УДК 632.4:57.022 https://doi.org/10.31548/biologiya2020.04.007
http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/14555

ПАТОГЕННІСТЬ ІЗОЛЯТІВ ГРИБА *GAEUMANNOMYCES TRITICI* (J.WALKER) HERN.-RESTR. & CROUS – ЗБУДНИКА ОФІОБОЛЬОЗУ ТА ЕФЕКТИВНІСТЬ ШТАМІВ Р. *BACILLUS* ПРОТИ ХВОРОБИ

***Л.О. КРЮЧКОВА**, доктор біологічних наук,*
професор кафедри фітопатології ім. акад. В.Ф. Пересипкіна
E-mail: lkriuchkova@nubip.edu.ua
https://orcid.org/0000-0003-4993-216X
***Д.Р. ОЛІФЕР,** аспірант кафедри фітопатології*
ім. акад. В.Ф. Пересипкіна
Національний університет біоресурсів і природокористування України

***Анотація.** Досліджено патогенні властивості ізолятів гриба Gaeumannomyces spp., виділених з уражених офіобольозом коренів пшениці озимої. Усі ізоляти характеризувалися вищою патогенністю на рослинах пшениці та ячменю, менше уражували овес, тому були ідентифіковані нами як Gaeumannomyces tritici. На пшениці озимій більшість ізолятів G. tritici проявили середній рівень патогенності, один ізолят характеризувався найвищою патогенністю, у двох ізоляти рівень патогенності був істотно нижчий.*

В умовах вегетаційного досліду досліджували вплив двох штамів р. Bacillus, B. subtilis 16 and B. pumilus 11, на ураженість пшениці офіобольозом при штучній інокуляції рослин ізолятами G. tritici різної патогенності. Встановлено, що ефективність обробки залежала від ступеня розвитку офіобольозу, а, отже, від патогенності ізоляту, взятого для інокуляції. Внесення в субстрат для вирощування пшениці суспензій клітин штамів р. Bacillus стимулювало ріст проростків у варіанті, де зараження проводили ізолятами G. tritici із середнім рівнем патогенності, а, отже, і рівень розвитку хвороби був середнім. За низької ураженості хворобою обробки рослин бактеріями були неефективними. Не відмічали стимулюючого ефекту і у варіанті з високим розвитком хвороби, де інфікування проводили високопатогенним ізолятом G. tritici.

***Ключові слова:** Bacillus spp., біологічний метод, Gaeumannomyces tritici, офіобольоз, патогенність, пшениця озима.*

Актуальність.

Популяції ґрунтових грибів складаються з різних за патогенністю штамів, що значною мірою впливає на шкідливість хвороб рослин, які вони спричиняють. Офіобольозна коренева гниль, збудником якої є гриб *Gaeumannomyces tritici* (J.Walker) Hern.-Restr. & Crous (Hernandez–Restrepo et al., 2016), в багатьох країнах світу - основний фактор, який знижує урожайність зернових культур (Mauler-Machnik et al., 2002). В Україні хвороба вперше була виявлена у 70-х роках минулого століття (Морщацкий, 1977), а вже до середини 80-х років поширилася по всій Україні, крім деяких районів Лівобережжя (Новохатка та ін.,1990). Нині в Поліссі та Північному Лісостепу її поширення на монокультурі пшениці озимої досягає 76-100% (Грицюк, 2015).

Аналіз останніх досліджень та публікацій.

Незважаючи на значну увагу, яку дослідники протягом багатьох десятиліть приділяють вивченню офіобольозу, проблема захисту зернових від ураження хворобою залишається невирішеною. На сьогоднішній день накопичено велику кількість інформації про ефективність хімічних, біологічних, імунологічних, агротехнічних та інших заходів її контролю. Інтенсивні дослідження з виявлення джерел стійкості до хвороби проводяться ще з 20-х років минулого століття (Scoot & Hollins, 1983), проте суттєвих результатів поки що немає. Масштабні дослідження щодо пошуку джерел стійкості та розроблення методів оцінки стійкості сортів пшениці озимої до офіобольозу проводилися у 80-х роках і в Україні (Лісовий та ін., 1991, Лісовий, Ріпенко, 1991). Проте сортів пшениці, стійких проти хвороби, не зареєстровано.

Очевидно, у захисті рослин пшениці від офіобольозу провідну роль відіграє не генетична стійкість сортів до хвороби. В процесі еволюції для захисту від збудника рослини набули здатності використовувати інші, зовнішні фактори. Встановлено, що на колонізацію коренів пшениці грибом *G. tritici* впливають такі фактори, як фізіологічний стан рослини, який, в свою чергу, залежить від кореневого живлення (Gilligan, 1983). Іншим чинником, який зменшує ураження пшениці хворобою, є колонізація ризосфери та кореневих клітин супутньою антагоністичною мікробіотою (Cook et al., 1995). Є дані, що попередня колонізація коренів непатогенними грибами, у тому числі *G. hyphopodioides* M. hern.-Rostr. & Crous, істотно підвищує стійкість пшениці до ураження фітопатогеном *G. tritici* (Osborne et al., 2018).

Ґрунтові бактерії, зокрема рр. *Pseudomonas* і *Bacillus*, також сприяють пригніченню офіобольозної інфекції. Висока заселеність ризосферного ґрунту бактеріями підвищує супресивність ґрунту, що сприяє кращому росту рослин та підвищує стійкість до ураження фітопатогенами. Цікаво, що найбільш інтенсивно досліджувалася супресивність ґрунту саме відносно гриба *G. tritici* (Deacon, 2006). Феномен поступового зниження розвитку офіобольозу в монокультурі пшениці, що отримав назву “take-all – decline”, завжди корелює із збільшенням у ґрунті чисельності бактерій-антагоністів роду *Pseudomonas.*

На ступінь колонізації коренів рослини антагоністичною мікрофлорою можуть впливати генетичні фактори, зокрема, стійкість сорту, ві-

рулентність збудника хвороби, тощо. Здавна відомо, що популяції гриба *G. tritici* є неоднорідними і складаються з різних за патогенністю штамів (Deacon & Henry,1978).

Мета дослідження – виділити ізоляти збудника офіобольозу пшениці та дослідити їх патогенність; встановити залежність між рівнем патогенності гриба та біологічною активністю штамів *B. subtilis* 16 та *B. pumilus* 11 при обробці суспензіями бактеріальних клітин ризосфери пшениці, ураженої збудником.

Матеріали і методи дослідження.

Ізоляцію збудника хвороби проводили із уражених офіобольозом зразків рослин пшениці озимої, які відбирали в дослідних полях Національного університету біоресурсів і природокористування України (с. Пшеничне Васильківського району Київської обл.) та Житомирського національного агроекологічного університету (м. Житомир). Виділенню гриба в чисту культуру передувала візуальна діагностика хвороби за почорнінням кореневої системи. Для ізоляції гриба переважно використовували тканини коренів зі слабким ступенем ураження, оскільки при сильному пошкодженні коренів патогеном виділенню його в чисту культуру перешкоджають численні гриби-сапрофіти, які як вторинні колонізатори заселили відмерлі тканини і можуть витісняти фітопатогена завдяки своєму швидкому росту в чашках Петрі на штучному поживному середовищі.

Уражені корені ретельно відмивали від ґрунту, поверхнево дезінфікували 10%-м розчином гіпохлориту натрію протягом 10 хв., двічі обполіскували стерильною водою і просушували фільтрувальним папером. Шматочки коренів розміром 2-3 см поміщали на картопляно-глюкозний агар (КГА) в чашки Петрі та інкубували в термостаті при 25^0С протягом 5 – 7 діб. Колонії грибів, які появлялися навколо коренів, розглядали під мікроскопом. Якщо гіфи по краях колоній мали характерний закручений вигляд («curling back») (Kwak & Weller, 2012), ці ізоляти ідентифікували як *Gaeumannomyces* spp. Для отримання моноізолятів використовували метод «hyphal–tip» (кінчика гіф): кінчики гіфів під мікроскопом акуратно відрізали і пересівали до інших чашок Петрі з КГА, чим започатковували монокультури гриба.

Належність виділених ізолятів до виду *G. tritici* (попередня назва – підвид *G. graminis* var. *tritici*) визначали за допомогою тесту на патогенність на різних видах зернових: пшениці, ячменю, вівса.

Зараження рослин пшениці озимої сорту Клариса збудником хвороби проводили згідно методики, описаної Bateman (1988) та модифікованої нами з врахуванням особливостей патогена. Моноізоляти *G. tritici* вирощували протягом 4 тижнів в чашках Петрі на КГА. Для зараження використовували колонізовані ізолятами гриба «агарові диски», вирізані в культурі гриба на рівній відстані від центру чашки. Їх поміщали у пластикові циліндричні ємності (діаметром 4,5 см) реверсом донизу на попередньо насипаний стерильний пісок, який слугував субстратом для вирощування рослин. В дисках рівномірно, на відстані 1-1,5 см один від одного, робили отвори, в які закладали по 1 насінині пшениці для пророщування. У кожній такій ємності пророщували по 5 насінин. Пов-

торність досліду – 6-кратна. Всього по кожному варіанту досліду вирощували по 30 рослин. Зверху інокулюм з насінням присипали піском і весь субстрат зволожували до повної вологоємності водогінною водою.

Ємності ставили на тацю та залишали без поливання за температури 25^{0}С до появи сходів. З появою сходів рослини періодично поливали, а через 6 тижнів проростки викопували, корені обмивали від піску та за симптомами (почорнінням поверхні коренів) і за наявністю на поверхні коренів характерних чорних широких гіф («runner hyphae»), видимих під мікроскопом, діагностували хворобу.

Обліки хвороби проводили за 4-бальною шкалою: 0, рослини здорові; 1, до 10% поверхні коренів почорніло; 2, від 10 до 25% коренів почорніло; 3, 25-50% коренів почорніло; 4, від 50 до 100% коренів почорніло, почорніння відмічається на основі стебла проростка (Ownley et al., 1992).

Дослідження ефективності штамів бацил проти офіобольозу пшениці проводили шляхом внесення суспензії клітин бактерій (титр 10^9 КУО/мл) в субстрат (стерильний пісок), у якому вирощували рослини. Об'єктами дослідження були штами *B. subtilis* 16 та *B. pumilus* 11, одержані із робочої колекції мікроорганізмів кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України). Штами бактерій вирощували методом глибинного культивування в колбах ємкістю 250 мл з рідким середовищем LB (Lysogeny broth) на качалці при 180 об./хв. протягом 72 год. при 25°С. Суспензію клітин отримували методом центрифугування культуральної рідини при 9000 об./ хв. Осад промивали 0,85% NaCl (pH 7,0) і потім знову центрифугували в тих же умовах. Промиті клітини суспендували в стерильній воді і доводили до титру 10^9 КУО мл$^{-1}$.

Статистичний обрахунок результатів дослідження здійснювали за допомогою пакетів програм "Statgrafics" та "Microsoft Exel".

Результати дослідження та їх обговорення.

Із уражених рослин озимої пшениці було виділено 30 ізолятів темно-забарвлених грибів, які за культуральними ознаками попередньо віднесено до роду *Gaeumannomyces* (Kwak & Weller, 2012). Для подальших досліджень ми відібрали 8 моноізолятів: 2 – із дослідного поля ЖНАЕУ і 6 – із дослідного поля НУБіП України. У даних ізолятів визначали видову належність та досліджували патогенні властивості на проростках рослин-хазяїнів.

На сьогодні відомо 19 видів *Gaeumannomyces* (Hemandez–Restrepo et al., 2016). Тривалий час у межах фітопатогенного виду *G. graminis* виділяли три підвиди: *G. graminis* var. *tritici, G. graminis* var. *avena* та *G. graminis* var. *graminis,* серед яких перший підвид більше уражує пшеницю і ячмінь, другий – овес, а *G. graminis* var. *graminis* – рис і трави (Peixoto et al., 2013). На сьогодні перші два підвиди отримали статус окремих видів, відповідно, *G. tritici* і *G. avenae* (Hemandez–Restrepo et al., 2016).

Для встановлення видової належності виділених ізолятів *Gaeumannomyces* ми дослідили їх патогенність та спеціалізацію на трьох зернових культурах: пшениці, ячмені, вівсі. Всі ізоляти уражували корені всіх трьох культур, проте більш патогенними виявилися на пшениці та ячмені. За цією ознакою попередньо їх було

віднесено до підвиду *G. graminis* var. *tritici* (тепер – вид *G. tritici*). В лабораторії молекулярної генетики Інституту генетики, фізіології і захисту рослин Міністерства освіти і науки Республіки Молдова за використання ПЛР-аналізу та наборів праймерів, розроблених для видо-специфічних ділянок геному Gaeumannomyces, було підтверджено належність ізолятів до даного підвиду/виду (Kriuchkova & Deaghileva, 2018).

Патогенні властивості ізолятів досліджували на сходах рослин пшениці озимої сорту Єлик. Всі проаналізовані нами ізоляти *G. tritici* проявили високий рівень патогенності. За показником «розвиток хвороби» істотно вищою патогенністю порівняно з іншими ізолятами характеризувався ізолят *G. tritici* 9/1 (Табл.1). Більшість інших ізолятів проявили середню патогенність (3/14, 7/14, 2/16/17, 3/16/17, 16/16), і лише два ізоляти (1/14, 4/16/17) виявилися низькопатогенними.

За результатами наших попередніх досліджень, попри наявність низькопатогенних ізолятів у популяціях гриба *G. tritici,* інші ґрунтові патогени - *Fusarium* spp., *Pythium* spp. - значно поступалися йому як за агресивністю, так і за співвідношенням високопатогенних і низькопатогенних штамів (Kriuchkova & Gritsyuk, 2017). Це дає підстави розглядати офіобольоз як найбільш небезпечну серед кореневих хвороб пшениці.

Слід відмітити, що зараження збудником офіобольозу коренів рослин пшениці має свої особливості. Збудник не руйнує клітини поверхні коренів, як це відбувається при зараженні іншими ґрунтовими патогенами (*Fusarium* spp., *Pythium* spp.,), а на першому етапі колонізує їх поверхню, обплітаючи мереживом чорних широких гіф. Тому корені спочатку не руйнуються, а навпаки, спостерігається деяка стимуляція їх росту порівняно з незараженим контролем. Потім збудник проникає всередину судин кореневої системи, закупорюючи її, що призводить до блокування надходження води до надземної частини рослини внаслідок чого рослина в'яне і гине. Навіть на дорослих рослинах симптоми хвороби часто залишаються непомітними через непошкодженість зовнішніх тканин кореня, а зниження продуктивності і навіть загибель рослин часто приписують іншим факторам.

1. Ізоляти Gaeumannomyces tritici, виділені із рослин пшениці озимої

Ізолят	Місце походження	Рік	Розвиток хвороби*	
			бал(0-4)	%
1/14	Фітодільниця ЖНАЕУ, м. Житомир	2014	1,10	27,5
3/14	Фітодільниця ЖНАЕУ, м. Житомир	2014	2,34	58,5
7/14	Фітодільниця ЖНАЕУ, м. Житомир	2014	1,87	46,8
2/16/17	«Дослідне поле» НУБіП України, с. Пшеничне	2017	2,20	55,0
3/16/17	«Дослідне поле» НУБіП України, с. Пшеничне	2017	1,46	36,5
4/16/17	«Дослідне поле» НУБіП України, с. Пшеничне	2017	1,10	27,5
16/16	«Дослідне поле» НУБіП України, с. Пшеничне	2017	1,83	45,8
9/1	«Дослідне поле» НУБіП України, с. Пшеничне	2017	2,88	72,0

*- представлено середні дані по трьох дослідах

Тому у своїх дослідженнях, крім показника «розвиток хвороби» в балах (0-4), для оцінки патогенності ізолятів ми використовували інші показники, які характеризують ріст і розвиток рослин, а саме: «маса 1 проростка» та «маса коренів з 1 проростка». З врахуванням даних по цим показникам істотно вищою патогенністю порівняно з іншими ізолятами характеризувався ізолят 9/1: при ураженні ним маса проростків і коренів пшениці була значно нижчою, ніж в інших варіантах. Ізоляти 3/14 і 7/14 характеризувалися середньою патогенністю, при зараженні ними також відмічали істотне зниженням маси коренів (Табл. 2). Ізоляти 16/16 і 3/16/17 проявили низький рівень патогенності – зниження маси коренів було неістотним.

На процес зараження рослин пшениці збудниками кореневих хвороб в природніх умовах, крім патогенності ізолятів, істотно впливають інші біотичні фактори, зокрема, стійкість сорту, супресивність ґрунту, тощо. Для збудника офіобольозу важливим чинником, який може перешкоджати зараженню ним рослин, є антагоністична мікрофлора ґрунту. Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення ефективності двох штамів р. *Bacillus* - *B. subtilis* 16 та *B. pumilus* 11, проти хвороби при внесенні їх у вигляді суспензії клітин в ризосферу пшениці озимої на фоні штучного зараження патогеном. Для створення штучного інфекційного фону використовували ізоляти *G. tritici* різної патогенності.

Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що дані штами р. *Bacillus* є досить перспективними у складі біопрепартів для захисту зернових культур від хвороб (Kriuchkova et al., 2017). Здатність бактерій колонізувати ризосферу та філоплану рослини, продукування антигрибних ліпопептидів (антибіотиків) та індукована системна стійкість є основними механізмами біологічного контролю штамів р. *Bacillus* (Cawoy et al., 2011).

Внесення суспензії клітин обох штамів р. *Bacillus* у субстрат, де вирощувалася пшениця, призводило до зниження (неістотного) розвитку хвороби, незалежно від патогенності ізолята. Істотну рістстимулювальну активність штамів р. *Bacillus* відмічали у варіантах, де для зараження рослин використовували низькопатогенний ізолят *G. tritici* 16/16. При внесенні

2. Патогенні властивості ізолятів G. tritici

Ізолят	Розвиток хвороби, бал (0-4)*	Маса 1 проростка, мг**	Маса коренів з 1 проростка, мг**	Патогенність
3/14	2,34	44,5 ab***	6,0a	середня
7/14	1,87	33,0 ab	8,5a	середня
9/1	2,88	29,0 a	7,5a	висока
16/16	1,83	51,4 b	13,1ab	низька
3/16/17	1,46	33,3 ab	22,5b	низька
$НІР_{05}$	-	26,4	13,3	

Примітки: * - дані представлено середні по трьом дослідам, ** - аналогічні дані отримано у двох дослідах; дані представлено по 1 досліду. *** - різні літери (a, b) свідчать, що відмінність між середніми даними є істотною

у субстрат для вирощування рослин суспензії клітин *B. subtilis* 16 маса коренів збільшилася у 3,5 рази; а у варіанті, де використовували штам *B. pumilus* 11, відмічали 3-кратне збільшення маси коренів (Рис.1); біомаса проростків збільшилася, відповідно, на 85 і 60% (Рис.2). Стимулювання росту проростків відмічали і при використанні суспензії клітин *B. subtilis* 16 на фоні зараження іншим низькопатогенним ізолятом *G. tritici* 3/16/17.

Рістстимулювального ефекту не виявлено у варіантах, де для штучного зараження використовували середньопатогенний ізолят 7/14. Навпаки, внесення бактерій навіть дещо пригнічувало розвиток кореневої системи проростків (неістотно). Не виявлено рістстимулюючого ефекту штамів р. *Bacillus* і у варіанті, де для створення штучного інфекційного фону використовували високопатогенний ізолят *G. tritici* 9/1.

Зважаючи на особливості ураження пшениці грибом *G. tritici*, біологічна активність штамів р. *Bacillus,* очевидно, визначається не стільки ступенем колонізації ними поверхні коренів чи синтезом антигрибних ліпопетидів, скільки здатністю продукувати стимулятори росту рослин (Hardoim et al., 2015). Тому рістстимулювальний ефект ми відмічали саме при ураженні низькопатогенними ізолятами, коли зниження ростових параметрів проростків пшениці незначне. Цього не відбувається при більш сильному ураженні, оскільки бактерії не здатні перешкоджати колонізації судин кореневої системи більш патогенними ізолятами *G. tritici.*

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про важливість біотичних факторів як ключових елементів, що впливають на біологічну ефективність мікробних біопрепаратів. Серед таких факторів заслуговує на увагу специфіка ураження фітопатогеном рослини-хазяїна та його патогенність. Особливо важливим є

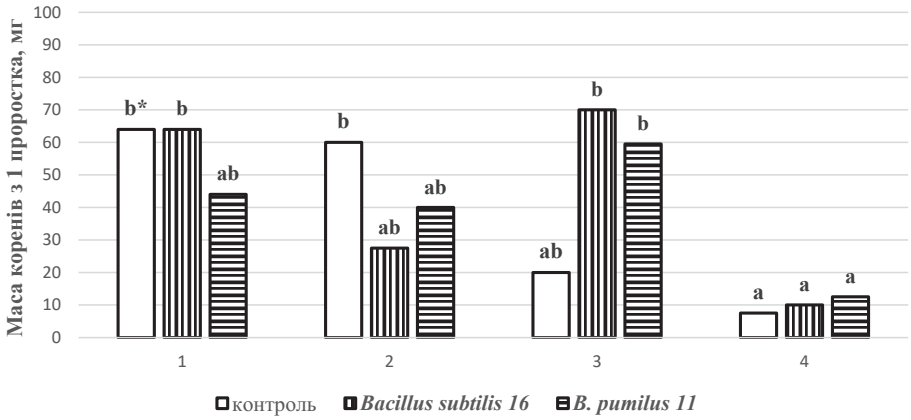

Рис. 1. Зміни маси кореневої системи проростків пшениці озимої при обробці бактеріальними суспензіями штамів *B. subtilis* 16 та *B. pumilus* 11 на фоні зараження ізолятами *G. tritici*

Ізоляти *G. tritici:* 1 – 3/16/17, 2 – 7/14, 3 - 16/16, 4 – 9/1.

*Різні літери (a, b) свідчать, що відмінність між середніми даним є істотною

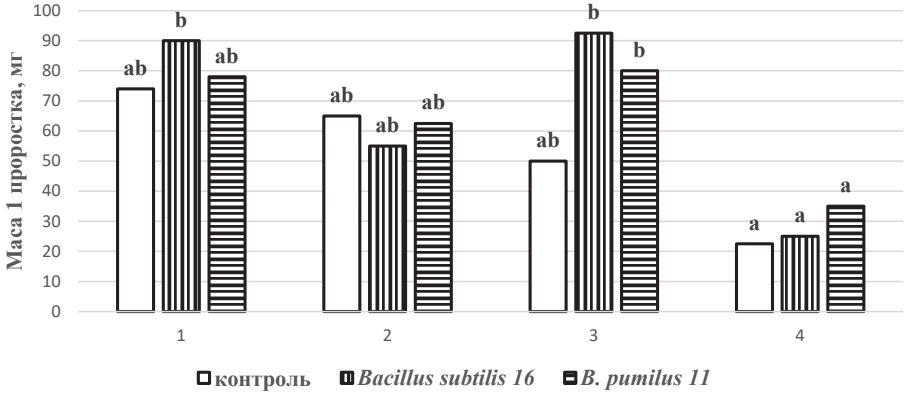

Рис.2. Зміни маси проростків пшениці озимої при обробці бактеріальними суспензіями штамів *B. subtilis* 16 та *B. pumilus* 11 на фоні зараження ізолятами *G. tritici*

Ізоляти *G. tritici:* 1 – 3/16/17, 2 – 7/14, 3 - 16/16, 4 – 9/1.

*Різні літери (a, b) свідчать, що відмінність між середніми даним є істотною

вивчення взаємодії рослин зі збудниками кореневих хвороб, оскільки їх еволюція тісно пов'язана з ґрунтом і відбувалася під тиском ґрунтової мікробіоти (Wong, 1983). Відомо мало прикладів генетично-детермінованої стійкості рослин до ґрунтових фітопатогенів, у більшості випадків природним надбанням рослин є зовнішній захист, який забезпечують їм ризосферні мікроорганізми (Cook et al., 1995). Здавна бактерії і гриби, які заселяють ґрунтові біоценози, викликають значний інтерес як потенційні агенти біологічного контролю (Osborne et al., 2018). Результати останніх досліджень свідчать про новий тип стійкості сортів пшениці до офіобольозу, який тісно пов'язаний з популяцією мікроорганізмів, яка формується у ризосфері такого сорту. Сорт з такою стійкістю, опосередковано, через мікробне угрупування, може мінімізувати популяцію *G. tritici* у ґрунті, і, незважаючи на високу сприйнятливість до хвороби, залишатися малоураженим (McMillan et al., 2018).

Висновки і перспективи.

Виділені нами із уражених офіобольозом коренів пшениці озимої ізоляти *G. tritici* характеризувалися різним рівнем патогенності. Патогенні властивості ізолятів більшою мірою проявлялися в інгібуванні росту проростків, ніж у зовнішніх симптомах. Від інгібувальної дії патогена на рослину залежала і ефективність двох штамів р. *Bacillus* при внесенні їх у вигляді суспензії клітин у ризосферу проростків пшениці. Високу ефективність бактеріального інокулянта відмічали при ураженні низькопатогенними ізолятами збудника офіобольозу, коли незначне зниження ростових параметрів проростків компенсувалось через стимулювальний ефект бактеріальних метаболітів. При сильнішому пригніченні проростків фітопатогеном обробка штамами р. *Bacillus* була неефективною.

Існує необхідність у подальших дослідженнях особливостей ураження рослин зернових культур різними видами ґрунтових фітопатогенів та їх

взаємовідношень з представниками ґрунтової мікробіоти, прямо та опосередковано, через рослину-хазяїна. Врахування специфіки того чи іншого захворювання дозволить підвищити ефективність біологічних препаратів та сприятиме екологізації захисту рослин.

Подяка. Автори висловлюють подяку професору НУБіП України, д-ру с.-.г наук Тетяні Патиці за надані для дослідження штами бактерій р. *Bacillus*, а також канд. біол. наук, старш. наук. співроб. Інституту генетики, фізіології та захисту рослин МОН Республіки Молдова Анжелі Дягілевій за допомогу в ідентифікації ізолятів *G. tritici* методом ПЛР-аналізу.

References

1. Hernandez-Rostrepo M., Groenewald J.Z., Elliot M.L., Cannong G., McMillan V.E., Crous P.W. (2016) Take-all or nothing. Studies in Mycol. 83. 19-48. www.studiesinmycology.org
2. Mauler-Machnik A., Rosslenbroich H.-J., Dutzmann S., Applegate J., Jautelat M. (2002) JAU 6476 – a new dimension DMI fungicide. Proc. of BCPC Conference -Pests & Diseases. Brighton, UK. 389 – 394.
3. Morshchatskyi A.A. (1977) Ofyobolez ozymoi pshenytsы. [Take-all of wheat] Zashchyta rastenyi. 5. 18. (In Russian)
4. Novokhatka V.H., Doroshenko N.V., Zabolotnaia V.A. (1990) Raspredelenye kornevыkh y prykornevыkh hnylei ozymoi pshenytsы v Ukraynskoi SSR. [Distribution of root and stem-base disease of winter wheat in Ukrainian SSR] Mykolohyia y fytopatolohyia. 24 (4). 352 – 357. (In Russian)
5. Grytsiuk N.V. (2015) Khvoroby koreniv i prykorenevoi chastyny stebla pshenytsi ozymoi ta obgruntuvannia zakhodiv zakhystu vid nykh v umovakh Polissia Ukrainy [Root and stem-base diseases of winter wheat and substantiation of their control in Ukrainian Polissya]. Kyiv, 21 p. (In Ukrainian)
6. Scott P.R., Hollins T.W. (1983) Role of plant breeding in controlling soilborne diseases of cereals. Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens / Ed. by Parker, C.A., Rovira, A.D., Moore, K.J., Wong, P.T.W., Kollmorgen, J.F. Proceedings of Section 5 of the Fourth International Congress of Plant Pathology, University of Melbourne, Australia, 17-24 Aug. 1983. 157 – 159.
7. Lisovyi M.P., Kolnobrytskyi M.I., Shupykova O.I. (1991) Rozvytok korenevykh hnylei ozymoi pshenytsi v riznykh ekolohichnykh zonakh URSR v zalezhnosti vid sortiv, struktury sivozminy ta poperednykiv. [Development of root diseases of winter wheat in different ecological zones of USSR in dependency of cultivars, crop rotation and previous crop]. Zakhyst roslyn. 38. 9 – 15. (In Ukrainian)
8. Lisovyi M.P., Ripenko V.M. (1991) Dzherela stiikosti ozymoi pshenytsi proty zbudnykiv korenevykh hnylei. [Sources of resistance against root rots causal agents]. Zakhyst roslyn. 38. 16 – 20. (In Ukrainian)
9. Gilligan C. A. (1983) Dynamics of root colonization by the take-all fungus. Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. / Ed. by Parker, C.A., Rovira, A.D., Moore, K.J., Wong, P.T.W., Kollmorgen, J.F. Proceedings of Section 5 of the Fourth International Congress of Plant Pathology, University of Melbourne, Australia, 17-24 Aug. 1983. 84 – 86.
10. Cook, R.J., Tomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G., Kim, D.S. (1995) Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proc Natl Acad Sci USA, 92(10). 4197-4201. https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4197
11. Osborne, S.-J., McMillan, V.E., White, R., Hammond-Kosack, K.E. (2018) Elite UK winter wheat cultivars differ in their ability to support the colonization of beneficial root-infecting fungi. Journ Exp Bot., 69(12), 3103-3115. DOI:10.1093/jxb/ery136
12. Deacon J.W. (2006) Fungal Biology. 4th ed. Blackwell Publishing. 371 pp.

13. Deacon J.W., Henry C.M. (1978) Studies on virulence of take-all fungus, Gaeumannomyces graminis, with reference to methodology. Ann. Appl. Biol., 89. 401 – 409.
14. Kwak Y.-S., Weller D.M. (2013) Take-all of wheat and natural disease suppression: a review. Plant Pathol. Journ., 29(2). 125-135. http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.SI.07.2012.0112
15. Ownley, B.H., Weller, D.M., Thomashow, L.S. (1992) Influence of in situ and in vitro pH on suppression of Gaeumannomyces graminis var. tritici by Pseudomonas fluorescens 2-79. Phytopathol. 82. 178-184.
16. Bateman, G.L. (1988) Pseudocercosporella anguioides, a weakly pathogenic fungus associated with eyespot in winter wheat at a site in England. Plant Path. 37. 291 – 296
17. Peixoto C.N., Ottoni G., Filippi M.C.C., Silva-Lobo V.L., Prabhu A.S. (2013) Biology of Gaeumannomyces graminis var. tritici isolates from rice and grasses and epidemiological aspects of crown sheath rot of rice. Tropical Plant Pathol., 38(6). 495- 504.
18. Kriuchkova L., Deaghileva A. (2018) Soilborne fungi on roots of wheat, their diversity and pathogenicity. Proceeding material of International Conference "The goals of sustainable development of the third millennium: challenges for universities of life sciences" (Vol. II), 23-25 May 2018, Kyiv. 53-54.
19. Kriuchkova L., Gritsyuk N. (2017) Populations of Pythium spp., Fusarium spp. and Gaeumannomyces spp. on wheat root and their association with root rot diseases. Proceeding materials of International Conference "Genetics, Physiology and Plant Breeding" (VI edition), 9-10 October 2017, Chisinau. 253-256.
20. Kriuchkova, L., Patyka, T., Shmyhel, T. (2017) In vitro potential of two Bacillus strains as biocontrol agents against plant pathogenic fungi. VI annual scientific conference «Biotechnology: accomplishment and hopes». NULESU, Kyiv. 24-25.
21. Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011) Bacillus-based biological control of plant diseases, in: Stoytcheva, M. (Eds.), Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management. IntechOpen, pp. 273-302. http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-themodern-world-pesticides-use-and-management/bacillus-based-biological-control-of-plant-diseases
22. Hardoim, P.R., van Oberbeek, V.S., Berg, G., Pirttila, A.M., Compant, S., Campisano, A., Doring, M., Sessitsch, A. (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiol Molecular Biol. Review., 79(3). 293-320. DOI: 10.1128/MMBR.00050-14
23. Wong P.T.W. (1983) Interaction between microbial residents of cereal roots. Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens / Ed. by Parker, C.A., Rovira, A.D., Moore, K.J., Wong, P.T.W., Kollmorgen, J.F. Proceedings of Section 5 of the Fourth International Congress of Plant Pathology, University of Melbourne, Australia, 17-24 Aug. 1983. 144 – 147.
24. McMillan, V.E., Canning, G., Moughan, J., White, R.P., Gatteridge, R.J., Hammond-Kosack, K.E. (2018) Exploring the resilience of wheat crops grown in short rotations through minimizing the build-up of an important soilborne fungal pathogen. Sci Reports. 8. 9550. DOI 10.1038/s41598-018-25511-8

L.O. Kriuchkova, D. R. Olifer (2020). PATHOGENICITY OF GAEUMANNOMYCES TRITICI (J. WALKER) HERN.-RESTR. & CROUS, THE TAKE-ALL FUNGUS AND EFFICACY OF BACILLUS STRAINS AGAINST DISEASE. *BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 11(4): 76-86. http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/14555. https://doi.org/10.31548/biologiya2020.04.007.*

Abstract. *Isolates of Gaeumannomyces spp. obtained from diseased roots of winter wheat showing take-all symptoms were characterized by pathogenicity. All isolates were more pathogenic on wheat and barley than on oat, and were identified as Gaeumannomyces tritici. Most isolates of G. tritici were characterized as middle pathogenic, the pathogenicity of one isolate was higher than those of others, and two isolates showed the lowest pathogenicity.*

In growth chamber assay, the effect of two Bacillus strains, B. subtilis 16 and B. pumilus 11, on take-all of wheat was studied. Pathogen inoculation was made by isolates of G. tritici of different pathogenicity. It was found that effective biological control depends on take-all severity, which, in turn, co-ordinates with the pathogenicity of fungal isolate. Applying the bacterial cells into the plant growth substrate stimulated the seedling growth when artificial inoculation was performed with a middle pathogenic isolate of G. tritici, and the disease severity was middle. There was no growth promotion by bacterial inoculant at slight disease severity. No stimulating effect was also observed at the high disease severity, where pathogen inoculation was performed with a highly pathogenic isolate of G. tritici.

Keywords: *Bacillus spp., biological control, Gaeumannomyces tritici, take-all, pathogenicity, winter wheat.*

УДК 632.98:633.1 https://doi.org/10.31548/biologiya2020.04.008
http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/14558

ПРИКЛАДНІ ПРОБЛЕМИ ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗОЛОТИСТОЇ КАРТОПЛЯНОЇ НЕМАТОДИ

А.Г. БАБИЧ, *кандидат сільськогосподарських наук, Національний університет біоресурсів і природокористування України, E-mail: nubipbabich@gmail.com*
Р.Д. СУХАРЕВА, *кандидат біологічних наук, УкрНДСКР ІЗР НААН України*
О.А. БАБИЧ, *кандидат біологічних наук, Національний університет біоресурсів і природокористування України, E-mail: nubipbabich@gmail.com*
І.В. ПРИХОДЬКО, *аспірант, Національний університет біоресурсів і природокористування України*

Анотація. *В Україні золотиста картопляна нематода – об'єкт внутрішнього карантину рослин поширена переважно на присадибних ділянках, значно рідше в колективних господарствах. Виявлення її осередків, особливо на початкових етапах заселення угідь досить ускладнено, оскільки типові ознаки ураження - глободерозом (відставання в рості й розвитку, хлорози, в'янення листя тощо) візуально проявляються лише після накопичення високої щільності популяції в результаті багаторічного вирощування пасльонових культур у монокультурі чи з мінімальними перервами між повторним їх розміщенням. Для удосконалення методів моніторингу золотистої картопляної нематоди апробовані різні схеми обстеження: по діагоналі, методом трикутника та конверту. Встановлено, що вищу ймовірність виявлення заселеності угідь золотистою картопляною нематодою забезпечує відбір ґрунтових зразків за методом конверту. Водночас порівняно з іншими схемами моніторингу, досягається більш рівномірне охоплення обстеженої площі.*

Сучасні методи флотації забезпечують високу ефективність виділення цист з ґрунту, доведеного до повітряно-сухого стану. Однак, зразки ґрунту, відібрані з вантажів підкарантинної продукції, часто потребують проведення експрес аналізу. Встановлено, що з підвищенням рівня вологості зразків ґрунту, спостерігалася тенденція до зниження частки виділення цист нематод. Тому, для досягнення вищої ефективності виділення цист нематод, слід застосовувати насичений розчин кухонної солі NaCl із розрахунку 50 грам на 1 літр води.

Визначення видового складу цистоутворюючих нематод картоплі доцільно проводити за комплексом морфометричних показників, біологічними особливостями (використанням сортів-диференціаторів) та біохімічними відмінностями. Однак, зважаючи на нинішню високу вартість біохімічних методів діагностування, їх слід застосовувати першочергово для ідентифікації карантинних

та нових для науки видів цистоутворюючих нематод. Зокрема, методом ізоелектричного фокусування білків в поліакриламідному гелі підтверджено належність цист, відібраних з осередків Закарпаття, до одного виду – золотистої картопляної цистоутворюючої нематоди Globodera rostochiensis (патотипу Ro1).

Ключові слова: *золотиста картопляна нематода, глободероз картоплі, методи виявлення, зразки ґрунту, виділення цист, ідентифікація видів.*

Актуальність.

Золотиста картопляна нематода (ЗКН) *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 є одним із найбільш небезпечних шкідливих організмів картоплі та інших пасльонових культур (EPPO, 2013).

Батьківщиною походження картопляної глободери вважають Андське передгір'я Південної Америки, звідки наприкінці XVIII століття вона була завезена в Європу, імовірно з посадковим матеріалом.

Нині золотиста картопляна нематода поширена в 36 країнах Європи, 12 – Азії, 6 – Африки, 3 – Північної Америки, 1 – Центральної Америки й Карибського регіону, 6 – Південної Америки, 3 – Океанії.

В Україні золотисту картопляну нематоду *G. rostochiensis* (Wollenweber, 1923; Behrens, 1975) уперше було виявлено в 1963 році на Всесоюзній науково-дослідній станції по раку картоплі Чернівецької області. Однак, незважаючи на запровадження карантинних заходів, запобігти її подальшому розселенню в нові регіони не вдалося. Так, в 1980 році осередки фітопаразита було зареєстровано в 11 областях на загальній площі 534,35 гектарів, а станом на 1 січня 1990 року площа заселення збільшилася до 4708,46 гектарів. На початок 2011 року осередки золотистої картопляної нематоди були зареєстровані у Вінницькій, Волинській, Житомирській, Закарпатській, Івано-Франківській, Київській, Луганській, Львівській, Одеській, Рівненській, Сумській, Тернопільській, Харківській, Хмельницькій, Черкаській, Чернівецькій і Чернігівській областях в 1124 населених пунктах 126 районів 17 областей України на загальній площі 4951,0558 гектарів (Babych, A., Babych, A., Suhareva, R., Statkevich, A., 2014).

В Україні ЗКН поширена переважно на присадибних ділянках, рідше в колективних господарствах. Основною причиною такого стану є багаторічне вирощування картоплі в монокультурі та її безконтрольна реалізація, недотримання сівозмін чи неможливість їхнього практичного впровадження, відсутність ефективних нематоцидів тощо. Так, в 1995 році площа заселення золотистою картопляною нематодою в індивідуальних господарствах складала 86 % від загальної інвазійної (2167,1 га), у 2007 році майже 95 % (від 5669,07 га), а нині понад 97 %.

Найбільші площі осередків глободерозу виявлено у Львівській, Волинській, Житомирській, Чернігівській, Сумській, Тернопільській та Хмельницькій областях. Однак, з огляду на те, що діагностування дуже низької вихідної чисельності популяції ускладнене, припускаємо, що фактична зона її поширення є значно більшою порівняно з офіційно зареєстрованою.

Розселення ЗКН відбувається в основному антропогенним шляхом, а саме, цисти можуть переноситися зараженим ґрунтом, знаряддями обробітку ґрунту, транспортними засобами, садивним матеріалом, а також водою, вітром тощо (Shesteperov A. A., Lukyanova E. A., 2018).

Для запобігання подальшого розселення, необхідно проводити систематичний моніторинг пасльонових культур, особливо в прикордонних областях. Тому, вдосконалення сучасних і розробка нових методів моніторингу глободерозу залишається однією з найбільш актуальних задач сьогодення.

Для виявлення цистоутворюючих нематод в агроценозах та встановлення щільності їхніх популяцій застосовують різні схеми маршрутних обстежень (по діагоналі, методом трикутника, конверта, човника тощо). Оскільки, єдиної загальноприйнятої схеми відбору проб немає, тому науковці і спеціалісти служби карантину рослин постійно працюють над їхнім удосконаленням.

В Україні розроблено стандартні методики (ДСТУ 3355-96 та ДСТУ 3344-96) відбору зразків ґрунту та бульб картоплі.

Фітосанітарне обстеження насаджень картоплі рекомендовано проводити у фазу цвітіння, коли на коренях рослин, навіть без засобів оптики, можливо, діагностувати наявність новоутворених самиць, білих за кольором на початкових фазах онтогенезу (Sukhomlin, K. B., Koshirets, V. M., Zinchenko, et al., 2019).

Визначення патотипів ЗКН здійснюють методом біотестування із використанням стандартних рослин-диференціаторів.

Для виділення цист нематоди із грунтових зразків застосовують різні способи: Фенуіка, Кірхнера, Вільке Бойнаке, флотаційно-лійковий та ін. Однак, постійно з'являються нові, більш досконалі пристрої. Зокрема, для виділення цист нематод із ґрунту спеціалістами Української науково-дослідної станції карантину рослин розроблено апарат «РУТА».

Ідентифікацію цистоутворюючих нематод картоплі здійснюють за трьома основними критеріями: комплексом морфометричних показників; біологічними особливостями (використанням сортів-диференціаторів) та біохімічними відмінностями.

Нині для ідентифікації розроблено також низку інших методів: ПЛР-аналіз, використання моноклональних антитіл у якості діагностичних процедур, серологічні методи ідентифікації тощо (Christoforou M., Pantelides, I.S., Kanetis, L., et al., 2014).

Проте, останнім часом, учені схиляються до думки, що достовірне визначення видового складу цистоутворюючих нематод можливе лише за поєднання різних методів: ПЛР-аналізу з морфо-анатомічною ідентифікацією та біотестуванням (Duceppe, MO., Lafond-Lapalme, J., Palomares-Rius, J.E. et al., 2017).

Метою дослідження було удосконалення методів виявлення, виділення та ідентифікації золотистої картопляної нематоди – об'єкта внутрішнього карантину рослин.

Матеріали і методи дослідження.

Обстеження полів, присадибних ділянок і відбір зразків ґрунту проводили за загальноприйнятими методиками (Shesteperov A. A., Lukyanova E. A., Bondarev A. A., 2019).

Вихідну (допосадкову) та післязбиральну щільність популяції

ЗКЦН встановлювали за кількістю личинок та яєць у цистах, виділених флотаційно-лійковим методом зі 100 $см^3$ ґрунту. Життєздатність личинок та яєць у цистах визначали за допомогою їхнього забарвлення 0,05 % розчином малахітової зелені та візуально під мікроскопом за формою тіла і станом внутрішніх органів личинок (Pridannikov, M.V., Petelina, G.G., Palchuk, et al., 2007).

Анально-вульварні пластинки цист виготовляли за загальноприйнятою методикою. Дослідження структури анально-вульварної області самиць проводили за великого збільшення під мікроскопом, а також із використанням імерсійної системи. Здатних до міграції личинкові стадії глободер виділяли модифікованим методом Бермана.

Морфологічні та морфометричні показники личинок II віку, самців вивчали на тимчасових водно-гліцеринових препаратах із використанням мікроскопів МБІ-3, МБІ-15. Фіксування нематод здійснювали ТАФом.

Для удосконалення методів виявлення КЦН в агроценозах проводили відбір грунтових проб нематологічним буром за різними схемами маршрутів (по діагоналі, методом трикутника та конверту).

Додатково також вивчали ефективність виділення цист залежно від рівня вихідної заселеності ґрунту та його зволоження. Повторність польових дослідів чотирикратна, лабораторно-вегетаційних – восьми-десятикратна.

Для визначення видової належності картопляних цистоутворюючих нематод апробовано біохімічний метод – ізоелектрофокусування білків у пластинах поліакриламідного гелю (С-3 %, Т-5 %) з амфолітом в інтервалі pH 3.0-10.0 з деякими модифікаціями (Karelov, A.V., Pylypenko, L.A., Kozub, N.O. et al., 2013). В основі методу – принцип розділення білків ізоелектричними точками у градієнті pH. Цисти КН для біохімічних досліджень замочували в дистильованій воді на 48 годин, після чого розтирали в мікрогомогенізаторі з 40 мл води та залишали на 20 годин у морозильній камері. Після відтавання екстракт цист – 25 мл поміщали в лунки аплікатора (Back, M., Haydock, P. and Jenkinson, P., 2006). Ізоелектрофокусування білків проб проводили на приладі АГГЕ-3 фірми «Хайу Калур» на охолоджуючому столику за напруги 600 вольт упродовж 2 годин і силі струму 15 міліампер. Білкові спектри нематод виявляли після відмивки гелю від амфолітів, з одночасною їхньою фіксацією розчином трихлороцтової кислоти, етанолу, води в співвідношенні 10 : 25 : 65. Після ізоелектричного фокусування білків гель інкубували впродовж 1 години за 37 ºС у 0,1 М фосфатному буфері з 0,025 % а – нафтилацетатом. Фарбування білкових спектрів і їхню відмивку від надлишку фарби (0,0С 5 % розчин кумасі синій R-250) проводили відповідно розчином оцтової кислоти, етанолу і води (10 : 25 : 65) (Sudha, R., Venkatasalama, E.P., Bairwa, A., et al., 2016). Фарбування естеразних зон здійснювали 0,1 % водним розчином міцного синього РР упродовж години. Фіксацію ізоферментного спектру естераз проводили розчином оцтової кислоти, етанолу і води (10 : 25 : 65) (Subbotin S.A., Vera I.C.D., Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G., 2011).

Результати дослідження та їх обговорення.

Виявлення осередків глободерозу, особливо на початкових етапах заселення угідь досить ускладнено,

оскільки типові ознаки ураження (відставання в рості та розвитку, хлорози, в'янення листя, а за дуже високої щільності й загибель рослин) візуально проявляються лише після багаторічного вирощування пасльонових культур у монокультурі або з мінімальними перервами.

За таких умов вищу імовірність їхнього виявлення забезпечує відбір ґрунтових зразків, першочергово з потенційно заселених карантинними організмами ділянок. Однак за проведення нематологічних обстежень виникають певні протиріччя, які потребують вирішення, зокрема, досягнення достовірного визначення рівня заселеності ґрунту за мінімально необхідної кількості відібраних зразків.

Для удосконалення методів моніторингу золотистої картопляної нематоди нами апробовані різні схеми маршрутів: по діагоналі, методом трикутника та конверту. Встановлено, що найбільшу ймовірність виявлення ЗКН забезпечував метод конверту з відбиранням 4 виїмок ґрунту на 5 погонних метрів маршруту (рис. 1).

Водночас, порівняно з іншими схемами моніторингу, досягається більш рівномірне охоплення площі ділянок із меншими інтервалами між відбором певних зразків. Апробація цього методу засвідчила доцільність його практичного застосування фахівцями карантинних інспекцій для виявлення осередків золотистої картопляної нематоди (табл. 1).

Отримані результати досліджень (табл. 2) засвідчили, що рекомендований метод Держстандарту виділення цист зі 100 см^3 ґрунту забезпечує імовірність виявлення цист лише у випадку надходження великих партій (завдяки збільшенню загального об'єму наважок ґрунту) або вантажів із високим рівнем інвазованості рослинної продукції.

Встановлено, що за наявності в 300 см^3 ґрунту однієї цисти стандартним флотаційним методом досягалося її виділення лише в 3 % випадків. За вихідної заселеності – 5 цист /300 см^3 ґрунту вірогідність виділення традиційним флотаційним методом становила 37 %. За рівня заселеності ґрунту – 15 цист імовірність їхнього виявлення досягала 87 %. За умови збільшення наважки ґрунту до 800 см^3 вірогідність виявлення 1 цисти в пробі становила відповідно 15 %, 5 – 72 %, а 15 цист – 96 %. Отже, для запобігання

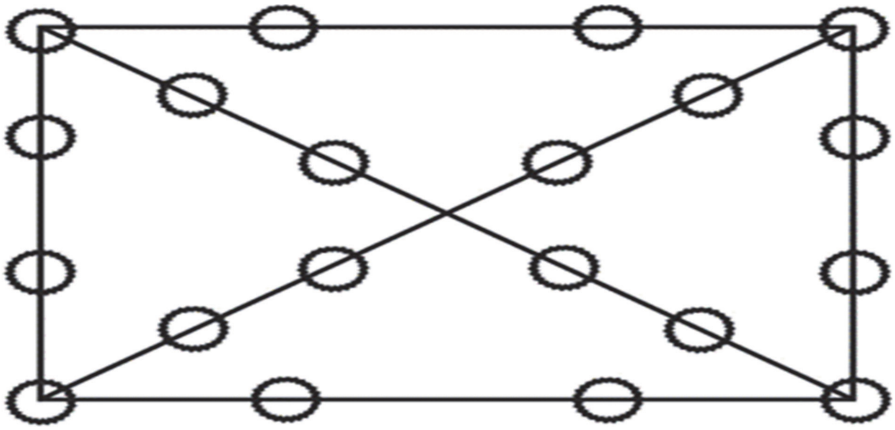

Рис. 1. Відбір ґрунтових зразків за схемою конверта

1. Ефективність виявлення заселеності ґрунту золотистою картопляною нематодою залежно від схеми відбору зразків

№ п/п	Схема відбору	Кількість цист, екз./100 см³ ґрунту				
		1	2	3	4	Середнє
м. Рахів Закарпатської області						
1.	Діагоналі	40	20	70	17	36,8
2.	Трикутника	16	53	88	104	65,3
3.	Конверта	43	166	250	420	219,7
м. Маневичі Волинської області						
1.	Діагоналі	32	96	193	172	123,2
2.	Трикутника	24	39	65	108	59,0
3.	Конверта	47	243	281	351	230,5

розселення цист ЗКН із підкарантинною продукцією доцільно для аналізу відбирати й аналізувати зразки загальним об'ємом – 800 см³ ґрунту.

Усі наявні нині методи базуються на виділенні цист із ґрунту доведеного до повітряно-сухого стану. Однак, зразки ґрунту, відібрані з вантажів підкарантинної продукції часто потребують проведення експрес аналізу. Тому, для визначення ефективності виділення цист залежно від рівня зволоженості ґрунту нами були проведені спеціальні дослідження.

Встановлено, що з підвищенням рівня вологості відібраних зразків ґрунту, спостерігалася тенденція до зниження частки їхнього виділення (табл. 3). Так, за 5 % вологості ґрунту флотаційним методом виділялося приблизно 97 % цист, а за 15,5 %, відповідно – 85 %. Тому, метою наших досліджень було підібрати економічно доступні речовини, які здатні забезпечити підвищення рівня виділення цист із вологого ґрунту.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що найдоцільніше для цієї мети застосовувати насичений розчин кухонної солі NaCl із розрахунку 50 грам на 1 літр води (табл. 3).

2. Вірогідність виявлення цист золотистої картопляної нематоди залежно від об'єму ґрунтової проби

№ п/п	Кількість цист в 300 см³ ґрунту	Вірогідність виявлення цист, %	
		Метод Держстандарту, 100 см³ ґрунту	Збільшена вибірка до 800 см³ ґрунту
1.	1	3	15
2.	3	19	28
3.	5	37	72
4.	7	53	81
5.	10	70	90
6.	15	87	96

3. Вплив вологості ґрунту на виділення цист картопляних нематод за методом Кірхнера

№ п/п	Вологість ґрунту в %	Вірогідність виділення, %	
		Рекомендований спосіб, %	При додаванні NaCl (50 гр/1л H_2O), %
1.	5,0	97	100
2.	10,0	90	99
3.	15,5	85	94
4.	24,0	73	90
5.	36,0	65	86

Традиційно цистоутворюючих нематод ідентифікують за комплексом морфологічних і біологічних особливостей та здатністю до розмноження на нематодостійких сортах. Однак, визначення видів і патотипів цими методами є досить складним і тривалим за часом процесом та вимагає певних практичних навичок. Тому, в останні роки для ідентифікації глободер почали застосовувати різні біохімічні методи.

Нашим завданням було оцінити можливість практичного використання методу ізоелектричного фокусування для ідентифікації цист золотистої картопляної нематоди.

У результаті проведених досліджень методом ізоелектричного фокусування білків в поліакриламідному гелі встановлено (рис. 2.), що білкові спектри (паспорти) цист відібраних з осередків Закарпаття вказують на їхню ідентичність і належність до одного виду *G. rostochiensis* (патотипу Ro_1) – золотистої картопляної цистоутворюючої нематоди, що також було підтверджено морфо-анатомічними та біологічними дослідженнями.

Водночас, зважаючи на нинішню економічну затратність проведення біохімічних методів, вважаємо за доцільне їхнє застосування першочергово для діагностування карантинних та нових для науки видів цистоутворюючих нематод.

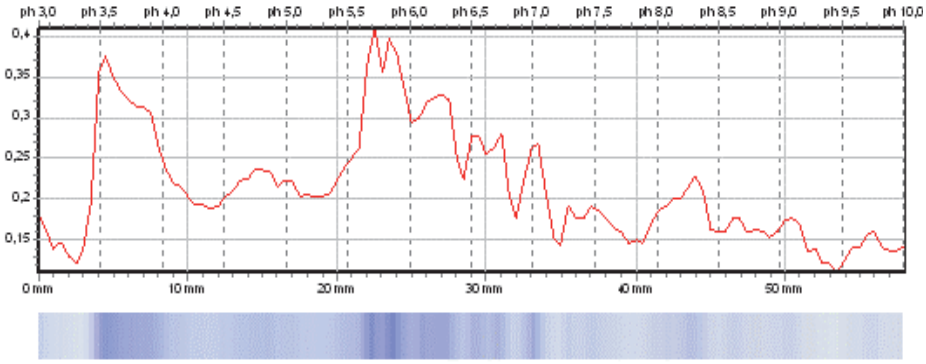

Рис. 2. Білковий паспорт цист золотистої картопляної нематоди із осередків Закарпатської області

Висновки та перспективи

1. Найбільшу ймовірність виявлення осередків золотистої картопляної нематоди забезпечував відбір зразків ґрунту за методом конверту.
2. Для запобігання розселення карантинних видів нематод, особливо із садивним матеріалом, варто відбирати й аналізувати на наявність цист зразки ґрунту загальним об'ємом – 800 см^3.
3. Використання насиченого розчину кухонної солі NaCl із розрахунку 50 грам на 1 літр води забезпечує підвищення ефективності виділення цист із вологого ґрунту флотаційним методом.
4. Біохімічні методи доцільно застосовувати першочергово для ідентифікації карантинних та нових для науки видів цистоутворюючих нематод.

References

1. EPPO. (2013). Globodera rostochiensis and Globodera pallida. PM 7/40 (3). OEPP/EPPO Bull., 43, 119-138. https://doi.org/10.1111/epp.12025
2. Babych, A. G., Babych, A. A., Suhareva, R. D., & Statkevich, A. A. (2014). Effect of crop rotation on the abundance of golden potato nematode. Plant protection and quarantine, 1, 42-45. https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-sevooborota-na-chislennost-zolotistoy-kartofelnoy-nematody/viewer
3. Shesteperov A. A., Lukyanova E. A. (2018). Foundations and methods of modeling of projected growth potato globoderosis on agrometeorological conditions. Rosiyskiy parazitologicheskiy zhurnal, 12(2), 95–103. https://doi.org/10.31016/1998-8435-2018-12-2-95-103
4. Sukhomlin, K. B., Koshirets, V. M., Zinchenko, M. O., Biletskiy, Y. V., & Zinchenko, O. P. (2019). The current state of the population of the golden potato cyst nematode Globodera rostochiensis (Nematoda, Heteroderidae) in the northwest of Ukraine. Biosystems Diversity, 27(1), 33–38. doi:10.15421/011905
5. Christoforou M., Pantelides, I.S., Kanetis, L., Ioannou, N. (2014). Rapid detection and quantification of viable potato cyst nematodes using qPCR in combination with propidium monoazide. Plant Pathology, 63, 1185-1192.
6. Duceppe, MO., Lafond-Lapalme, J., Palomares-Rius, J.E. et al. (2017). Analysis of survival and hatching transcriptomes from potato cyst nematodes, Globodera rostochiensis and G. pallida. Sci Rep 7, 3882. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03871-x
7. Shesteperov A. A., Lukyanova E. A., Bondarev A. A. (2019). Application the Hassell model for prediction the population density of golden nematode of potato after growing Globodera resistant variety of potato. Russian Journal of Parasitology, 13(1), 90–96. DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-1-90-96.
8. Pridannikov, M.V., Petelina, G.G., Palchuk, M.V., Masler, E.P., Dzhavakhiya, V.G. (2007). Influence of components of Globodera rostochiensis cysts on the in vitro hatch of second-stage juveniles. Nematology, 9, 837-844. https://doi.org 10.1163/156854107782331126
9. Karelov, A.V., Pylypenko, L.A., Kozub, N.O. et al. (2013). Allelic state of the molecular marker for golden nematode (Globodera rostochiensis) resistance gene H1 among Ukrainian and world potato (Solanum tuberosum ssp. tuberosum) cultivars. Cytol. Genet., 47, 294–297. https://doi.org/10.3103/S0095452713050058
10. Back, M., Haydock, P. and Jenkinson, P. (2006). Interactions between the potato cyst nematode Globodera rostochiensis and diseases caused by Rhizoctonia solani AG3 in potatoes under field conditions. Eur. J. Pl. Pathol., 114, 215-223. https://doi.org/10.1007/s10658-005-5281-y

11. Sudha, R., Venkatasalama, E.P., Bairwa, A., Bhardwaj, V. and Dalamu-Sharma, R. (2016). Identification of potato cyst nematode resistant genotypes using molecular markers. Scient. Hort., 198, 21-26. https://doi.org/10.1016/ j.scienta.2015.11.029

12. Subbotin S.A., Vera I.C.D., Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G. (2011). Identification, phylogeny and phylogeography of circumfenestrate cyst nematodes (Nematoda: Heteroderidae) as inferred from analysis of ITS-rDNA. Nematology, 13, 805–24. https://doi.org/10.1163/138855410X552661

A.G. Babich, R.D. Suhareva, O.A. Babich, I.V. Prichodko (2020). APPLIED PROBLEMS OF DETECTION AND IDENTIFICATION OF GOLDEN POTATO NEMATODE. *BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 11(4): 87-95. http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/14558. https://doi.org/10.31548/biologiya2020.04.008.*

Abstract. *In Ukraine, the golden potato nematode - an object of internal quarantine of plants is distributed mainly in homesteads, much less often in collective farms. Detection of its foci, especially in the initial stages of land settlement is quite difficult, because the typical signs of damage - globoderosis (lag in growth and development, chlorosis, leaf wilting, etc.) are visually manifested only after the accumulation of high population density as a result of long-term cultivation of nightshade crops in monoculture or with minimal intervals between re-placement. To improve the methods of monitoring the golden potato nematode, various survey schemes were tested: diagonally, by the method of triangle and envelope. It is established that the highest probability of detection of land population by the golden potato nematode is provided by the selection of soil samples by the envelope method. At the same time, compared to other monitoring schemes, a more uniform coverage of the surveyed area is achieved.*

Modern methods of flotation provide high efficiency of isolation of cysts from the soil brought to an air-dry state. However, soil samples taken from quarantined goods often require rapid analysis. It was found that with increasing humidity of soil samples, there was a tendency to decrease the proportion of nematode cysts. Therefore, to achieve higher efficiency of nematode cyst isolation, a saturated solution of NaCl should be used at the rate of 50 grams per 1 liter of water.

Determination of the species composition of cyst-forming potato nematodes should be carried out on a set of morphometric parameters, biological features (using varieties of differentiators) and biochemical differences. However, given the current high cost of biochemical diagnostic methods, they should be used primarily to identify quarantine and new to science species of cyst nematodes. In particular, the method of isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gel confirmed the belonging of cysts selected from Transcarpathian cells to one species - golden potato cyst nematode Globodera rostochiensis (pathotype Ro1).

Keywords: *golden potato nematode, potato globoderosis, detection methods, soil samples, cyst isolation, species identification.*

ДО УВАГИ АВТОРІВ!

Вимоги до розміщення статті в журналі та на сайті журналу:

- ✓ УДК;
- ✓ назва статті;
- ✓ ім'я та прізвище автора (авторів);
- ✓ анотація;
- ✓ ключові слова;
- ✓ актуальність (introduction);
- ✓ аналіз останніх досліджень та публікацій (Analysis of recent researches and publications);
- ✓ мета (purpose);
- ✓ матеріали і методи дослідження (materials and methods);
- ✓ результати дослідження та їх обговорення (results and discussion);
- ✓ висновки і перспективи (discation);
- ✓ referens;
- ✓ назва статті, ім'я та прізвище автора (авторів), анотація (abstract), ключові слова (keywords) англійською мовою.

У **статті має бути переклад англійською мовою (сумарним обсягом не менше ніж 1800 знаків):** назва статті, ім'я та прізвище автора (авторів), анотація на 3-6 речень головних думок, важливих тез і формулювань, тексту матеріалу статті, що виявляє наукову новизну (нове знання).

Обов'язковим є список використаних джерел **(Referens)** наприкінці статті (праці не лише державних, а й зарубіжних дослідників). Посилання на авторів або на наукову працю має позначатися в тексті у квадратних дужках за міжнародним стандартом **APA (використовуватиметься під час розташування рукописів у зарубіжних базах)**.

Рекомендований обсяг статті 10-20 стор. знаків. Табличний та графічний матеріал може бути лише книжкового формату, а його кількість доречною. Таблиця повинна мати порядковий номер, вказується зліва перед назвою таблиці. Назва таблиці подається над таблицею (кегль шрифту – 14, напівжирний, міжрядковий інтервал – 1,5, розміщення по ширині). Текст таблиці подається гарнітурою Times New Roman (кегль шрифту – 12, міжрядковий інтервал – 1). Рисунок повинен бути єдиним графічним об'єктом і згрупованим; мати номер і назву, що вказується поза об'єктом (кегль шрифту – 14, напівжирний, міжрядковий інтервал – 1, розміщення по ширині). Розташування рисунку має бути в тексті. Рисунки повинні бути контрастними, чорно-білими або кольоровими. Графічні матеріали не повинні бути сканованими!!! Формули (зі стандартною нумерацією) виконуються в редакторі Microsoft Equation. В наукових статтях не допускається автоматичних переносів слів та використання макросів. Абзаци позначати тільки клавішею "Enter", не застосовувати пробіли або табуляцію (клавіша "Tab"). Не допускається використання ущільненого або розрідженого шрифту.

Категорично не приймаються описові статті (сукупність загальновідомих характеристик та оцінок об'єкта досліджень, або сукупність запозичених характеристик і тез).

Редакція залишає за собою право на скорочення, незначне редагування та виправлення статті (зі збереженням головних висновків та стилю автора).

При передруку посилання на науково-практичний журнал «BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION» *обов'язкове.*