

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

**КОЛОМІЄЦЬ ЮЛІЯ ВАСИЛІВНА**

УДК 579.84/86:581.143.6:635.64

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ДІАГНОСТИКИ І РЕГУЛЯЦІЇ  
БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ ТОМАТІВ В УКРАЇНІ**

03.00.20 «Біотехнологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора сільськогосподарських наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

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

**Науковий консультант** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Григорюк Іван Панасович,**  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України,  
професор кафедри фізіології, біохімії рослин  
та біоенергетики

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Дробик Надія Михайлівна,**  
Тернопільський національний педагогічний  
університет імені Володимира Гнатюка,  
декан хіміко-біологічного факультету

доктор сільськогосподарських наук, професор,  
член-кореспондент НААН  
**Лавриненко Юрій Олександрович,**  
Інститут зрошуваного землеробства НААН,  
заступник директора з наукової роботи

доктор сільськогосподарських наук,  
старший науковий співробітник  
**Тряпціна Наталія Василівна,**  
Інститут садівництва НААН,  
завідувач сектору біотехнологічних досліджень

Захист відбудеться «28» грудня 2017 року о 9<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.15 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

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

Автореферат розіслано «27» листопада 2017 року

В. о. вченого секретаря  
спеціалізованої вченої ради

Р. Д. Васишин

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Використання високопродуктивних сортів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.), стійких до збудників бактеріальних хвороб, зокрема чорної бактеріальної плямистості (*Xanthomonas vesicatoria* (Doidge 1920) Vauterin et al. 1995), бактеріального раку (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith 1910) Davis et al. 1984) і бактеріальної крапчастості (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young et al. 1978), є ключовим елементом інтенсифікації галузі овочівництва. Масове їхнє вирощування можливе лише за впровадження сучасних наукових розробок з тестування рослинного матеріалу на наявність збудників, відбору стійких сортів томатів та виробництва біологічних препаратів з антибактеріальною дією (Патика В. П., Мельничук Т. М., Шерстобоев М. К., 2015).

Основою біотехнологічних підходів захисту рослин проти збудників бактеріальних хвороб є вирощування стійких сортів. Застосування культури клітин і тканин для відбору стійких до фітопатогенів сортів томатів є перспективним напрямом біотехнологічних досліджень, який пов'язаний із введенням тканин і органів в культуру *in vitro*, аналізом індукованої й природної стійкості клітинних популяцій, добором стійких клітин, регенерацією із них рослин та мікроклональним розмноженням регенерантів. Головною перевагою клітинної біотехнології є ведення цілеспрямованого добору генотипів у контрольованих умовах, зокрема на селективному фоні, який створюють за участі токсичних продуктів життєдіяльності фітопатогенних бактерій (Чугункова Т. В., 2011; Дубровна О. В., 2012).

Розроблення ефективних методів захисту рослин томатів від бактеріальних хвороб обумовлене тривалим латентним періодом розвитку збудників, складністю своєчасною діагностикою в ранній період ураження і численними джерелами інфекції. Для ідентифікації патогенів необхідне проведення лабораторних досліджень, зокрема морфологічних та біохімічних тестів, молекулярної діагностики, імуноферментного аналізу з використанням серологічних сироваток або імуностріпів (Игнатов А. Н., 2009, Быкова Г. А., 2011). Нині значна увага сконцентрована на розроблення ДНК-діагностики збудників овочевих культур з використанням різних типів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР): ВІО-ПЛР, STS-ПЛР, MLST/MLSA-ПЛР, nested-ПЛР, PRIMIS-ПЛР, real-time ПЛР та мультиплексні ПЛР-тест-системи, що уможливають ідентифікувати одночасно кілька збудників (Büttner D., 2003; Карлов А. Н., 2007; Ozdemir Z., 2009; Корнев К. П., 2014).

У виробничих умовах проти збудників бактеріальних хвороб застосовують пестициди, які не позбавлені суттєвих недоліків, до яких відноситься шкідливий вплив на довкілля, здатність акумулюватися в тканинах рослин та необхідність багаторазової обробки. Для одержання екологічно безпечної овочевої продукції і зниження рівня навантаження пестицидами назріла необхідність у розробленні систем захисту на основі біологічно активних речовин, механізм дії яких пов'язаний із стимуляцією природної імунної системи рослин (Озерецковская О. Л., 2002; Тютюрев С. А., 2002).

Важливим пріоритетним завданням є наукове обґрунтування біотехнологічних засад використання індукторів стійкості, серед яких значна увага сконцентрована на натуральних продуктах проміжних реакцій імунної відповіді, зокрема саліцилової кислоти та її похідних (Galal A. A., 2002; Vallad G. E., 2004, Тютєрев С. Л., 2015). Саліцилова кислота проявляє антистресову дію і посилює активність ферментів про- та антиоксидантної системи рослинних клітин, зокрема каталази, НАДФН-оксидази і пероксидази, які володіють широким спектром дії (Живет'єв М. А., 2014; Бояркина С. В., 2016; Омеличкіна Ю. В., 2017).

У сучасних умовах постає необхідність розроблення якісно нових технологій вирощування високопродуктивних сортів томатів, що вимагає залучення комплексних підходів із використанням стійких сортів, відібраних методами клітинної селекції, обов'язкового контролю якості насінневого матеріалу і поширення збудників бактеріальних хвороб, застосування сучасних методів діагностики й систем захисту на основі біопрепаратів, які характеризуються низькою токсичністю по відношенню до рослин та високою активністю проти фітопатогенів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано в межах 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.); «Дослідження біологічних та біохімічних властивостей комплексних біопрепаратів» (договір про виконання науково-дослідних робіт № 16/141, 2013 р.); «Розробка комплексних біотехнологічних заходів захисту рослин на основі ентомологічних та біологічних препаратів» (номер державної реєстрації 0109U000956, 2012–2013 рр.). З 2016 р. до теперішнього часу продовжується робота за науковою темою «Основи технології вирощування і захисту рослин томатів від бактеріальних хвороб в умовах відкритого і закритого ґрунту» (номер державної реєстрації 0116U0018008).

**Мета та завдання дослідження.** Мета дисертаційного дослідження – розроблення наукових і методологічних основ клітинної біотехнології відбору сортів томатів з підвищеною стійкістю до бактеріальних хвороб й комплексного використання біотехнологічних підходів діагностики та зниження поширення збудників бактеріальних хвороб для біологічного вирощування томатів.

Для досягнення поставленої мети слід було вирішити наступні завдання:

- обґрунтувати цілісну концепцію комплексних заходів захисту рослин томатів від бактеріальних хвороб на основі використання біотехнологічних підходів;
- розробити біометод оцінки і добору стійких сортів томатів до збудників *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* та *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*;
- оцінити вплив природних шляхів поширення і збереження збудників бактеріальних хвороб в посівах томатів в Україні;

- удосконалити систему скринінгових тестів для ідентифікації збудників бактеріальних хвороб і вивчення патогенності, морфолого-культуральних та біохімічних ознак;

- розробити молекулярно-біологічну методику діагностики із підбором праймерів до високоспецифічних геномних ділянок збудників чорної бактеріальної плямистості, бактеріальної крапчастості та бактеріального раку томатів (гени *hrp*, *cfl*, *pat-1*);

- встановити специфіку поширення бактеріальної інфекції в тканинах генеративних органів рослин томатів;

- оцінити ступінь активності антиоксидантної системи в рослинах томатів за дії індуктора стійкості і хімічних та біологічних препаратів;

- обґрунтувати можливість використання хімічних і біологічних препаратів проти збудників бактеріальних хвороб;

- провести скринінг мікроорганізмів і виявити екологічно безпечні штами антагоністів проти збудників бактеріальних хвороб.

*Об'єкт дослідження* – біотехнології відбору сортів томатів з різним ступенем стійкості до бактеріальних хвороб, захисні реакції рослин томатів, генетипові і фізіолого-біохімічні властивості збудників.

*Предмет дослідження* – сорти томатів, збудники бактеріальних хвороб та способи обмеження ступеня їхнього поширення.

**Методи дослідження:** біотехнологічні методи – культура соматичних тканин і клітин, ембріокультура, клональне мікророзмноження, клітинна селекція *in vitro*; молекулярно-генетичні – полімеразна ланцюгова сайт специфічна реакція; лабораторні – визначення ступеня й розвитку ураження рослин томатів хворобами бактеріальної етіології; мікробіологічні – виділення збудників у чисту культуру, визначення їхньої патогенності і чутливості до хімічних та біологічних засобів захисту рослин; біохімічні – визначення вмісту хлорофілу, поліфенолів, флавоноїдів, активність пероксидази, антиоксидантної системи, мікротомія рослинних матеріалів, гістохімічний аналіз тканин, світлова та люмінесцентна мікроскопія.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Основні положення дисертаційної роботи, які визначають наукову новизну результатів, полягають у наступному:

- вперше розроблено технології комплексного захисту рослин томатів від бактеріальних хвороб на основі використання біотехнологічних підходів;

- запропоновано біотехнологічну схему відбору сортів рослин томатів з підвищеною стійкістю одночасно проти збудників бактеріальної плямистості *Xanthomonas vesicatoria*, бактеріального раку *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* і бактеріальної крапчастості томатів *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Виявлено підвищену стійкість сортів томатів проти фітотоксичних метаболітів в умовах *in vitro* та *in vivo*;

- в умовах України виявлено і охарактеризовано збудники чорної бактеріальної плямистості *Xanthomonas vesicatoria*, бактеріального раку *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* і бактеріальної крапчастості томатів *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*;

– вперше визначено наявність бактерій-епіфітів у складі мікробіоти насіння томатів з антагоністичною активністю щодо фітопатогенів даної культури;

– встановлено, що уражені і здорові представники сегетальної рослинності у посівах томатів є акумуляторами високоагресивних штамів бактерій *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava* та *Xanthomonas* sp., які є збудниками хвороб томатів та широкого спектру овочевих культур;

– вперше розроблено молекулярно-біологічну методику ідентифікації збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчатості і бактеріальної плямистості в насінні та уражених рослинах томатів;

– вперше з'ясовано, що під дією фітотоксичних метаболітів *Xanthomonas vesicatoria* і *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* відбувається трансформація клітин калюсу томатів, що проявлялася в просочуванні суберином й інтенсивному наповненні компонентами лігніну тангентальних і фронтальних антиклінальних стінок, накопиченні в протопластах густого секрету полісахаридної природи та утворенні нових внутрішньоклітинних кластерів, які створюють тканинні бар'єри для поширення бактеріальної інфекції в здорові тканини;

– вперше визначено специфічний процес у калюсах томатів за інокуляції збудником *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* з виділенням чіткої межі між ураженою і неураженою частинами без ознак реакцій індукованого імунітету, доведено що тип захисної системи калюсних тканин є реактивним;

– встановлено зв'язок між складом жирних кислот ліпідів і адаптацією калюсних тканин томатів до бактеріального стресу, що, значною мірою, виявляється в збільшенні кількості ненасичених жирних кислот в результаті активації ацил-ліпідних  $\omega$ 6- та  $\omega$ 3-хлоропластних десатураз;

– доведено можливість застосування індуктора стійкості саліцилової кислоти в захисті рослин томатів від збудників бактеріальних хвороб, яка виявляє стимулювальний вплив на морфометричні показники і антиоксидантну активність;

– виявлено закономірності формування антибактеріальної активності препаратів з діючими речовинами манкоцеб, фосфіт алюмінію і фосфориста кислота для обмеження ступеня розвитку збудників бактеріального раку, чорної бактеріальної плямистості та бактеріальної крапчатості рослин томатів;

– отримали подальший розвиток створення сортів томатів резистентних проти бактеріальних хвороб;

– отримали подальший розвиток методологічні підходи дослідження механізмів стійкості внутрішньоклітинних компартментів томатів проти бактеріальних хвороб на різних рівнях організації рослинного організму.

**Практичне значення одержаних результатів.** У процесі вирощування екологічно безпечної овочевої продукції доцільно використовувати науково-методичні підходи, які викладені в роботі здобувача, що дозволяє враховувати особливості комплексного захисту томатів від бактеріальних хвороб на основі біотехнологічних підходів. Розроблено науково-методичні рекомендації з виявлення і ідентифікації збудника бактеріальної крапчатості рослин томата

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, які запропоновано фахівцям у галузі біотехнології, мікробіології, спеціалістів карантинної та насінневої інспекції України.

Науково обґрунтовано і розроблено біотехнологічну схему відбору сортів томатів з підвищеною біологічною стійкістю проти бактеріального раку, бактеріальної крапчастості й чорної бактеріальної плямистості в умовах *in vitro*, яка дозволяє в обмеженому часі й просторі обирати сорт з низьким сприйняттям бактеріальних метаболітів, а також вирощувати їх в господарствах України в умовах ризику ураження *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* та *Xanthomonas vesicatoria*.

Вперше запропоновано алгоритм індукування механізмів захисту рослин. Розроблено методичні рекомендації щодо виробництва і комплексного застосування мікробіологічних препаратів у захисті рослин від бактеріальних хвороб томатів. Рекомендовано застосування біопрепаратів Фітохелп і Фітоцид на основі бактерій *Bacillus subtilis* в інтегрованій системі комплексного захисту рослин томатів. Впроваджено у профільних і навчальних лабораторіях молекулярно-генетичний метод ідентифікації збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчатості й бактеріальної плямистості в насінні та уражених рослинах томатів.

Результати дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі вищих навчальних закладів під час викладання дисциплін «Загальна біотехнологія», «Біоінженерія», «Екологічні біотехнології» і «Молекулярна біотехнологія» з наряду підготовки спеціалістів «Біотехнологія».

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачу належить постановка проблеми, визначення мети і завдань дослідження, розроблення теоретико-методологічних й методичних підходів при біотехнологічних, біохімічних і молекулярно-генетичних дослідженнях патогенезу, діагностики та регуляції збудників бактеріальних хвороб томатів. Викладені у дисертаційній роботі наукові результати, положення, висновки і рекомендації виконано здобувачем особисто і є її науковим доробком. У роботах, які опубліковано у співавторстві, особистий внесок здобувача полягає у визначенні завдань, виборі методів, проведенні аналізів, обговоренні результатів і їх інтерпретації, узагальненні експериментальних даних, формулюванні висновків та написанні статей. Здобувачем самостійно проаналізовано теоретичні і практичні положення, підготовлено текст дисертації й науково обґрунтовано висновки та здійснено математично-статистичну обробку отриманих даних.

**Апробація результатів дисертації.** Основні теоретичні положення, висновки і рекомендації дисертаційного дослідження презентовано і обговорено на II Міжнародній науковій конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» (м. Харків, 2011 р.); V Міжнародній конференції молодих вчених, присвяченій 160-річчю від дня народження професора Ф. М. Каменського «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція» (м. Одеса, 2011 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 50-річчю заснування факультету захисту рослин «Захист рослин: наука, освіта, інновації в умовах глобалізації» (м. Київ,

2012 р.); VII і VIII міжнародних конференціях молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (м. Харків, 2012, 2013 рр.); Міжнародній науково-практичній конференції «Клеточная биология и биотехнология растений» (м. Мінськ, Республіка Білорусь, 2013 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Глобализация науки: проблемы и перспективы» (м. Уфа, Російська Федерація, 2014 р.); державній науково-практичній конференції «Сучасні агробіотехнології та землеустрій в Україні» (м. Біла Церква, 2015 р.); II Міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Інноваційні технології та інтенсифікація розвитку національного виробництва» (м. Тернопіль, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Карантин та інтегрований захист рослин. Перспективи розвитку в XXI столітті» (м. Київ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Модернізація національної системи управління державним розвитком: виклики і перспективи» (м. Тернопіль, 2015 р.); X і XV міжнародних конференціях «Развитие науки в XXI веке» (м. Харків, 2015, 2016 рр.); V Міжнародній науково-практичній конференції «Рослини та урбанізація» (м. Дніпропетровськ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Ресурсозберігаючі технології та їх правова і економічна оцінка в сільськогосподарському виробництві» (м. Київ, 2016 р.); II Міжнародній науковій конференції «Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21<sup>st</sup> century» (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Овочівництво і баштанництво: історичні аспекти, сучасний стан, проблеми і перспективи розвитку» (м. Крути, 2016 р.); IV Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (с. Центральне, 2016 р.); Міжнародній науковій конференції «Селекційно-генетична наука і освіта» (м. Умань, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Стан та перспективи розвитку виробництва органічної продукції» (с. Селекційне, 2016 р.); XII Міжнародній науковій та практичній конференції daRostim 2016 «Biotechnology for agriculture and environmental protection» (м. Одеса, 2016 р.); II Міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Сучасні проблеми агроєкології» (м. Миколаїв, 2016 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції «Світові рослинні ресурси: стан та перспективи розвитку» (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Актуальні проблеми та перспективи інтегрованого захисту рослин» (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Стан і перспективи розробки та впровадження ресурсоощадних, енергозберігаючих технологій вирощування сільськогосподарських культур» (м. Дніпро, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Microbial Biodiversity: current problems and solutions» (м. Астана, Республіка Казахстан, 2016 р.); XV з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Одеса, 2017 р.); VI Міжнародній науково-практичній конференції «Рослини та урбанізація» (м. Дніпро, 2017 р.); XV з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Одеса, 2017 р.).



**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 69 наукових праць, із яких монографія, 13 статей у наукових фахових виданнях України, 10 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 3 статті в наукових виданнях інших держав, 4 статті в виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 7 статей в інших наукових виданнях, 28 тез наукових доповідей, 3 науково-методичні рекомендації.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 400 сторінках і складається з анотацій, вступу, огляду літератури, об'єктів і методів дослідження, шести експериментальних розділів, узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаної літератури та додатків. Основний текст містить 58 таблиць та 69 рисунків. Список цитованої літератури включає 651 джерело (з них 397 латиницею).

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПІДХОДІВ В РЕГУЛЯЦІЇ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ ТОМАТІВ (огляд літератури)**

Проаналізовано сучасний стан і новітні біотехнологічні розробки в галузі клітинних технологій для розв'язання практичних задач, які пов'язані із клітинною селекцією томатів на стійкість проти збудників бактеріальних хвороб. Висвітлено механізми стійкості рослин томатів у відповідь на чинники патогенності збудників бактеріальних хвороб. Показано, що розвиток інноваційних біотехнологій у екологічному вирощуванні томатів залежить від знань про біологічні, генетичні характеристики, симптоми і шкідливість, джерела інфікування та збереження збудників бактеріальних хвороб томатів у природних умовах. Виділено основні тенденції та найперспективніші наукові напрями за темою дисертації.

### **ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Досліджено 16 сортів томатів: Чайка, Малиновий дзвін, Флора, Клондайк, Елеонора, Оберіг, Атласний, Зореслав, Господар, Кіммерієць, Дама, Легінь, Любимий, Талан, Фландрія та Кумач, які занесено до Державного реєстру рослин, що придатні для вирощування в Україні і стійкі проти основних грибних хвороб. В експериментах використано штами збудників бактеріальних хвороб томатів, отримані з Інституту пестицидів та захисту рослин (Сербія) і колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України.

Для визначення ступеня стійкості сортів томатів проти збудників бактеріальної крапчастості, чорної бактеріальної плямистості та бактеріального раку як селективний чинник застосовували суспензію бактеріальних клітин (20 млрд кл./мл), які прогрівали за температури 100 °С протягом 2,5 год. З метою прискореного одержання рихлого калюсу живильне середовище Мурашіге і Скуга (МС) доповнювали 8,0 мг/л 6-бензиламінопурину й 4,0 мг/л індолілоцтової кислоти. Для відбору калюсних клітин томатів селективні

чинники вносили в середовище в концентрації 0,4 %; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0 і 10,0 % та культивували за температури  $25\pm 2$  °C без освітлення. Після 4 тижнів вирощування підраховували приріст калюсної маси і життєздатні колонії. Відбір калюсних колоній здійснювали методом змішування з агаром в триразовій повторності (Сидоров В. А., 1990).

Ізолювання бактерій з відібраних зразків і визначення їхніх патогенних властивостей здійснювали шляхом штучного зараження рослин томатів у лабораторних умовах згідно рекомендацій К. Г. Бельтюкової та ін. (1968). Здатність індукувати реакцію надчутливості визначали введенням суспензії бактеріальних клітин  $1\times 10^7$  КУО/мл під епідерміс листків тютюну (Klement Z. Et al., 1990). Морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості виділених бактерій визначали з використанням класичних методів (Бельтюкова К. Г. та ін., 1968; Klement Z. et al., 1990; Патица В. П. та ін., 2014). Морфологію бактеріальних колоній вивчали на картопляному агарі і встановлювали колір, форму колоній та їхню консистенцію. Здатність утилізувати вуглеводи як джерело вуглецю здійснювали на середовищі Гіса з індикатором бромтимол синій. Для виявлення у бактерій протеолітичних ферментів використовували м'ясо-пептонний бульйон. Для встановлення наявності пектолітичних ферментів вивчали здатність ізолятів мацерувати шматочки картоплі в стерильних умовах вологої камери (Бельтюкова К. Г. и др., 1968).

Визначення жирнокислотного складу загальних клітинних ліпідів здійснювали згідно методики Brian V. L. (1967). Розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали на хромато-маспектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert. Серологічні властивості виділених бактерій досліджували з використанням реакції аглютинації і антисывороток до штамів фітопатогенних бактерій, які одержано із зернових культур (Патица В. П. та ін., 2014).

Виділення ДНК із чистих культур штамів здійснювали за допомогою реактивів ДНК-сорб-Б («АмплиСенс», Російська Федерація), рослинних тканин томатів з ознаками бактеріального ураження – за допомогою реактивів ДНК-сорб-С («АмплиСенс», Російська Федерація). Для діагностики бактеріального раку *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* використовували специфічні праймери СММ5-СММ6, бактеріальної крапчастості *P. syringae* pv. *tomato* – P1-P2 і чорної бактеріальної плямистості *X. vesicatoria* – RST2-RST3. Продукти ПЛР аналізували в 1,7 % агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мл). Розміри продуктів ампліфікації оцінювали за допомогою маркерів молекулярної маси GeneRuler 100 bp DNA Ladder та GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

Анатомо-гістологічні дослідження бактеріального патогенезу тканин квіток і плодів виконували за стандартними протоколами із застосуванням люмінесцентного мікроскопа AxioScope 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 концентраціях спиртів, які потім 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, яка модифікована Фрустом (Паушева З. П., 1988).

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

Чутливість фітопатогенних бактерій до різних доз хімічних та біологічних препаратів виявляли за інтенсивністю росту на картопляному агарі з доданими до нього препаратами в дозах, які рекомендовано виробником. Взаємовідносини між бактеріями вивчали методом перпендикулярних штрихів (Егоров Н. С., 1957). Фітотоксичність виділених ізолятів визначали за впливом суспензії бактеріальних клітин на енергію проростання та лабораторну схожість насіння томатів (Берестецкий О. А., 1978).

Активність ферменту пероксидази в проростках сортів томатів вимірювали спектрофотометричним методом за оптичною густиною продуктів реакції, які утворилися за умов окиснення бензидину (Паушева З. П., 1988). Розчинні поліфеноли враховували за методом Folin Ciocalteu в модифікації Singleton Rossi. Визначення суми флавоноїдів здійснювали спектрофотометричним методом і одночасно аналізували калібрувальну криву за кверцетином. Катехіни вимірювали спектрофотометричним методом за допомогою 9 н  $H_2SO_4$  та 1 % ваніліну з утворенням стабільних комплексів. Антиоксидантну активність фенолів встановлювали за модифікованим методом Блуа та Бранд-Вільямса з оцінки антиоксидантної активності сполук та екстрактів (Починок Х. Н., 1976)

Вміст сухої речовини в дозрілих плодах томатів визначали гравіметричним методом, цукрів – за Бертраном, вітаміну С (аскорбінової кислоти) – згідно Муррі, загальної кислотності – титруванням витяжки розчином лугу, нітратів – потенціометрично за допомогою іонселективного електрода, цукрово-кислотний коефіцієнт – за співвідношенням цукрів та кислотності плодів (Гончар О. М., 2000). Статистичний аналіз результатів здійснювали за допомогою пакета прикладних програм STATISTICA v.6.0.

## **РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

### **ПОШИРЕННЯ, ЗБЕРЕЖЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДЛЕНИХ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ ТОМАТІВ**

Опрацьовано дані фітосанітарної інспекції з поширеності бактеріальних хвороб томатів за 2013–2016 рр. Наявність збудників бактеріальних хвороб томатів характерна для більшості областей України. Останніми часами в Донецькій, Рівненській, Житомирській, Сумській, Тернопільській,

Хмельницькій і Волинській областях не виявлено збудників бактеріальних хвороб. Для господарств даних областей характерна поширеність грибних хвороб, таких як фітофтороз, фузаріозне в'янення, септоріоз та альтернаріоз.

Зокрема, у 2013 р. розвиток бактеріальних хвороб прослідковувався максимальним у Вінницькій області і становив 21–30 %, Чернігівській, Київській й Миколаївській областях – 16–20 %, тоді як в інших областях вирощування томатів не перевищував 10 %. У 2014 і 2016 рр. збільшення розвитку бактеріальних хвороб було характерним для Закарпатської та Івано-Франківської областей. Максимальні його значення виявлено в Миколаївській області у 2014–2015 рр. У 2015 р. розвиток бактеріальних хвороб томатів в діапазоні 11–20 % встановлено у Вінницькій, Черкаській, Чернігівській і Дніпропетровській областях (рис. 1).

У Київській, Херсонській, Запорізькій і Дніпропетровській областях на посадках томатів домінуючими бактеріальними хворобами були чорна бактеріальна плямистість, бактеріальна крапчастість та бактеріальний рак. Розвиток хвороби рослин томатів протягом вегетації збудником чорної бактеріальної плямистості становив 5,5–34,7 %, бактеріального раку – 3,2–30,5 та бактеріальної крапчастості – 8,3–33,4 %. Вивчення динаміки бактеріальних хвороб томатів показало, що найінтенсивніше їхній розвиток відбувається в другій половині вегетації, що пов'язано з середньодобовою температурою (21–24 °С) і відносною вологістю повітря (понад 70 %). Таке явище пояснюється також накопиченням достатньої кількості інфекції, загущенням посадок томатів і утриманням вологи на адаксіальному боці рослин.

На уражених рослинах томатів виявлено типові симптоми для збудників чорної бактеріальної плямистості, бактеріальної крапчастості та бактеріального раку (рис. 2, 3, 4).

**Бактеріальна мікрофлора насіння томатів.** Найбільшу кількість типів ізолятів виділено із необробленого фунгіцидом насіння сорту Чайка, зокрема 1 ізолят із сірувато-білими, 3 – із рожевими і 11 – із жовтими (від кремового до оранжевого) колоніями. Мікрофлора насіння сортів томатів Флора, Господар, Кіммерієць, Дама і Фландрія також відзначалася різноманітним видовим складом. З даних сортів томатів виділено 36 ізолятів жовтого кольору та 12 – сірувато-білого. Найменший видовий склад визначено у мікробіоти із насіння сортів Клондайк, Любимий та Кумач. Із насіння сорту Клондайк відібрано 1 ізолят із жовтими колоніями і 2 – бежевого кольору.

Ідентифіковано як представники роду *Pseudomonas* ізоляти (ІЗ-70, ІЗ-76, ІЗ-78), які є аеробними рухливими паличками і утворюють флуоресцентний пігмент й не формують спор. Жовтопігментні колонії на основі морфологічно-культуральних властивостей ідентифіковано як *Xanthomonas*.

За обробки насіння сортів томатів протруйником з діючими речовинами 200 г/л карбоксилу і 200 г/л тіраму відбувалось відчутне зменшення чисельності і видового складу мікроорганізмів (рис. 5).

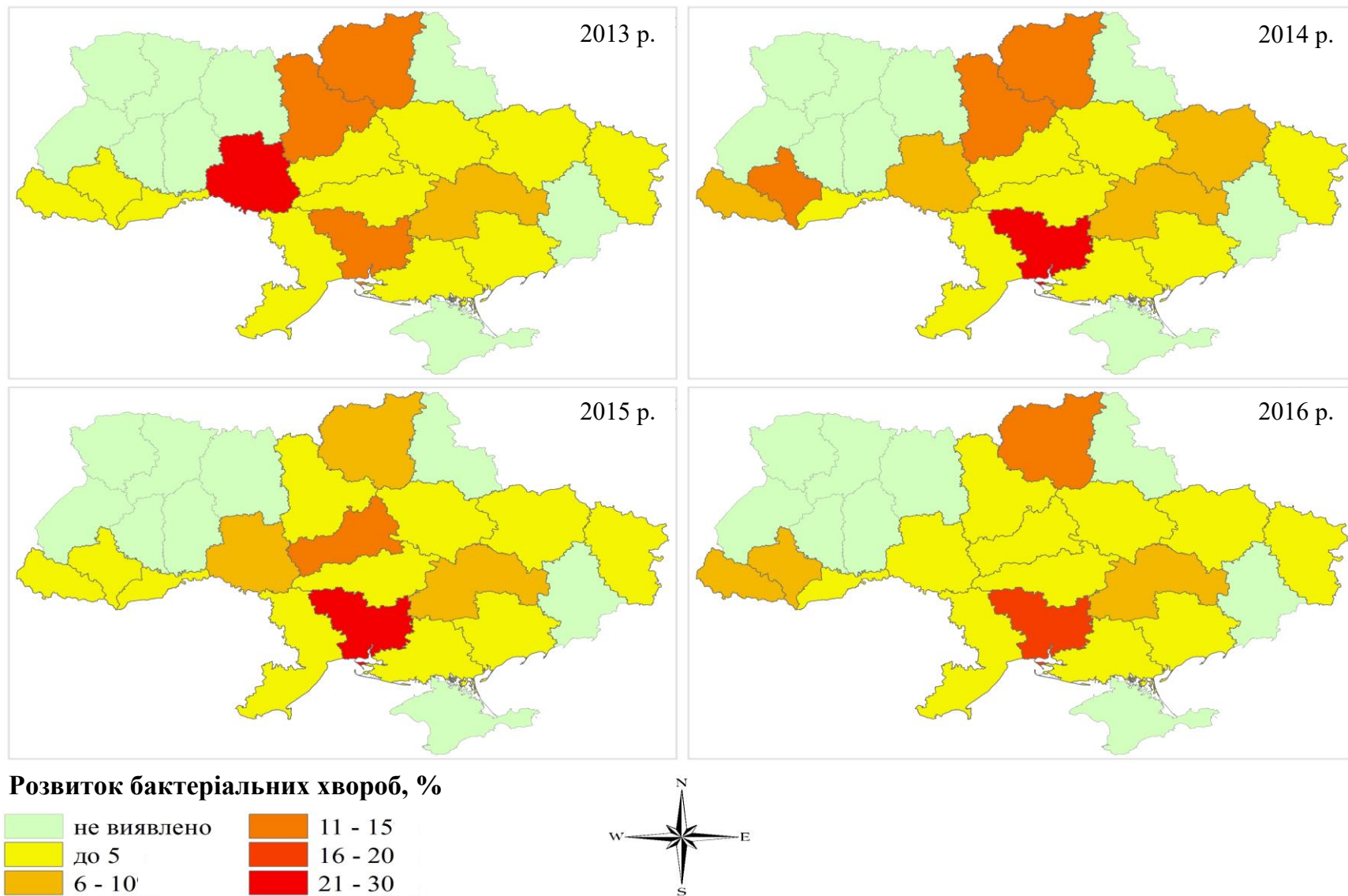


Рис. 1. Поширеність і розвиток бактеріальних хвороб томатів в областях України протягом 2013–2016 рр. заданими фітосанітарної інспекції

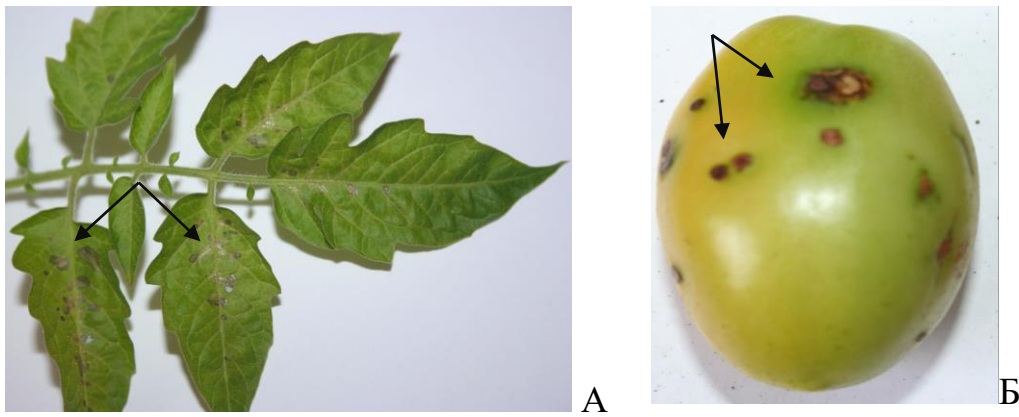


Рис. 2. Симптоми чорної бактеріальної плямистості на поверхні листкових пластинок та плодів томатів: А – темні плями розміром 3–5 мм; Б – плями випуклої форми.



Рис. 3. Симптоми бактеріального раку на поверхні листкових пластинок та плодів томатів: А – некротичні зони по краю листка; Б – плями з водянистими краями і запалим центром.

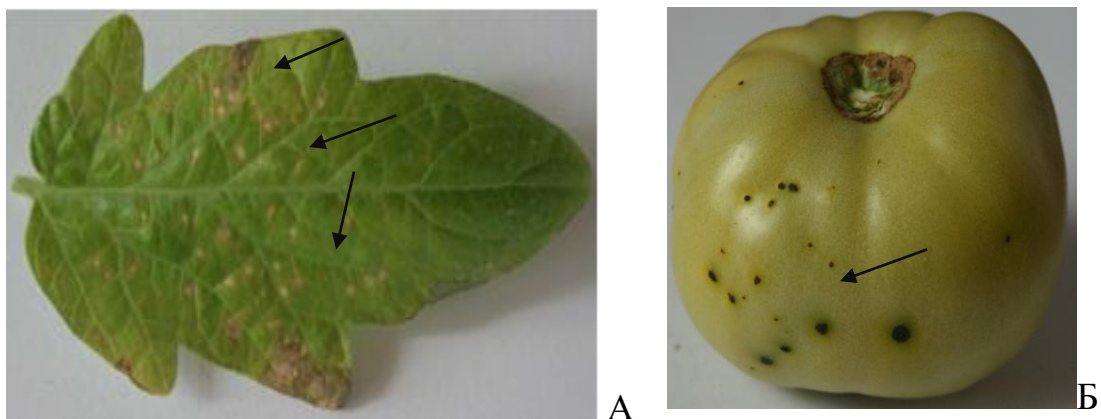


Рис. 4. Симптоми бактеріальної крапчастості на поверхні листкових пластинок та плодів томатів: А – коричневі плями розміром 2–3 мм; Б – дрібні опуклі крапки 1–5 мм.

Для обробленого насіння сортів томатів було характерно лише чотири типи колоній: бежевого кольору з рівними краями випуклої форми і нерівними плоскої, а також плоскі та випуклі сірувато-білого кольору з рівними краями. Патогенні для томатів бактерії виділено з обох зразків насіння томатів.



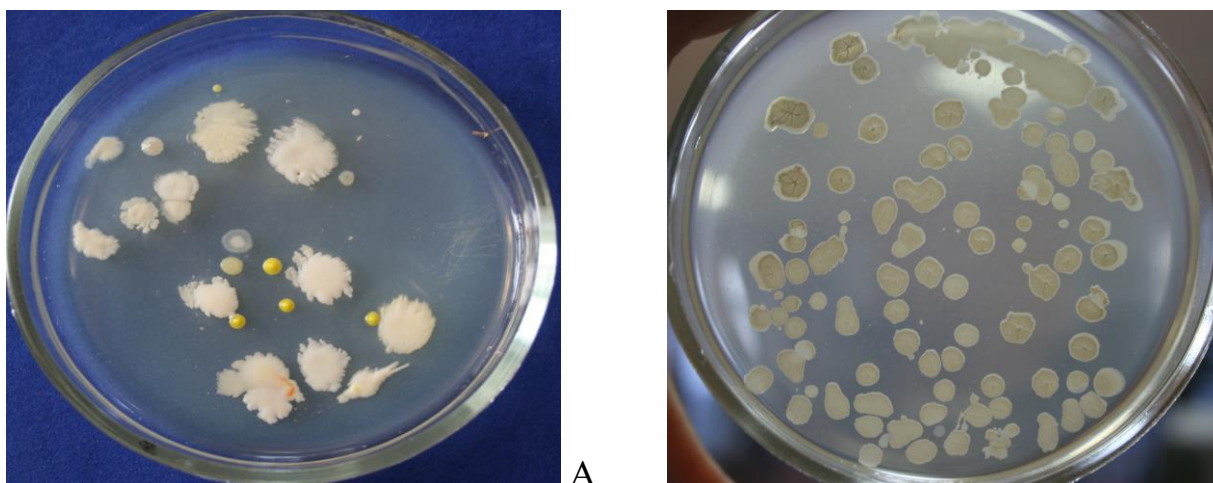


Рис. 5. Мікрофлора із необробленого (А) і обробленого (Б) фунгіцидом насіння томата сорту Чайка

Отже, патогенні для томатів бактерії роду *Pseudomonas* і *Xanthomonas* виявлено на обох досліджуваних зразках насіння, яке є живильним субстратом для життєдіяльності та збереження патогенних мікроорганізмів.

**Специфіка поширення бактеріальної інфекції в тканинах генеративних органів томатів.** Встановлено, що поширення бактерій по тканинах плодів відбувається латерально від провідних пучків з транспортом цукрів і інших поживних речовин по клітинах паренхіми. Оскільки для бактерій характерним є позитивний хемотаксис у векторі градієнта концентрації цукрів, це свідчить про те, що рух транспортних цукрів є важливим чинником, який забезпечує бактерії енергією. Міжклітинний транспорт речовин відбувається відповідно до структури тканин і клітин, які задіяні в транспортних мережах, концентрація цукрів в яких дещо вища. Це створює додаткові умови для спрямованого руху бактерій не спонтанно, а відповідно певних внутрішніх закономірностей. З одного боку здатність тканин перешкоджати руху бактерій і пригнічувати їхню життєдіяльність, з іншого – внутрішні енергетичні ресурси, які зосереджені в тканинах і органах рослин, відіграють роль аттрактантів й живлять мікроорганізми (рис. 6).

Патогенні мікроорганізми в тканини насінневих зачатків проникають через фунікулус та провідні пучки. При фарбуванні тканин акридиновим оранжевим у клітинах з ознаками патогенної трансформації методом люмінесцентної мікроскопії виявлено скупчення бактерій паличковидної форми. Клітинні стінки здорових клітин флуоресціюють жовто-зеленим кольором.

Отже, у результаті гістохімічних та цитологічних досліджень встановлено, що збудники бактеріальних хвороб можуть активно заражати насіння томатів, як системно через ксилему, так і ззовні через зараження плоду. Збудники виявляються в насінні, ендоспермі й фунікулусі, хоча і не в таких кількостях як у клітинах ксилеми. Отримані результати підкреслюють труднощі виявлення невеликих початкових популяцій патогенів у партіях насіння, а отже і необхідність всебічного контролю якості насінневого матеріалу на наявність збудників бактеріальних хвороб.

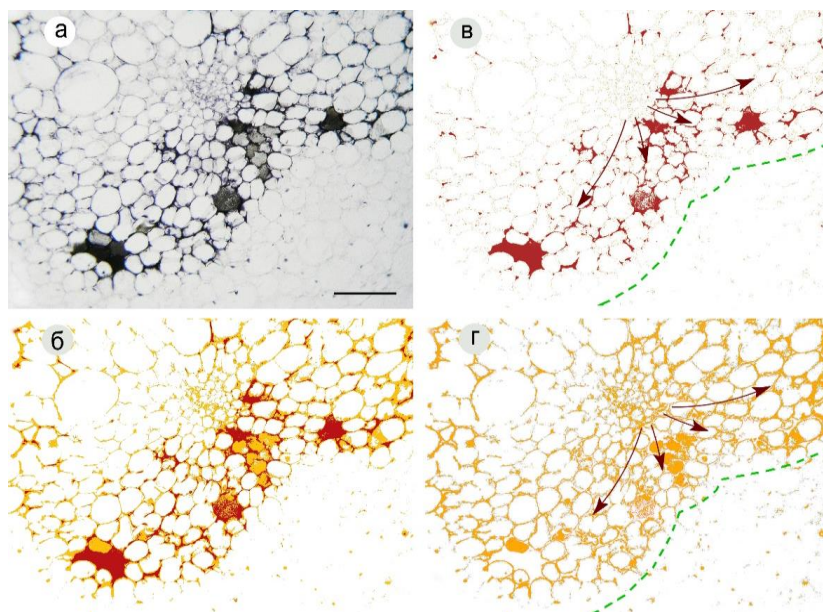


Рис. 6. Вектори поширення патогенних бактерій у тканинах плодів томатів (а, б, в, г)

Примітка. Пунктиром позначено наявність специфічного бар'єру, який не має чітких гістохімічно виражених ознак.

**Сегетальна рослинність як резерватори фітопатогенних бактерій.** У посівах томатів виявлено і описано бактеріальні ураження бур'янів пирію повзучого, щиряці звичайної, фізалісу опушеного й дурману звичайного, водночас ідентифіковано їхні збудники. Із зразків уражених і здорових рослин ізолювано й ідентифіковано фітопатогенні бактерії *Xanthomonas sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas sp.* та *Pseudomonas viridiflava*. Переважна кількість штамів роду *Pseudomonas* і *Xanthomonas*, які ізолювано з уражених тканин пирію, щиряці, фізалісу й дурману була високоагресивна по відношенню до томатів, перцю та баклажанів. Ізоляти, які віднесені до *P. syringae*, кількісно переважали серед виділених бактерій і відзначалися високою агресивністю. За умов штучного зараження даних культур бактерії зумовлювали типові для бактерій роду *Pseudomonas* і *Xanthomonas* симптоми ураження (рис. 7).

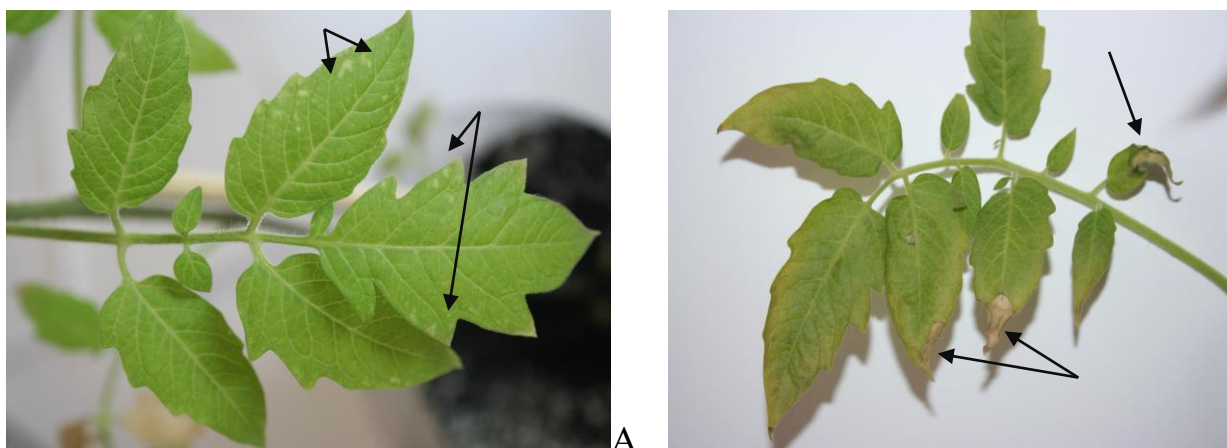


Рис. 7. Симптоми штучного зараження рослин томатів ізолятами бактерій, які виділено з бур'янів: А – *Pseudomonas syringae*; Б – *Xanthomonas sp.*



Стає очевидним, що бур'яни є екологічною нішею для життєдіяльності фітопатогенних бактерій, які уражують значну кількість овочевих культур. Саме такий широкий фронт екологічних ніш виживання фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* і *Xanthomonas* є причиною їхнього широкого розповсюдження в природі.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ОСНОВНИХ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ РОСЛИН ТОМАТІВ

**Ідентифікація збудника чорної бактеріальної плямистості *Xanthomonas vesicatoria*.** Видову належність виділених ізолятів підтверджено даними щодо жирнокислотного складу. З'ясовано, що профілі клітинних ліпідів штамів *X. vesicatoria* ІЗ-10, ІЗ-11, ІЗ-15, ІЗ-17, ІЗ-20, ІЗ-23, ІЗ-25, ІЗ-30 і ІЗ-31 складаються з жирних кислот від  $C_{14}$  до  $C_{18}$ . Для ізолятів характерна наявність значної кількості розгалужених жирних кислот ( $i-C_{13:0}$  3-ОН,  $i-C_{15:0}$ ,  $a-C_{15:0}$ ,  $i-C_{16:0}$  і  $a-C_{17:0}$ ), а нерозгалужені  $C_{16:1}$  *cis* 9 та  $C_{16:0}$  становлять максимальну частку від загального профілю. Жирнокислотний склад сумарних клітинних ліпідів виділених ізолятів корелює з результатами морфологічного та біохімічного аналізу.

Для впровадження молекулярно-діагностичних систем на території України вперше рекомендовано використання праймерів специфічних до регуляторної ділянки гена *hrp B*. ПЛР аналіз ДНК *X. vesicatoria* колекційного штаму 9098 і виділених штамів *X. vesicatoria* з праймерами RST2 й RST3 виявив у бактерій фрагмент ДНК очікуваного розміру – 840 п. н. ПЛР-продукт аналогічного розміру (840 п. н.) було виявлено також у спектрах ампліфікації ДНК інфікованих польових рослин та бактерій колекційного штаму *X. vesicatoria* 9098.

Таким чином, виявлено чорну бактеріальну плямистість томатів, а також виділено й ідентифіковано збудника *X. vesicatoria*.

**Ідентифікація збудника бактеріального раку *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.** Дослідження жирнокислотного складу загальних клітинних ліпідів типових колекційних і виділених штамів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* показали наявність жирних кислот з довжиною вуглецевого ланцюга від  $C_{14}$  до  $C_{18}$ , зокрема з насичених 12-метил-тридеканова ( $i-C_{14:0}$ ), ізо-13-метил-тетрадеканову ( $i-C_{15:0}$ ), антеізо-12-метил-тетрадеканову ( $a-C_{15:0}$ ), пентадеканову ( $C_{15:0}$ ), ізо-14-метил-пентадеканову ( $i-C_{16:0}$ ), гексадеканову ( $C_{16:0}$ ), антеізо 14-метил-гексадеканову ( $a-C_{17:0}$ ) та октадеканову кислоти ( $C_{18:0}$ ).

Специфічний ПЛР-аналіз колекційних і виділених штамів з парою праймерів СММ5-СММ6 дозволив виявити очікуваний продукт ампліфікації розміром 614 п. н. Даний фрагмент локалізований на послідовності ДНК гена *pat-1*, що кодує ендонуклеази і є одним з регуляторних чинників, який спричиняє в'янення рослин. ПЛР аналіз ДНК з уражених судин стебла рослин томатів дозволив виявити ампліфікаційний фрагмент розміром 614 п. н. Стає очевидним, що ізоляти за морфологічними, фізіолого-біохімічними і молекулярними властивостями ідентичні виду *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Праймери СММ5 і СММ6 можуть бути використані для

достовірного виявлення збудника бактеріального раку *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* та створення на їхній основі діагностичної тест-системи.

**Ідентифікація збудника бактеріальної крапчастості *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.** За жирнокислотним складом виділені ізоляти виявились подібними до колекційних штамів. Проведеними дослідженнями підтверджено, що у клітинних ліпідах виділених штамів *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-9, ІЗ-13, ІЗ-28 і ІЗ-46 домінуючими є гексадеканова, гексадеценова та октадеценова жирні кислоти.

Виділені з томатів штами виявляли серологічну спорідненість з антисывороткою до типового штаму R140 *P. syringae* різних серогруп. Високий титр в реакції аглютинації досліджуваних штамів з антисывороткою до представника серогрупи IV свідчить щодо їхньої належності до серогрупи IV за схемою серогруповання бактерій *P. syringae*.

У результаті ПЛР з ДНК бактерій колекційного штаму *P. syringae* pv. *tomato* Darrg-4 213 і виділених штамів *P. syringae* pv. *tomato* та праймерами P1 й P2 відбувалось утворення ПЛР-продуктів розміром 650 п. н. ПЛР-аналіз зразків ДНК, виділених з уражених рослин томатів із цими праймерами дозволив також виявити ПЛР-продукти очікуваного розміру у 650 п. н. Отже, використання ПЛР-аналізу з комбінацією праймерів P1–P2 є перспективним для ідентифікації бактерій виду *P. syringae* pv. *tomato* і забезпечує високий рівень специфічності як у випадку виділення ДНК із чистої культури, так і рослинної тканини.

**Мультиплексна ідентифікація збудників бактеріальних хвороб рослин томатів.** На основі одержаних результатів розроблено умови проведення мультиплексної реакції для виявлення збудників в уражених тканинах томатів, на основі таких параметрів як температура відпалу внесених у реакційну суміш пар праймерів та концентрації реагентів ПЛР-суміші. Оптимізована ПЛР дозволила отримати ампліфікаційні фрагменти відповідних розмірів і ідентифікувати всі три збудники в одній реакції (рис. 8).

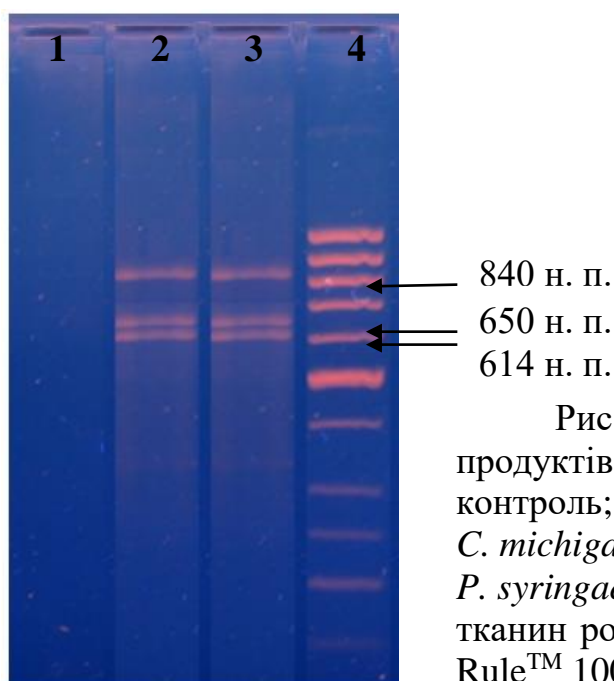


Рис. 8. Електрофореграма продуктів ПЛР: 1 – негативний контроль; 2, 3 – ДНК із уражених *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* тканин рослин томата; 4 – маркер Gene Rule™ 100bp DNA Ladder.

Таким чином, розроблено спосіб одночасного виявлення збудників чорної бактеріальної плямистості, бактеріального раку та бактеріальної крапчастості томатів методом мультиплексного ПЛР, що значним чином спрощує та знижує затратність робіт у профільних лабораторіях.

### **ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ ДЛЯ ОЦІНКИ ЯКОСТІ І СТІЙКОСТІ СОРТІВ ТОМАТІВ ПРОТИ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ**

**Регенерація рослин томатів через культуру калюсної тканини.** За аналізу приросту сирової маси калюсу і частоти калюсоутворення залежно від вмісту регуляторів росту в живильному середовищі дійшли висновку, що лише поєднання 6-БАП і ІОК у комбінаціях, які включали МС1 8,0 мг/л ІОК і 4,0 мг/л 6-БАП та МС2 0,8 мг/л ІОК і 0,4 мг/л 6-БАП, спричиняє утворення рихлого світло жовтого пасуємого калюсу з високими показниками. На всіх типах експлантатів формувалася калюса з частотою від 40 до 100 %. Справжні і сім'ядольні листки були ефективнішими експлантатами для отримання первинного калюсу порівняно з сегментами стебла. Частота індукції калюсоутворення за використання листкових експлантатів була максимальною і становила 86–100 %. Найвищий відсоток калюсоутворення відбувався на середовищі МС1. За умов формування первинного калюсу із справжніх листків частота калюсогенезу на середовищі МС1 дорівнювала 100 %, а приріст калюсної маси становив 0,70–1,53 г, тоді як на МС2 – 0,65–1,38 г. За використання сегментів стебла як первинного експлантату максимальна частота калюсогенезу становила 76 %. Стає очевидним, що тип експлантату визначає максимальні і мінімальні показники частоти калюсогенезу.

Встановлено, що з сегментів стебла формувалася інтенсивно обводнений рихлий і майже прозорий калюс пастельного кольору, із сім'ядольних листків – щільніший, менш обводнений світло-бурий калюс, що відзначається наявністю елементів диференціації. Такого ж типу калюс – щільний і світло-коричневий формувалася за використання експлантатів справжніх листків (рис. 9).

За перенесення калюсних тканин, які сформовані з різних експлантатів, на середовище для індукції морфогенезу встановлено достовірні відмінності в морфогенетичному потенціалі різних типів калюсу. Щільний і світло-коричневий морфогенний калюс, який сформований із справжніх листків, відзначався високою регенераційною здатністю. На 10–15 добу культивування відбувалося формування проростків і коренів, частота регенерації яких становила 68,5–85,0 % (рис. 10).

Отже, згідно результатів дослідження основна роль в індукції калюсо- і морфогенезу обумовлюється складом живильного середовища, вихідним генотипом і типом первинного експлантата рослин томатів, тому є необхідність у розробленні ефективної системи регенерації для кожного конкретного сорту томатів. Встановлені особливості калюсогенезу в культурі *in vitro* використано в розробленні біометоду оцінки стійкості сортів томатів проти збудників бактеріальних хвороб.

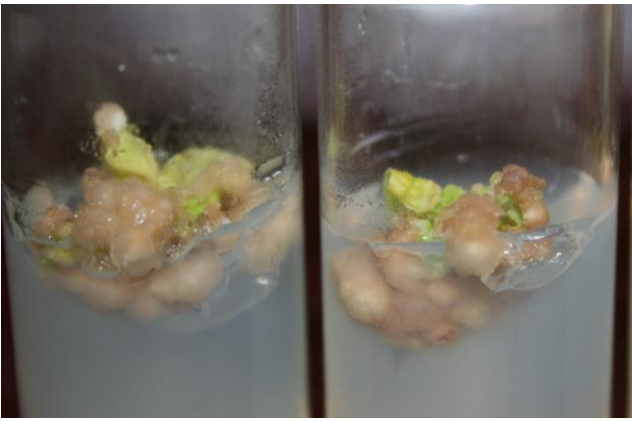


Рис. 9. Утворення калюсу із справжніх листків томатів

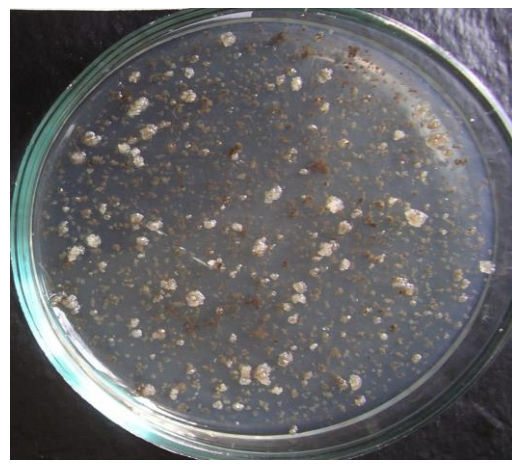


Рис. 10. Регенерація проростків томатів із морфогенного калюсу

**Біометод оцінки стійкості сортів томатів проти збудників бактеріальних хвороб за допомогою клітинної селекції.** Перевірено 16 детермінантних сортів томатів української селекції: Чайка, Малиновий дзвін, Флора, Клондайк, Елеонора, Оберіг, Атласний, Зореслав, Господар, Кіммерієць, Дама, Легінь, Любимий, Талан, Фландрія та Кумач на стійкість проти збудників бактеріальних хвороб в умовах *in vitro*. Для відбору калюсних клітин томатів прогріті клітини збудників вносили в живильне середовище МС в концентрації 0,4 %; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0 і 10,0 %. Наявність прогрітих клітин зумовлювало різке зменшення кількості утворених калюсних колоній порівняно з контролем, оскільки лише незначна частина агрегатів, завдяки генетичним або адаптаційним змінам, була здатна до поділу та проліферації у присутності метаболітів бактерій. Низька 0,4 % концентрація прогрітих клітин бактерій не виявляла значного токсичного впливу на життєздатність калюсної культури. Виживання клітин становило 30–45 %, що не дозволило здійснити відбір клітин на стійкість проти метаболітів бактерій. Починаючи з концентрації 0,8 %, відбувалося побуріння калюсної тканини та зменшення кількості життєздатних клітин (рис. 11).



А



Б

Рис. 11. Формування калюсних тканин рослин сорту томата Чайка: А – контроль; Б – 0,8 % прогрітих клітин *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* CFBR 4999.

Повне пригнічення розвитку калюсів спричиняла 10 % концентрація прогрітих клітин збудників. Сублетальними виявились концентрації від 0,8 до 6 % прогрітих клітин штамів *P. syringae* pv. *tomato* Pst2, *X. vesicatoria* 9098 і *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* CFBR 4999, за яких визначено 80–88 % зменшення життєздатних колоній залежно від сортових особливостей.

Водночас встановлено максимально-граничні концентрації селективних чинників для кожного сорту томата, а також відібрано колонії, які відзначаються активним приростом маси калюсу, що є однією із інтегральних характеристик стійкості рослин проти стресових чинників. Наявна методика в лабораторних умовах дозволяє достовірно визначати генотипи рослин томатів з більшим відсотком виживання калюсних клітин за високих концентрацій чинників бактеріального походження. Узагальнення отриманих даних свідчить про доцільність використання сортів томата Чайка, Клондайк і Зореслав в районах, де існує загроза поширення бактеріального раку, бактеріальної крапчастості й бактеріальної плямистості, Фландрія, Легінь – бактеріальної плямистості, а Оберіг, Атласний, Господар та Кіммерієць – бактеріальної крапчастості.

Отже, розроблений біометод на виявлення чутливості тканин до дії фітотоксичних метаболітів дозволяє швидко провести диференціацію сортів томатів за стійкістю проти збудників бактеріальних хвороб. Відібрані генотипи можуть слугувати вихідним матеріалом для створення стійких сортів томатів проти бактеріальних хвороб.

**Антиоксидантна активність рослин томатів за дії фітотоксичних метаболітів збудників бактеріальних хвороб.** У зв'язку з тим, що індуктори захисних реакцій біо- та абіогенної природи, які підвищують стійкість рослин за рахунок мобілізації їхніх природних механізмів, знаходять все більше застосування, вивчено вплив саліцилової кислоти. За додавання в живильне середовище саліцилової кислоти в низьких концентраціях виявлено її рістстимулюючий ефект на рослини сортів томатів Чайка і Малиновий дзвін за дії бактеріального стресу. Відбувалося достовірне зростання довжини пагонів на 1,4–13,1 % й коренів – на 7,7–20,0 %. Дія екзогенної саліцилової кислоти на рослини томатів залежала від її концентрації, але збільшення морфометричних показників рослин із підвищенням концентрації саліцилової кислоти у живильному середовищі не було прямопропорційним. Встановлена стимуляція ростових процесів рослин супроводжувалася кількісними змінами компонентів антиоксидантної системи (табл. 2).

Обробка рослин саліциловою кислотою підсилювала процеси біосинтезу фенольних сполук у клітинах за впливу фітотоксичних сполук збудника бактеріальної крапчастості томатів. За дії 4,0 % прогрітих клітин відбувалося підвищення кількості фенольних сполук у листках рослин сортів томата від 29,5 до 32,7 %. Обробка рослин саліциловою кислотою у концентраціях 0,5–5 мг/л посилювала накопичення розчинних фенолів, катехінів і флавоноїдів за умов бактеріального стресу. У листках рослин сортів томатів Чайка і Малиновий дзвін максимальні значення вмісту фенолів становили 15,11–17,00 мг/мл, катехінів 26,17–28,29 та флавоноїдів 6,37–7,15 мг/мл за

додавання 1 мг/л саліцилової кислоти. За високих концентрацій саліцилової кислоти 5 і 10 мг/л рівень фенольних сполук був меншим за контроль, що пов'язано з руйнуванням клітинних структур. Показано, що антиоксидантна активність фенолів у листках рослин сортів томата Чайка і Малиновий дзвін у контролі становила 5,54 й 4,72 мкМ-екв, на середовищі з 4,0 % прогрітих клітин *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 – 10,44 та 9,56 мкМ-екв (рис. 12). Такі перебудови пов'язані з рівнем генерації активних форм кисню у даних сортів томата, які відрізняються за ступенем стійкості проти фітопатогенних бактерій.

Таблиця 2

**Акумуляція вмісту фенольних сполук у листках рослин-регенерантів сортів томатів за дії саліцилової кислоти**

Варіант		Феноли, мг/мл	Катехіни, мг/мл	Флавоноїди, мг/мл
Прогріті клітини <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ІЗ-28, %	Саліцилова кислота			
<b>Чайка</b>				
–	–	6,72±0,07	4,61±0,03	4,56±0,03
4,0	–	9,99±0,05*	4,09±0,04*	4,76±0,05*
4,0	0,5	10,16±0,06*	10,72±0,05*	4,25±0,07*
4,0	1,0	17,00±0,05*	28,39±0,03*	7,15±0,03*
4,0	2,5	12,86±0,04*	15,43±0,08*	5,62±0,05*
4,0	5	7,72±0,08*	3,59±0,05*	3,50±0,07*
4,0	10	6,71±0,04	3,38±0,03*	1,79±0,07*
<b>Малиновий дзвін</b>				
–	–	5,23±0,07	3,77±0,06	3,86±0,05
4,0	–	7,42±0,05*	3,99±0,04*	4,12±0,03*
4,0	0,5	8,36±0,05*	9,63±0,04*	4,37±0,05*
4,0	1,0	15,11±0,03*	26,17±0,03*	6,37±0,03*
4,0	2,5	10,82±0,07*	13,88±0,06*	4,83±0,04*
4,0	5	6,48±0,07*	3,25±0,05*	3,12±0,06*
4,0	10	5,22±0,02	3,12±0,03*	2,88±0,03*

Примітка. \*зазначено статистично достовірні відмінності між експериментом і контролем ( $p < 0,05$ ), результати представлені як  $M \pm n$ ,  $n=3$

У листках рослин за сумісної дії саліцилової кислоти і фітотоксичних метаболітів *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 антиоксидантна активність фенолів у сорту Чайка підвищувалася на 4,94–7,04 мкМ-екв порівняно з контролем, Малиновий дзвін – 4,86–7,16 мкМ-екв. В цілому, порівняння показників вмісту компонентів і активності антиоксидантної системи свідчить про можливість використання саліцилової кислоти як природного індуктора підвищення стійкості рослин томатів проти фітотоксичних метаболітів збудників бактеріальних хвороб.

Наявність фітотоксичних метаболітів спричиняла достовірне зростання активності ферменту пероксидази в листках рослин-регенерантів у варіантах на



середовищі МС і з додаванням у живильне середовище саліцилової кислоти. Для сорту Чайка в контролі вона становила  $27,4 \pm 0,04$  од.  $\text{мг}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , Малиновий дзвін –  $24,0 \pm 0,04$ , на середовищі з 4,0 % прогрітих клітин *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28  $36,2 \pm 0,05$  та  $43,4 \pm 0,03$  од.  $\text{мг}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . За дії фітотоксичних метаболітів максимальні значення активності пероксидази у листках рослин-регенерантів прослідковувалися за концентрації 1 мг/л саліцилової кислоти, які для сорту Чайка склали  $94,5 \pm 0,04$  од.  $\text{мг}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , Малиновий дзвін –  $81,16 \pm 0,05$  од.  $\text{мг}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ .

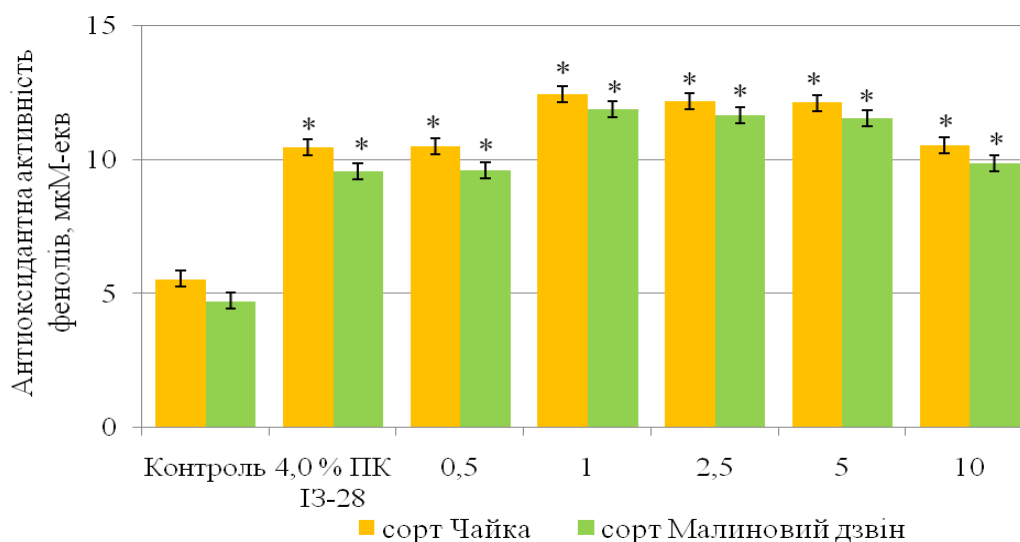


Рис. 12. Ефективність впливу саліцилової кислоти на антиоксидантну активність у листках рослин-регенерантів сортів томатів за дії фітотоксичних метаболітів

Примітка. \*зазначено статистично достовірні відмінності між експериментом і контролем ( $p < 0,05$ ), результати представлені як  $M \pm n$ ,  $n=3$

Стає очевидним, що зростання активності антиоксидантної системи і ферменту пероксидази в листках під дією саліцилової кислоти підтверджує ефективність її використання для активації процесів росту та підвищення імунітету рослин томата за бактеріального ураження.

#### СПЕЦИФІЧНІ ЗМІНИ В ТКАНИНАХ ОРГАНІВ РОСЛИН ТОМАТІВ ПІД ВПЛИВОМ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ

**Просторова гетерогенність калюсних тканин і їхня чутливість до збудників.** Швидкість і специфіка розвитку бактеріальних хвороб у тканинах вегетативних й генеративних органів томатів залежить від багатьох внутрішніх та зовнішніх чинників. Важливе значення мають сортові відмінності рослин і природа патогенного мікроорганізму. На рис. 13 наведено результати взаємодій калюсних тканин з бактеріями *X. vesicatoria* ІЗ-30. Калюс томатів представлений складним комплексом паренхімних клітин, компактно і рихло складених, меристемоїдних та аксіальних структур.

Рихла паренхіма з вираженими міжклітинниками зосереджена на периферії. Структурні особливості даної складової калюсу обумовлені несинхронізованим поділом і просторовим положенням клітин. Тривалість клітинного циклу залежить від швидкості проходження пресинтетичної і

синтетичної фаз, що, у свою чергу, пов'язано з доступністю необхідних елементів живлення. За контакту з такими клітинами калюсу бактерії *X. vesicatoria* ІЗ-30 достатньо швидко проникають всередину клітин і рухаються по міжклітинникам (рис. 13, б–в). Швидкий рух інфекції призупиняється в момент наближення бактерії до організованішої структури: щільних і упорядкованих клітин з правильною геометрією. Міжклітинники в таких зонах калюсних тканин менш розвинуті. Площа контакту клітин між собою і швидкість переносу продуктів пластичного обміну й сигнальних молекул, які запускають каскади біохімічних трансформацій та захисних реакцій, значно збільшуються. У результаті прискорюється передача сигнальних молекул по сим- і апопласту. За високої вірулентності бактерій розвиваються реакції надчутливості рослин, внаслідок чого у клітин потовщуються стінки, відбувається компартментація протопластів (рис. 13, в–д) та руйнується ядерний апарат. З часом клітини втрачають ознаки життєздатності і створюють специфічні бар'єри, які перешкоджають поширенню інфекції по здорових тканинах.

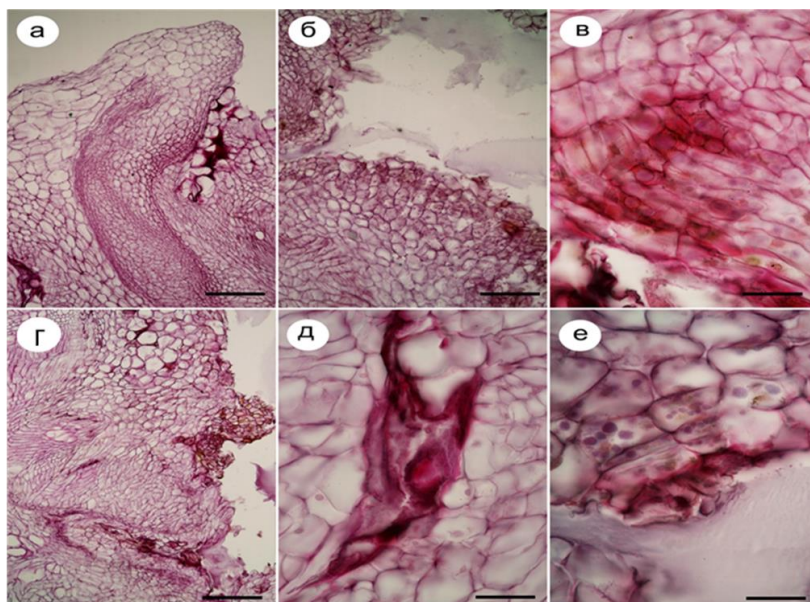


Рис. 13. Розвиток реакцій надчутливості у морфогенному калюсі томата сорту Чайка під впливом бактерій *X. vesicatoria* ІЗ-30: а–в – локалізація бактеріальної колонії в тканинах калюса; г–е – потовщення клітинних стінок, компартментація протопластів, руйнування ядерного апарату.

Прослідковано специфіку поширення *X. vesicatoria* ІЗ-30 у зоні формування аксіального органу, який за будовою схожий на корінь (рис. 14, а). Ураження клітин відбувається лише в клітинах, що оточують аксіальну структуру. Патогенні бактерії зупиняються до покривних тканин і залишають орган неушкодженим. Дана особливість, пов'язана із фізіологічною специфікою клітин кореневої системи, зокрема, наявністю в них молекулярних механізмів, які забезпечують формування систем стійкості. Оскільки типових реакцій індукованого імунітету не визначено, то у даному випадку стійкість кореня проти ураження є конститутивною.



Патогенез калюсних тканин під дією вірулентного штаму *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 в цілому є типовим. Клітинні стінки просочуються суберином і наповнюються компонентами лігніну, що характерно для реакцій індукованого імунітету (рис. 14). Характерно, що лігнін інтенсивніше відкладається на тангентальних і фронтальних антиклінальних стінках відповідно до потенційних напрямів транслокації фітопатогенних бактерій (рис. 14, б).

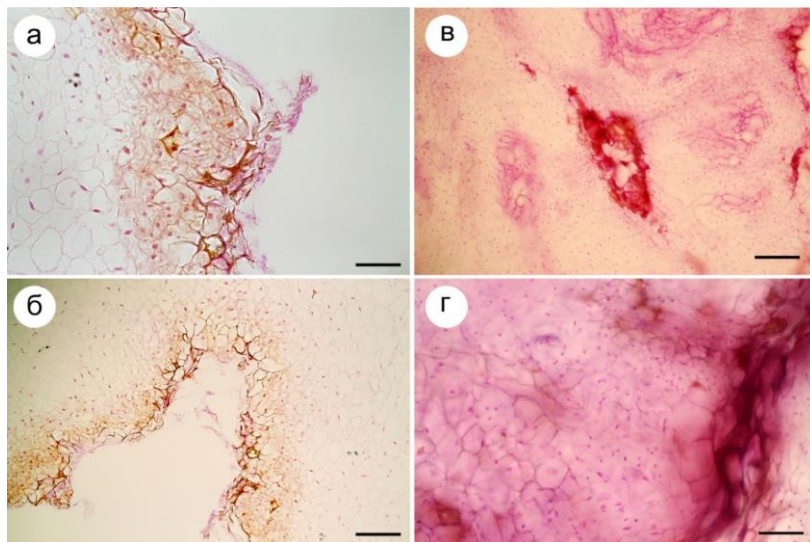


Рис. 14. Відкладення суберину і лігніну в клітинах за реакції індукованого імунітету в калюсів томатів внаслідок зараження тканин: а, б – *X. vesicatoria* ІЗ-30; в, г – *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ІЗ-28.

У калюсах з достатньо сформованою системою гідроцитів і гетерогенними за типом й характером розподілу клітин створюються неоднорідні умови для проникнення бактерій у глибокі шари калюсів. За розвитком, напрямом і швидкістю поширення інфекції було оцінено рівень стійкості тканини й клітини проти збудників. Провідні пучки калюсних тканин, що складені системою гідроцитів або трахеїдоподібних елементів і не задіяні в переносі інфекції, є центрами зон з активною протидією інфекції. Визначено також, що бактерії не долають утворених тканинних бар'єрів (рис. 15).

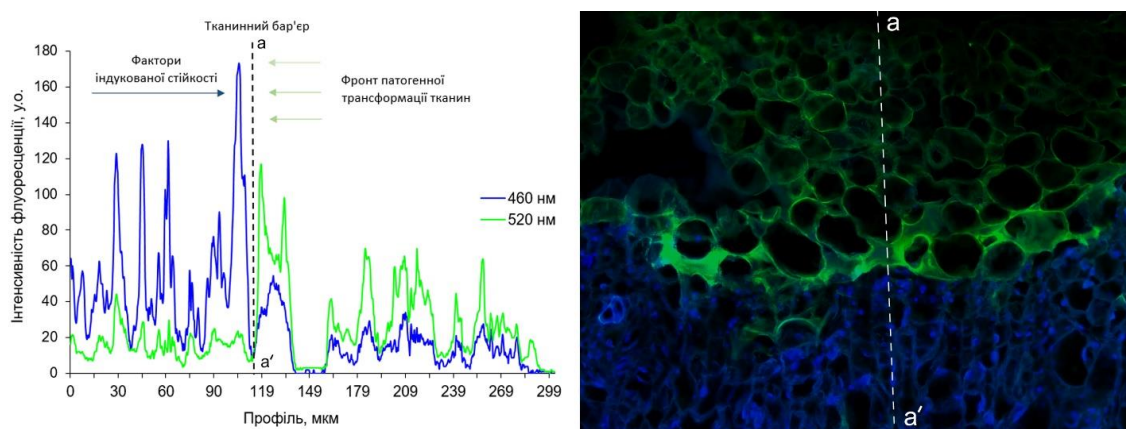


Рис. 15. Флуоресценція калюсної тканини томата сорту Малиновий дзвін і її профіль на межі тканинного бар'єру (а–а'), який створений у відповідь на ураження клітин *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ІЗ-28; зелений фільтр – FITS; синій фільтр – DAPI.

Методом люмінесцентної мікроскопії показано чітку межу між ураженими і живими клітинами (а–а'). На межі поширення інфекції не визначено чіткого переходу щодо підвищення інтенсивності трансформації вторинної клітинної стінки здорових клітин, яку спричиняють сигнальні системи рослин в умовах поширення інфекції.

Вперше виявлено інший тип захисних систем рослин, який ґрунтується не на розвитку структурних трансформацій, а на активації біохімічних реакцій, які блокують перенос через плазмолему патогенних білків-ефекторів та інших небезпечних чинників патогенезу. Даний механізм захисних реакцій рослин представляє одну з найбільших наукових цінностей, оскільки розкриває потенційні можливості молекулярної взаємодії в системі – патоген-хазяїн.

Встановлено, що характер розвитку бактеріального раку і поширення збудника *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* по калюсних тканинах менш агресивний (рис. 16). Для цього виду мікроорганізмів характерно виділення у навколишнє середовище екзополісахаридів. Відповідно захисна реакція клітин має дещо інший характер і відбувається менш виражено. Бактерії виявляються, головним чином, в міжклітинному просторі. Уражені клітини швидко ізолюються від здорових тканин і поширення інфекції блокується клітинними полімерами. Оскільки патогени вільно рухаються по міжклітинниках, перешкодою для їхньої транслокації є компактність розташування клітин, а також високоактивних антибактеріальних чинників, таких як дифензини, стоматини тощо.

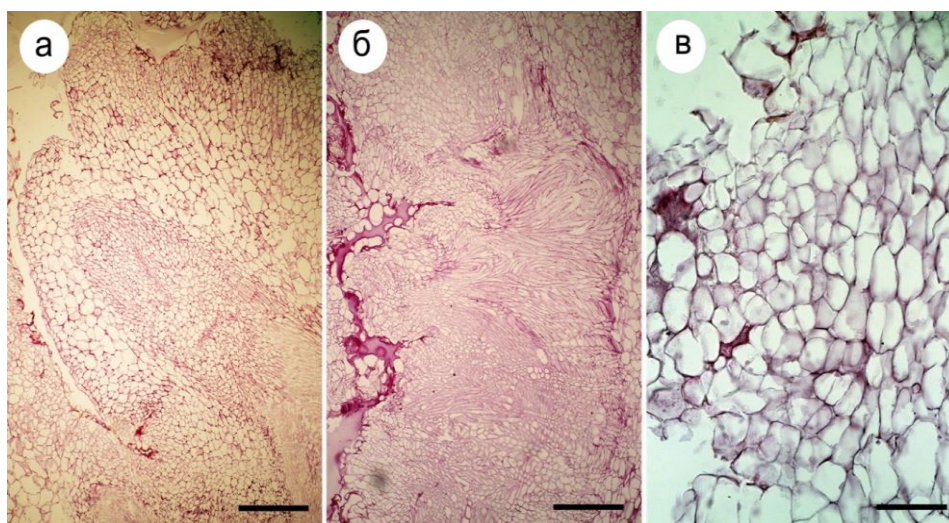


Рис. 16. Розвиток реакцій надчутливості у морфогенному (а, б) і неморфогенному (в) калюсі томата сорту Малиновий дзвін під впливом бактерій *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

В проведених експериментах характер відповідних захисних реакцій калюсних тканин томатів залежить від виду патогенного мікроорганізму. Реакція надчутливості проглядається в зонах значного ураження тканин. Індукована патогенна трансформація клітин в калюсах досліджених сортів томатів, які вважають відносно стійкими проти бактеріальних хвороб, морфологічно завершується на стадії часткової або повної лігніфікації і суберинизації клітинних стінок.

Таким чином, запропоновано застосування культури калюсних тканин томатів як зручної моделі вивчення особливостей патогенезу збудників бактеріальних хвороб для встановлення молекулярних механізмів взаємодії бактерій із клітиною-хазяїном. Встановлені механізми запропоновано використовувати як зручний інструмент для відбору засобів захисту з антибактеріальною дією на першому етапі контактування збудника з тканинами рослини томатів.

**Жирнокислотний склад ліпідів калюсів томатів за дії фітотоксичних метаболітів збудників бактеріальних хвороб.** У стійкості рослин проти бактеріального зараження крім специфічних, важливу роль відіграють і неспецифічні реакції клітин на рівні мембран. Ліпіди калюсних тканин сортів томатів мають аналогічний якісний склад і відрізняються лише за кількісним умістом окремих жирних кислот. У складі ліпідів калюсних тканин виявлено насичені і ненасичені жирні кислоти з кількістю вуглецевих атомів від C<sub>15</sub> до C<sub>22</sub>. У найбільшій кількості містяться пальмітинова (C<sub>16:0</sub>), стеаринова (C<sub>18:0</sub>), олеїнова (C<sub>18:1</sub>), лінолева (C<sub>18:2</sub>) та ліноленова (C<sub>18:3</sub>) кислоти. Внесення в живильне середовище прогрітих клітин патогенних штамів збудників бактеріальних хвороб зумовлювало збільшення частки ненасичених жирних кислот та зміни функціонального стану клітинних мембран.

Наявність подвійних зв'язків у вуглеводневих ланцюгах жирних кислот здійснюється за участі ацил-ліпідних десатураз, оцінка активності яких за допомогою стеароїл-(SRD), олеїл-(ORD) і лінолеїл-(LRD) десатуразних співвідношень дозволяє достовірно оцінювати формування механізмів синтезу й роль ненасичених жирних кислот, що домінують у структурі сумарних ліпідів у ліпоксигеназній сигнальній системі стійкості проти збудників бактеріальних хвороб.

Для сортів томатів Чайка і Малиновий дзвін стеароїл-(SRD) співвідношення десатураз у контролі знаходилося в межах 0,85–0,86. За впливу фітотоксичних метаболітів показник SRD для сорту Чайка підвищувався до 0,93, а сорту Малиновий дзвін знижувався до 0,65, що, ймовірно, пов'язано із різною стійкістю сортів томатів проти збудників бактеріальних хвороб.

Активність ацил-ліпідних ω6- і ω3-хлоропластних десатураз визначали за співвідношенням LRD й ORD, рівень яких для калюсних тканин сорту Чайка становив 0,18 і 0,32, а для сорту Малиновий дзвін – 0,15 й 0,26, що підтверджує наявність підвищеної активності олеатної десатурази та експресії гена *fad2*, який кодує хлоропластну ω6-десатуразу в калюсах (табл. 3). На середовищах з 4 % прогрітих клітин *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* I3-38, *P. syringae* pv. *tomato* I3-28 і *X. vesicatoria* I3-30 рівень LRD для сорту томата Чайка збільшувався порівняно з контролем й коливався в діапазоні 0,1–0,21 та ORD – 0,51–0,64.

Для сорту Малиновий дзвін було характерно збільшення рівня ORD від 0,65 до 0,72 та зменшення LRD від 0,05 до 0,08 порівняно з контролем. Отримані дані свідчать про наявність адаптивної експресії ацилліпідної ω6 десатурази, яка каталізує перетворення олеїнової кислоти в лінолеву. На живильному середовищі з фітотоксичними метаболітами коефіцієнт

ненасиченості, що є інтегральним показником загального характеру жирнокислотного складу ліпідів, збільшувався для сорту Чайка на 1,04–2,66, а Малиновий дзвін – на 0,47 порівняно з контролем.

Таблиця 3

**Співвідношення основних груп жирних кислот сумарних ліпідів калюсних клітин сортів томатів в умовах бактеріального стресу, %**

Показник	Чайка			Малиновий дзвін		
	ПК 4 % ІЗ-38	ПК 4 % ІЗ-28	ПК 4 % ІЗ-30	ПК 4 % ІЗ-38	ПК 4 % ІЗ-28	ПК 4 % ІЗ-30
Σ насичених жирних кислот	24,79	19,79	29,19	35,78	31,11	35,48
Σ ненасичених жирних кислот	75,21	80,21	70,81	64,22	68,89	64,52
КН	3,03	4,05	2,43	1,79	2,21	1,82
SRD	0,89	0,93	0,83	0,65	0,73	0,73
ORD	0,64	0,61	0,51	0,72	0,71	0,65
LRD	0,19	0,21	0,10	0,05	0,08	0,06

Примітки: КН – коефіцієнт ненасиченості жирних кислот; SRD – стеароїл-десатуразне; ORD – олеїл-десатуразне; LRD – лінолеїл-десатуразне співвідношення.

Стає очевидним, що ненасичені жирні кислоти є основним механізмом в реакції мембран калюсних клітин томатів на бактеріальний стрес за внесення в живильне середовище прогрітих клітин патогенних штамів *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* ІЗ-38, *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-28 та *X. vesicatoria* ІЗ-30. Зміни олеїл-(ORD) і лінолеїл-(LRD) десатуразних співвідношень доцільно використовувати як біохімічні маркери стійкості для первинної діагностики і селекційного відбору генотипів томатів з високим потенціалом проти збудників бактеріальних хвороб.

**ВПЛИВ БІОДОБРІВ НА ПОСІВНІ ЯКОСТІ ТОМАТІВ  
І УРАЖЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНИМИ ХВОРОБАМИ**

**Передпосівна обробка насіння біодобривами як засіб стимуляції росту та фізіолого-біохімічних процесів у рослинах сортів томатів.** Застосування біодобрив Агро-Бак Плюс (штам *Bacillus subtilis* М4, титр  $1 \times 10^8$  КУО/г), Екстрасол (штам *Bacillus subtilis* Ч-13, титр  $1 \times 10^8$  КУО/мл<sup>3</sup>), Рост Концентрат (12–14 % гумату калію, мікро- й макроелементи, природні стимулятори, вітаміни, антибіотики та біологічно активні речовини: N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Co, Mo та B) зумовило значний стимулювальний вплив на енергію проростання насіння томатів. Так, у середньому в контролі енергія проростання насіння на 3 добу становила 30 %, у варіанті з добривом Агро-Бак Плюс – 34 %, а з Рост Концентрат – 44 %. Застосування біодобрив помітно стимулювало ріст коренів і пагонів рослин. Висота рослин томатів у контролі без внесення біодобрив дорівнювала  $47 \pm 3,8$  мм. Найвираженіший вплив на висоту рослин ( $66 \pm 7,2$  мм) був за використання Рост Концентрат на основі похідних гумінових



речовин природного походження. Продуктивність рослин, значною мірою, визначається рівнем накопичення в асимілюючих органах пластидних пігментів, основним джерелом яких є процес фотосинтезу. За даних умов для екстрактів листків сортів томатів максимальне поглинання світла в ацетоні у спектральних частотах становить 435 і 635 нм, які характерні для хлорофілів (рис. 17).

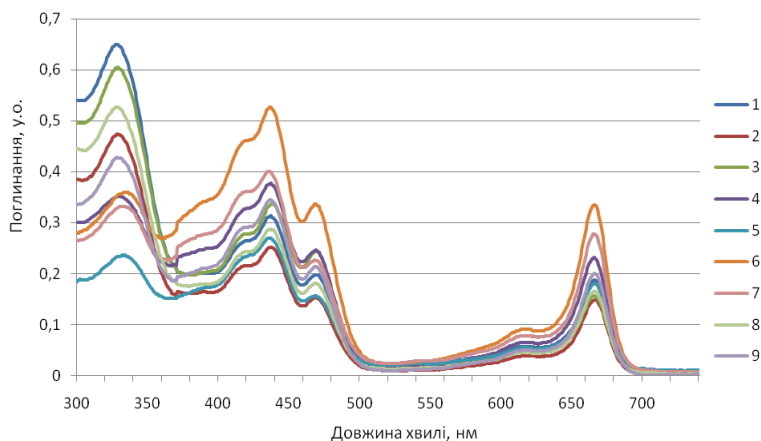


Рис. 17. Спектри поглинання екстрактів листків сортів томатів за обробки біодобривами Рост Концентрат (1 – Малиновий дзвін, 6 – Чайка, 7 – Елеонора) та Агро-Бак Плюс (3 – Малиновий дзвін, 4 – Чайка, 9 – Елеонора). Контроль: 2 – Малиновий дзвін, 5 – Чайка, 8 – Елеонора.

На контрольному варіанті вміст хлорофілів у листках сортів томатів складав 1,7–2,23 мг/г і каротину – 0,7–0,83 мг/г (табл. 4).

Таблиця 4

#### Вміст пігментів у листках сортів томатів під дією біодобрив

Варіант оброблення	Хлорофіл, мг/г			Каротиноїди, мг/г	Хл а+b / каротиноїди
	а	б	а+b		
<b>Чайка</b>					
Контроль	1,58±0,03	0,65±0,07	2,23±0,08	0,83±0,03	2,69
Агро-Бак Плюс	2,04±0,10*	0,87±0,06*	2,91±0,05*	0,95±0,04	3,06
Рост Концентрат	2,95±0,09*	1,15±0,07*	4,10±0,09*	1,31±0,06*	3,13
<b>Елеонора</b>					
Контроль	1,45±0,05	0,55±0,06	2,00±0,07	0,78±0,07	2,56
Агро-Бак Плюс	1,74±0,03*	0,55±0,09	2,29±0,04*	0,86±0,04	2,66
Рост Концентрат	2,43±0,06*	0,94±0,07*	3,37±0,03*	1,14±0,06*	2,95
<b>Малиновий дзвін</b>					
Контроль	1,28±0,04	0,42±0,03	1,7±0,05	0,70±0,06	2,43
Агро-Бак Плюс	1,37±0,03*	0,65±0,06*	2,02±0,04*	0,83±0,03	2,43
Рост Концентрат	1,63±0,06*	0,73±0,07*	2,36±0,08*	0,91±0,03*	2,59

Примітка. \*Зазначено статистично достовірні відмінності між експериментом і контролем ( $p < 0,05$ ), результати представлені як  $M \pm n$ ,  $n=4$

Використання біодобрива Агро-Бак Плюс забезпечило збільшення вмісту хлорофілів на 115,0–130,9 % і каротину – на 114,5–147,1 % до контролю.

Застосування Рост Концентрату також зумовлювало зростання їхньої кількості на 138,8–183,8 та 146,1–157,8 % відповідно. Високий сумарний уміст хлорофілів а+b ( $2,23 \pm 0,08$  мг/г) у листках сорту Чайка, який відзначається підвищеною стійкістю проти збудників, забезпечується ефективною роботою фотосинтетичного апарату асиміляційних органів. Для даного сорту цей показник був найвищим на фоні застосування біодобрив Агро-Бак Плюс –  $2,91 \pm 0,05$  мг/г та Рост Концентрат –  $4,10 \pm 0,09$  мг/г. Аналогічна закономірність прослідковувалась і за зміною кількості каротиноїдів.

Отже, співвідношення вмісту хлорофілів до каротиноїдів є одним із інтегральних фізіологічних показників стійкості рослин проти біо- і абіотичних чинників середовища.

**Визначення біометричних показників і ступеня зараження рослин томатів бактеріальними хворобами за умов використання біодобрив.** У фазу квітування–плодоношення встановлено збільшення в 1,1–7,5 раза кількості амоніфікувальних, целюлозоруйнівних, педотрофних та фосфат-мобілізувальних мікроорганізмів порівняно з контролем, що забезпечує оптимізацію процесів трансформації органічних та неорганічних сполук. Застосування біодобрив у технології вирощування томатів стимулювало формування вегетативної маси і збільшення площі листової пластини, довжини міжвузля та діаметру стебла. За внесення біодобрива Рост-Концентрат визначено максимальне значення показників росту стебла ( $33,2 \pm 1,2$  см), площі листової пластини ( $0,095$  м<sup>2</sup>) та зав'язування плодів томатів (94,8 %). Застосування біодобрив зумовило зниження кількості нітратів, підвищення вмісту сухої речовини, сумарних цукрів, вітаміну С, поліпшення харчової якості та цінності плодів томатів (табл. 5).

Таблиця 5

**Ефективність впливу біодобрив на біохімічні показники  
у плодах томата сорту Чайка**

Біохімічні показники	Контроль	Біодобрива		
		Агро-Бак-Плюс	Рост-Концентрат	Екстрасол
Суша речовина, %	$5,01 \pm 0,06$	$6,12 \pm 0,03^*$	$6,43 \pm 0,05^*$	$6,24 \pm 0,05^*$
Нітрати, мг/кг сирої маси	$1,90 \pm 0,01$	$1,75 \pm 0,08^*$	$1,78 \pm 0,03^*$	$1,80 \pm 0,04^*$
Сума цукрів, %	$7,20 \pm 0,04$	$7,35 \pm 0,04^*$	$7,40 \pm 0,03^*$	$7,30 \pm 0,03^*$
Органічні кислоти, %	$1,07 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,05$	$1,06 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,04$
Смаковий індекс, бали	$6,73 \pm 0,07$	$7,00 \pm 0,04^*$	$6,98 \pm 0,08^*$	$6,82 \pm 0,04^*$
Вітамін С, мг/%	$52,8 \pm 0,08$	$54,2 \pm 0,08^*$	$56,6 \pm 0,08^*$	$53,6 \pm 0,08^*$
β-каротин, мг %	$1,63 \pm 0,05$	$1,65 \pm 0,05$	$1,66 \pm 0,05$	$1,65 \pm 0,03$

Примітка. \*вказано статистично достовірні відмінності між експериментом і контролем ( $p < 0,05$ ), результати представлені як  $M \pm n$ ,  $n=4$

Водночас з'ясовано ступінь ураження сортів томатів під час вегетації грибними і бактеріальними хворобами за використання біодобрив. Ступінь ураження рослин у контролі становив 19,97 %. За застосування біодобрив характерним було підвищення імунітету томатів до хвороб, що

супроводжувалося зниженням ступеня ураження листків та стебел до 16,73–18,50 %.

Таким чином, обробка томатів біодобривами активізує ґрунтову мікрофлору, спричиняє мобілізацію і оптимізацію живлення рослин азотом й фосфором, покращує ростові процеси, формування високої врожайності та якості плодів, що, в свою чергу, супроводжується підвищенням стійкості рослин проти збудників бактеріальних хвороб. Використання мікробіологічних і гумінових добрив зумовлює підвищення результативності вирощування томатів у відкритому і закритому ґрунті.

### ШЛЯХИ РОЗРОБЛЕННЯ КОМПЛЕКСНИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЗАХОДІВ ЗАХИСТУ РОСЛИН ТОМАТІВ

**Ефективність впливу фунгіцидів на збудників бактеріальних хвороб томатів.** Досліджено антибактеріальну активність хімічних засобів захисту. Встановлено, що не всі препарати проявляють антибактеріальну активність щодо грампозитивних і грамнегативних збудників бактеріального раку, чорної бактеріальної плямистості та бактеріальної крапчастості томатів. Так, препарати з діючими речовинами азоксистробін, 250 г/л; фенамідон, 75 г/л + пропамокарб гідрохлорид, 375 г/л; хлорокис міді, 350 г/л; мандипропамід, 250 г/л + дифеноконазол, 250 г/л і дифеноконазол, 250 г/л виявились не активними щодо штамів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato*, а також *X. vesicatoria*. Вони не були активними і щодо виділених штамів. У дослідженнях препарат з діючою речовиною фосфіт алюмінію, 570 г/л + фосфориста кислота, 80 г/л проявляв високу антибактеріальну активність відносно грампозитивних *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, а зони гальмування росту коливались від 36 до 70 мм.

Препарати з діючою речовиною металаксил + манкоцеб у концентрації 302 г/кг, 600, 525 і 640 г/кг виявляли незначну активність щодо грамнегативних *P. syringae* pv. *tomato* із зонами гальмування росту від 14 до 30 мм. Характерно, що препарат з діючою речовиною піраклостробін 50 г/кг + метирам 550 г/кг був активним відносно грампозитивних *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* і не проявляв антибактеріальної активності щодо грамнегативних *P. syringae* pv. *tomato*. Виділені штами *X. vesicatoria* відзначалися високою чутливістю до препаратів з діючою речовиною манкоцеб. Зони гальмування росту коливались в межах від 14 до 50 мм. Штами *X. vesicatoria* були резистентними до препарату з діючою речовиною піраклостробін, 50 г/кг + метирам, 550 г/кг.

Отримані результати достовірно підтверджують антибактеріальну активність препаратів з діючими речовинами манкоцеб, фосфіт алюмінію і фосфориста кислота для обмеження розвитку збудників бактеріального раку, чорної бактеріальної плямистості та крапчастості рослин томатів.

**Системна дія мікробних препаратів на збудників бактеріальних хвороб рослин томатів.** За вивчення впливу біологічних препаратів на збудників встановлено, що Азотофіт, на основі бактерій *Azotobacter chroococcum*, і Фітохелп – *Bacillus subtilis* проявляли високу антибактеріальну активність до збудника бактеріального раку *C. michiganensis* subsp.

*michiganensis* з діаметром зони відсутності росту 77–80 мм, Аверком і Аверком нова – до збудників бактеріального раку, чорної бактеріальної плямистості та крапчастості рослин томатів. Найвищу активність до збудника чорної бактеріальної плямистості *X. vesicatoria* забезпечили Фітоцид і Фітохелп на основі бактерій *Bacillus subtilis*. Підтверджено антагоністичну активність бактерій родів *Bacillus*, *Streptomyces* до фітопатогенних бактерій, а біопрепарати на їхній основі рекомендовано застосовувати для обмеження розвитку збудників бактеріального раку, чорної бактеріальної плямистості та крапчастості рослин томатів.

**Активність ферменту пероксидази в листках рослин томатів за дії біологічних і хімічних препаратів.** У листках рослин томатів визначено оптимальні значення активності пероксидаз слабозв'язаних з клітинною стінкою. Відбувалось зміщення оптимуму рН для пероксидази, що пов'язано з перевагою синтезу форм ферменту за умов обробки хімічними і біологічними препаратами. Для рослин, які оброблено біопрепаратами, характерні вищі значення активності пероксидази 51,4– 12,5 од.мг<sup>-1</sup>•с<sup>-1</sup> за рН=4,7 і рН=5,5, що свідчить про індукцію синтезу аніонних та катіонно-аніонних форм. Виявлено два піки активності у листках рослин томата за дії біопрепаратів Фітоциду та Фітохелпу. Оптимальні значення активності пероксидаз за обробки листків рослин хімічними препаратами спостерігали за рН=4,7, при цьому відмічено посилення генерації аніонних пероксидаз. Так, зміна активності молекулярних форм пероксидаз забезпечує підвищення стійкості рослин проти комплексу стресових чинників.

Для аналізу інтенсивності синтезу активних форм кисню, який спричинений хімічними і біологічними препаратами, й вивчення адаптаційних властивостей рослин томата досліджували добову динаміку активності пероксидази (табл. 6).

Таблиця 6

**Активність ферменту пероксидази в листках рослин томата сорту Чайка за обробки біологічними і хімічними препаратами**

Препарат	Активність ферменту пероксидази (од.мг <sup>-1</sup> •с <sup>-1</sup> )				
	До обробки	через 1 годину	через 6 годин	через 12 годин	через 24 години
Контроль	15,0±0,04	15,4±0,04	15,0±0,02	15,6±0,03	15,4±0,04
Фітал	–	27,7±0,06	55,5±0,03	112,5±0,02	24,5±0,02
Купроксат	–	36,0±0,02	7,6±0,02	31,5±0,05	13,5±0,06
Метаксил	–	67,5±0,03	81,1±0,05	111,5±0,03	65,8±0,06
Азотофіт	–	30,7±0,05	43,0±0,04	54,5±0,04	77,7±0,04
Фітохелп	–	24,0±0,04	32,6±0,02	41,5±0,02	94,7±0,03
Фітоцид	–	23,2±0,02	23,2±0,02	80,5±0,04	112,7±0,03

Примітка. Різниця між експериментом і контролем достовірна за  $p < 0,05$ , результати представлені як  $M \pm n$ ,  $n=3$

У процесі експерименту з'ясовано, що впродовж доби активність пероксидази в листках рослин у контролі залишалася на початковому рівні –



15,0–15,6 од.мг<sup>-1</sup>•с<sup>-1</sup>. Активність ферменту пероксидази в листках рослин томатів, які оброблені хімічними препаратами Фітал і Метаксил, була максимальною на 12 год, тоді як на 24 год відбувалось її зниження на 41,0–78,2 %. У відповідь на обробку біопрепаратами визначено поступове підвищення активності пероксидази на 1, 6, 12 та 24 год. У листках рослин, оброблених *B. subtilis*, активність ферменту збільшувалася і була максимальною на 24 год 94,7–112,7 од.мг<sup>-1</sup>•с<sup>-1</sup>. За обробки Азотофітом активність пероксидази підвищувалася до 77,7 од.мг<sup>-1</sup>•с<sup>-1</sup>.

Таким чином, можна дійти висновку про перспективність застосування в комплексному захисті рослин томатів проти бактеріальних хвороб біопрепаратів на основі PGPR-бактерій *Bacillus* і *Azotobacter*, ефективність яких визначається високою антибактеріальною активністю відносно збудників і значним впливом на такий механізм формування резистентності як синтез активних форм кисню у процесі пероксидазного сигнального шляху.

**Роль природних індукторів у формуванні стійкості рослин томатів проти збудників бактеріальних хвороб.** Концентрації саліцилової кислоти виявляють різну антибактеріальну активність до виділених штамів (табл. 7). Діаметр зони відсутності росту збільшувався із підвищенням концентрації саліцилової кислоти, яка проявляла високу антибактеріальну активність до збудників бактеріального раку *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* та чорної бактеріальної плямистості *X. vesicatoria*, а діаметр зони відсутності росту коливався в межах від 70 до 80 мм. Дещо меншою антибактеріальною активністю відзначалася саліцилова кислота щодо штамів *P. syringae* pv. *tomato*, зони гальмування росту яких не перевищували 14 мм. Встановлено, що антибактеріальні властивості саліцилової кислоти пов'язані, в першу чергу, з її впливом на клітинні стінки мікроорганізмів як хелатуючого агента.

Таблиця 7

**Антибактеріальна активність саліцилової кислоти щодо збудників бактеріальних хвороб томатів**

Концентрація розчину саліцилової кислоти, мг/л	Діаметр зони відсутності росту (мм) штамів збудників навколо лунок з розчином СК								
	<i>X. vesicatoria</i>			<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>			<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>		
	IЗ-30	IЗ-31	IЗ-34	IЗ-28	IЗ-46	IЗ-13	IЗ-38	IЗ-40	IЗ-51
0,5	24±1	22±2	24±2	2±1	2±1	2±1	15±2	12±2	14±1
1,0	36±2	34±1	38±4	4±1	4±1	6±1	20±4	26±3	24±2
2,5	42±3	40±3	44±2	8±2	6±2	8±2	45±3	47±4	44±2
5,0	60±2	60±2	62±3	10±3	8±2	10±2	63±4	66±2	64±4
10,0	80±3	70±4	80±4	14±4	12±2	12±2	70±4	60±2	75±4
Контроль	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Примітка. Різниця між експериментом і контролем достовірна за  $p < 0,05$ , результати представлені як  $M \pm n$ ,  $n=3$

Застосування саліцилової кислоти знижувало ступінь розвитку чорної бактеріальної плямистості, бактеріальної крапчастості та бактеріального раку на молодих рослинах томатів за штучного зараження.

У заражених листках необроблених рослин саліциловою кислотою симптоми хвороби проявлялися на другу добу у вигляді світло-бурих плям з жовтим обідком, які збільшувалися в кінці досліду до великих світло-бурих некрозів. Після зараження рослини томатів, які оброблено саліциловою кислотою, не мали явних ознак ураження порівняно з контролем. На 7 добу у контролі на листках томатів з'являлись світло-бурі сухі плями, ступінь ураження листків коливалась від 26 до 50 %. Водночас у рослин, які оброблено саліциловою кислотою, дані симптоми простежувались незначною мірою, що підтверджує поява на листках порівняно дрібніших темно-бурих крапок і зони ураження від 5 до 15 % листової пластинки.

У рослин, які необроблено саліциловою кислотою і заражено *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, через 7 днів на зрізі стебла з'являвся некроз серцевини, а через 14 днів ступінь ураження становив 50–75 %. Водночас у оброблених рослин томатів на 7 добу явних симптомів ураження не спостерігали, а на 14 добу уражено було не більше ніж 50 % тканини.

Обприскування рослин томатів розчином саліцилової кислоти було ефективнішим, ніж замочування коренів. Збільшення концентрації саліцилової кислоти підвищувало ступінь пригнічення розвитку бактеріальних хвороб рослин томатів. Отримані результати важливі для подальшого з'ясування можливостей створення нових препаратів на основі саліцилової кислоти з високою активністю проти збудників бактеріальних хвороб.

**Антагоністична активність та фітотоксична дія біологічно активних речовин бактерій роду *Bacillus*, вилучених з насіння томатів.** Із необробленого насіння томатів відібрано 6 ізолятів, які проявляли антагоністичну активність по відношенню до тест-культур. Ізолят ЧА3 виділено із насіння сорту Чайка, ОБ1 і ОБ2 – Оберіг, КМ2 – Кіммерієць, ФЛ1 – Фландрія та СА1 – Санька.

Ізолят ОБ2 проявив високу антагоністичну активність до збудника бактеріальної крапчастості, діаметр пригнічення росту штамів *P. syringae* pv. *tomato* становив від 74–80 мм, ізолят ОБ1 до *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* – 40–80 мм (табл. 8). Ізолят ЧА3 також мав високу антагоністичну активність до збудників бактеріального раку та бактеріальної крапчастості. Ізоляти КМ2, ФЛ1 і СА1 відзначалися дещо меншою антагоністичною активністю по відношенню до тест-культур. Ізоляти проявляли антагоністичну активність також до збудника чорної бактеріальної плямистості, за діаметру пригнічення росту штамів *X. vesicatoria* 9098 та ІЗ-30, ІЗ-31 на 38–74 мм.

Для визначення потенційного продуцента з метою застосування його в аграрному виробництві проведено порівняльну оцінку фітотоксичності відібраних активних ізолятів. Обробка водними суспензіями ізолятів-антагоністів не мала гальмівного впливу на схожість насіння, а, навпаки, простежувалось її підвищення на 5–12 % порівняно з контролем.

Відібрані штами стабільно і достовірно стимулювали ріст коренів та пагонів рослин томатів порівняно з контролем. Максимальні значення ІП 111 % і ІК 125 % були визначені за обробки насіння томатів клітинною суспензією ізоляту КМ2. Суттєве збільшення вегетативної маси проростків від 8,2 до 20,0 % відбувалось за обробки ізолятами ФЛ1, КМ2 та СА1, що підтверджує їхні рістстимулювальні властивості. Відмінною особливістю після обробки ізолятами ФЛ1, КМ2 і СА1 було наростання бічних коренів, що спричиняло збільшення маси кореневої системи рослин.

Таблиця 8

**Антагоністична активність ізолятів, які виділено із насіння сортів томатів**

Тест-культури	Діаметр зони відсутності росту, мм					
	ЧА3	ОБ1	ОБ2	КМ2	ФЛ1	СА1
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> CFBR 4999	80±2,0	40±4,0	70±4,0	50±4,0	60±1,0	54±2,0
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ІЗ-38	44±2,0	80±3,0	50±3,0	30±3,0	40±2,0	40±3,0
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ІЗ-40	80±4,0	80±1,0	60±3,0	44±2,0	30±3,0	30±2,0
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Dappg-4 213	60±1,0	60±3,0	74±4,0	20±1,0	20±1,0	20±1,0
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ІЗ-28	52±2,0	34±3,0	74±4,0	44±2,0	36±4,0	34±1,0
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ІЗ-46	54±1,0	36±1,0	76±1,0	42±2,0	30±3,0	32±1,0
<i>X. vesicatoria</i> 9098	56±3,0	50±4,0	74±3,0	44±1,0	40±1,0	44±4,0
<i>X. vesicatoria</i> ІЗ-30	56±3,0	52±3,0	72±4,0	44±1,0	38±3,0	40±4,0
<i>X. vesicatoria</i> ІЗ-31	58±4,0	50±3,0	72±4,0	42±4,0	40±4,0	38±3,0

Примітка. ЧА3, ОБ1, ОБ2, КМ2, ФЛ1, СА1– ізоляти роду *Bacillus* із насіння сортів Чайка, Оберіг, Кіммерієць, Фландрія, Санька.

На підставі проведених досліджень запропоновано узагальнюючу схему системного комплексного використання біотехнологічних підходів для біологічного вирощування томатів (рис. 18). Основними складовими системи, які впливають на ефективність вирощування томатів в Україні, є своєчасна ідентифікація збудника, відбір генотипів з підвищеною стійкістю до патогенів та вибір препаратів біологічного захисту рослин томатів. Ідентифікація збудника базується на вивченні комплексу його морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей із застосуванням серологічних та молекулярно-біологічних методів діагностики.

Використання біотехнологічних підходів, зокрема біологічних препаратів захисту, ДНК-технологій ідентифікації збудників та клітинної селекції разом з агротехнічними заходами створює перспективи високопродуктивного біологічного вирощування томатів в зонах ризикованого овочівництва України. Результати аналітичних і експериментальних досліджень підтверджують доцільність створення комплексних біологізованих технологій вирощування томатів на основі комплексного науково обґрунтованого використання вітчизняних біотехнологічних розробок.

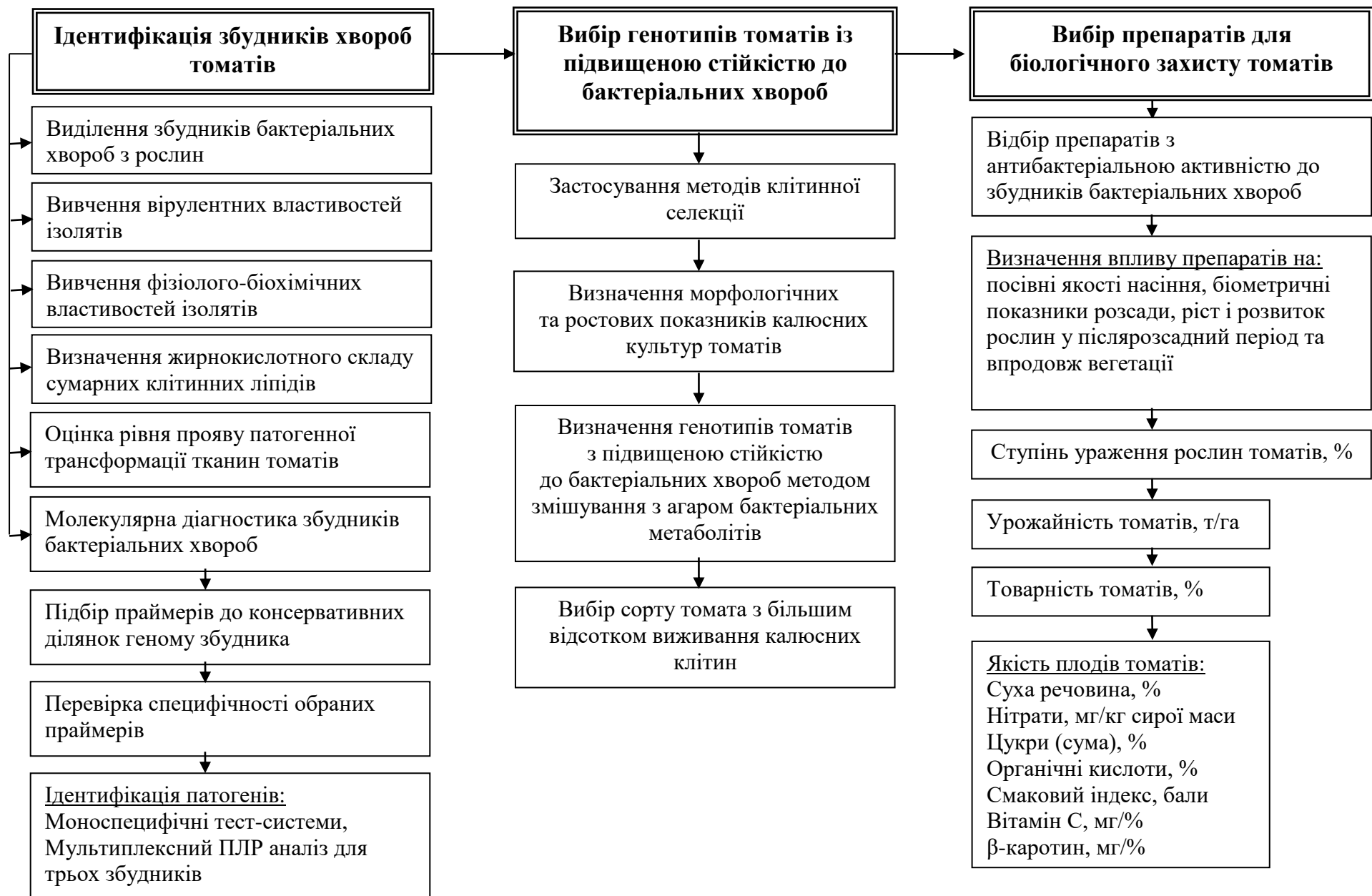


Рис. 18. Алгоритм використання біотехнологічних підходів для біологічного вирощування рослин томатів

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично узагальнено і практично вирішено важливу наукову проблему щодо розроблення технології вирощування високопродуктивних сортів томатів, що базується на комплексному підході із використанням стійких проти хвороб сортів, відібраних методами клітинної селекції, обов'язкового контролю якості насінневого матеріалу та поширення збудників бактеріальних хвороб, застосування сучасних методів діагностики й систем захисту на основі біопрепаратів, які відзначаються низькою токсичністю по відношенню до рослин та високою активністю дії на фітопатогени.

1. Запропоновано принципову схему комплексних систем захисту томатів на основі використання біотехнологічних підходів, зокрема біологічних препаратів захисту, ДНК-технологій ідентифікації збудників та клітинної селекції, для високопродуктивного вирощування томатів.

2. На основі клітинної селекції розроблено метод біотестування стійкості сортів томатів проти збудників бактеріальних хвороб із застосуванням їхніх фітотоксичних метаболітів в концентрації максимального інгібування  $IC_{80}$ .

3. Встановлено, що сорти томатів Чайка, Клондайк й Зореслав стійкі до збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та чорної бактеріальної плямистості; Фландрія, Легінь – чорної бактеріальної плямистості, а Оберіг, Атласний, Господар і Кіммерієць – бактеріальної крапчастості. Наявні сорти запропоновані для вирощування в районах, де існує загроза поширення збудників *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* та *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

4. Під дією фітотоксичних метаболітів *X. vesicatoria* і *P. syringae* pv. *tomato* відбувається трансформація клітин калюсу томатів, що проявляється в просочуванні суберином і інтенсивному наповненні компонентами лігніну тангентальних і фронтальних антиклінальних стінок, накопиченні в протопластах густого секрету полісахаридної природи та утворенні нових внутрішньоклітинних кластерів, які створюють тканинні бар'єри для поширення бактеріальної інфекції в здорові тканини, що важливо для відбору засобів захисту з антибактеріальною дією на першому етапі контактування збудника з тканинами рослин томатів.

5. Зараження репродуктивних органів рослин томатів збудниками *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* та *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* відбувається системно через ксилему й ззовні шляхом зараження плоду. На початкових стадіях прослідковуються паренхіматозний, плацентарний, фунікулярно-інгументальний та нуцеларний бар'єри, які гальмують поширення бактеріальної інфекції. Збудники виявляються в насінні, ендоспермі і фунікулусі, хоча й не в таких кількостях як в клітинах ксилеми, що необхідно враховувати в контролі якості насінневого матеріалу.

6. Реакція калюсних клітин рослин томатів на бактеріальний стрес виявляється в збільшенні кількості ненасичених жирних кислот на 21,8–29,6 %, що забезпечується активацією ацил-ліпідних  $\omega 6$ - і  $\omega 3$ -хлоропластних десатураз.

Коливальні зміни олеїл-(ORD) і лінолеїл-(LRD) десатуразних співвідношень дозволяють достовірно оцінити роль ліпоксигеназної сигнальної системи у формуванні стійкості рослин томатів проти збудників бактеріальних хвороб.

7. Для ідентифікації збудників *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* та *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* в насінні й уражених тканинах рослин томатів на різних етапах онтогенезу запропоновано застосовувати мультиплексний ПЛР-аналіз із використанням пар праймерів CMM5-CMM6, RST2-RST3 та P1-P2.

8. Встановлено видовий склад збудників бактеріальних хвороб, які поширені в сучасних агрофітоценозах томатів в Київській, Херсонській, Дніпропетровській та Запорізькій областях. Розвиток хвороби рослин томатів протягом вегетації збудником чорної бактеріальної плямистості (*Xanthomonas vesicatoria*) становив 5,5–34,7 %, бактеріального раку (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) – 3,2–30,5 та бактеріальної крапчастості (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) – 8,3–33,4 %. На розвиток бактеріальних хвороб істотний вплив мають погодні умови, особливо кількість опадів. Більш інтенсивний розвиток бактеріальних хвороб спостерігається в другій половині вегетаційного періоду, що пов'язано із загущеністю посадок томатів і утриманням вологи на рослинах.

9. Насіння томатів, уражена і здорова сегетальна рослинність у посівах томатів є акумуляторами високоагресивних штамів бактерій *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava* та *Xanthomonas* sp., які є збудниками хвороб томатів та широкого спектра овочевих культур.

10. Обробка рослин томатів саліциловою кислотою за дії фітотоксичних метаболітів збудників підсилює процеси біосинтезу фенольних сполук у клітинах, у результаті чого відбувається збільшення вмісту розчинних фенолів, катехінів і флавоноїдів на 32,7 %. Застосування саліцилової кислоти зумовлює підвищення стійкості рослин томатів проти бактеріальних хвороб за рахунок зростання антиоксидантної активності фенолів на 4,86–7,16 мкМ-екв і пероксидази на 37,8–58,3 од.мг<sup>-1</sup>•с<sup>-1</sup>.

11. Обробка насіння біодобривами зумовлює збільшення сумарного вмісту хлорофілів a+b на 15–83,8 % й каротиноїдів 14,5–57,8 %, що підтверджує ефективність функціонування фотосинтетичного апарату і є одним із інтегральних фізіологічних показників стійкості рослин проти біотичних стресових чинників. Підвищення активності пероксидази на 12,5–35 % в листках сортів томатів під дією біодобрив свідчить про ефективність їхнього використання для активації процесів росту і імунітету рослин. За дії біодобрив характерним є підвищення імунітету томатів до хвороб, що супроводжується зниженням ступеня ураження листків та стебел до 15,67–17,32 %.

12. Виявлено антибактеріальну активність препаратів з діючими речовинами манкоцеб, фосфіт алюмінію і фосфориста кислота з метою застосування для обмеження розвитку збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та чорної бактеріальної плямистості томатів.

13. Біопрепарати Азотофіт, на основі бактерій *Azotobacter chroococcum*, Фітоцид і Фітохелп – *Bacillus subtilis*, Аверком й Аверком нова – *Streptomyces*

*avermililis* проявляють антибактеріальну активність до збудників бактеріального раку, чорної бактеріальної плямистості та бактеріальної крапчастості томатів, які рекомендовано застосовувати для обмеження розвитку бактеріальних хвороб томатів. За обробки біологічними препаратами визначено підвищення активності ферменту пероксидази, що підтверджує підсилення розвитку неспецифічних захисних реакцій рослин томатів.

14. З насіння томатів відібрано та ідентифіковано бактерії роду *Bacillus* з антагоністичною дією відносно збудників *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* та *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, які є нетоксичними й мають стимулюючу дію на проростки томатів та є перспективними для створення на їхній основі нових біопестицидів для захисту томатів від бактеріальних патогенів.

### ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Розроблений метод біотестування, що ґрунтується на використанні *in vitro* культури клітин і тканин рослин, запропоновано використовувати в біотехнологічній практиці і овочівництві для скорочення термінів відбору стійких генотипів томатів проти збудників бактеріальних хвороб.

2. Розроблена молекулярно-біологічна методика діагностики збудників чорної бактеріальної плямистості, бактеріального раку і бактеріальної крапчастості рекомендована для профільних лабораторій ДП «Державний центр сертифікації та експертизи сільськогосподарської продукції» для своєчасного виявлення збудників в насіннєвому матеріалі і уражених рослинах томатів.

3. Виробникам біологічних препаратів з антибактеріальною та фітостимулювальною активністю пропонуються шість високоактивних штамів-антагоністів роду *Bacillus*.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

#### Монографія:

1. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Бактеріальні хвороби рослин томатів: [монографія]. К., 2017. 360 с. (*Здобувачеві належить наукова ідея, розроблення, узагальнення експериментальних даних, написання монографії*).

#### Статті у наукових фахових виданнях України:

2. Дубровін В. О., **Коломієць Ю. В.**, Таргоня В. С. Вплив ферментованої гнойової біомаси на вегетацію овочевих культур у закритому ґрунті. Агробіологія. 2011. Вип. 6 (86). С. 99–103. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження впливу поживного органічного розчину на продуктивність рослин, їхній аналіз*).

3. Таргоня В. С., **Коломієць Ю. В.**, Оверченко В. В., Пилипчук О. О. До питання розроблення комплексних біотехнологічних заходів захисту рослин на основі ентомологічних і біологічних препаратів. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2012.

№ 6 (35). Режим доступу до статті: [http://www.nbuuv.gov.ua/e-journals/Nd/2012\\_6/12tvs.pdf](http://www.nbuuv.gov.ua/e-journals/Nd/2012_6/12tvs.pdf) (Здобувачем проведено експериментальні дослідження з використання біотехнологічних підходів в захисті рослин, їхній аналіз).

4. Таргоня В. С., Коломієць Ю. В., Оверченко В. В. До питання використання біотехнологічних альтернатив для біологічного агровиробництва. *Агробіологія*. 2012. Вип. 9 (96). С. 16–20. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження з використання біотехнологічних альтернатив у агротехнологіях, їхній аналіз).

5. Коломієць Ю. В., Григорюк І. П., Буценко Л. М. Ефективність впливу фунгіцидів на збудників бактеріальних хвороб томатів. *Вісник аграрної науки*. 2015. № 10. С. 21–24. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження з встановлення антибактеріальної активності фунгіцидів проти збудників, їхнє узагальнення та написання статті).

6. Коломієць Ю. В., Григорюк І. П., Буценко Л. М. Застосування методу клітинної селекції для оцінки якості і стійкості сортів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) проти збудників бактеріальних хвороб. Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. 2015. № 3–4 (28–29). С. 33–37. (Здобувачем запропоновано ідею роботи, проведено експериментальні дослідження з відбору сортів томатів за стійкістю до збудників, їхнє узагальнення та написання статті).

7. Коломієць Ю. В., Григорюк І. П., Буценко Л. М. Бактеріальна мікрофлора насіння сортів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) за умов протруєння фунгіцидом. *Вісник аграрної науки*. 2016. № 10. С. 21–25. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження з виділення збудників з насіння томатів, їхнє узагальнення та написання статті).

8. Коломієць Ю. В., Григорюк І. П., Буценко Л. М. Жирнокислотний склад ліпідів калюсів томатів за умов бактеріального стресу. *Карантин і захист рослин*. 2016. № 10. С. 4–7. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження ролі ненасичених жирних кислот в стійкості до збудників, їхнє узагальнення та написання статті).

9. Коломієць Ю. В., Григорюк І. П., Буценко Л. М. Ефективність впливу саліцилової кислоти на компоненти антиоксидантної системи рослин сортів томата за умов бактеріального стресу. *Карантин і захист рослин*. 2016. № 11–12. С. 7–11. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження ролі компонентів антиоксидантної системи в стійкості томатів до збудників, їхнє узагальнення та написання статті).

10. Коломієць Ю. В., Таргоня В. С., Григорюк І. П. Системний підхід до розроблення комплексних заходів захисту рослин томатів на основі використання біотехнологічних альтернатив. *Агробіологія*. 2016. Вип. 2 (128). С. 27–33. (Здобувачем запропоновано ідею роботи, алгоритм екологічно безпечного вирощування томатів на основі біотехнологічних підходів, їхнє узагальнення та написання статті).

11. Коломієць Ю. В., Григорюк І. П., Буценко Л. М. Активність пероксидази в листках рослин томата за дії біологічних і хімічних препаратів.



Овочівництво і баштанництво. 2016. Вип. 62. С. 115–122. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження ролі ферменту пероксидази в стійкості томатів до збудників, їхнє узагальнення та написання статті).*

12. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Індукуючий ефект саліцилової кислоти на збудників бактеріальних хвороб рослин томатів. Карантин і захист рослин. 2017. № 1–3. С. 16–19. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження антибактеріальної активності саліцилової кислоти, їхнє узагальнення та написання статті).*

13. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Бактеріальні хвороби сегетальних рослин у насадженнях томатів. Карантин і захист рослин. 2017. № 4–6. С. 10–14. *(Здобувачем виділено збудники бактеріальних хвороб, проведено аналіз та написання статті).*

14. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Чайка В. М., Буценко Л. М., Горбатенко Л. Ю. Особливості прояву та поширеність бактеріальних хвороб у насадженнях томатів в Україні. Карантин і захист рослин. 2017. № 7–9. С. 4–8. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження впливу погодних умов на поширення збудників, їхнє узагальнення та написання статті).*

### **Статті у наукових фахових виданнях України,**

#### **включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

15. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.** Індукція утворення калюсних клітин культурою помідора (*Lycopersicon esculentum* Mill.) в умовах *in vitro*. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2013. № 41. Режим доступу до статті: [http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd\\_2013\\_5\\_4.pdf](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd_2013_5_4.pdf). *(Здобувач брала участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень щодо впливу регуляторів росту на індукцію утворення калюсних тканин та узагальнення результатів).*

16. Аветисян Ю. Ф., Ліханов А. Ф., **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П. Роль гістохімічних бар'єрів у розвитку бактеріальної крапчастості репродуктивних органів томата звичайного (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Збалансоване природокористування. 2014. № 3. С. 15–21. *(Здобувач брала участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень щодо особливостей патогенезу збудника та узагальнення результатів).*

17. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П. Створення томатів, стійких до бактеріальних хвороб, шляхом клітинної селекції. Продовольча індустрія в АПК. 2014. № 2. С. 32–36. *(Здобувач брала участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень впливу фітотоксичних метаболітів на калюсні тканини томатів та узагальнення результатів).*

18. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П. Молекулярна діагностика бактеріальних хвороб рослин томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Продовольча індустрія в АПК. 2014. № 3. С. 31–35. *(Здобувач брала участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень застосування сайт-специфічної ПЛР для ідентифікації чистих культур збудників та узагальнення результатів).*

19. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М., Білявська Л. О. Системна дія мікробних препаратів на збудники бактеріальних хвороб рослин томатів. *Агроекологічний журнал*. 2016. № 3. С. 83–89. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження з визначення антибактеріальної активності мікробних препаратів, їхнє узагальнення та написання статті).*

20. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Передпосівна обробка насіння біодобривами як засіб стимуляції росту та фізіолого-біохімічних процесів у рослинах сортів помідора. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2016. № 5 (26). Режим доступу до журналу: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7245/7024> *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження з встановлення впливу біодобрив на ріст і стійкість томатів до збудників, їхнє узагальнення та написання статті).*

21. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Фітотоксична дія біологічно активних речовин бактерій роду *Bacillus*, вилучених з насіння помідорів. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2016. № 6 (63). Режим доступу до журналу: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7544/7258> *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження з вивчення фітотоксичної активності штамів-антагоністів до збудників, їхнє узагальнення та написання статті).*

22. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Діагностика бактеріальних хвороб рослин помідорів в умовах відкритого і закритого ґрунту України. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2016. № 7 (64). Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7720> *(Здобувачем запропоновано ідею роботи, проведено експериментальні дослідження з ідентифікації збудників в уражених тканинах томатів, їхнє узагальнення та написання статті).*

23. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Формування мікробіоти ризосфери і підвищення продуктивності рослин томатів за дії біодобрив. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Агрономія*. 2016. Вип. 235. С. 85–94. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження з вивчення впливу біодобрив на урожайність томатів, їхнє узагальнення та написання статті).*

24. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Індукуючий вплив біодобрив на продуктивність рослин томатів і формування мікробіоти ризосфери. *Агроекологічний журнал*. 2017. № 1. С. 75–82. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження впливу біодобрив на етапи органогенезу розсади та харчової якості плодів томатів, їхнє узагальнення та написання статті).*

#### **Статті у наукових виданнях інших держав:**

25. **Kolomiets J. V.**, Grygoryuk I. P., Butsenko L. M. A comparative analysis of fatty acid composition of tomato callus lipids under bacterial stress. *East European*

Scientific Journal. 2016. № 9 (13). P. 26–30. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження складу жирних кислот калюсних тканин томатів за дії фітотоксичних метаболітів збудників, їхнє узагальнення та написання статті).*

26. **Kolomiets J. V.**, Grygoryuk I. P., Butsenko L. M. Effect of salicylic acid on the components of antioxidant system of tomato plants in terms of bacterial stress. East European Scientific Journal. 2016. № 11 (15). P. 10–15. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження активності антиоксидантної системи томатів за дії фітотоксичних метаболітів збудників, їхнє узагальнення та написання статті).*

27. **Kolomiets J. V.**, Grygoryuk I. P., Butsenko L. M. Bacterial diseases of tomatoes plant in terms of open and covered growing of Ukraine. Annals of Agrarian Science. 2017. Vol. 15 (2). P. 213–216. *(Здобувачем виділено збудники бактеріальних хвороб томатів, вивчено їх біологічні властивості, здійснено їхнє узагальнення та написання статті).*

#### **Статті в інших наукових виданнях,**

##### **включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

28. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.**, Буценко Л. М. Впровадження ПЛР-діагностики найпоширеніших на території України збудників бактеріальних хвороб томата. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. 2012. Вип. 178. С. 109–116. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження щодо ідентифікації збудників бактеріальних хвороб томатів, їхнє узагальнення).*

29. **Коломієць Ю. В.**, Аветисян Ю. Ф. Етіологія бактеріальних хвороб томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) у господарствах Дніпропетровської області. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. 2014. Вип. 204. С. 132–136. *(Здобувачем виділено збудники бактеріальних хвороб, встановленої їхні біологічні властивості).*

30. **Kolomiets J. V.**, Grygoryuk I. P., Butsenko L. M. Effect of biological and chemical preparations on peroxidase activity in leaves of tomato plants. Scientific Journal «ScienceRise». 2016. № 10/1 (27). P. 48–52. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження впливу препаратів на активність пероксидази, їхнє узагальнення та написання статті).*

31. Kolomiets J. V. Investigation of the influence of salicylic acid on the causes of bacterial diagnostics of tomatoes. Science Journal «ScienceRise: Biological Science». 2017. № 2 (5). С. 14–18.

#### **Статті в інших наукових виданнях:**

32. Дубровін В. О., **Коломієць Ю. В.**, Таргоня В. С., Старчевський Ю. І. Використання технологічних альтернатив для вирощування біологічної продукції в гідропонних установках. Агробіологія. 2011. Вип. 6 (86). С. 95–99.

(Здобувач брала участь в розробленні технологічної схеми отримання екологічно чистої продукції).

33. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П. Жирнокислотний склад сумарних клітинних ліпідів збудників бактеріальних хвороб рослин томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Карантин і захист рослин. 2014. № 9. С. 4–6. (Здобувач брала участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень щодо ідентифікації збудників за жирнокислотним складом ліпідів та узагальнення результатів).

34. Білявська Л. О., Козирицька В. Є., **Коломієць Ю. В.**, Бабич О. А., Іутинська Г. О. Фітозахисні та рістрегулювальні властивості метаболітних препаратів на основі ґрунтових стрептоміцетів. Доповіді НАН України. 2015. № 1. С. 131–137. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження впливу біопрепаратів на рослини томатів, їхнє узагальнення та написання статті).

35. **Коломієць Ю. В.**, Демчук Т. Л. Регенерація виду *Lycopersicon esculentum* Mill. через культуру калюсної тканини. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2011. Т. 11. С. 301–306. (Здобувачем одержано калюсні тканини та рослини-регенеранти томатів, здійснено їхнє узагальнення та написання статті).

36. Мельничук М. Д., **Коломієць Ю. В.**, Ліханов А. Ф., Аветисян Ю. Ф. Специфічна трансформація тканин репродуктивних органів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) під впливом патогенних мікроорганізмів. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2013. Т. 12. С. 298–293. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження етапів патогенної трансформації тканин томатів, їхнє узагальнення та написання статті).

37. Коломієць Ю. В. Бактеріальні хвороби томатів. Фактори експериментальної еволюції. 2017. Т. 20. С. 207–210.

38. **Коломієць Ю. В.**, Ліханов А. Ф., Григорюк І. П. Просторова гетерогенність і специфічність індукованих бактеріозів у калюсних тканинах *Lycopersicon esculentum* Mill. *in vitro*. Мікробіологія і біотехнологія. 2017. № 3 (39). С. 24–32. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження особливостей патогенезу трьох основних збудників бактеріальних хвороб, їхнє узагальнення та написання статті).

#### Тези наукових доповідей:

39. Коломієць Ю. В. Регенерація виду *Lycopersicon esculentum* Mill. в культурі *in vitro* за дії регуляторів росту. Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти: II Міжнародна наукова конференція, м. Харків, 11–13 жовтня 2011 року: тези доповіді. Х., 2011. С. 63–64.

40. **Коломієць Ю. В.**, Оверченко В. В. Changes of fatty acid composition of tomato callus tissue lipids in bacterial stress conditions. Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція: V Міжнародна конференція молодих вчених, присвячена 160-річчю від дня народження професора Ф. М. Каменського, м. Одеса, 13–17 червня 2011 року: тези доповіді. Одеса, 2011. С. 218–219. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).

41. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.**, Буценко Л. М. Впровадження ПЛР-діагностики найпоширеніших на території України збудників бактеріальних хвороб томатів. Захист рослин: наука, освіта, інновації в умовах глобалізації: Міжнародна науково-практична конференція присвячена 50-річчю заснування факультету захисту рослин, м. Київ, 15–18 жовтня 2012 року: тези доповіді. К., 2012. С. 115–116. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей*).

42. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.**, Буценко Л. М. Підбір селективних праймерів з метою розробки діагностичного набору для ідентифікації *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* та *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Біологія: від молекули до біосфери: VII Міжнародна конференція молодих учених, м. Харків, 20–23 листопада 2012 року: тези доповіді. Х., 2012. С. 191. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей*).

43. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.** Возбудители бактериальных болезней томата в хозяйствах Днепропетровской области. Глобализация науки: проблемы и перспективы: Международная научно-практическая конференция, г. Уфа, Российская Федерация, 7 февраля 2014 года: тезисы доклада. Уфа, 2014. Т. 3. С. 186–189. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей*).

44. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.** Получение каллуса томата для проведения клеточной селекции устойчивых к возбудителям бактериальных болезней сортов. Клеточная биология и биотехнология растений: Международная научно-практическая конференция, г. Минск, Республика Беларусь, 13–15 февраля 2013 года: тезисы доклада. Минск, 2013. С. 187. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей*).

45. Аветисян Ю. Ф., **Коломієць Ю. В.**, Ліханов А. Ф. Вплив мікробних ліполісахаридів на калюсні клітини помідора (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Біологія: від молекули до біосфери: VIII Міжнародна конференція молодих учених, м. Харків, 3–6 грудня 2013 року: тези доповіді. Х., 2013. С. 137. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей*).

46. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Оцінка стійкості сортів томатів проти збудників бактеріозів за допомогою клітинної селекції. Сучасні агробіотехнології та землеустрій в Україні: Державна науково-практична конференція, м. Біла Церква, 19 листопада 2015 року: тези доповіді. Біла Церква, 2015. С. 4–5. (*Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей*).

47. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Методологічні принципи застосування фунгіцидів для обмеження розвитку бактеріальних хвороб томатів. Інноваційні технології та інтенсифікація розвитку національного виробництва: II Міжнародна науково-практична Інтернет-конференція, м. Тернопіль, 20–21 жовтня 2015 року: тези доповіді. Тернопіль,

2015. С. 69–71. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

48. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Антагоністична активність епіфітної мікрофлори насіння томатів до збудників бактеріальних хвороб. Карантин та інтегрований захист рослин. Перспективи розвитку в ХХІ столітті: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 19–20 листопада 2015 року: тези доповіді. К., 2015. С. 65–66. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

49. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Бактеріальна мікробіота насіння томатів (*Lycopersicon esculentum Mill.*) сортів української селекції. Модернізація національної системи управління державним розвитком: виклики і перспективи: Міжнародна науково-практична Інтернет-конференція, м. Тернопіль, 16–17 грудня 2015 року: тези доповіді. Тернопіль, 2015. С. 46–48. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

50. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Ефективність впливу біопрепаратів на збудників бактеріальних хвороб томатів. Развитие науки в ХХІ веке: X Международная конференция, г. Харьков, 15 февраля 2016 года: тезисы доклада. Х., 2016. Ч. 1. С. 81–84. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

51. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Функціональна роль пероксидази в адаптації рослин сортів томатів до збудників бактеріозів. Рослини та урбанізація: V Міжнародна науково-практична конференція, м. Дніпропетровськ, 16–17 лютого 2016 року: тези доповіді. Дніпропетровськ, 2016. С. 76–78. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

52. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Фітотоксична активність біологічно активних речовин бактерій-епіфітів насіння рослин томатів. Ресурсозберігаючі технології та їх правова і економічна оцінка в сільськогосподарському виробництві: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 27–28 квітня 2016 року: тези доповіді. К., 2016. С. 42–43. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

53. **Kolomiets J. V.**, Grygoryuk I. P., Butsenko L. M., Pasichnyk L. A. Identification of the agent of tomato bacterial speck in the farms of Zaporozhye region. Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21<sup>st</sup> century: II International Scientific Conference, Kyiv, April 14–15, 2016: abstracts book. Kyiv, 2016. P. 66–67. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

54. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Вплив мікробних препаратів на збудників бактеріальних хвороб томатів. Овочівництво і баштанництво: історичні аспекти, сучасний стан, проблеми і перспективи розвитку: Міжнародна науково-практична конференція, м. Крути,

21–22 березня 2016 року: тези доповіді. Крути, 2016. Т. 2. С. 156–160. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

55. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М., Бородай В. В. Антифунгальна активність представників епіфітної мікрофлори насіння рослин томатів. Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: IV Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів, с. Центральне, 21 квітня 2016 року: тези доповіді. Центральне, 2016. С. 57–58. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

56. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Скринінг *in vitro* сортів томатів на стійкість проти збудників бактеріозів за допомогою клітинної селекції. Селекційно-генетична наука і освіта: Міжнародна наукова конференція, м. Умань, 18–20 березня 2016 року: тези доповіді. Умань, 2016. С. 137–140. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

57. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Передпосівна обробка насіння біодобривами як засіб регуляції процесів росту та активності пероксидази в рослинах сортів томатів. Развитие науки в XXI веке: XV Международная конференция, г. Харьков, 15 июля 2016 года: тезисы доклада. Х., 2016. Ч. 1. С. 143–147. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

58. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Вміст і співвідношення фотосинтетичних пігментів в листках рослин за умов передпосівної обробки насіння сортів томатів мікродобривами. Стан та перспективи розвитку виробництва органічної продукції: Міжнародна науково-практична конференція, с. Селекційне, 20 липня 2016 року: тези доповіді. Селекційне, 2016. С. 69–73. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

59. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М., Лісовий О. А. Бактеріальні хвороби рослин томатів в умовах відкритого і закритого ґрунту України. Biotechnology for agriculture and environmental protection: XII<sup>th</sup> International Scientific and Practical Conference daRostim 2016, Odessa, 7–10 September 2016: Proceedings. Odessa, 2016. P. 116–117. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

60. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Вплив біодобрив на формування мікробіоти ризосфери рослин томатів. Сучасні проблеми агроєкології: II Міжнародна науково-практична Інтернет-конференція, м. Миколаїв, 1 листопада 2016 року: тези доповіді. Миколаїв, 2016. С. 72. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

61. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Зміни активності пероксидази в листках рослин томата за дії біологічних і хімічних препаратів.

Світові рослинні ресурси: стан та перспективи розвитку: II Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 3 листопада 2016 року: тези доповіді. К., 2016. С. 247–249. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

62. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Вплив бактеріального стресу на жирнокислотний склад ліпідів калюсів томатів. Актуальні проблеми та перспективи інтегрованого захисту рослин: Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів, м. Київ, 7–9 листопада 2016 року: тези доповіді. К., 2016. С. 40–42. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

63. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Антиоксидантна активність рослин томата за дії саліцилової кислоти в умовах бактеріального стресу. Стан і перспективи розробки та впровадження ресурсощадних, енергозберігаючих технологій вирощування сільськогосподарських культур: Міжнародна науково-практична конференція, м. Дніпро, 22–23 листопада 2016 року: тези доповіді. Дніпро, 2016. С. 55. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

64. **Kolomiets J. V.**, Grygoryuk I. P., Butsenko L. M. Biofertilizers as a means of stimulating growth, physiological and biochemical processes in the tomato varieties of plants. Microbial Biodiversity: current problems and solutions: International scientific-practical conference, Astana, November 25, 2016: materials. Astana, 2016. P. 178–182. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

65. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П. Адаптаційна трансформація тканин томатів за ураження збудником бактеріальної крапчастості. Рослини та урбанізація: Шоста Міжнародна науково-практична конференція, м. Дніпро, 1–2 березня 2017 року: тези доповіді. Дніпро, 2017. С. 53–55. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

66. **Коломієць Ю. В.**, Григорюк І. П., Буценко Л. М. Ідентифікація *Xanthomonas vesicatoria* в насінні сортів томатів в Україні. XV з'їзд Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського, м. Одеса, 11–15 вересня 2017 року: тези доповіді. Одеса, 2017. С. 269. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їхнє узагальнення та написання тез доповідей).*

#### **Науково-методичні рекомендації:**

67. Мельничук М. Д., Теслюк В. В., Дубровін В. О., Григорюк І. П., Камінський В. Ф., Кошевський І. І., Редько В. В., Бойко О. А., **Коломієць Ю. В.** Методологічні і біотехнологічні основи індукування механізмів захисту рослин від хвороб: [наукові основи і рекомендації]. К., 2011. 41 с. *(Здобувачеві належить аналіз, узагальнення експериментальних даних та написання рекомендацій).*



68. Мельничук М. Д., Кравчук В. І., Таргоня В. С., Дубровін В. О., Голуб Г. А., Теслюк В. В., Новохацький М. Л., Грогуленко Д. П., **Коломієць Ю. В.**, Оверченко В. В., Марус О. А., Бельченко В. М., Пилипчук О. О., Шейкін Б. М., Лешишак О. В., Наголович К. П. Методичні рекомендації щодо виробництва і комплексного застосування ентомологічних і мікробіологічних препаратів у захисті рослин. К., 2013. 85 с. (Здобувачеві належить аналіз, узагальнення експериментальних даних та написання рекомендацій).

69. Григорюк І. П., Патица В. П., **Коломієць Ю. В.**, Буценко Л. М., Пасічник Л. А., Теслюк В. В., Таргоня В. С. Виявлення та ідентифікація збудника бактеріальної крапчастості рослин томата *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: [науково-методичні рекомендації]. К., 2016. 40 с. (Здобувачеві належить ідея, розроблення, узагальнення експериментальних даних та написання рекомендацій).

## АНОТАЦІЯ

**Коломієць Ю. В. Біотехнологічні основи діагностики і регуляції бактеріальних хвороб томатів в Україні.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук зі спеціальності 03.00.20 «Біотехнологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2017.

Дисертацію присвячено розв'язанню актуальної наукової проблеми, зокрема розробленню біотехнологічних основ вирощування високопродуктивних сортів томатів, що ґрунтується на актуалізованих способах ідентифікації збудників бактеріальних хвороб, скороченні термінів відбору генотипів томатів з підвищеною стійкістю до збудників та на удосконалених способах контролю бактеріальних хвороб томатів.

Створено цілісну концепцію забезпечення здорового статусу посадкового матеріалу томатів на всіх етапах його виробництва та експлуатації з врахуванням особливостей природно-кліматичних умов України, поширеного видового складу збудників бактеріальних хвороб і основних типів взаємозв'язків у переважаючих патокомплексах патоген-хазяїн. Вдосконалено біотехнології відбору рослин-кандидатів у донорські рослини та підтримки здорового статусу рослин в умовах культури *in vitro* та в умовах відкритого ґрунту.

Запропоновано біотехнологічну схему відбору сортів рослин томатів з підвищеною стійкістю одночасно проти збудників бактеріальної плямистості *Xanthomonas vesicatoria*, бактеріального раку *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* і бактеріальної крапчастості томатів *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, що базується на використанні *in vitro* культури клітин та тканин рослин.

Розроблено молекулярно-біологічну методику ідентифікації збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості і бактеріальної плямистості в насінні та уражених рослинах томатів. Актуалізовано і охарактеризовано збудники чорної бактеріальної плямистості *Xanthomonas vesicatoria*, бактеріального раку *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* і

бактеріальної крапчастості томатів *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* в умовах України.

Запропоновано технології комплексного захисту рослин томатів від бактеріальних хвороб на основі використання біотехнологічних підходів. Доведено можливість застосування індуктора стійкості саліцилової кислоти в захисті рослин томатів від збудників бактеріальних хвороб, яка виявляє стимулюючий вплив на морфометричні показники та антиоксидантну активність.

**Ключові слова:** сорти томатів, збудники бактеріальних хвороб, біотехнології, культура ізольованих клітин, діагностика, біологічний захист, антагоністична активність, продуктивність

## АННОТАЦІЯ

**Коломиєць Ю. В. Біотехнологічні основи діагностики і регуляції бактеріальних захворювань томатів в Україні.** – На правах рукописи.

Дисертація на соискание ученої ступені доктора сільськогосподарських наук по спеціальності 03.00.20 «Біотехнологія». Національний університет біоресурсів і природопольовання України, Київ, 2017.

Дисертація присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми, в частині розробки біотехнологічних основ вирощування високопродуктивних сортів томатів, ґрунтованих на актуалізованих способах ідентифікації збудників бактеріальних захворювань, скороченні строків відбору генотипів томатів з підвищеною стійкістю до збудників і удосконалення способів контролю бактеріальних захворювань томатів.

Сформована цілісна концепція забезпечення здорового статусу посадочного матеріалу томатів на всіх етапах його виробництва і експлуатації з урахуванням особливостей природно-кліматических умов України, розповсюдженості видового складу збудників бактеріальних захворювань і основних типів взаємодій в переважаючих патоконцентраціях патоген-хазяїн. Удосконалена біотехнологія відбору рослин-кандидатів в донорські рослини і підтримання здорового статусу рослин в умовах культури *in vitro* і в умовах відкритого ґрунту.

Предложено біотехнологічну схему відбору сортів рослин томатів з підвищеною стійкістю одночасно проти збудників бактеріальної пятнистості *Xanthomonas vesicatoria*, бактеріального раку *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* і бактеріальної крапчастості томатів *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, ґрунтований на використанні *in vitro* культури кліток і тканин рослин.

Розроблено молекулярно-біологічну методику ідентифікації збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості і бактеріальної пятнистості в семенах і уражених рослинах томатів. Актуалізовані і охарактеризовані збудники чорної бактеріальної пятнистості *Xanthomonas vesicatoria*, бактеріального раку *Clavibacter*

*michiganensis* subsp. *michiganensis* и бактериальной крапчатости томатов *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* в условиях Украины.

Предложено технологию комплексной защиты растений томатов от бактериальных болезней на основе использования биотехнологических подходов. Доказана возможность применения индуктора устойчивости салициловой кислоты в защите растений томатов от возбудителей бактериальных болезней, которая проявляет стимулирующее влияние на морфометрические показатели и антиоксидантную активность.

**Ключевые слова:** сорта томатов, возбудители бактериальных болезней, биотехнологии, культура изолированных клеток, диагностика, биологическая защита, антагонистическая активность, производительность.

## ANNOTATION

**Kolomiets Yu. V. Biotechnological bases of diagnosis and control of tomato bacterial diseases in Ukraine.** – The Manuscript.

Dissertation in candidacy for a degree of Doctor of Agricultural Sciences, in specialty 03.00.20 Biotechnology. National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The thesis is devoted to solving actual scientific problem, in particular the development of biotechnological bases of cultivation of highly productive varieties of tomatoes, which is based on an integrated approach using resistant varieties, selected by methods of cell selection, monitoring of seed quality and spread of agents of bacterial diseases, modern methods of diagnostics and protection systems based on biologies with low toxicity against plants and wide spectrum of effects on phytopathogens.

It is propose the principle scheme of complex systems of tomato protection based on the use of biotechnological alternatives, particularly biologies, DNA technology for identification of pathogens, and cell selection for a high performance of tomato growing in Ukraine. It is first proposed biotechnological scheme for the selection of genotypes of tomato plants with increased resistance simultaneously against several pathogens of bacterial diseases. It is established that bacterial pathogenesis leads to the complete destruction of chloroplasts, nuclei and other cell compartments. Under the influence of bacterium exometabolites in fruit cells it is formed tough secret of polysaccharide nature that causes significant disruption of the functions of protoplasts, induces the creation of additional cell walls, and leads to chlorotic changes with subsequent necrotizing of tissues. We have identified six stages of transformation of the parenchyma of tomato fruits caused by bacterial invasion, and it is shown that the development of bacterial pathogenesis in tomato reproductive organs is prevented by histochemical barriers. In terms of destruction with pathogens of tomato bacterial spot and bacterial black spot, in the initial stages it is observed cell (parenchymal) and tissue (placental, funicular-integumental, nucellar) barriers inhibiting the spread of bacterial infection.

It is developed molecular-genetic method of identification of pathogens of bacterial cancer, bacterial speck and bacterial spot in seeds and infected plants of

tomatoes in Ukraine. It is established species composition of tomato bacterial diseases agents found during the vegetation period, which is represented by bacterial black spot agent *Xanthomonas vesicatoria*, bacterial cancer agent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, and bacterial spot agent *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. It is shown that tomato seeds, affected and healthy segetal vegetation in tomatoes are accumulators for highly aggressive strains of bacteria of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* genus, which may be pathogens for a wide range of cultivated vegetables.

The use of salicylic acid as a natural inducer of resistance causes an increase in the degree of resistance of tomato plants against bacterial diseases through the increase of antioxidant activity and peroxidase enzyme. It is first identified the antibacterial activity of drugs with active ingredients mancozeb, aluminium aphosphite and phosphorous acid to limit the development of pathogens of bacterial cancer, bacterial black spot, and bacterial speck of tomatoes. It is experimentally proved the antagonistic activity of bacteria of the genera *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* against pathogens *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; biologies on their basis are recommended for suppression of tomato bacterial diseases. When treating tomatoes with chemical and biological agents it was identified increased activity of peroxidase enzyme, which is correlated with the development of plant resistance against biotic stress.

Among tomato seeds they were selected six stable highly active antagonists against pathogens *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, non-toxic, with a stimulating effect on tomato seedlings, which are promising for creation on their basis of new bio-pesticides for protection of tomatoes against bacterial pathogens.

**Key words:** varieties of tomatoes, pathogens of bacterial diseases, biotechnology, isolated cell culture, diagnostics, biological protection, antagonistic activity, productivity.