстежень, моніторингу експериментальних майданчиків з насадженнями груші пріоритетним було застосування диференційованої діагностики бактеріозів зерняткових з урахуванням найбільш типових симптомів бактеріальної патології, які мають наступні ознаки:

- ✓ у насадженні, в першу чергу, зазвичай уражуються кращі дерева;
- ✓ в'янення завжди відбувається дуже швидко;
- ✓ ексудат (рідина) різного кольору і консистенції: від рідкого, водянистого до тягучого, який застигає краплями; колір – прозорий, білий, бурштиново-жовтий, вишневий, бурий, чорний рід-ий, з часом стає більш густий; виявляється в тріщинах кори, плодах, зав'язі, пагонах, листках тощо.

Для більш точної діагностики бактеріальної патології зерняткових рослин слід дотримуватись триади Коха (основопологаючих умов обґрунтування гіпотези інфекційної етіології будь-якого захворювання): мікроорганізм постійно зустрічається в організмі хворих об'єктів та відсутній у здорових; мікроорганізм має бути ізольований від хворого об'єкта та її штам повинен бути вирощений у чистій культурі; при зараженні чистою культурою мікроорганізму здоровий об'єкт хворіє; мікроорганізм має бути повторно ізольований від експериментально зараженого об'єкта. Отже, із ураженої тканини рослин виділяють ізоляти бактерій у чистій культурі, якими штучно заражують той же орган виду і сорту рослини, з якого виділено бактерії. Якщо після інокуляції динаміка інфекційного процесу та кінцеві симптоми аналогічні тим, з яких виділено ізоляти, проводять реізоляцію патогена. За всіма біологічними властивостями ізоляти і реізоляти мають бути ідентичними.

2.2. Методи проведення дослідження

Відбір зразків. Рослинний матеріал для мікробіологічного аналізу збирали в стерильний папір або посуд, швидко доставляли у лабораторію та аналізували. Якщо зразки зів'яли, їх ретельно розправляли. Кожен зразок забезпечували етикеткою, у якій указують місце і дату збору, сорт рослини, а також прізвище збирача. Крім цього, кожен зразок супроводжували описом зовнішніх ознак захворювання. При плямистості листя характеризували форму плям (незграбна, округла, розпливчаста та інше), їх величину, забарвлення, жирність, наявність хлоротичної зони, виділення бактеріального ексудату тощо. За наявності гнилі вказують характер ураження (загальна мокра або локальна місцева гниль), забарвлення ураженої тканини, її консистенцію, запах [25, 37].

Відповідно до загальноприйнятих методик відбору рослинного матеріалу плодкових культур та ДСТУ 3355-96 по діагоналі або із суміжних рядів насаджень у 5-7 точках відбирали проби (генеративні й вегетативні органи рослин), відступаючи від краю насаджень, доріг на 20-30 м, і формували середню пробу рослин з нормальним розвитком (1-2 рослини запаковували в

окремий пакет) і таких, які мають візуальні симптоми ураження (в'янення, некрози, плямистості, хлорози, наліт, нарости, деформації, гнилі). Отже, у кожному зразкові має бути 2-3 пагони або плоди з нормальним розвитком. Здорові плоди бажано пакувати в окрему тару.

Відбір рослинного матеріалу по «діагоналі» ділянки – цим методом відбирали проби вегетуючих рослин, до яких є легкий доступ. По діагоналі поля, в 7-10 точках, відступаючих на рівних відстанях в визначених інтервалах аналогічно з методикою «конверта», беруться проби рослин в кількості, достатній для отримання вихідного зразка. У подальших дослідженнях з модельних дерев відбирали по 20 ззовні здорових листків з кожного дерева біля основи гілок. Середню пробу вагою 10 грамів переносили в колби з стерильною водопровідною водою (100 мл) та збовтували на качалці 30 секунд, після чого через 0,1 мл рідини розтирали шпателем на поверхні пластинок з поживним середовищем різного складу [45], таблиця 2.1.

Таблиця 2.1 – Склад основних поживних середовищ для дослідження

Середовище	Склад компонентів на 1 л води, г	Призначення середовища
1	2	3
Картопляний агар, КА	Очищену і нарізану шматочками картоплю (200) кип'ятять близько 20 хв., фільтрують через ватяний фільтр, доводять до колишнього обсягу, додають агар-агар (20); після його розплавлення доводять рН до 7,2, фільтрують і стерилізують в автоклаві при тиску 1 атм протягом 30 хвилин.	Для виділення та культивування фітопатогенних бактерій
1	2	3

М'ясо-пептонний агар, МПА	МПБ: 5 м'ясних бульйонних кубиків (20) розчиняють, додають пептон (10), кип'ятять до розчинення, фільтрують, підлужнюють (рН 7,4–7,6) і стерилізують при тиску 1 атм протягом 30 хвилин. До 1 л МПБ додають ущільнювач агар-агар (15-20), кип'ятять до розплавлення, підлужнюють, фільтрують гарячим через ватно-марлевий фільтр, розливають і стерилізують при тиску 1 атм протягом 30 хвилин.	Для виділення та ідентифікації збудників бактеріозів
Леванове середовище	Дріжджовий екстракт 2 г, бактопептон 5 г, NaCl 5 г, цукроза 50 г, агар 20 г, дистильована вода до 1 л. рН 7,0-7,2.	для виділення фітопатогенних бактерій
Середовище Кінга Б	Пептон (Difco) 20 г, гліцерин 10 мл, K ₂ HPO ₄ 1,5 г MgSO ₄ x 7H ₂ O 1,5 г, агар 15-20 г, дистильована вода до 1 л. рН 7,0-7,2.	для виділення фітопатогенних бактерій

Чашки Петрі інкубували при 27-30⁰С протягом 3-4 днів, після чого відбирали типові колонії (наприклад, для родів *Erwinia*, *Pseudomonas*).

Пробопідготовку (відбір лабораторної проби та екстракцію збудника) проводять безпосередньо після відбору зразків або зберігають при температурі від 4 до 8⁰С.

При відборі зразка для аналізу вирізують уражені частини рослини з обов'язковим захопленням здорової тканини, щоб була добре помітна межа між здоровою та ураженою тканиною.

Виділення патогена мікробіологічними методами в чисту культуру (метод Дригальського). Цей метод необхідний на етапі наукового дослідження щодо встановлення етіології захворювання, а також він є обов'язковим і не може бути замінений на молекулярно-біологічні та генетичні дослідження. Це обумовлено тим, що в уражених тканинах, крім патогена, містяться й інші види мікроорганізмів (у культивованому і некультивованому станах), які унеможливають ідентифікацію збудника захворювання.

Виділення ізолятів з місць ураження проводилось у спеціалізованій лабораторії (боксі) з дотриманням усіх вимог асептики. Руки, стіл, інструменти, обладнання мають бути простерилізовані (протерті спиртом, за необхідності дослідний зразок опускають в спирт, після чого підпалюють: особливо це важливо для соковитих зразків, плодів та з метою знищення епіфітних поверхневих мікроорганізмів) [11].

Метод суспендування у буфері. Проби поміщають у відповідний контейнер (наприклад, пластиковий пакет 10×15 або 15×20 см, або одноразова пластикова склянка з кришкою на 150 мл, або колбу Ерленмейера на 200 мл), додають 30 мл фосфатного буфера (PB) або фосфатно-солевого буфера (PBS). Здійснюють центрифугування, обсяг буфера може бути зменшений, якщо кількість рослинної тканини невеликі.

Приготування буферу фосфатного (PB): 50 mM (PB), pH 7,0 використовують для мацерації зразка, ресуспендування осаду при центрифугуванні, приготування бактеріальної суспензії

Na_2HPO_4 – 4, 26 г, KH_2PO_4 – 2,72 г, вода дистильована 1 л.

Для приготування фосфатного буфера розчиняють інгредієнти, доводять до pH 7,0 і стерилізують при температурі 121°C протягом 15 хв.

Фосфатно-сольовий буфер PBS: 10 mM (PBS), pH 7,2 використовують для мацерації зразка, ресуспендування осаду при центрифугуванні, приготування бактеріальної суспензії, промивання, розведення антитіл.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 2,9 г, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г, NaCl — 8,0 г, KCl – 0,2 г.

Для приготування фосфатно-сольового буфера розчиняють інгредієнти, доводять до рН 7,2 та стерилізують при температурі 121⁰С протягом 15 хв.

Наступний етап методики: контейнер поміщають на ротаційний шейкер, потім інкубують зі швидкістю не менше 200 об./хв.. від 1,0 до 1,5 годин. Для зразків із симптомами можна одразу відібрати відповідну кількість мацерату для проведення відбірного аналізу на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-аналізу) або збагачення). Для безсимптомних зразків використовувати суспензію, концентровану методом центрифугування.

Мацерат акуратно зливають або безпосередньо в центрифужну пробірку на 50 мл, залишивши м'якоть у контейнері чи пакеті, або попередньо профільтровують через фільтрувальний папір, потім центрифугують 10 хв. прискоренням 8000 g або 15 хв. з прискоренням 7000 g за температури нижче 10⁰С.

Супернатант зливають, не ушкоджуючи осаду. Осад ресуспендують у 1 мл РВ або РBS та переносять у стерильну мікропробірку. Екстракт використовують відразу для відбірних тестів: імунофлуоресцентного аналізу (ІФ-аналізу), ПЛР-аналізу, а також для прямої ізоляції та біологічного аналізу (зараження незрілих) плодів).

Посів із розтертого рослинного матеріалу. Добре промитий шматочок рослинної тканини переносять у стерильну ступку, розміщену близько до полум'я пальника, і розтирають товкачем з додаванням кількох крапель стерильної води до отримання однорідної маси. Попередньо прожареною на полум'ї пальника та охолодженою петлею беруть одну краплю суспензії, що утворилася, та переносять у чашку Петрі на поверхню щільного поживного середовища. Унесений матеріал рівномірно розтирають шпателем по всій поверхні середовища; цим самим шпателем проводять посів у другій та третій чашках Петрі для отримання більшої кількості ізольованих колоній.

Виділення фітопатогенних бактерій з уражених рослин ускладнюється тим, що в них поряд зі збудниками бактеріозів знаходиться багато сторонніх мікроорганізмів. Особливо багато спорових та інших грампозитивних бактерій

трапляється під час аналізів забруднених ґрунтом органів рослин. Для перешкодження розвитку цих мікроорганізмів у щільні поживні середовища додають різні анілінові фарби, такі як малахітова зелень, генціанвіолет або кристалвіолет. Ці фарби затримують зростання спорових і грамполозитивних мікроорганізмів, майже не впливаючи на грамнегативні бактерії.

Створення вологої камери. На дно чашки Петрі кладуть шар гігроскопічної вати, яку покривають двома шарами фільтрувального паперу. Підготовлені чашки стерилізують у сушильній шафі при 130⁰С протягом 3 годин або в автоклаві при тиску 2 атм 30-40 хвилин. Перед розкладанням зразків підстилки з вати і фільтрувального паперу зволожують стерильною водою. Розкладають рослинний зразок з дотриманням стерильності. Використовувані металеві інструменти (ланцети, пінцети, голки) фламують. Чашки Петрі з підготовленим матеріалом поміщають у термостат за оптимальної температури (до 25-30⁰С) [11].

Метод обростання уражених тканин: на поживне тверде середовище розкладають стерильний матеріал рослини або не стерильний (різні шматочки ураженої рослинної тканини, що підлягає дослідженню) у чашках Петрі. Тримують чашки в термостаті при 28⁰С і спостерігають за ростом мікроорганізмів, зокрема бактерій, навколо зразка.

Потім відбирають потрібні колонії і роблять з них відсів на поживні середовища з подальшим відбором колоній бактерій для наступних досліджень. Ріст бактерій навколо дослідних зразків певною мірою свідчить про бактеріальну природу ураження.

Бактеріологічна схема ідентифікації проводилася за загальновідомими бактеріологічними тестам, зазначеним у літературних джерелах [26, 46-48].

У спеціалізованих лабораторіях для визначення зараженості рослин збудниками бактеріозів застосовують люмінесцентний, серологічний та інші методи, що потребують наявності необхідного обладнання або спеціальних імунних сироваток.

Застосування комерційних тест-систем для ідентифікації фітопатогенних бактерій (API). Тест-система API 20 E (BioMerіeux, Франція)

містить 8 загальноприйнятих і 12 асиміляційних тестів, які можна використати для ідентифікації фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*. Стріпи API 20 E складаються з 20 мікролунок, що містять дегідровані субстрати. За умови внесення в лунки бактеріальної суспензії збудників за інкубування накопичуються продукти метаболізму, зумовлюючи зміну забарвлення середовища. Результатів обліковують згідно таблиці обліку результатів. На підставі отриманих даних ідентифікують за допомогою списку профілів API 20 E.

Тест Уайта на незрілих плодах груші, яблуні (тест на патогенність).

Інокують незрілі плоди сприйнятливих сортів груші, яблуні. Відбирають здорові, не пошкоджені комахами плоди промивають їх під проточною водою з милом. Рекомендується стерилізувати плоди з поверхні, прополоскавши їх у 70%-му спирті, а потім у стерильній воді.

Поміщають залежно від розміру в стерильну чашку Петрі чи іншу відповідну прозору ємність з вкладеною стерильною вологою фільтрувальною паперу. Можна використовувати цілі плоди або їх частини зі шкіркою, завтовшки близько 1 см або більше (залежно від висоти вологої камери). Інокують плоди суспензією 10^9 кл./мл у стерильному PBS або РВ за допомогою одноразових шприців з тонкою голкою, проколюючи шкірку перпендикулярно поверхні і вводячи близько 10 мкл суспензії на глибину близько 5 мм. До кожного зразка використовують окремий шприц. Можна нанести підозрілу культуру на поверхню плода та зробити кілька уколів тонкою стерильною препарувальною голкою через бактеріальну масу і, не стерилізуючи голку, зробити ще кілька уколів у іншому місці плоду. Також, можна використовувати дерев'яну зубочистку.

Як позитивний контроль використовують референтний штам збудника бактеріального опіку, як негативний – буфер, в якому були приготовані суспензії зразків. Вологу камеру закривають та інкубують при температурі від 25⁰С до 27⁰С до п'яти діб.

Для інокуляції використовують зрізані молоді пагони або горщики. (рослини сприйнятливих сортів груші, яблуні або сприйнятливих видів глоду,

кизильника). Ножицями, змоченими в суспензії бактерій, зрізають половину листової пластинки кількох молодих листків на молодих пагонах. Поміщають рослини в теплицю або кліматичну камеру, інкубують за температури від 20⁰С до 25⁰С та вологості від 80% до 100%. Проглядають через три, сім та 15 днів. З інокульованих рослин, зав'язей або пагонів, що виявили симптоми бактеріозів, ізолюють відповідні колонії.

Тест позитивний, якщо через 2-7 діб на поверхні виступають краплі бактеріального ексудату. При цьому плоди можуть побуріти. У негативному контролі при цьому повинні спостерігатися тільки некротичні ушкодження у місці уколів або ушкоджень не спостерігається зовсім.

Статистичну обробку виконували за загальноприйнятими у математичній статистиці методиками із застосуванням програм Microsoft Excel, Statistica.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Обстеження агроценозу груші (*Pyrus communis* L.) на наявність ознак прояву бактеріозів.

Щорічні втрати врожаю від бактеріозів становлять 10,0-15,0 %, а роки епіфітотійного розвитку можуть перевищувати 50,0% . Вчені припускають, що через підвищення температури збитки від бактеріозів, а також економічні витрати лише зростатимуть. Так, при збільшенні середньодобової температури у літній період на 3-4⁰С поширеність бактеріозів підвищується вдвічі, а ураженість рослин – на 30,0-50,0%. Статистичні дані показують, що в останні роки значно скоротилися площі під культурами зерняткових (яблуні та груші), зокрема у 2021 році порівняно з 2000 роком на 62,9% – яблуні та 36,8% – груші [49].

Під час вегетаційного періоду склад мікробіоти плодкових рослин зазнає значних змін , що визначається специфікою зміни фізіологічних та біохімічних процесів у рослині. Вважають, що джерелами появи фітопатогенів на листках є посадковий матеріал, рослинні рештки. Мікроорганізми, пристосовані до різних екологічних ніш, здатні активно розмножуватись та давати приріст епіфітним представникам. Характерною особливістю епіфітної мікробіоти є те, що вона використовує мінеральні і органічні речовини, які виділяються рослиною в залежності від умов навколишнього середовища. А видовий склад мікробних угруповань (епіфітні та ендofітні популяції) впливає на ураження рослин фітопатогенами [10, 11, 26].

В проведених дослідженнях було перевірено стан насаджень груші (*Pyrus communis* L.) візуальним методом. Так, при візуальній оцінці насаджень груші було встановлено, що ураженість хворобами проявилась досить не значно.

Під час маршрутних обстежень враховували видовий і сортовий склад насаджень, вік дерев та їхній загальний стан (у т. ч. наявність механічних ушкоджень, морозобоїн тощо), заселення шкідливими комахами, що можуть

слугувати переносниками збудників бактеріозів. Обстеження проводили за відповідним планом-графіком (див. табл. 2.1, розділ 2).

Перші ознаки ураження груш бактеріальним некрозом кори були виявлені ще до початку вегетаційного періоду у вигляді засохлих бруньок, навколо яких злущувався верхній шар кори, та виразок, що утворились попереднього року. В цілому, перше обстеження дає змогу виявити рослини, що були заражені бактеріозами під час попереднього вегетаційного періоду.

Так, було встановлено, що розвиток бактеріальної хвороби (по типу некрозу) починався водночас з розгортанням бруньок і призводив до засихання окремих суцвіть на деревах. Ступінь ураження в цей час не перевищував 5,0% і лише на деревах, що зазнали впливу несприятливих погодних умов у зимовий період (фіксували не більше 10%).

За наступними спостереженнями виявлено, що на початку росту пагонів відбувалось пошкодження кори у вигляді клиноподібних виразок, з добре помітними краями, і, як наслідок, часткове відмиранням листків. З літературних джерел відомо, що від бактеріального опіку такий тип пошкоджень рослин відрізняється відсутністю ексудату та насичених вологою темних плям.

В ході досліджень частота виявлення пошкоджень від бактеріальної інфекції виявилася не високою (11,5%), табл. 3.1.

За опублікованими працями встановлено, що холодний клімат викликає у зерняткових культур глибший стан спокою та повільніше відновлення розвитку бруньок після зими, тоді як м'яка зима може зумовлювати поверхневий стан спокою та швидке відновлення розвитку [50].

На початку весни ми спостерігали прояви хвороб лише на окремих пагонах дерев різних сортів груші (до 2,0% від біомаси крони). Оскільки зимовий період минулого року характеризувався як помірно-прохолодний (безсніжний), то сильних пошкоджень від температурних мінімальних показників на деревах не виявлено.

Таблиця 3.1 – Частота виявлення збудників бактеріальних хвороб груші

Варіанти досліджу	Частота виявлення збудників бактеріозів, %	
	бактеріальні ознаки	змішана інфекція
Майданчик №1 (контроль) Екологічна технологія вирощування сортів	0	3,3
Сорт Вежа мускатна	11,5	1,6
Сорт Деканка мускатна	9,2	2,0

Примітка: частота ізоляції $IF = (m/M) \times 100$, де m – кількість зразків, з яких було виділено певний ізолят чи комплекс мікроорганізмів, M – загальна кількість зразків.

Однак, глобальні кліматичні зміни значним чином впливають на біологію патогенів. Відносно теплі зими сприяли перезимівлі шкодочинних організмів, вегетація рослин настає раніше. Відмічається, що взимку висока температура впливає на ранні фенологічні фази, такі як вимушений спокій та пробудження квіткових бруньок. Навесні вона може вплинути на стійкість вже розвинених квіток, а під час розвитку плодів – на їх якість і врожайність. Отже, підвищення температури може призводити до розладу фенологічних фаз розвитку рослин, включаючи цвітіння, розвиток плодів та врожайність.

Таким чином, погодно-кліматичні фактори необхідно враховувати у технологіях вирощування культур та організації проведення весняно-польових робіт. Розуміння змін і розробка ефективних стратегій захисту рослин є важливими завданнями для сільськогосподарської галузі в умовах глобального потепління та зміни клімат. Врахування різних обставин (у тому числі ситуаційних, соціальних) є також необхідною умовою сучасного агровиробництва і отримання високого врожаю.

При проведенні науково-дослідної роботи відмічено, що перші прояви бактеріозів (по типу бактеріального опіку) спостерігали під час цвітіння та на

початку зав'язування плодів. Було виявлено, що уражені квітконіжки ставали темно-зеленого кольору, поступово темнішали, а деякі суцвіття засихали, залишаючись на гілках, на зав'язях утворювались насичені вологою плями з краплинами ексудату на поверхні.

Для характерних ознак бактеріальної хвороби (бактеріального опіку) було віднесено такі симптоми:

- всихання листків водночас на 1 гілці, при цьому уражене листя майже чорного кольору у груші і не опадало при струшуванні;
- відмирання верхівок пагонів; листки уражених пагонів сухі та скручені; іноді спостерігається плямистість (плями чорного кольору); на корі також помітні плями темного кольору (з фіксацією чітко окресленої межі між здоровою тканиною і ураженою);
- ураження зав'язей у вигляді чорних плям з темно-зеленою, насиченою вологою облямівкою;
- поява краплин ексудату на поверхні уражених плодів та корі пагонів.

Суха та тепла сонячна погода сприяла уповільненню проявів бактеріального захворювання дослідних дерев. Так, рівень ураження пагонів становив 4,0-7,0% і лише на окремих деревах досягав 8,0-9,0%. У зразках, відібраних в цей період, кількість життєздатних фітопатогенних бактерій була низькою через пошкодження рослинних тканин сапрофітною мікробіотою (наприклад, споровими бактеріями роду *Bacillus* sp.

Розповсюдженням збудників бактеріозів може стати сильне обрізування дерев, а також резерватори інфекції, зокрема масове розмноження і активність фітофагів (грушевої листоблішки).

Таким чином, для подальшої роботи необхідно проводити діагностичні лабораторні тестування та дослідження з метою підтвердження, ідентифікації ізольованих патогенів за комплексом морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних, патогенних властивостей.

3.2. Лабораторна діагностика ізолятів фітопатогенних бактерій, виділених з рослинних зразків *Pyrus communis* L.

Біологічні властивості фітопатогенних бактерій ускладнюють їх ідентифікацію, тому для визначення і типування виду збудників бактеріозів, крім їх патогенності щодо рослин-господарів і морфологічних ознак, необхідно ґрунтовно дослідити морфологічні, культуральні та біохімічні властивості.

Мікробіологічний аналіз ізолятів, відібраних з рослинних зразків, показав, що це рухливі палички, розміром 0,9-1,5 x 0,1-0,7 мкм, спор і капсул не утворюють; розташовані поодинокі, іноді парами та короткими ланцюжками, грамнегативні, некислотостійкі аероби або факультативні анаероби.

На поживних агаризованих середовищах (МПА, LB) утворюють дрібні колонії круглої форми, за розміром маленькі, з рівними краями, іноді опалесцентні, білі, блискучі, маслянистої консистенції (рис. 3.1).

Досліджено, що ізоляти можуть утворювати невелику зернисту плівку, при цьому МПБ (бульйон) мутнішає. Інтенсивність помутніння середовища оцінено як помірне. Оптимальна температура для розвитку бактерій становила +30°C.

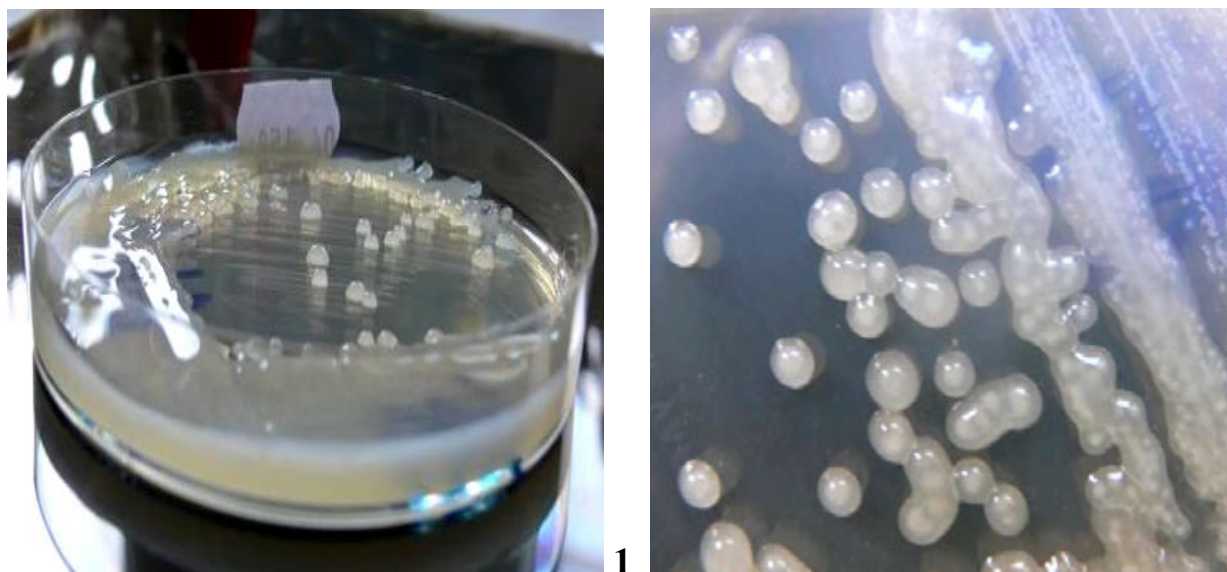


Рисунок 3.1. Ізоляти на поживних середовищах: картопляний агар (1); леванове середовище (2)

На середовищі Кінга Б ріст бактерій виявився слабим, утворювались дрібні круглі колонії з чіткими краями та слабкою флуоресценцією в УФ.

Процедура виділення та очищення бактеріальних культур потребує пробопідготовки та створення оптимальних мікробіологічних умов посіву і культивування, що займає від 48 годин.

В наступних етапах досліджень ми використовували блок-схему ідентифікації, опубліковану в роботі [26].

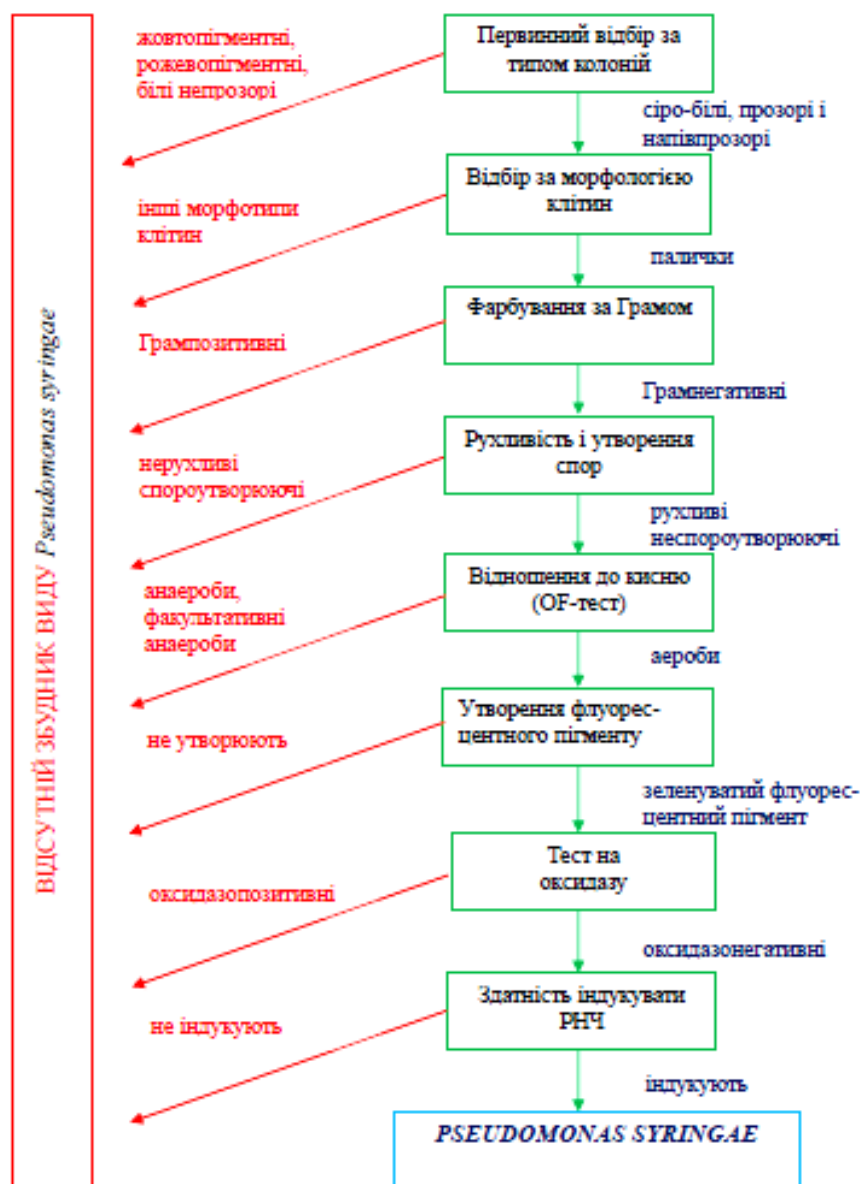


Рисунок 3.2. Блок-схема ідентифікації фітопатогенних бактерій (на прикладі роду *Pseudomonas*)

У сучасній діагностиці бактеріальних хвороб застосовується схема, що включає три основні етапи: виявлення збудника в рослинному матеріалі, ізоляція збудника на поживні середовища, ідентифікація чистої культури збудника захворювання. Відбіркові тести ми проводили через ізоляцію патогенів на класичні, оптимізовані або спеціально пібібрані поживні середовища і тести (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Характеристика поживних та ферментних властивостей при диференційному тестуванні ізолятів (№ Із 02, № Із 03)

Найменування тесту	Результат
Окраска за Грамом	–
Утворення левану	+
Флуоресцентний пігмент на середовище Кінга Б (під УФ)	–
Оксидативний/Ферментативний (О/Ф) тест Визначення аеробної ферментації	O+/F+
Каталаза	+
Тест на оксидазу	–
Редукція нітратів	–
Утилізація і	+
Ріст при 39 ⁰ С	–
Розрідження желатини	+
Уреаза	–
Індол	–
Редукція цукрів та їх похідних	+
Ацетоїн	+

Для всіх аналізів, які використовуються під час проведення лабораторної діагностики, слід проводити процедуру валідації або верифікації, якщо метод був валідований раніше. Для забезпечення максимальної стабільності проведення бактеріологічної оцінки (діагностики) науковці рекомендують використовувати готові комерційні набори. Якщо це неможливо, слід

проводити попередні випробування реагентів, які передбачається використовувати для конкретного тесту. Необхідно враховувати, що заміна хоч одного компонента в комплекті реагентів може змінити параметри всієї тест-системи. Тому, при заміні хоча б одного з ключових реагентів тест має бути повторно валідований.

До кожної серії зразків було включено позитивний та негативний контроль, а також внутрішній контроль для деяких тестів. За відсутності контрольних зразків результати тестування не можуть бути визнані достовірними.

В ході проведення загальноприйнятого біохімічного тестування ізолятів, виявлено фенотипові властивості культур, характерних для збудників бакетріозів. Для контролю використано типовий штам (позитивний контроль) бактерій роду *Pseudomonas* – *P. syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 (УКМ В-1027).

Науково-обґрунтований підхід дозволяє у дослідженнях спочатку диференціювати ізоляти та відокремити фітопатогенні бактерії, типові до конкретного роду (наприклад, до *Pseudomonas*), вивчаючи такі показники: анаеробна ферментація, продукція ферментів каталази, гідроліз желатини, ферментація глюкози та лактози, тест на патогенність.

Другий етап досліджень охоплює вивчення ростових показників бактеріальних культур на поживних середовищах (МПА та інших) при оптимумах температури і при високих до 40⁰С, а також за присутності 5,0% NaCl; продукція оксидази, ферментація манози, сорбіту, утворення сірководню та індолу. Визначені показники дозволяють типувати дослідні ізоляти від родової належності до видової (*Pseudomonas syringae*).

Таким чином, було систематизовано отримані дані та апробовано схему мікробіологічної ідентифікації у порівнянні з типовим штамом – *P. syringae*. Виявлено негативні результати за тестами на оксидазу, визначено продукцію каталази, рис. 3.3.



Рисунок 3.2. Каталазний тест – реакція ізоляту № Із 02 (МПА, 28⁰С протягом 24 годин нанесений 3,0% розчин перекису водню)

За проведеними дослідженнями обидва ізоляти бактерій розріджують желатину, не фіксувалося утворення індолу, уреазі. Крім цього, культури практично не ростуть на МПА за підвищеної температури до 40⁰С. Ферментують глюкозу, сахарозу, манозу, що відповідає літературним даним [46-48].

Дослідні ізоляти бактерій № Із 02, № Із 03 під вазеліновою олією не росли у пробірках, що свідчить про те, що виділені та первинно ідентифіковані бактерії є аеробами та відбувається окислювальна реакція.

На сьогодні вчені розширюють спектр аналізів щодо біологічних властивостей виділених фітопатогенів та схем їх ідентифікації за допомогою введення нових методик і методів оцінювання, оптимізованих комплексних тестів, готових комерційних тест-систем тощо.

3.3. Оцінка діагностичних методів виявлення бактеріозів плодових культур

Через здатність збудників бактеріозів швидко поширюватися у довкіллі шкідливість таких хвороб як опік плодових дуже велика. У сильно заражених садах опік плодових дерев може вражати до 50,0-90,0% насаджень, а сильно уражені дерева можуть загинути протягом одного сезону. Присутність бактеріального опіку плодових може бути згубною як для грушевих, яблуневих насаджень, так і для розплідників.

На сучасному етапі діагностики фітопатогенних бактерій ефективно зарекомендували себе експрес методи діагностики мікроорганізмів за серологічними та фізіолого-біохімічними ознаками. Для цього застосовують імунофлуоресцентний, непрямий імуноферментний аналізи (наприклад, для виявлення *Erwinia amylovora*), серологічні, молекулярні (ПЛР) аналізи [26].

Для швидкої ідентифікації та диференціації збудників хвороб плодових культур (*P. syringae*, *E. amylovora*), які спричиняють симптоми у вигляді виразок на гілках та плямистості листя, може бути використаний жирнокислотний склад клітинних ліпідів [51].

Для прискорення проведення рутинних мікробіологічних аналізів багато фірм пропонують до використання вже готові набори відомих мікробіологічних тестів (тест-системи). Одними з найчастіше вживуваних тест-систем є АРІ набори фірми Biomerieux. Їх можна використати для ідентифікації фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*.

За результатами проведених експериментів нами було показано, що діагностичний метод за допомогою тест-системи АРІ 20 Е достатньо ефективний і перспективний для біохімічної диференційованої ідентифікації оксидазонегативних мікроорганізмів. Досліди проведено згідно інструкції виробника інкубування здійснювалось за температури 25-26⁰С. облік та зчитування результатів проводили через 24 години (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Результати біохімічних тестів фітопатогенних бактерій на стрипах API 20E («-» – ознака негативна; «+» – ознака позитивна)

Лунка	Субстрат	Реакція/фермент	Ізолят		<i>P. syringae</i>
			№ Із 02	№ Із 03	
NO ₃	Азотнокислий калій	Редукція нітратів	-	-	-
TRP	L-триптофан	Виділення індолу	-	-	-
GLU	D-глюкоза	Зброджування	-	+	-
ADH	L-аргінін	Аргініндигідролаза	-	-	-
URE	Сечовина	Уреаза	+	-	+
ESC	Заліза цитрат трьохзаміщений	Гідроліз (β-глюкозидаза)	+	-	+
GEL	Желатина (бичача)	Желатиназа	+	-	+
PNPG	2-нітрофеніл-β-D-галактозид	β-галактозидаза	-	-	-
GLU	D-глюкоза	Асиміляція	+	+	+
ARA	L-арабіноза	Асиміляція	+	+	+
MNE	D-маноза	Асиміляція	+	+	+
MAN	D-манітол	Асиміляція	+	-	+
NAG	N-ацетил-глюкозамін	Асиміляція	-	-	-
MAL	D-мальтоза	Асиміляція	-	-	-
GNT	Глюконат калію	Асиміляція	+	+	+
CAP	Капріонова кислота	Асиміляція	+	+	+
ADI	Адипінова кислота	Асиміляція	-	-	-
MLT	Яблучна кислота	Асиміляція	+	-	+
CIT	Натрію цитрат трьохзаміщений	Асиміляція	+	+	+
PAC	Фенілоцтова кислота	Асиміляція	-	-	-
Оксидаза			-	-	-

Стріпи API 20 E складаються з 20 мікролунок, що містять дегідровані субстрати. За умови внесення в лунки бактеріальної суспензії збудників за інкубування накопичуються продукти метаболізму, зумовлюючи зміну забарвлення середовища. Результати описували і обліковували згідно таблиці обліку результатів. На підставі отриманих даних ідентифікували за допомогою списку профілів API 20 E.



Рисунок 3.3. Характеристика ізоляту № Із 02 за використання тест-системи API 20 E

Ізолят № Із 03 дещо відрізнявся за характеристиками по тест-системі від дослідного ізоляту №Із 02 та контролю (типового штаму *P. syringae*), а саме: за реакцією гідролізу (β -глюкозидази), желатинази, зброджування деяких цукрів, тому попередньо його не можна віднести до виду *P. syringae*.

На підставі отриманих експериментальних даних можна стверджувати, що використання комерційних тест-систем для ідентифікації фітопатогенних бактерій дають змогу швидко ідентифікувати збудників бактеріальних хвороб рослин з різних родів, у тому числі *Pseudomonas*.

При перевірці патогенності виділених ізолятів бактерій проводили тест на молодих незрілих плодах груші (тестування на виявлення властивостей, характерних для збудника опіку). Суспензію бактерій ізоляту № Із 03 (титр 10^8 клітин/мл) наносили на плід груші і потім у цьому місці тричі розколювали стерильною ентомологічною голкою під шкірку, на різну глибину. Процедуру повторювали кілька разів і зразки поміщали у вологу камеру. Як контроль використовували уколи зі стерильною водою.

В результаті тестування через 3 доби у місцях уколів з'явилися некротические плями и ознаки виділення молочно-білого ексудату, що може

свідчити про належність ізоляту до виду *Erwinia amylovora*). У негативному контролі при цьому спостерігалися тільки некротичні ушкодження у місці уколів.

Таким чином, отримані результати тестування бактеріальних ізолятів з використанням тест-системи API 20 E і класичних мікробіологічних методів сходилися.

У зв'язку з тим, що бактеріальний опік плодівих дуже стійкий до зовнішніх умов середовища, сприятливі кліматичні умови для розвитку хвороби створюють серйозну небезпеку для плодівих насаджень. Тому велике значення має своєчасне виявлення, прогнозування появи та розвитку інфекції у садових насадженнях. Для ідентифікації фітопатогенних грамнегативних бактерій застосовуються різні мікробіологічні селективні середовища, а також серологічні, молекулярно-генетичні аналізи.

ВИСНОВКИ

У роботі представлено теоретична та практична частини наукового дослідження щодо оцінки ефективності методів діагностики бактеріозів плодових культур (на прикладі насаджень груші), які показали, що визначення фітопатогенних бактерій ускладнено гетерогенністю фенотипів (як у мікробіологічних, , так і в фізіолого-біохімічних або молекулярно-біологічних тестах), а також схожістю симптомів бактеріозів з іншими патогенами різної етіології та епіфітототійним потенціалом. При підборі методів діагностики і дослідженнях бактеріозів необхідно порівнювати отримані лабораторні дані з результатами польових досліджень.

1. Візуальною оцінкою насаджень груші при маршрутних обстеженнях за складеним планом-графіком встановлено, що ураженість бактеріальними хворобами проявлялась досить не значно у експериментальних насадженнях. Встановлено, що розвиток бактеріального некрозу на деревах груші розпочинався водночас з розгортанням бруньок і призводив до засихання окремих суцвіть на деревах. При цьому ступінь ураження не перевищувала 5,0%. На деревах, що зазнали впливу несприятливих погодних умов у зимовий період, фіксували прояв ознак бактеріозів не більше 10%.

2. Встановлено, що частота виявлення пошкоджень від бактеріальної інфекції виявилася не високою , в межах 11,5%. Прояви бактеріозів (по типу бактеріального опіку) спостерігали під час цвітіння та на початку зав'язування плодів. Виявлено, що уражені квітконіжки ставали темно-зеленого кольору, поступово темнішали, суцвіття засихали, залишаючись на гілках, на деяких зав'язях утворювались плями з краплинами ексудату на поверхні.

3. Показано, що погодно-кліматичні фактори (суха та сонячна погода) може сприяти уповільненню проявів бактеріального захворювання дослідних дерев зерняткових. Фіксували рівень ураження пагонів на рівні 4,0-7,0%, поодинокі прояви на деревах до 8,0-9,0%. При цьому у зразках, відібраних в теплий період, кількість життєздатних фітопатогенних бактерій була низькою

через пошкодження рослинних тканин сапрофітною мікробіотою (споровими бактеріями роду *Bacillus* sp.).

4. За результатами проведених досліджень обґрунтована доцільність паралельного лабораторно-діагностичного тестування та комплексного дослідження виділених ізолятів фітопатогенних бактерій на предмет їх підтвердження, ідентифікації за оптимальними методичними схемами аналізу морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних, патогенних властивостей.

5. Науково-обґрунтований підхід дозволив у дослідженнях диференціювати виділені ізоляти та відокремити фітопатогенні бактерії, типові до роду *Pseudomonas* (*Pseudomonas syringae*), вивчаючи такі показники: ростова активність бактеріальних культур на різних поживних середовищах, анаеробна ферментація, продукція ферментів каталази, гідроліз желатини, ферментація цукрів, негативна реакція на оксидазу, тест на патогенність та інше.

6. Отримані експериментальні дані підтверджують те, що діагностичний експрес-метод за допомогою тест-системи API 20 E достатньо ефективний і перспективний для біохімічної диференційованої ідентифікації оксидазонегативних мікроорганізмів. Вже через 24 години за температури 25-26⁰С було ідентифіковано зразки дослідних ізолятів бактерій за допомогою списку профілів (згідно з протоколом до тест-системи API 20 E).

7. Перевірка патогенності ізолятів бактерій на біотесті молодих незрілих плодах груші показала позитивний результат для одного ізоляту № Із 03 з титром 10⁸ клітин/мл, що свідчить про його фітопатогенні властивості, які характерні для збудника опіку. Велике значення має своєчасне та кваліфіковане виявлення, прогнозування появи та розвитку інфекції у садових насадженнях. З урахуванням ймовірної латентної інфекції важливим завданням є контроль чистоти посадкового матеріалу (саджанців) та лабораторна діагностика зерняткових рослин за методами, які мають більш високу специфічність і чутливість, що, в цілому, дозволяє точно виявляти і диференціювати збудника бактеріозу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бегей С.В., Шувар І.А. Екологічне землеробство: підручник. Львів : «Новий Світ-2000», 2012. 432 с.
2. Бойко А.Л., Патица В.П. Фітовіруси: екологія, діагностика, профілактика. Агроекологічний журнал. Спецвип. 2002. № 3. С. 23-26.
3. Сало І.А. Розвиток ринку плодів в Україні. К.: ННЦ ІАЕ, 2013. 394 с.
4. Волкогон В.В., Заришняк А.С., Гриник І.В. та ін. Методологія і практика використання мікробних препаратів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур : монографія. Київ : Аграрна наука, 2011. 156 с.
5. Кондратенко Т. Є. Яблуня (сорти). К.: КП «Редакція журналу «Дім, сад, город». 2005. 54 с.
6. Матвієнко М.В. Груша в Україні / М.В. Матвієнко, Р.Д. Бабіна, П.В. Кондратенко. К.: Аграрна думка, 2006. 320 с.
7. Горяїнова В.В., Станкевич С.В., Батова О.М., Жукова О.М. Загальна фітопатологія: навч. посібник. Житомир: ПП «Рута», 2023. 378 с.
8. Туренко В.П., Білик М.О., Кулешов А.В. та ін., Комплексні системи захисту сільськогосподарських культур від хвороб: навч. посіб. Вид. 2-ге, допов. Харків: Майдан, 2019. 330 с.
9. Марков І.Л. Фітопатологія. Київ: Фенікс, 2015. 492 с.
10. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гриник І.В., Патица В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: [монографія: в 3-х т.]. Т.1. К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. 444 с.
11. Патица В.П., Пасічник Л.А., Гвоздяк Р.І. та ін. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень: монографія. Т. 2; за ред. В.П. Патики. Вінниця: Віндрук, 2017. 432 с.
12. Гвоздяк Р.І., Гойчук А.Ф., Розенфельд В.В. Лісова фітопатобактеріологія. Навчальний посібник / За ред. проф. А.Ф.Гойчука. Київ : ВД «Вініченко», 2014. 252 с.
13. Young J.M. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. J. of Plant Pathology. 2010. V. 92 (1, Supplement). P. 5–14.

14. Quarantine pests of Europe. Data sheets on quarantine pests for the European Union and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization // CAB International. 1997. pp. 1071-1081.
15. Van der Zwet T., Orolaza-Halbrecht N., and Zeller W. 2012. Fire Blight: History, Biology, and Management, APS Press, St. Paul, MN. 460 pp.
16. Evaluation of the Regulated non-quarantine pest (RNQP) status for *Erwinia amylovora* [EPPO, 2018-04-05] <https://pra.eppo.int/pr/4b08fc37-4d61-495a-8f96-a0bfadeba0f3>
17. Perminow J.I.S., Borge J., Brurberg M.B. and Stensvand A. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial blister bark on apple in Norway. Plant Disease. 2018. 102, 1653.
18. [CABI] Centre for Agriculture and Bioscience International. Invasive Species Compendium. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (bacterial canker or blast (stone and pome fruits)). 2019. [Accessed Jul. 22, 2020]. Available at: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/45014>
19. Hirano S.S. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte / S.S. Hirano, C.D. Upper. Microbiology a. molecular biology rev. 2000. Vol. 64, № 3. P. 624-653/
20. *Pseudomonas syringae*: an overview and its future as a ‘rain making bacteria’ / P. Manohar, et al. Intern. Res. J. of Biological Sci. 2015. Vol. 4 (2). P. 70-77.
21. Gutiérrez-Barranquero, J. A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the ‘Hodgepodge’ of the *Pseudomonas syringae* complex / J.A. Gutiérrez-Barranquero, F.M. Cazorla, A. de Vicente. Frontiers in Plant Sci. 2019. Vol. 10. Art. 570.
22. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis / M. Gomila, et al. Frontiers in Microbiology. 2017. Vol. 8. Art. 2422.
23. Bacteria from four phylogroups of the *Pseudomonas syringae* complex can cause bacterial canker of apricot / L. Parisi, et al. Plant Pathology. 2019. Vol. 68, iss. 7. P. 1249-1258.

24. Zwet van der T., Beer S. V. Fire blight - its nature, prevention and control. A Practical Guide to Integrated Disease Management. US Department of Agriculture // *Agri cult. Inform. Bulletin*. 1995. № 631. 97 pp.
25. Моніторинг хвороб сільськогосподарських культур: навч. посіб. / С.В. Станкевич, В.М. Положенець, Л.В. Немерицька, І.А. Журавська. Житомир: Видавництво «Рута», 2022. 301 с.
26. Експрес діагностика фітопатогенних бактерій і фітоплазм в агроecosистемах. Методичні рекомендації. В.П. Патики, Л.А. Пасічник, Л.М. Буценко, В.Ф. Петриченко, С.Р. Зубачов, Л.А. Данкевич, Н.В. Житкевич, Г.Б. Гуляєва, І.П. Токовенко, А.В. Калініченко, Д. Сушанович, П. Кураш, М.В. Патики, В.П. Карпенко, В.В. Круть, Л.В. Кириленко, С.І. Колісник, К.С. Коробкова, О.А. Демченко, Т.Т. Гнатюк, С.М. Мороз. За ред. В.П. Патики. – Вінниця: «Віндрук», 2019. 86 с.
27. Paulin J.P. *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. In: Fireblight, the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora* (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford (GB). 2000.
28. Andrews J. H. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces / J. H. Andrews, R. F. Harris [et al.] // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2000. 38. P. 145-180.
29. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (1984). Baltimore. London. p. 469-471.
30. Diagnosis of *Erwinia amylovora*. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants. SMT project SMT-4-CT98-2252. 38 pp.
31. El-Helaly, AF. Nutritional requirements of isolates of *Erwinia amylovora*. [Text] / El-Helaly, AF//El-Goorani MA *Phytopathology* . 2006.P. 56.
32. Ertimurtaş, D. Classical and molecular diagnosis of *Pseudomonas syringae* pathovars causing bacterial canker on stone fruits / D. Ertimurtaş, H. Özaktan // *J. of Turkish Phytopathology*. 2020. Vol. 49, № 3. P. 55–61.
33. Diversity, pathogenicity and biocontrol efficacy of *Pseudomonas syringae* isolated from plants in northern Jordan / F. A. Almomani [et al.] // *Romanian Biotechnological Letters*. 2022. Vol. 27, № 1. P. 3264-3269.

34. Rapid evaluation of pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with a lilac tissue culture bioassay and syringomycin DNA probes / H. J. Scheck [et al.] // Plant Disease. 1997. Vol. 81, № 8. P. 905-910.
35. Akbaba, M. Evaluation of bacteriophages in the biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from cankers on sweet cherry (*Prunus avium* L.) in Turkey / M. Akbaba, H. Ozaktan // Egyp. J. of Biological Pest Control. 2021. Vol. 31.
36. Біологічно активні речовини в рослинництві / Грицаєнко З.М., Пономаренко С.П., Карпенко В.П., Леонтюк І.Б. К.: ЗАТ «НІЧЛАВА», 2008. 352 с.
37. Методика наукових досліджень в агрономії: навч. посібник / [Е.Р. Ермантраут, М.А Бобро, Т.І. Гопцій та ін.]. Х.: Харк. нац. аграр. ун-т ім. В.В. Докучаєва, 2008. 64 с.
38. Mougou I. Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affecting citrus orchards in Tunisia by using indigenous *Bacillus* spp. and garlic extract / I. Mougou, N. Boughalleb-Mhamdi // Egyp. J. of Biological Pest Control. 2018. Vol. 28. Art. 60.
39. Scortichini, M. Bacterial canker and decline of European hazelnut / M. Scortichini // Plant Disease. 2002. Vol. 86, 7. P. 704-709.
40. Т.Р. Pirog, D.V. Piatetska, H.A. Yarova, G.O. Iutyńska. The effect of surfactants of microbial origin on phytopathogenic microorganisms. Мікробіологічний журнал. 2021. 83(6): 75-94.
41. Adetunji AI, Olaniran AO. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. Saudi J Biol Sci. 2021; 28(1):669-79.
42. Ходаківська Ю.Б., Матвієнко М.В. Біохімічний склад і органолептична оцінка плодів перспективних сортів та елітних форм груші (*Pirus communis* L.) в умовах північної частини Лісостепу України. Садівництво. 2016. Вип. 71. С. 108-113.
43. *Pseudomonas syringae* in wheat agrophytocenosis / L.A. Pasichnik, E.A. Savenko, L.N. Butsenko, V.F. Patyka. Science and World. 2014. Vol. 1, №4. P. 52-56.
44. Xin, X. F. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen / X.F. Xin, B. Kvitko, S.Y. He. Nature Reviews Microbiology. 2018. Vol. 16, № 5. P. 316.

45. Експериментальна ґрунтова мікробіологія: монографія. Волкогон В.В., Надкернична О.В., Токмакова Л.М. та ін. К. : Аграрна наука, 2010. 464 с.
46. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology/ Springer. 2001. Vol. 3. 1450 p.
47. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology/ Springer. 2005. Vol. 2. 1106 p.
48. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Springer. 2007. Vol. 2. 1136 p.
49. Прокопенко О. Рослинництво України: статистичний збірник. Державна служба статистики України. Київ. 2022. 182 с.
50. The comparison of dormancy dynamics in apple trees grown under temperate and mild winter climates imposes a renewal of classical approaches. Malagi G. et al. Trees. 2015. Vol. 29. P. 1365-1380.
51. Яковлева Л.М., Мороз С.Н., Щербина Т.Н., Огородник Л.Е., Гвоздяк Р.И., Патыка В.Ф. *Erwinia amylovora* – возбудитель бактеріального ожога деревьев в Украине. Мікробіологічний журнал. 2014. 76, №4. С. 26-33.