

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

**АВЕТИСЯН ЮЛІЯ ФЕДОРІВНА**

УДК 601.4:577.21:632:635.64

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ДІАГНОСТИКИ І ПАТОГЕНЕЗУ  
ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ ТОМАТА  
(*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.)**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата сільськогосподарських наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Національному університеті біоресурсів і природокористування України

**Науковий керівник** кандидат біологічних наук, доцент  
**Коломієць Юлія Василівна**,  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України,  
доцент кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

**Офіційні опоненти:** доктор сільськогосподарських наук, професор  
**Постоєнко Володимир Олексійович**,  
ННЦ «Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича»,  
заступник директора з наукової та інноваційної роботи

доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Пасічник Лідія Анатоліївна**,  
Інститут мікробіології і вірусології  
ім. Д. К. Заболотного НАН України,  
старший науковий співробітник відділу фітопатогенних  
бактерій

Захист відбудеться «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 р. о \_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.15 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ–41, вул. Генерала Родимцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97

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

Автореферат розісланий «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 р.

**Вчений секретар**  
спеціалізованої вченої ради



**Ю. В. Коломієць**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Україна завжди славилась родючими ґрунтами та унікальними ґрунтово-кліматичними умовами, що дозволяють вирощувати на її території значну кількість видів овочевих культур. З ХІХ століття завдяки своїм поживним, дієтичним і протекторним властивостям, широке розповсюдження набули рослини томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.), які завезено в Україну з Європи.

За даними продовольчої і сільськогосподарської комісії ООН (FAO), бактеріальні хвороби спричиняють втрату близько 30 % урожаю сільськогосподарських культур. В господарствах України, що вирощують рослини томата, поширені збудники бактеріального раку *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) (Smith 1910) Davis et al. 1984, чорної бактеріальної крапчастості *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*P. syringae* pv. *tomato*) (Okabe 1933) Young et al. 1978 та плямистості *Xanthomonas vesicatoria* (*X. vesicatoria*) (Doidge 1920) Vauterin et al. 1995.

Для більшості сільськогосподарських рослин проблема комплексного довготривалого захисту є невирішеною, тому господарства змушені використовувати пестициди та агрохімікати. На сьогодні актуальним залишається розробка швидких і надійних методів діагностики патогенів, використання культури клітин для визначення захисного потенціалу і вивчення процесів розпізнавання біологічних еліситорів клітинами сортів рослин томата у відповідь на біотичний стрес. Значущість вирішення цієї проблеми і обумовила вибір теми, структуру та актуальність дисертаційної роботи.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до науково-дослідних тем Національного університету біоресурсів і природокористування України «Дослідження ефективності застосування комплексних біопрепаратів при вирощуванні рослин томатів» (договір про виконання науково-дослідних робіт № 213, 2012 р.) та «Дослідження біологічних та біохімічних властивостей комплексних біопрепаратів» (договір про виконання науково-дослідних робіт № 15/141, 2013 р.).

**Мета і задачі дослідження.** Метою роботи було вивчення використання фітотоксичних метаболітів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria* в біотехнологічному скринінгу генотипів рослин томата з підвищеною стійкістю до бактеріальних хвороб й розробка біотехнологічних методів діагностики бактеріального раку, бактеріальної плямистості та бактеріальної крапчастості рослин томата на території України. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **задачі**:

- дослідити бактеріальні хвороби в уражених зразках рослин томата;
- визначити оптимальний склад живильного середовища (ЖС) для росту калюсної культури 10 сортів рослин томата;
- одержати фітотоксичні метаболіти *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* й дослідити умови їх використання як селективних чинників для відбору генотипів рослин томата з підвищеною стійкістю в умовах *in vitro*;

- з'ясувати реакцію калюсних клітин рослин томата на різну концентрацію фітотоксичних метаболітів в умовах *in vitro*;

- виділити з уражених тканин рослин томата ізоляти бактерій, описати властивості, встановити жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів та довести їх причетність до патогенезу;

- визначити структурно-анатомічні особливості будови генеративних органів за впливу виділених ізолятів бактерій та за умов штучного зараження рослин томата збудником бактеріальної крапчатості;

- оцінити ефективні праймери для ідентифікації *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* й можливість їх використання для ідентифікації *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria*;

- перевірити специфічність пропонованих праймерів за умов проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з ДНК українських ізолятів фітопатогенних бактерій.

*Об'єкт дослідження* – біотехнологічні заходи діагностики й вибору генотипів рослин томата з підвищеною стійкістю до бактеріальних хвороб.

*Предмет дослідження* – стійкість калюсних клітин рослин томата проти різних концентрацій патогенних чинників *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria*, патогенна трансформація клітин рослин томата за умов бактеріального ураження, використання молекулярної діагностики для ідентифікації *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria*.

**Методи дослідження.** Для виконання поставлених задач використовували метод культури клітин рослин *in vitro*, клітинної селекції, мікробіологічні та серологічні методи дослідження, мікротомію рослинних тканин, гістохімічні методи аналізу тканин, світлову і люмінесцентну мікроскопію, молекулярно-генетичні методи, макрофотографування, цифрову обробку даних інтенсивності люмінесценції та гістохімічних реакцій вимірювали за допомогою спеціалізованої комп'ютерної програми Image Pro Premier 9.1 (США), статистичну обробку результатів проводили з використанням пакетів програм Excel.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Визначено комплекс біотехнологічних прийомів для отримання калюсних клітин рослин томата в умовах *in vitro*, використання абаксіально розміщених листових експлантатів на середовищі Мурасіге і Скуга (МС), доповненому 0,1 мг/мл 6-бензиламінопурином (6-БАП) і 1 мг/мл  $\beta$ -індолілоцтовою кислотою (ІОК).

Встановлено доцільність використання фітотоксичних метаболітів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* для відбору генотипів томата з підвищеною стійкістю в умовах *in vitro*. Визначено, що екзополісахариди *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* мають більший пригнічуючий ефект проліферації калюсних клітин, ніж прогріті клітини *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria*. Запропонована біотехнологічна схема відбору генотипів рослин томата з підвищеною стійкістю до кількох збудників бактеріальних хвороб.

Показано кореляцію підвищення стійкості томата сорту Самсон при дії фітотоксичних метаболітів *P. syringae* pv. *tomato* в умовах *in vitro* та *in planta*.

Окреслено динаміку розвитку бактеріальної крапчатості в клітинах плодів рослин томата з підвищеною стійкістю до бактеріальної крапчатості. Виявлено, що розвиток бактеріальної крапчатості рослин томата сорту Самсон відзначався формуванням внутрішньоклітинних бар'єрів у паренхімі плодів і плаценті. Вперше досліджено роль метаболітів полісахаридної природи в обмеженні розвитку бактеріальної крапчатості, показано, що їх кількість залежала від ступеня пошкодження бактеріями *P. syringae* pv. *tomato* плодів рослин томата. Вперше показано доцільність використання праймерів CMM5/CMM6, P1/P2 та RST2/RST3 для діагностики та ідентифікації збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчатості та бактеріальної плямистості томата методом ПЛР в Україні.

**Практичне значення одержаних результатів.** Обґрунтовано і запропоновано до практичного використання біотехнологічну схему відбору генотипів томата з підвищеною стійкістю до бактеріального раку, бактеріальної крапчатості й чорної бактеріальної плямистості в умовах *in vitro*, яка дозволяє в обмеженому часі і просторі обирати сорти з низьким ступенем впливу бактеріальних метаболітів і вирощувати їх в господарствах України в умовах ризику ураження *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria*.

Цитологічні дослідження тканин рослин томатів, уражених бактеріальною крапчатістю, носять практичний інтерес для пошуку маркерних ознак стійкості проти патогена та розширили уявлення про захисні реакції.

Для розробки вітчизняних діагностичних тест-систем проведено апробацію праймерів CMM5/CMM6, P1/P2 і RST2/RST3 за умов проведення ПЛР з ДНК українських ізолятів фітопатогенних бактерій й встановлено, що їх використання уможливорює ідентифікацію *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria* на території України.

Матеріали дисертації доцільно впроваджувати в господарствах та дослідницьких лабораторіях з метою використання здорового посадкового матеріалу, перевірки стійкості сортів для їх вирощування, своєчасної ідентифікації збудників бактеріальних хвороб і розробки профілактичних заходів з обмеження інфекції, засобів боротьби й недопущення спалаху епіфітотій бактеріальної крапчатості та плямистості.

**Особистий внесок здобувача** полягає в опрацюванні наукової літератури, проведенні досліджень та статистичній обробці результатів.

Дисертантом визначено оптимальний склад живильного середовища для калюсогенезу рослин томата та отримано калюсні тканини 10 генотипів томата. Виділено препарати ліпополісахаридів (ЛПС) *P. syringae* pv. *tomato* 2, *X. vesicatoria* 9098 і екзополісахаридів (ЕПС) *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999, вивчено їх дію на калюсні клітини й показано залежність між концентрацією селективних чинників в ЖС і приростом калюсної маси сортів. Проведено штучне зараження *P. syringae* pv. *tomato* 2, фіксація та цитологічні дослідження постійних мікротомних препаратів томату сорту Самсон, встановлено особливості протікання патогенезу. Виділено збудників бактеріальної крапчатості і плямистості в Дніпропетровській області й вивчено жирнокислотний склад їх загальних клітинних ліпідів. За даними літератури, обрано праймери для ідентифікації *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* й перевірено їх специфічність на українських і

різних за походженням ізолятах збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчатості та плямистості.

Визначення завдань та напрямів дослідження, опрацювання та обговорення експериментальних результатів проведено разом із науковим керівником кандидатом біологічних наук Ю. В. Коломієць.

Висловлюємо подяку за консультативну допомогу у проведенні досліджень і цінні поради співробітнику відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України доценту, кандидату біологічних наук Л. М. Буценко, за участь у плануванні експерименту – співробітникам Національного університету біоресурсів і природокористування України доктору біологічних наук, професору, член-кореспонденту НАН України І. П. Григорюку та доценту, кандидату біологічних наук А. Ф. Ліханову.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи представлено на Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 50-річчю заснування факультету захисту рослин «Захист рослин: наука, освіта, інновації в умовах глобалізації» (Київ, 2012 р.); VII Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2012 р.); Международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск, 2013 г.); IX Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології (Львів, 2013 р.); II Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії: матеріали» (Київ, 2013 р.); VII Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченої 115 річниці заснування НТУУ «КПІ» «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2013 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми наук про життя та природокористування» (Київ, 2013 р.); VIII Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2013 р.); III Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2014 р.); Международной научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы и перспективы исследований растительного мира» (Ялта, 2014 г.) та на звітних засіданнях кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України (2012 та 2013 рр.).

**Публікації.** За темою дисертаційної роботи опубліковано 18 наукових робіт, в тому числі 7 статей, з них 5 статей у фахових виданнях України, у тому числі 2 статті у фахових виданнях України, що включені до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у інших виданнях, 11 тез наукових доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається із вступу, 6 розділів, аналізу і узагальнення результатів, рекомендацій виробництву, висновків, списку використаних джерел із 154 найменувань із них 77 зарубіжних авторів. Робота викладена на 121 сторінці комп'ютерного тексту і включає 12 таблиць та 35 рисунків.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ (Огляд літератури)

Узагальнено та проаналізовано дані літератури щодо поширення бактеріальних хвороб рослин томата на території України. Викладено наукові дані стосовно впливу фітотоксичних метаболітів на рослини томата в умовах *in vitro* та *in planta*. Описано та узагальнено можливості створення біотехнологічного відбору стійких до *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* в умовах *in vitro*. Показані існуючі біотехнологічні аспекти діагностики бактеріального раку, бактеріальної крапчатості й плямистості з використанням молекулярно-біологічних методів. На основі даних літератури показано актуальність теми дисертаційної роботи та доцільність проведення досліджень.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційну роботу виконано на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України упродовж 2011–2014 років. Для досліджень обрано 10 сортів рослин томата, які занесено до Державного реєстру рослин, що придатні до поширення в Україні української (Кременчуцький, Іришка, Лагідний, гібрид Тарасенко-2 та Малинове віконте) і зарубіжної селекції (Ріо Фуего, Пето 86, Мобіл, Самсон та Санька).

В роботі використано штами збудників бактеріозів томата, а саме: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* P-8, P-12, P-73, 110 та 4999, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 4213, ВВ-9, 120, 2, що отримані з Інституту пестицидів та захисту рослин (Сербія) та *X. vesicatoria* 9098, *X. vesicatoria* 7862, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 – з колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Для отримання калюсних клітин томата використовували живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС) з регуляторами росту нафтилоцтова кислота (НОК), 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота (2,4-Д), 6-бензиламінопурин (6-БАП) та індолілоцтова кислота (ІОК) (табл. 1.).

Таблиця 1

#### Живильні середовища для отримання калюсної культури рослин томата

Живильне середовище	Регулятор росту, мг/л			
	6-БАП	НОК	2,4-Д	ІОК
К1	1	0,5	0	0
К2	0,5	0	1,5	0
К3	0,5	1	0	0
К4	0,1	0	0	1
К5	1	1	0	0
К6	0,4	0	0	0

Для отримання бактеріальних токсинів використовували фітопатогенні бактерії *X. vesicatoria* 9098, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999 та *P. syringae*

рв. *tomato* 2. Як стресовий чинник до ураження бактеріальною крапчатістю і чорною бактеріальною плямистістю використовували суспензію клітин (20 млрд кл/мл), які прогрівали за температури 100 °С протягом 2,5 год прогріті клітини (ПК), що містять ліпополісахариди бактерій (активні О-антигени), відповідно *P. syringae* рв. *tomato* 2 та *X. vesicatoria* 9098. Екзополісахариди (ЕПС) *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* отримували при вирощуванні *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999 на середовищі з 0,5 % дріжджовим екстрактом, 1,5 глюкози та 0,5 % CaCO<sub>3</sub>. Культивування здійснювали 12 діб в колбах на качалках за температури 27 °С. Бактеріальну масу відділяли центрифугуванням (6000 об., 20 хв). В подальших дослідженнях використовували надосодову рідину.

Визначення генотипів з підвищеною стійкістю проводили за дії ряду концентрацій ПК та ЕПС на життєздатність калюсних клітин методом змішування з агаром в трьох повторностях. Для цієї мети відбирали 200 мг калюсних клітин кожного сорту і переносили на живильне середовище К4 з додаванням різних концентрацій (0,4 %, 0,8, 2, 4, 6 і 10 %) кожного з препаратів селективних чинників й культивували за температури 25±2 °С, освітлення 2 клк та 16-годинного фотоперіоду. Масу калюса в процесі культивування встановлювали методом порівняльного зважування.

Виділення збудників з уражених зразків рослин томата проводили на межі ураженої і здорової тканин. Для досліджень хворі рослини групували за різними симптомами і описували загальний стан. Зразки стебла, плодів і листків томата промивали водогінною нестерильною (10–15 хв), стерильною (5 хв) водою, розтирали до гомогенного стану в стерильній фарфоровій ступці та висівали мікробіологічною петлею в чашках Петрі на поверхню картопляного агару (КА).

Вивчення біохімічних властивостей виділених ізолятів здійснювали з використанням набору АРІ 20Е для ідентифікації *Enterobacteriaceae* та інших Грам (–) паличок. Здатність бактерій утворювати леван визначали на МПА з 5 % сахарози. Утворення округлих, піднятих, куполоподібних колоній слугує показником синтезу левана.

Визначення метилових ефірів жирних кислот здійснювали за допомогою хромато-маспектронетричної системи Agilent 6800N/5973 inert. Колонка HP-5MS (довжиною 30 м та внутрішнім діаметром 0,25 мм) з використанням нерухомої фази 5 % фенілметилполісилоксану товщиною 0,25 мм. Газ носій гелій (1 мл/хв), температура термостата 150–250 °С, підвищення температури 4 °С/хв. Температура випарника – 250 °С. Детектор маспектронетричний, температура інтерфейсу – 250 °С

Анатомо-гістологічні дослідження бактеріального патогенезу тканин квіток і плодів виконували за стандартними протоколами з використанням люмінесцентного мікроскопа AxioScore A-1 Carl Zeiss та диференційно-інтерференційного контрасту (DIC). Рослинний матеріал фіксували розчином Чемберлена (70 % етиловий спирт – формалін – оцтова кислота, v/v/v – 90/5/5). Зразки поступово зневоднювали у серіях спиртів, які далі заміщували хлороформом і просочували парафіном. Дослідження здійснювали на постійних мікропрепаратах товщиною 10–12 мкм, які виготовляли на санному мікротомі. Тканини фарбували ацетофуксином та гематоксиліном за



Гейденгайном. Визначення М-лігніну проводили за Дженсоном, суберину – за методикою Прозіної, модифікованої Фрустом.

Для люмінесцентної мікроскопії тканин використовували барвник акридиновий оранжевий (1:10000, фільтр Yellow, рН 5,6). Локалізацію полісахаридів у клітинах репродуктивних органів визначали за реакцією ШЙК (реактив Шифа та йодна кислота). Мікрофотографування виконували у програмі AxioVision Rel. 4.7 Carl Zeiss (Німеччина). Лінійні розміри тканин і клітин, цифрову обробку даних інтенсивності люмінесценції та гістохімічних реакцій визначали за допомогою спеціалізованої комп'ютерної програми Image Pro Premier 9.1 (США).

Для діагностики бактеріального раку *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, бактеріальної крапчастості *P. syringae* pv. *tomato* та бактеріальної плямистості *X. vesicatoria* використовували специфічні праймери: СММ5/СММ6, Р1/Р2 та RST2/RST3.

Для виділення ДНК бактерії культивували на середовищі МПБ 20 год за температури 28 °С. Клітини осаджували центрифугуванням (6000 об/хв). ДНК *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *atrofaciens* виділяли за допомогою реактивів ДНК-сорб-Б («Амплиценс», ФГУН ЦНИИЭ, Роспотребнадзор, Россия) за інструкцією. ДНК *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* отримували гідролізом клітин в 1н NaOH 7 хв. за температури 100 °С. Осад, отриманий при центрифугуванні (11000 об./хв, 5 хв), розчиняли в 100 мкл ТЕ-буфера. ПЛР проводили на ампліфікаторі Gene Amp PCR System 2400 в об'ємі 25 мкл. Реакційна суміш містила: dNTP (5x) 5мкл, ПЦР-буфер (5x) 5 мкл, Таг-полімераза 0,5 мкл, по 1 мкл кожного праймера, ДНК-матриця 1 мкл. Після прогрівання реакційної суміші за температури 95 °С 5 хв, здійснювали 30 циклів ПЛР: 95 °С – 30 с, 59 °С – 30 с, 72 °С – 45 с, 72 °С – 7 хв, охолодження до 4 °С.

Продукти ПЛР аналізували в 1,7 % агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мл). Розміри продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркерів молекулярної маси GeneRuler 100 bp DNA Ladder та GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Збудники бактеріальних хвороб рослин томата.** Зразки рослин томата з господарства Дніпропетровської області характеризувалися гальмуванням росту і мали пригнічений вигляд. З уражених рослин нами виділено 35 ізолятів бактерій, з яких для подальших досліджень на КА відбирали круглі, випуклі, жовті з рівними краями слизові колонії, характерні для *X. vesicatoria*, і сіро-білі, округлі, слабо підняті з гладкою блискучою поверхнею колонії – *P. syringae* pv. *tomato*.

При мікроскопіюванні та використанні тест ситеми АРІ 20Е визначено, що ізоляти 1 групи – тонкі палички 0,6×1,0–1,5 мкм, малорухливі, грамнегативні. Оксидазонегативні. Нітрати не відновлювали, індол не утворювали. Каталазопозитивні. Продукували кислоту з глюкози, манози, галактози. Желатин зріджували повільно. Лактозу, рамнозу, сорбіт не використовували. На середовищах з вуглеводами утворювали напівпрозорі колонії. Ізоляти 2 групи – палички 0,6×1,5–3 мкм, рухливі, рух поступальний. Грамнегативні. Утворювали

леван з сахарози. При рості на середовищі МПБ спостерігали муть з плівкою на поверхні. Оксидазонегативні, каталазопозитивні. Цитрат утилізували. Індол не утворювали. Продукують кислоту з глюкози, сахарози, інозиду. Не завсвоювали лактозу, мальтозу, арабінозу, ксилозу, валін, триптофан та треонін. Викликали зелену флуоресценцію середовища МПБ.

За фенотипофими властивостями свіжовиділені ізоляти бактерій відповідають наведеному у Берджі для *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria*.

Для підтвердження ідентифікації фітопатогенних бактерій за набором загальноприйнятих фенотипових ознак, визначено спектр жирних кислот (ЖК), що, як відомо, співпадає з даними досліджень ДНК–ДНК і ДНК–рРНК гібридизації. Нами з'ясовано, що профілі ЖК клітинних ліпідів ізолятів коливаються в межах від C<sub>14</sub> до C<sub>18</sub>, але їх якісний і кількісний склад був різний (табл. 2).

Таблиця 2

**Порівнювальна оцінка складу жирних кислот клітинних ліпідів збудників бактеріальних хвороб рослин томата в господарствах Дніпропетровської області**

Жирна кислота		Кількість ЖК, % від загального вмісту ЖК	
Формула	Назва	Ізоляти 1 групи	Ізоляти 2 групи
C <sub>10:0</sub>	деканова кислота	1,6	0
C <sub>10:0</sub> 3-ОН	3-гідроксидеканова кислота	0	0,5
C <sub>12:0</sub>	додеканова кислота	0	5,1
C <sub>12:0</sub> 2-ОН	2-гідроксидодеканова кислота	0	2,0
C <sub>12:0</sub> 3-ОН	3-гідроксидодеканова кислота	0	0,6
i-C <sub>13:0</sub> 3-ОН	3-гідрокси-11-метил-додеканова кислота	0,9	0
i-C <sub>15:0</sub>	13-метил-тетрадеканова кислота	2,3	0
a-C <sub>15:0</sub>	12-метил-тетрадеканова кислота	9,2	0
C <sub>15:0</sub>	пентадеканова кислота	1,4	0
i-C <sub>16:0</sub>	14-метил-пентадеканова кислота	6,7	0
C <sub>16:1 cis 9</sub>	цис-9-гексадеканова кислота	32,7	35,6
C <sub>16:0</sub>	гексадеканова кислота	20,5	23,4
C <sub>16:1 B</sub>	B ізомер гексадеканової кислоти	3,1	0
a-C <sub>17:0</sub>	14-метил-гексадеканова кислота	2,5	0
C <sub>18:1 cis 9</sub>	цис-9-октадеканова кислота	1,5	0
C <sub>18:1 cis 11</sub>	цис-11-октадеканова кислота	0	26,8
C <sub>18:0</sub>	октадеканова кислота	5,6	4,4
Слідові кількості інших ЖК		12	1.6

Для ізолятів групи 1 характерна наявність значної кількості розгалужених ЖК (i-C<sub>13:0</sub> 3-ОН, i-C<sub>15:0</sub>, a-C<sub>15:0</sub>, i-C<sub>16:0</sub> і a-C<sub>17:0</sub>), а прямоланцюгові C<sub>16:1 cis 9</sub> та C<sub>16:0</sub> становлять максимальну частку від загального профілю (табл. 2.). Гідроксикислоти представлені ізоформою C<sub>13:0</sub> 3-ОН. Одержані нами результати підтверджують

схожість жирнокислотних профілів ізолятів з групою 6, за визначенням, до якої належить збудник бактеріальної крапчастості рослин томата – *X. vesicatoria*.

Встановлено, що ізоляти бактерій 2 групи, що за фенотиповими ознаками ідентифіковано нами, як *P. syringae* pv. *tomato*, мають менше 3 %  $C_{12:0}$  2-ОН, сума  $C_{16:1}$  cis 9 та  $C_{18:1}$  cis 11 становить 62,33, а відношення  $C_{16:0}$  до  $C_{16:1}$  cis9 – 0,66. У профілі переважають гексадеканова ( $C_{16:0}$ ), гексадеценава ( $C_{16:1}$ ) та октадеценава ( $C_{18:1}$  cis 11) ЖК (табл. 2.), що за даними літератури відповідає ЖК *P. syringae* pv. *tomato*. Отже, вивчення жирнокислотного складу сумарних клітинних ліпідів виділених ізолятів корелює з результатами морфологічного та біохімічного аналізу. Підтверджено, що причинами загибелі насаджень томатів в господарстві Дніпропетровської області є поширення збудників бактеріальної плямистості *X. vesicatoria* та бактеріальної крапчастості *P. syringae* pv. *tomato*

**Використання методів клітинної селекції для відбору рослин томата з підвищеною стійкістю до збудників бактеріальних хвороб.** Метод культури клітин рослин дозволяє отримувати за короткий проміжок часу значну кількість біоматеріалу – калюсу, що в подальшому використовується для дослідження впливу на клітини рослини фітотоксичних метаболітів збудників бактеріальних хвороб.

Дослідженнями показано суттєві відміни в інтенсивності калюсогенезу стеблових та листкових експлантатів. Як виявилось, фрагменти листової пластинки мають вищі показники калюсогенезу, ніж стеблові, як за приростом маси калюса, так і за часом утворення. Листкові експлантати формували зрілу калюсну масу за 20–23 діб, стеблові – 29–31 (рис. 2.).

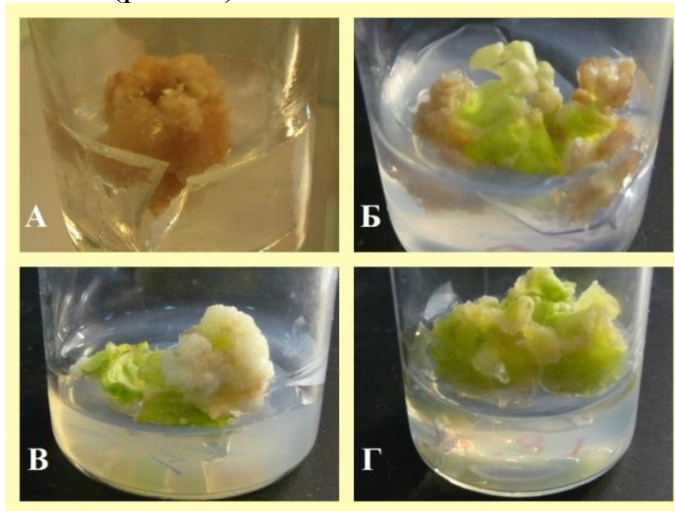


Рис. 2. Вплив регуляторів росту на тип калюсних тканин рослин томата сорту Санька: А – середовище К2; Б – К3; В – К4; Г – К6.

Приріст калюсної маси стеблових експлантатів був у 1,5–2 рази нижчим за листові, а у сорту Малинове віконте – у 5 разів. Це може бути зумовлено різним вмістом ендогенних регуляторів росту у тканинах експлантатів, складом живильного середовища тощо. Збільшення маси калюса залежало також від генотипу, мінімальне значення якого було у сорту Малинове віконте –  $0,34 \pm 0,021$  г, максимальне – Санька  $0,60 \pm 0,017$  г. Враховуючи результати індукції, приросту і морфологічних особливостей калюсних культур для їх індукції рекомендовано живильне середовище К4 (МС + 0,1 мг/л 6-БАП і 1 мг/л ІОК) й листові

експлантати рослин томата, що забезпечувало утворення рихлого, пухкого та злегка обводненого калюса

Визначення генотипів томата з підвищеною стійкістю проти *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* передбачало встановлення робочого діапазону концентрацій стресового чинника, в межах якого була різна життєздатність калюсних клітин. Одночасно проводили їх висів на контрольне середовище без додавання препаратів прогрітих клітин (ПК) і екзополісахаридів (ЕПС). Через 3–4 тижні культивування на середовищі К4 доповненого ЕПС *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999, ПК *P. syringae* pv. *tomato* 2 і ПК *X. vesicatoria* 9098, виростили різні за розміром калюсні колонії (рис. 3., А–Е).

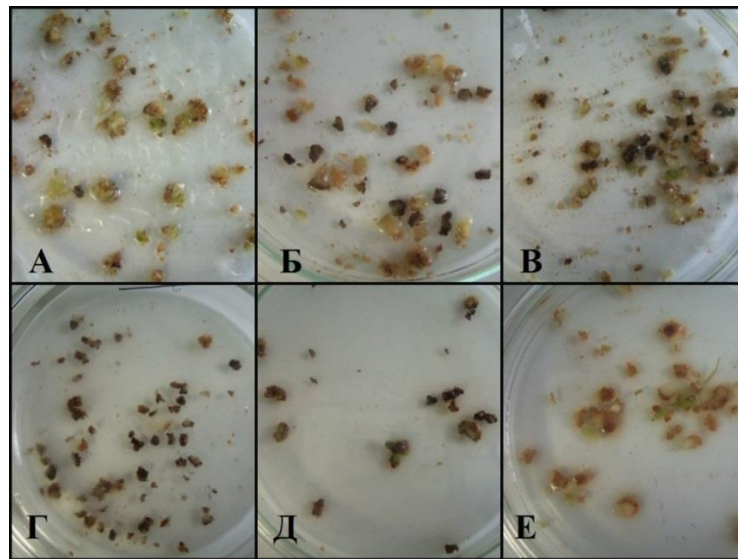


Рис. 3. Дія різних концентрацій прогрітих клітин *P. syringae* pv. *tomato* на калюсні тканини рослин томата сорту Самсон: А – 0,4 % ПК *P. syringae* pv. *tomato* 2; Б – 0,8; В – 2; Г – 4; Д – 6 %; Е – контроль.

Кожен генотип відзначається певним ступенем сприйняття фітотоксичних метаболітів. В кінці першого пасажу мінімальна частина агрегатів (8–15 %) завдяки генетичним чи адаптаційним змінам, була здатна до поділу і проліферації на селективному середовищі при дозах ЕПС *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999: 4% для сортів Іришка, Лагідний та Самсон, 2 – Малинове віконте, Пето 86, гібрид Тарасенка-2, Санька, 0,8 – Кременчуцький, Ріо Фуего та Мобіл. На селективних середовищах з ПК *P. syringae* pv. *tomato* 2: 6 % для сорту Самсон, 4 – Лагідний, Малинове віконте, Пето 86, Гібрид Тарасинка-2, 2 – Санька, Іришка, Ріо Фуего, Мобіл, 0,8 – Кременчуцький. На селективних середовищах з ПК *X. vesicatoria* 9098: 6 % – Лагідний, Самсон, Пето 86, 4 – Малинове віконте, Санька, 2 – Кременчуцький, Гібрид Тарасенка-2, Іришка, Ріо Фуего та Мобіл.

Однакові концентрації селективних чинників по-різному впливали на приріст маси та частоту калюсоутворення. Отримані результати дозволяють окреслити межі концентрацій бактеріальних чинників патогенності, за яких зберігається життєдіяльність калюсних ліній наявних сортів томата в умовах *in vitro*.

Розроблена методика дозволяє в лабораторних умовах обирати сорт томата з більшим відсотком виживання калюсних клітин за ширшого спектру концентрацій фітотоксинів, які відзначаються захисною дією проти збудника.

**Роль гістохімічних бар'єрів у розвитку бактеріальної крапчастості репродуктивних органів рослин томата.** За результатами досліджень, після проникнення патогенних мікроорганізмів у рослинні тканини, збудник бактеріальної крапчастості (*P. syringae* pv. *tomato* 2) системно поширюється по рослинному організму. У досліджених плодах рослин томата сорту Самсон, штучно ураженого *P. syringae* pv. *tomato* 2, встановлено, що патогенні мікроорганізми в тканини насінневих зачатків здатні проникати через провідні пучки та фунікулус (рис. 4., г).

Це підтверджується чисельними фактами просторової спрямованості патогенезу, яка чітко визначається характером розташування та організації провідних пучків (рис 4., в, к). Клітинні оболонки навколо осередків активного патогенезу інтенсивно флуоресціювали, що більш за все є проявом захисної реакції рослинного організму (рис. 4., л).

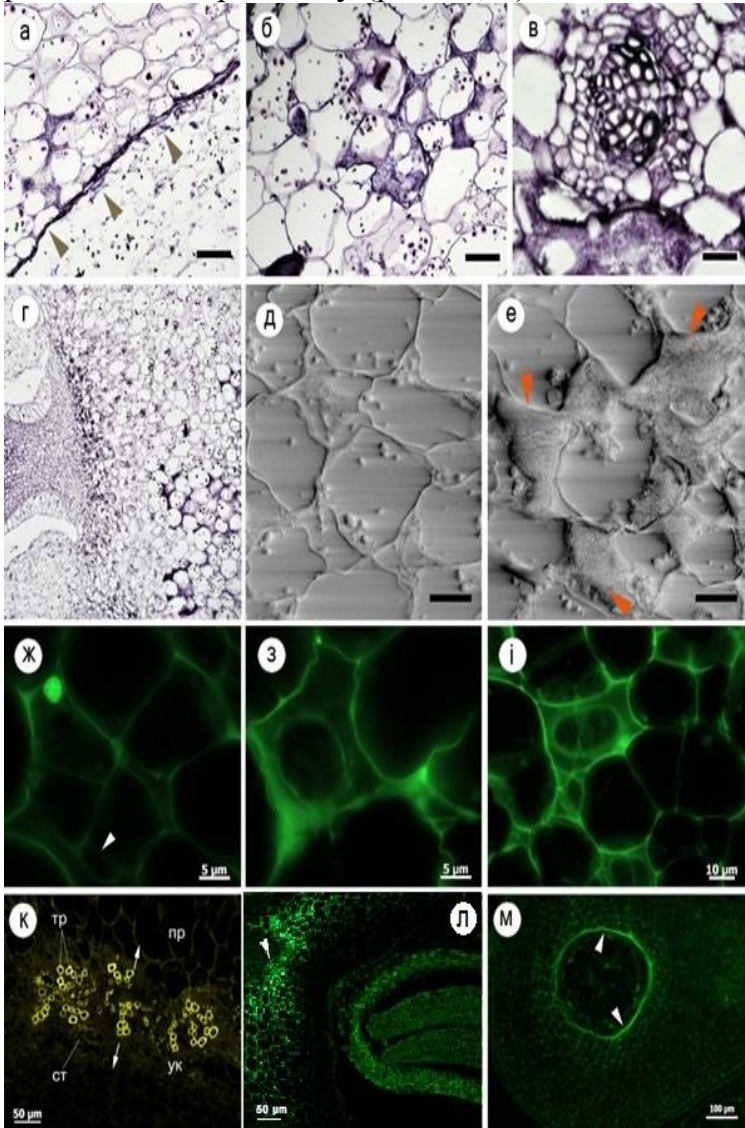


Рис. 4. Стан репродуктивних органів рослин томата сорту Самсон за умов ураження тканин *P. syringae* pv. *tomato* 2: а – розподіл полісахаридів, який обумовлений плацентарним бар'єром; б – локалізація патогенних бактерій та полісахаридів у паренхімі плода; в – поширення бактерій від провідного пучка; г, л – блокування поширення бактеріальної інфекції з плаценти до фунікулуса тканинними бар'єрами; мікроморфологія клітин здорової (д) і ураженої патогенами (е) паренхіми мезокарпію (DIC контраст); к – провідні пучки: тр – трахеїди, ст – ситоподібні трубочки, пр – паренхіма, стрілками показано напрям збільшення оптичної густини протопластів клітин фунікулуса та інтегумента; ж – початкова стадія трансформації клітин під впливом патогенних бактерій; з, і – формування внутрішньоклітинних бар'єрів у паренхімі плодів; м – нуцелярний бар'єр, що захищає зародковий мішок і яйцеклітину від шкодочинної дії патогенів (стрілками показано відкладення біополімерів на зовнішньому шарі клітин нуцелуса, жовтий фільтр).

Водночас клітини томата сорту Стожар, отримані з господарства Дніпропетровської області з ознаками бактеріальної крапчатості, мали у протопластах густий секрет, вірогідно, полісахаридної природи (підтверджено реакцією ШЙК). Вони майже не давали світіння (рис. 5., показано стрілками). Зниження флуоресценції клітинних стінок, на нашу думку, було пов'язано з деструктивними процесами в целюлозній матриці. Клітинні стінки здорових клітин флуоресціюють жовто-зеленим кольором. Уражені клітини, на початкових стадіях бактеріальної інвазії, виявляють яскраву автофлуоресценцію у блакитному спектрі, що пояснюється накопиченням речовин фенольної природи.

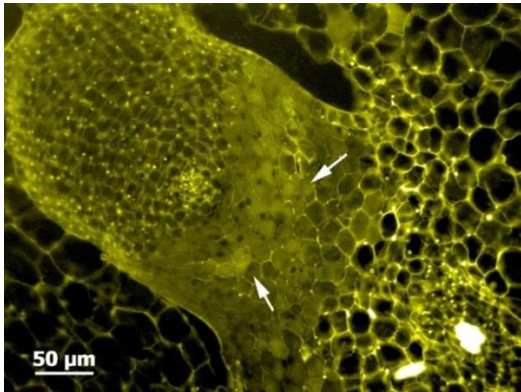


Рис. 5. Флуоресценція здорових і уражених бактеріями (показано стрілками) тканин плаценти та насінневого зачатка томата сорту Стожар

Вони створюють ефективні перешкоди і унеможливають транслокацію бактерій через клітини плаценти томата сорту Самсон до насінневих зачатків.

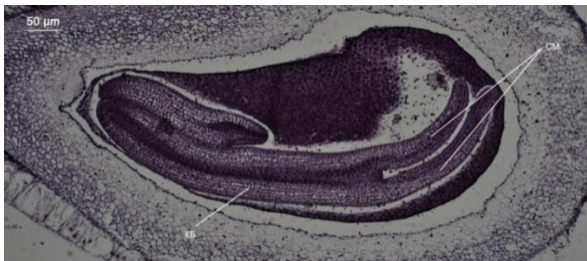


Рис. 6. Розвиток насіння томата сорту Самсон, який уражений *P. syringae* pv. *tomato* 2: СМ – сім'ядолі, КБ – камбій.

Поряд з тим встановлено, що розвиток бактеріальної крапчатості томата сорту Самсон відзначався формуванням внутрішньоклітинних бар'єрів у паренхімі плодів і плаценті включно (рис. 4., а, з, і). Кількість секрету полісахаридної природи у протопластах клітин та міжклітинниках корелювала із ступенем пошкодження плодів рослин томата.

За результатами гістохімічного аналізу блокування поширення бактеріальної інфекції з плаценти до фунікулуса відбувається за участі клітинного (рис. 4., г, л) та плацентарного гістохімічних бар'єрів (рис. 4., а, м).

Дослідження мікротомних препаратів плодів томата сорту Самсон показали, що насінневі зачатки формуються без порушень (рис. 6.). А у плодах томата сорту Стожар з ознаками бактеріальної крапчатості простежувалось їх перетворення та недорозвинення основних тканини – інтегумента, нуцелуса і зародкового мішка. Гістохімічні дослідження пилку томата сорту Стожар показали, що із всіх мікроспор лише 50–55 % виявляються фертильними.

**Молекулярна діагностика бактеріальних хвороб рослин томата.** Постійний контроль за поширенням збудників бактеріальних хвороб є підставою для розробки профілактичних заходів з обмеження інфекції.

У результаті ампліфікації ДНК різних за походженням штамів *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* згідно зазначених для

мультиплексної тест-системи умов й використанні праймерів CMM5/CMM6, P1/P2 та RST2/RST3 нами отримано специфічні для кожного виду ДНК-фрагменти.

Різні розміри ампліфікованих фрагментів дозволяють з легкістю розрізнити ДНК трьох збудників у одному зразку (рис. 8., А, Б, В).

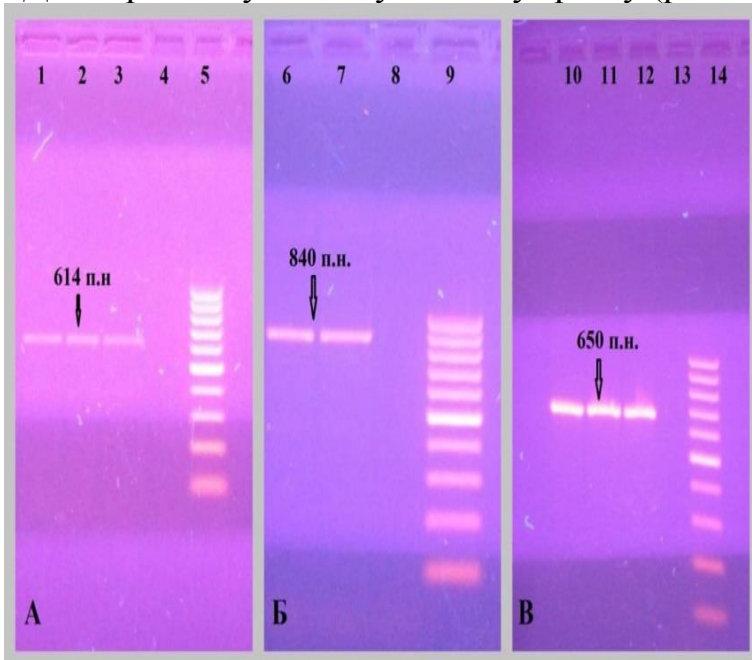


Рис. 8. Електрофореграми продуктів ПЛР з використання праймерів: А – CMM5/CMM6, Б – P1/P2, В – RST2/RST3: 1 – ДНК *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P-8; 2 – ДНК *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis* P-12; 3 – ДНК *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P-73, 4 – ДНК *X. vesicatoria* 9098, 6 – ДНК *X. vesicatoria* 9098, 7 – ДНК *X. Vesicatoria* 7862, 8 – ДНК *P. syringae* pv. *tomato* 120, 10 – ДНК *P. Syringae* pv. *tomato* 4213, 11 – ДНК *P. syringae* pv. *tomato* BB-9, 12 – *P. syringae* pv. *tomato* 120, 13 – *X. Vesicatoria* 9098, 5, 9, 14 – маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder

Так, збільшення кількості копій специфічних повторів ділянки гена *hrp B* (*X. vesicatoria* штами 9098 та 7862) з використанням неспецифічних праймерів CMM5/CMM6 і P1/P2 (рис. 8., А, В – доріжки 4, 13), ділянки гена *cfl* (*P. syringae* pv. *tomato* штами 4213, BB-9, 120) з праймером RST2/RST3 (рис. 5., Б – доріжка 8) – результатів не дало. Відсутність продуктів ампліфікації простежувалась також у випадку проведення ПЛР з ДНК *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (штами P-8, P-12, 3-73) і праймерами P1/P2, RST2/RST3 (на рис. 8 не зображено). Перевагою використання описаних праймерів у мультиплексних тест-системах є те, що за відсутності ДНК-мішені (патогена в біоматеріалі) специфічний продукт ампліфікації з ДНК інших збудників бактеріальних хвороб томата не утворюється (рис 8., А, Б, В – доріжки 4, 8, 13).

Для розробки вітчизняних тест-систем перевіряли специфічність пропонованих праймерів за умов проведення ПЛР з ДНК українських ізолятів фітопатогенних бактерій. Доведено, що праймери CMM5/CMM6 не мають зони комплементу в ДНК обох видів, а P1/P2 та RST2/RST3 не взаємодіють з ДНК *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011. Встановлена невідповідність між теоретично прогнозованими розмірами ампліконів і результатами ПЛР з ДНК українських ізолятів *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027. Так праймери P1/P2 утворювали з ДНК *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 амплікони розміром 1200 п. н, 2000 й 3000, а праймери RST2/RST3 – 1500 п. н. Наявність такого розміру фрагментів ДНК в біопробі не впливає на виявлення ДНК *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria*, оскільки значно відрізняється від зазначених для описаних пар праймерів.

Отже, досліджувані праймери можна використовувати в моноспецифічній тест-системі для виявлення *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. Syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria*, та в мультиплексному ПЛР аналізі біоматеріалу на присутність трьох видів збудників одночасно.

## ВИСНОВКИ

1. В результаті роботи було вивчено спосіб використання фітотоксичних метаболітів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria* в біотехнологічному скринінгу генотипів рослин томата з підвищеною стійкістю до бактеріальних хвороб й розроблено біотехнологічні схеми діагностики бактеріального раку, бактеріальної плямистості та бактеріальної крапчатості рослин томата на території України.

2. Причинами загибелі насаджень томатів в господарстві Дніпропетровської області є поширення *X. vesicatoria* та *P. syringae* pv. *tomato*. Профіль жирних кислот сумарних клітинних ліпідів виділених нами ізолятів збудників бактеріальних хвороб рослин томата, корелює з ідентифікацію морфологічними та біохімічними методами.

2. Абаксіальне розташування листкових експлантатів томата забезпечує в 2,5–3 рази більшу частоту калюсоутворення, ніж адаксіальне. Для індукції калюсоутворення рослин томата доцільно змінювати темнову і світлову фази й використовувати живильне середовище Мурасіге і Скуга доповнене 0,1 мг/л 6-БАП і 1 мг/л ІОК для листкових та 0,4 мг/л 6-БАП для стеблових експлантатів.

3. Біотехнологічна схема визначення меж концентрацій бактеріальних чинників патогенності, за яких зберігається життєдіяльність калюсних ліній наявних сортів в умовах *in vitro* передбачає використання елементів методики клітинної селекції та, як селективні чинники, прогрітих клітин *X. vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato*, екзополісахаридів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* в концентраціях 0,4 %, 0,8, 2, 4, 6 та 10 %.

4. В господарствах, де існує загроза поширення бактеріального раку, бактеріальної крапчатості й бактеріальної плямистості рекомендовано вирощувати сорти рослин томата Самсон і Лагідний; бактеріальної плямистості – Санька, Пето 86, Малинове віконте, а бактеріальної крапчатості – Ріо Фуего та Малинове віконте.

5. Підвищена стійкість томата сорту Самсон до препаратів прогрітих клітин *P. syringae* pv. *tomato* 2 в умовах *in vitro* корелює з результатами цитологічного дослідження. Бактеріальна крапчастість репродуктивних органів рослин томата сорту Самсон на початкових стадіях активізує формування клітинного і тканинних бар'єрів, які гальмують поширення бактеріальної інфекції.

6. Розвиток бактеріальної крапчатості томата сорту Самсон зумовлював конституційні перебудови клітин – формування нових клітинних стінок, що розділяють материнську клітину на рівні або нерівні, функціонально активні та уражені частини. В обмеженні розвитку бактеріальної крапчатості томата сорту Самсон важливу роль відіграють секрети полісахаридної природи, кількість яких корелює із ступенем пошкодження *P. syringae* pv. *tomato* 2.



7. В рослинах томата сорту Стожар з ознаками бактеріальної крапчатості, отриманих з господарства Дніпропетровської області, визначено недорозвинення та структурно-морфологічні аберації насінневих зачатків, 50–55 % пилку виявилось фертильним.

8. Розміри ампліконів ДНК українських ізолятів *X. vesicatoria* з праймерами RST2/RST3 не відрізняються від теоретично прогнозованих, що підтверджує можливість діагностики бактеріальної плямистості тест-системою з їх використанням. За умов використання праймерів СММ5/СММ6, P1/P2 і RST2/RST3 та відсутності ДНК-мішені (патогена в біоматеріалі) у мультиплексних тест-системах, специфічний продукт ампліфікації з ДНК інших збудників бактеріальних хвороб томата не утворюється.

9. Праймери СММ5/СММ6 не мають зони комплементативності з ДНК *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, а праймери P1/P2 і RST2/RST3 – з ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011.

10. ПЛР за умов використання праймерів P1/P2 з ДНК *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 утворювалися амплікони розміром 1200 п. н, 2000 й 3000, а праймерів RST2/RST3 – 1500 п. н, що не впливає на діагностику *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* у біопробі й підтверджує їх специфічність та можливість використання для ідентифікації збудників бактеріальних хвороб томата, поширених на території України.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

У результаті досліджень розроблено науково-практичні рекомендації щодо перевірки сорту рослин томата на стійкість до фітотоксичних метаболітів збудників бактеріальних хвороб, впровадження діагностичних тест-систем для ідентифікації *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* в Україні та використання цитологічних досліджень для перевірки імунного потенціалу ураженої рослини.

1. Отримання первинних калюсних клітин рослин томата рекомендовано здійснювати на живильному середовищі Мурасіге і Скуга доповненому 0,1 мг/л 6-БАП та 1 мг/л ІОК. Як експлантати використовувати абаксіальної розміщенні на живильному середовищі листові пластинки площею 0,5–1,0 см<sup>2</sup>, які необхідно вирощувати за температури 25±2 °С в темряві протягом 10–14 діб.

2. Підвищену стійкість рослин томата до фітопатогенів рекомендовано визначати з використання елементів методики клітинної селекції методом змішування з агаром. Як селективні чинники використовувати прогріті клітини *X. vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato* та екзополісахариди *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* в концентраціях 0,4 %, 0,8, 2, 4, 6 та 10 %. При цьому підраховують число життєздатних колоній та приріст калюсної маси.

3. Особливості бактеріального патогенезу та визначення маркерів стійкості рекомендовано проводити при цитологічному дослідженні уражених патогеном тканин рослин томата – постійних мікропрепаратах товщиною 10–12 мкм, отриманих на санному мікроскопі.

4. Для ідентифікації *S. michiganensi* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria* в Україні рекомендовано специфічні праймери: СММ5/СММ6, Р1/Р2, RST2/RST3.

Практична реалізація пропозицій дисертаційного дослідження розширює можливості захисту врожаю рослин томата.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Статті у фахових виданнях:*

1. Аветисян Ю. Ф. Індукція утворення калюсних клітин культурою помідора (*Lycopersicon esculentum* Mill.) в умовах *in vitro* [електронний ресурс] / **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2013. – № 41. – С. 13. – Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd\\_2013\\_5\\_4.pdf](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd_2013_5_4.pdf). (Здобувачем проведено експериментальну частину та написано статтю).

2. Аветисян Ю. Ф. Створення томатів, стійких до бактеріальних хвороб, шляхом клітинної селекції / **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць, І. П. Григорюк // Продовольча індустрія в АПК. – 2014. – № 2. – С. 32–36. (Здобувачем проведено експериментальну частину та написано статтю).

3. Аветисян Ю. Ф. Молекулярна діагностика бактеріальних хвороб рослин томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць, І. П. Григорюк // Продовольча індустрія в АПК. – 2014. – № 3. – С. 31–35. (Здобувачем проведено експериментальну частину та написано статтю).

4. Аветисян Ю. Ф. Роль гістохімічних бар'єрів у розвитку бактеріальної крапчатості репродуктивних органів томата звичайного (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / **Ю. Ф. Аветисян**, А. Ф. Ліханов, Ю. В. Коломієць, І. П. Григорюк // Збалансоване природокористування. – 2014. – № 3. – С. 15–21. (Здобувачем проведено експериментальну частину та написано статтю).

5. Аветисян Ю. Ф. Жиринокислотний склад сумарних клітинних ліпідів збудників бактеріальних хвороб рослин томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / **А. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць, І. П. Григорюк // Карантин і захист рослин. – 2014. – № 9. – С. 4–6. (Здобувачем проведено експериментальну частину та написано статтю).

### *Статті в іншому виданні:*

6. Аветисян Ю. Ф. Впровадження ПЛР-діагностики найпоширеніших на території України збудників бактеріальних хвороб томату / **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць, Л. М. Буценко // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. – 2012. – Вип. 178. – С. 109–116. (Здобувачем проведено експериментальну частину та написано статтю).

7. Специфічна трансформація тканин репродуктивних органів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) під впливом патогенних мікроорганізмів / М. Д. Мельничук, Ю. В. Коломієць, А. Ф. Ліханов, **Ю. Ф. Аветисян** // Фактори

експериментальної еволюції організмів. – 2013. – Т. 12. – С. 298–293. (Здобувачем проведено експериментальну частину та написано статтю).

*Матеріали та тези наукових доповідей:*

8. Аветисян Ю. Ф. Впровадження ПЛР-діагностики найпоширеніших на території України збудників бактеріальних хвороб томатів / **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць, Л. М. Буценко // «Захист рослин: наука, освіта, інновації в умовах глобалізації»: Міжнародна науково-практична конференція присвячена 50-річчю заснування факультету захисту рослин, 15–18 жовтня 2012 р.: матеріали конференції. – Київ, 2012. – С. 115–116. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

9. Аветисян Ю. Ф. Підбір селективних праймерів з метою розробки діагностичного набору для ідентифікації *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* та *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* / **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць, Л. М. Буценко // «Біологія: від молекули до біосфери»: VII Міжнародна конференція молодих учених, 20–23 листопада 2012 р.: матеріали конференції. – Харків, 2012. – С. 191. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

10. Аветисян Ю. Ф. Возбудители бактериальных болезней томата в хозяйствах Днепропетровской области / **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць // «Глобализация науки: проблемы и перспективы»: Международная научно-практическая конференция, 7 февраля 2014 г.: материалы конференции. – Уфа, – 2014. – Т. 3. – С. 186–189. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

11. Аветисян Ю. Ф. Получение каллуса томата для проведения клеточной селекции устойчивых к возбудителям бактериальных болезней сортов / **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць // «Клеточная биология и биотехнология растений»: Международная научно-практическая конференция, 13–15 февраля 2013 г.: материалы конференции. – Минск, 2013. – С. 187. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

12. Рибчинська М. А. Утворення та ріст калюсних клітин томату / М. А. Рибчинська, **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць // «Молодь і поступ біології»: IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, 16–19 квітня 2013 р.: матеріали конференції. – Львів, 2013. – С. 483–484. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

13. Рибчинська М. А. Регенерація рослин томату в культурі *in vitro* / М. А. Рибчинська, **Ю. Ф. Аветисян**, Ю. В. Коломієць // «Біотехнологія: звершення та надії»: II Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, 16–17 травня 2013 р.: матеріали конференції. – Київ, 2013. – С. 45–46. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

14. Аветисян Ю. Ф. Залежність процесів калюсоутворення від типу експлантату і вмісту регуляторів росту / **Ю. Ф. Аветисян**, М. А. Рибчинська, Ю. В. Коломієць // «Біотехнологія XXI століття»: VII Всеукраїнська науково-

практична конференція, присвячена 115 річниці заснування НТУУ «КПІ», 24 квітня 2013 р.: матеріали конференції. – Київ, 2013. – С. 12–13. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

15. Аветисян Ю. Ф. Клітинні механізми реакції помідора *Lycopersicon esculentum* Mill. на біотичний стрес / Ю. Ф. Аветисян, Ю. В. Коломієць // «Актуальні проблеми наук про життя та природокористування»: II Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, 16–18 жовтня 2013 р.: матеріали конференції. – Київ, – 2013. – С. 7–8. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

16. Аветисян Ю. Ф. Вплив мікробних ліполісахаридів на калюсні клітини помідора (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / Ю. Ф. Аветисян, Ю. В. Коломієць, А. Ф. Ліханов // «Біологія: від молекули до біосфери»: VIII Міжнародна конференція молодих учених, 3–6 грудня 2013 р.: матеріали конференції. – Харків, 2013. – С. 137. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

17. Аветисян Ю. Ф. Отримання калюсних ліній томата стійких до збудників бактеріального раку та бактеріальної крапчатості / Ю. Ф. Аветисян, Ю. В. Коломієць // «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології»: III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, 24–27 лютого 2014 р.: матеріали конференції. – Донецьк, 2014. – С. 235. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

18. Аветисян Ю. Ф. Молекулярна діагностика бактеріальної крапчатості томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / Ю. Ф. Аветисян, Ю. В. Коломієць // «Проблемы и перспективы исследований растительного мира»: Международная научно-практическая конференция молодых учених, 13–16 мая 2014 г.: материалы конференции. – Ялта, 2014. – С. 31. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, опрацювання та узагальнення одержаних даних).

## АНОТАЦІЯ

**Аветисян Ю. Ф. Біотехнологічні аспекти діагностики і патогенезу збудників бактеріальних хвороб томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.). – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2015.

Дисертація присвячена вивченню бактеріальних хвороб, розробці швидких і надійних біотехнологічних методів діагностики патогенів, скринінгу захисного потенціалу рослин томата.

Встановлено доцільність використання фітотоксичних метаболітів *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* для відбору генотипів томата з підвищеною стійкістю в умовах *in vitro*. Запропоновано біотехнологічну схему відбору генотипів рослин томата з підвищеною стійкістю до кількох збудників бактеріальних хвороб.

Показано кореляцію підвищення стійкості томата сорту Самсон при дії фітотоксичних метаболітів в умовах *in vitro* та *in planta*. Окреслено динаміку розвитку бактеріальної крапчатості в клітинах плодів рослин томата з підвищеною стійкістю до *P. syringae* pv. *tomato*. Вперше показано доцільність використання праймерів CMM5/CMM6, P1/P2 та RST2/RST3 для діагностики та ідентифікації збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчатості та бактеріальної плямистості в Україні методом ПЛР.

Матеріали дисертації доцільно впроваджувати в господарствах та дослідницьких лабораторіях з метою використання здорового посадкового матеріалу, перевірки стійкості сортів для їх вирощування, своєчасної ідентифікації збудників бактеріальних хвороб і розробки профілактичних заходів з обмеження інфекції, засобів боротьби й недопущення спалаху епіфітотій бактеріальної крапчатості та плямистості.

**Ключові слова:** рослини томата, бактеріальні хвороби рослин томата, калюс, фітотоксини, стійкість, гістохімічний бар'єр, ідентифікація.

## АННОТАЦІЯ

**Аветисян Ю. Ф. Биотехнологические аспекты диагностики и патогенеза возбудителей бактериальных болезней томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.). – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2015.

Диссертация посвящена изучению бактериальных болезней и защитного потенциала растений томата. Целью работы было изучение использования фитотоксичных метаболитов *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* и *X. vesicatoria* в биотехнологическом скрининге генотипов растений томата с повышенной устойчивостью к бактериальным болезням и разработке биотехнологических методов диагностики бактериального рака, бактериальной пятнистости и бактериальной крапчатости растений томата на территории Украины.

Бактериальные болезни растений томата наносят значительный ущерб в открытом и закрытом грунте. Потребность в новых экологических способах контроля вспышек и распространения бактериозов обуславливает развитие биотехнологического направления решения вопроса. На сегодня актуальным остается разработка быстрых и надежных методов диагностики патогенов, использования культуры клеток для определения защитного потенциала и изучение процессов распознавания биологических элиситоров клетками сортов растений томата в ответ на биотический стресс. Значимость решения этой проблемы и обусловила выбор темы, структуру и актуальность диссертационной работы.

Для выполнения поставленных задач использовали метод культуры клеток растений *in vitro*, клеточной селекции, микробиологические и серологические методы исследования, микротомию растительных тканей, гистохимические методы анализа тканей, световую и люминесцентную микроскопию, молекулярно-генетические методы.

В результате работы показано, что насаждения томатов в тепличных хозяйствах Днепропетровской области пораженные возбудителями бактериальных болезней. По результатам морфологического и биохимического анализа, изоляты идентифицированы как *P. syringae* pv. *tomato* и *X. vesicatoria*. Показано, что профиль жирных кислот суммарных клеточных липидов выделенных изолятов возбудителей бактериальных болезней растений томата, коррелирует с результатами морфологического и биохимического анализа и подтверждает распространение в тепличных хозяйствах Днепропетровской области возбудителей бактериальной крапчатости и пятнистости томата.

Определен комплекс биотехнологических приемов для получения каллусных клеток растений томата в условиях *in vitro*. Показано, что использование абаксиально размещенных листовых эксплантатов на среде Мурасиге и Скуга (МС), дополненной регуляторами роста 0,1 мг/мл 6-бензиламинопурином (6-БАП) и 1 мг/мл β-индолилуксусной кислотой (ИУК). Исследована целесообразность использования фототоксичных метаболитов *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* и *X. vesicatoria* для отбора генотипов томата с повышенной устойчивостью в условиях *in vitro*. Предложена биотехнологическая схема отбора генотипов растений томата с повышенной устойчивостью к нескольким возбудителям бактериальных болезней.

Результаты наших исследований свидетельствуют о целесообразности использования сортов томата Самсон и Лагидный в районах, где существует угроза распространения бактериального рака, бактериальной крапчатости и бактериальной пятнистости; в частности Санька, Пето, Малиновое виконте – бактериальной пятнистости, а Рио Фуэго и Малиновое виконте – бактериальной крапчатости.

Показана корреляция повышения устойчивости томата сорта Самсон при действии фитотоксических метаболитов в условиях *in vitro* и *in planta*. Показана динамика развития бактериальной крапчатости в клетках плодов растений томата с повышенной устойчивостью к *P. syringae* pv. *tomato*. Впервые исследована роль метаболитов полисахаридной природы в ограничении развития бактериальной крапчатости, показано, что их количество зависело от степени повреждения бактериями *P. syringae* pv. *tomato* 2 плодов растений томата. Площадь тканей с характерными для бактериальной трансформации отложениями полисахаридов увеличилась за степенной функцией.

Гистохимический анализ показал, что блокировка распространения бактериальной инфекции из плаценты к фуникулусу происходит при участии клеточного и плацентарного гистохимических барьеров. Они создают эффективные препятствия и делают невозможным транслокацию бактерий через клетки плаценты томата сорта Самсон. Цитологические исследования тканей растений томата, пораженных бактериальной крапчатостью, представляют практический интерес для поиска маркеров устойчивости против патогена.

Впервые показана целесообразность использования праймеров СММ5/СММ6, Р1/Р2 и RST2/RST3 для диагностики и идентификации возбудителей бактериального рака, бактериальной крапчатости и бактериальной пятнистости в Украине методом ПЦР. Размеры ампликонов ДНК украинский изолятов *X. vesicatoria* с праймерами RST2/RST3 не отличаются от теоретически прогнозируемых, что подтверждает

возможность диагностики бактериальной пятнистости ПЦР тест-системой с их использованием. Показано, что при использовании праймеров СММ5/СММ6, Р1/Р2 и RST2/RST3 и отсутствии ДНК-мишени (патогена в биоматериале) в мультиплексных тест-системах, специфический продукт амплификации с ДНК других возбудителей бактериальных болезней томата не образуется.

Получение в ходе исследований результаты будут полезны для скрининга сортов растений томата на устойчивость к фитотоксическим метаболитам возбудителей бактериальных болезней и разработки диагностических тест-систем для идентификации *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* и *X. vesicatoria* в Украине.

**Ключевые слова:** растения томата, бактериальные болезни растений томата, калюс, фитотоксины, устойчивость, гистохимических барьер, идентификация.

## SUMMARY

**Avetisyan Y. F. Biotechnological aspects of diagnosis and pathogenesis of bacterial diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). – The manuscript.**

Dissertation on the receipt of scientific degree of candidate of agricultural sciences from speciality 03.00.20 – biotechnology. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015

Dissertation work is dedicate to research bacterial diseases, the development of rapid and reliable diagnosis of pathogens biotechnological methods, screening potential protective tomato plants.

Established the feasibility of using phytotoxic metabolites of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* and *X. vesicatoria* for selecting genotypes with increased resistance of tomato in conditions *in vitro*. The proposed biotechnology scheme selection genotypes of tomato plants with enhanced resistance to several bacterial diseases.

Shown correlation improve the stability of tomato varieties Samson phytotoxic metabolites by the action in terms of *in vitro* and *in planta*. Outlined dynamics of bacterial speck in fruit tomato plants with enhanced resistance to *P. syringae* pv. *tomato*.

For the first time demonstrated the feasibility of using primers СММ5/СММ6, Р1/Р2 and RST2/RST3 for the diagnosis and identification of bacterial canker, bacterial spot and bacterial speck of tomato in Ukraine PCR.

**Keywords:** tomato plants, tomato bacterial diseases, callus, fitotoksyny, stability, histochemical barrier, identification.