Сиводед Є. В., Кирик М. М., Китаєв О. І., Кривошапка В. А., Грисюк С. М., Пелехатий В. М.
УДК 632.4:633.854.78:543.427.4

ЕКСПРЕСНИЙ МЕТОД ДІАГНОСТИКИ ГРИБНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ СОНЯШНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

Є. В. СИВОДЕД, провідний спеціаліст, фітопатолог
Херсонська обласна фітосанітарна лабораторія
М. М. КИРИК, доктор біологічних наук, академік НААН України, професор кафедри фітопатології ім. акад. В. Ф. Пересипкіна
Національний університет біоресурсів і природокористування України
О. І. КИТАЄВ, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, провідний інженер лабораторії фізіології рослин та мікробіології
Інститут садівництва НААН України
В. А. КРИВОШАПКА, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії фізіології рослин та мікробіології
Інститут садівництва НААН України
С. М. ГРИСЮК, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри радіобіології та радіоекології
Національний університет біоресурсів і природокористування України
В. М. ПЕЛЕХАТИЙ, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри рослинництва
Житомирський національний агроекологічний Університет
E-mail: evgeniyasyvoded@gmail.com

Анотація. *Дана робота присвячена розробці методики ранньої діагностики грибних захворювань сільськогосподарських рослин, що підвищить ефективність захисних заходів відносно них.*

Метою дослідження є розробка експресного методу ранньої діагностики грибних захворювань соняшника шляхом модифікації методів реєстрації індукції флуоресценції хлорофілу й флуоресцентної мікроскопії.

Дослідження проводили протягом 2016–2018 років у польових умовах на території науково-виробничої фірми «Дріада» Генічеського району Херсонської області, Херсонській обласній фітосанітарній лабораторії та у лабораторії фізіології рослин і мікробіології Інституту садівництва НААН України. Об'єктами досліджень були рослини соняшника однорічного Helianthus annuus L. *За умов запропонованої нами модифікації та поєднання методів фотоіндукції флуоресценції та люмінесцентної мікроскопії встановлено наявність прихованої грибної інфекції у рослин соняшника однорічного.*

Визначено, що у рослин соняшника за наявності прихованої грибкової інфекції спостерігаються зміни форм індукційних кривих та значне зростання

їх інтенсивності на рівні Fpl, Fp та Ft.

Сиводед Є. В., Кирик М. М., Китаєв О. І., Кривошапка В. А., Грисюк С. М., Пелехатий В. М.

З'ясовано, що для аналізу впливу грибної інфекції найбільш об'єктивним показником фотоіндукції флуоресценції є параметр Kpl.

Підтвердженням наявності прихованої грибної інфекції є поява спалахів жовто-зеленої флуоресценції за умов попереднього впливу на листки рослин температури +60 °С.

Грибна хвороба була виявлена візуально через 12–18 діб після визначення з використанням методів фотоіндукції флуоресценції та люмінесцентного зображення й була ідентифікована як Phomopsis helianthi M.

Ключові слова: *соняшник однорічний, грибні захворювання, діагностика, індукція флуоресценції хлорофілу, Phomopsis helianthi* M.

Актуальність. Відомо, що причинами виникнення захворювання рослин можуть бути як чинники навколишнього середовища (літня посуха або зимові морози, нестача поживних речовин в ґрунті або їх надлишок і т.п.), так і різні паразитичні організми (гриби, бактерії, віруси). Більшість інфекційних хвороб характеризуються грибною етіологією. Так, із 162 небезпечних захворювань у країнах Центральної Європи грибними спричиняються 135 (83 %). Ці патогени широко розповсюджені в природі і за сприятливих для їх розвитку умов завдають значної шкоди [9]. Недобір врожаю соняшника від такого особливо небезпечного грибкового патогену, як *Phomopsis helianthi* M. може сягати понад 70 % [10]. Для розробки заходів щодо обмеження розвитку та зниження шкідливості захворювання важливе значення має розробка методики їх ранньої діагностики.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. На сьогоднішній день існує багато методів діагностики хвороб та ідентифікації грибних патогенів. Найбільш простий спосіб ідентифікації патогенів за зовнішніми ознаками захворювання (симптомами), які вони спричиняють на уражену рослину [15]. Однак за умов використання даного методу можуть виникати ускладнення, які пов'язані з тим, що однакові ураження рослини можуть викликати різні мікроорганізми.

Стандартний для фітопатологів підхід при визначенні фітопатогенних грибів – виділення їх в чисту культуру на живильному середовищі, отримання характерних морфологічних утворень (найчастіше – спороношення) і подальшою ідентифікацією з використанням мікроскопів.

Але тут виникають певні труднощі: не всі паразитичні гриби можливо культивувати на штучних поживних середовищах: багатьом потрібна наявність живих тканин рослини-господаря або присутність інших компонентів [14].

За останній час широкого розвитку отримали молекулярні методи дослідження. Вони базуються на використанні ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, імуноферментний аналіз), або ПЦР (полімеразна ланцюгова реакція, *polymerase chain reaction*). Однак ці методи не так часто використовуються через складність отримання антитіл та специфічну будову клітинних стінок.

Тому, незважаючи на універсальність цих методів та переваги у порівнянні з іншими, перспективи їх практичного використання мають низку труднощів, які полягають у тому, що для їх розробки і перевірки потрібно досить багато часу і відповідна експериментальна база. Крім того, дані методи діагностики захворювань дозволяють визначити грибні патогени виключно після початку розвитку патологічного процесу. У таких випадках не завжди можливо вчасно здійснити захисні заходи відповідно до ідентифікованих патогенів.

Водночас встановлено, що на ранніх стадіях захворювання, які ще не можливо виявити візуально, вже відбуваються перші зміни у перебігу фотосинтетичних процесів і їх можливо зафіксувати [5]. У зв'язку з цим останнім часом для аналізу перебігу цих процесів у листках рослин все частіше використовують метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ). Флуоресценція хлорофілу є єдиним показником, що дозволяє вивчати у живих об'єктах проходження фотохімічних реакцій, пов'язаних з роботою фотосистеми II (FS 2) вищих рослин. Дана система відповідає за розклад води і виділення кисню та є чутливою не тільки до абіотичних, але й біотичних чинників [3].

Високо-інформативні спектрально-флуоресцентні методи останнім часом використовують у екологічному моніторингу для визначення впливу на рослини наведених вище чинників. Підґрунтям для їх застосування є висока чутливість структурних компонентів клітин, і, перед усім, мембранних систем, на дію стресових чинників, що проявляється в накопиченні окислених речовин, в тому числі ліпідів, серед яких найнебезпечнішим є малоновий діальдегід [7].

Сучасні чутливі та безінвазійні мікроспектральні методи дозволяють проводити дослідження рослинних тканин та клітин не порушуючи їх цілісності, отримувати інформацію за невеликий проміжок часу безпосередньо після дії стресу, або на ранньому етапі розвитку патогенів [13].

Флуоресценція хлорофілу та її індукційні зміни реєструються портативними приладами для визначення функціонального стану рослин у польових умовах [1, 2, 4].

Це слугує основою для широкого застосування даного методу у діагностиці стану рослин. Основним показником цього методу є крива індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), яка показує залежність інтенсивності флуоресценції від часу після початку освітлення. Встановлено, що певні ділянки цієї кривої є індикаторами відповідних фізіологічних процесів у ланцюгу фотосинтезу. Порушення окремих його ланок, викликані екзо- та ендогенними чинниками, проявляються у характерних змінах відповідних ділянок кривої ІФХ [5]. Перспективним методом, що дозволяє визначати наявність вірусної інфекції за функціональними змінами в рослинах є метод фотоіндукції флуоресценції хлорофілу (метод Каутського) [11]. Перевагами даного методу є висока чутливість, експресність та можливість проводити діагностику вірусних захворювань не тільки в лабораторних але й у польових умовах [12].

Однак, дані методи повною мірою не адаптовані для ранньої діагностики грибних захворювань сільськогосподарських культур. У зв'язку з цим виникає потреба у розробці методики ранньої діагностики цих хвороб, і зокрема, соняшника, шляхом модифікації методу реєстрації індукції флуоресценції хлорофілу та методу флуоресцентного зображення.

Мета дослідження. Розроблення експресного методу ранньої діагностики грибних захворювань соняшника шляхом модифікації методів реєстрації індукції флуоресценції хлорофілу та флуоресцентної мікроскопії.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводили протягом 2016–2018 років у польових умовах на території господарств НВФ «Дріада» Генічеського району Херсонської області, Херсонській обласній фітосанітарній лабораторії та у лабораторії фізіології рослин і мікробіології Інституту садівництва НААН України. Об'єктами досліджень були листки рослин соняшника однорічного *Helianthus annuus* L. гібриду Одеський 28/3.

Дослідження проводили одночасно на 11 рослинах у 3-кратній повторності. Зразки для аналізів відбирали з п'ятої пари листків у першій декаді червня з візуально здорових рослин. Подальші спостереження за проявом хвороб на рослинах проводили кожні 7 днів до збирання врожаю.

У відібраних у польових умовах листках соняшника визначали перебіг фотосинтетичних процесів шляхом вимірювань змін інтенсивності прямої флуоресценції хлорофілу за проміжок часу від однієї мілісекунди до чотирьох

хвилин з використанням портативного хронофлуометра «Флоратест». Визначення індукції флуоресценції хлорофілу виконували за інтенсивністю збуджуючого світла 60–80 Вт/м^2. У кінетиці індукційних переходів флуоресценції хлорофілу знаходять своє відображення процеси як світлової, так і темнової фаз фотосинтезу. З метою оцінки стану фотосинтетичного апарату проводили оцінку змін у функціонуванні фотосинтетичних процесів у листках соняшника. Дослідження проводили на основі показників фотоіндукції флуоресценції, а саме:

F_o – початкове значення флуоресценції після ввімкнення освітлення;

F_{pl} – рівень її на час досягнення тимчасового сповільнення зростання її сигналу, так зване “плато”;

F_p – максимальне значення флуоресценції;

F_t – стаціонарний рівень її через 1,5–3 хвилини після початку освітлювання.

На основі отриманих результатів будували індукційну криву стосовно кожної досліджуваної рослини.

Всі показники індукційної кривої представлено у відносних одиницях еталона флуоресценції (світлофільтр ОС-14) з емісією в тому ж спектральному

діапазоні, що й флуоресценція хлорофілу листка.

Оцінку ефективності роботи фотосинтетичного апарату листків рослин здійснювали за допомогою коефіцієнтів K_{pl}, K_1 та RFD, які обчислювали за формулами:

$K_{pl} = (F_{pl} – F_o) / F_v$ – частка центрів, що не відновлюють первинний акцептор електронів Q_A;

$K_1 = (F_p – F_o) / F_p$ – коефіцієнт ефективності електронного транспорту поблизу реакційних центрів фотосистеми 2 (FS 2);

$RFD = (F_p – F_t) / F_t$ – коефіцієнт ефективності темнових фотохімічних процесів.

Наявність грибних захворювань визначали з використанням лабораторного мікроспектрофлуориметра СМФ-2р створеного на базі люмінесцентного мікроскопу МЛ-4 за термолюмінесцентною методикою О. І. Китаєва із співавторами [6]. Спостереження індукції флуоресценції хлорофілу проводили на живих листках рослин після їх п’ятихвилинної адаптації до темряви. Флуоресценцію листків соняшника збуджували синьо-фіолетовим світлом ($\lambda_{макс}$ = 436 нм) інтенсивністю 300-400 Вт/м^2 і фіксували люмінесцентне зображення цифровою фотокамерою *Nicon*. Надалі листки нагрівали до температури 60 °С і переглядали під люмінесцентним мікроскопом МЛ-4 з фотофіксацією змін кольору свічення.

Визначення грибної хвороби та оцінка її впливу в якості стрес – чинника, проводили шляхом порівняння інформативних показників ІФХ дослідних рослин.

Ідентифікацію патогену проводили за загальноприйнятими методиками з використанням мікроскопів *Karl Zeiss* та *Primo Star Zeiss* з виводом зображення на монітор комп'ютера [8].

Результати досліджень та їх обговорення. Як відомо з літературних джерел [3] при активному фотосинтезі, коли всі реакційні центри (РЦ) знаходяться у відкритому робочому стані, за умов слабкого освітлення, майже вся поглинута енергія світла використовується у процесі фотосинтезу. Тому інтенсивність флуоресценції хлорофілу у клітині набагато нижча, ніж у розчині. Невелика частина енергії електронного збудження (не більш 3 %) переходить в енергію світла флуоресценції у вигляді так званої фонової флуоресценції F_0. Як правило, за нормальних умов величина F_0 мала, що говорить про активне використання клітинами енергії поглинутого світла. Але, якщо за умов будь-яких впливів, порушується стан фотосинтетичних мембран, то РЦ переходять у неактивний (закритий) стан, коли потік електронів у первинних процесах фотосинтезу зупиняється. В цих умовах поглинута енергія світла вже не може використовуватись у даному процесі і в зв'язку з цим, флуоресценція хлорофілу сильно зростає та наближається до своїх максимальних значень F_P. Встановлено, що закриті центри можна створити також надлишковою освітленістю клітин, коли відбувається світлове насичення фотосинтезу. Фотосинтетичний ланцюг переносу електрона наче "захлинається" від надлишку поглинутої світлової енергії, переводячи все більшу частину її у флуоресценцію [3].

Оскільки існує тісний зворотний зв'язок між фотосинтетичними реакціями й інтенсивністю флуоресценції хлорофілу, нами було досліджено взаємозв'язок між змінами параметрів індукції флуоресценції хлорофілу та наявністю грибних захворювань у рослин, які не мали візуальних уражень вірусами та хворобами (рис. 1, а), що також було підтверджено аналізом за допомогою світлової мікроскопії (рис.1, б). У процесі виконання робіт ми проводили експресні дослідження флуоресценції хлорофілу. Початок відмінностей у рівнях флуоресценції між рослинами були зафіксовані у першій декаді червня (рис. 2). У першу чергу це стосується графіку кривих досліджуваних рослин жовтого (6), синього (7) та бордового кольору (2). Для цих індукційних кривих зафіксовано збільшення F_0 на 46 %,

що є ознакою відносного зростання кількості неактивних хлорофілів, які не передають енергію на реакційні центри FS 2. Значення флуоресценції на рівні плато (Fpl) зростає на 76 %, при цьому коефіцієнт плато збільшується майже на 70 %, що вказує на значне зростання неактивних реакційних центрів FS 2. Високий рівень флуоресценції

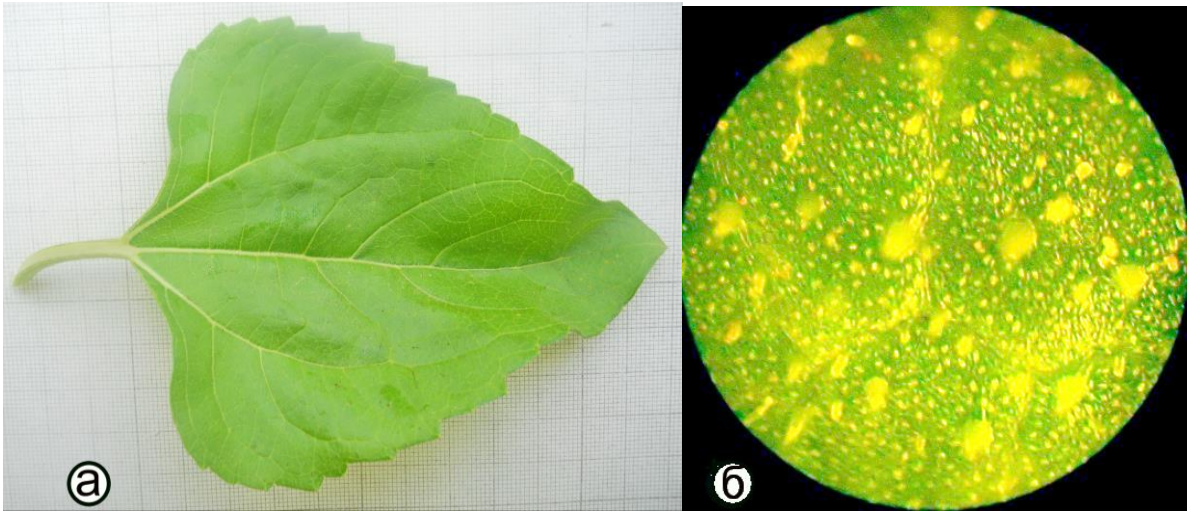

Рис. 1. Листок соняшника без видимих симптомів грибних хвороб. Візуальне зображення (а) та його вигляд за світлової мікроскопії (б). × 40.

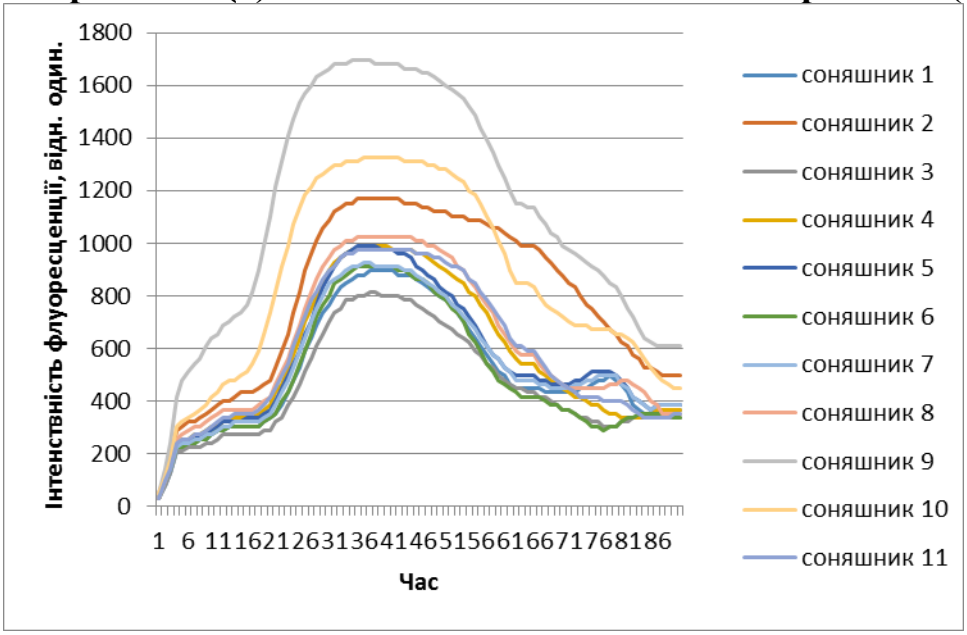

Рис. 2. Індукційні зміни флуоресценції хлорофілу листків рослин соняшника

хлорофілу в максимумі індукції флуоресценції (вищий на 50 %) свідчить про пригнічення фотосинтетичних процесів, що проявляється у більш швидкому закриванні реакційних центрів FS 2 та супроводжується значним зростанням рівня флуоресценції хлорофілу. При цьому відмічено більш повільне зниження флуоресценції хлорофілу до стаціонарного рівня Ft. На окремих ділянках цього зниження рівень флуоресценції хлорофілу був вдвічі

вищий, що також може бути викликано впливом інфекції на швидкість перебігу темнових фотохімічних процесів.

У процесі досліджень нами виявлено, що усім досліджуваним рослинам була притаманна наявність рівномірної за інтенсивністю емісії флуоресценції червоного кольору. З метою виявлення прихованої грибкової інфекції листки рослин під час дослідження були піддані дії температури +60 °С. Під впливом цього чинника за період дослідження методом люмінесцентної мікроскопії на окремих зразках нами зафіксовано появу спалахів жовто-зеленої флуоресценції (рис. 3, а).

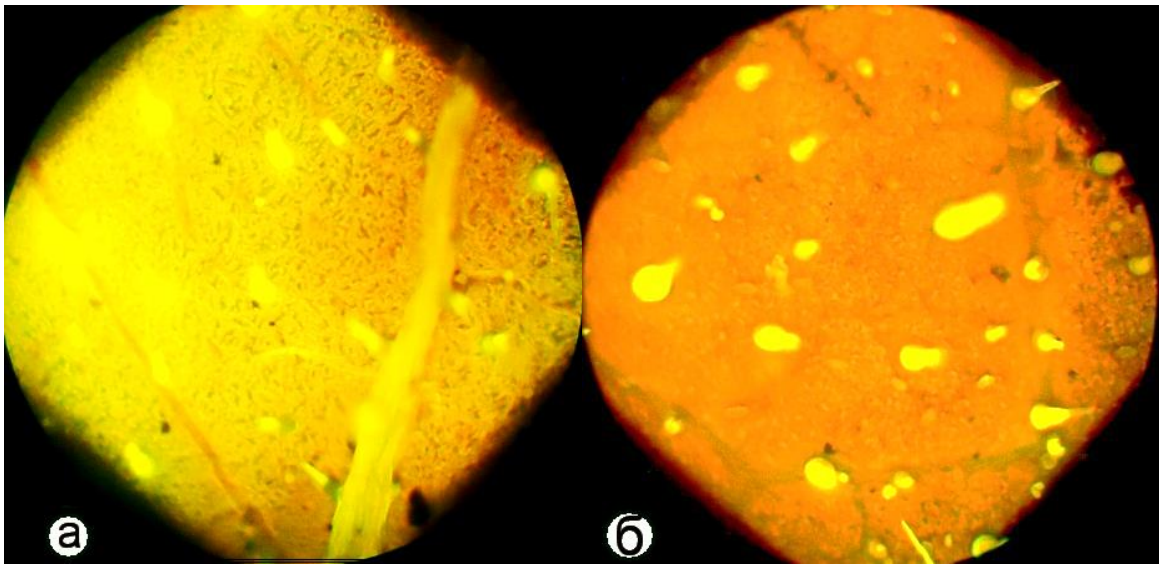

Рис. 3. Листки соняшника однорічного під люмінесцентним мікроскопом, де: а – вигляд під люмінесцентним мікроскопом листка соняшника з ранніми ознаками наявності грибкового патогену. Т = 60 °С; б – вигляд неураженого листка.

Зростання емісії флуоресценції, як відомо, є наслідком накопичення прихованих окиснених речовин. Жовта флуоресценція притаманна окисненим ліпідам (альдегідам, найнебезпечнішим з яких є малоновий діальдегід) мембран клітин і, перед усім, хлоропластів [7]. У свою чергу поява значної кількості альдегідів в мембранах свідчить про патологічні зміни в клітинах, що дозволяє припустити наявність грибної хвороби, яка ще не проявила себе візуально. Встановлено, що листки у рослини з відсутніми грибковими хворобами після температурного впливу не змінили світло-червоний колір флуоресценції (рис. 3, б).

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

на найбільш ранніх стадіях її розвитку.

У подальших польових дослідженнях ми спостерігали за станом відібраних рослин соняшника. Через 12–18 діб нами були зафіксовані перші прояви грибної хвороби у тих рослин, листки яких раніше мали жовто-зелену флуоресценцію (рис. 4).

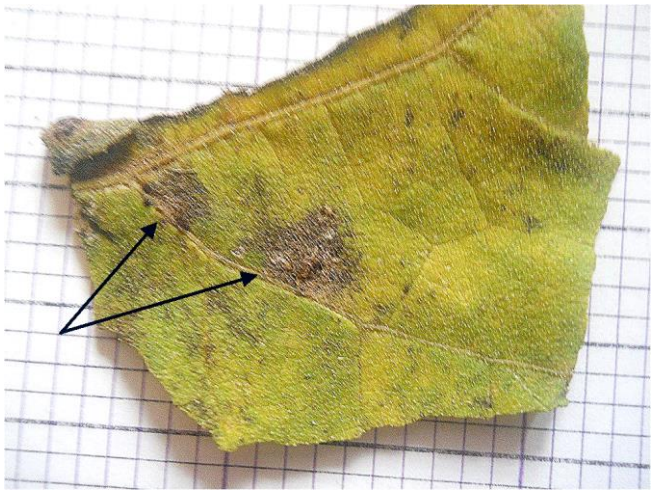

Рис. 4. Початкове ураження листка соняшника грибковою хворобою (указано стрілкою)

У подальшому шляхом мікроскопіювання дана хвороба була ідентифікована нами як *Phomopsis helianthi* M. (рис. 5). Таким чином, за аналізом

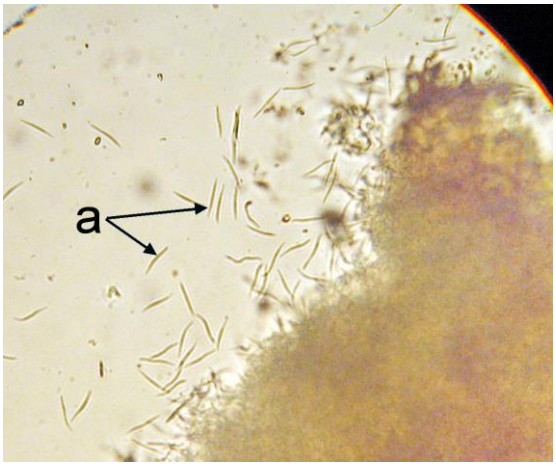

Рис. 5. *Phomopsis helianthi* M. на листках соняшника, де а) β-спори. ×320.

індукційних змін флуоресценції хлорофілу та люмінесцентної мікроскопії після дії температури ми можемо діагностувати наявність грибної інфекції у дослідних зразках соняшника однорічного *Helianthus annuus* L.

Висновки і перспективи. За умов запропонованої нами модифікації та поєднання методів фотоіндукції флуоресценції та люмінесцентної мікроскопії встановлено наявність прихованої грибкової інфекції у рослин соняшника однорічного.

Визначено, що у рослин соняшника за наявності прихованої грибкової інфекції спостерігаються зміни форм індукційних кривих та значне зростання їх інтенсивності на рівні Fpl, Fp та Ft.

З'ясовано, що для аналізу впливу грибної інфекції найбільш об'єктивним показником фотоіндукції флуоресценції є параметр Kpl.

Підтвердженням наявності прихованої грибної інфекції є поява спалахів жовто-зеленої флуоресценції за умов попереднього впливу на листки рослин температури +60 °С.

Грибна хвороба була виявлена візуально через 12–18 діб після визначення з використанням методів фотоіндукції флуоресценції та люмінесцентного зображення й була ідентифікована як *Phomopsis helianthi* M.

Перспективним є подальша розробка даного методу з метою ранньої діагностики наявності прихованої інфекції у різних сільськогосподарських рослин.

Список використаних джерел

1. Войтович І. Д., Китаєв О. І., Клочан П. С., Романов В. О. та ін. Пристрій для визначення стану нативного хлорофілу. : Деклараційний патент на корисну модель. Україна (19)(UA)(11) 12382 (51) МПК (2006) G09B 23/28 (2006.01) G01N 21/64. Бюл. № 2, від 15.02.2006. С. 1-6.

2. Брайон О. В., Корнєєв Д. Ю., Снєгур С. С., Китаєв О. І. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флуоресценції хлорофілу. : Методичні вказівки для студентів біологічного факультету. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2000. 25 с.

3. Карапетян Н. В. Бухов Н. Г. Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений. : Физиология растений. 1986. Т. 33. № 5. С. 1013-1026.

4. Китаєв О., Клочан П., Романов В. Портативний хронофлуорометр для експрес-діагностики фотосинтезу «Флоратест». : Зб. доп. конф. – звіту з комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України у галузі сенсорних систем та технологій, Київ, 2–3 лютого 2005 р. С. 59.

5. Корнеев Д. Ю. Информационные возможности индукции флуоресценции хлорофилла Киев: Альтерпрес, 2002. С. 15–28.

6. Китаев О. И., Скряга В. А., Матвиенко Н. В., Бублик Н. А., Долид А. В. Люминесцентный спектральный метод диагностики сорто-подвойной совместимости груши. Материалы Международной научно-практической конференции «Достижения науки и инновации в садоводстве». Министерство сельского хозяйства РФ Мичуринский государственный аграрный университет, г. Мичуринск, 14-16 октября 2009 г. С. 94–96.

7. Мерзляк М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в

мембранах растительной клетки. ; Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М.: ВИНИТИ, 1989. Т. 6: 167 с.

8. Методы фитопатологии / Кирай З., Клемент З., Шоймонш Ф., Вереш Й. М.: Колос, 1974. С. 3–40.

9. Мюллер Э., Лёффлер В. Микология*:* Пер. с нем. М.: Мир, 1995. 343 с.

10. Петренкова В. П., Долгова Е. М. Болезни подсолнечника на Украине. : Защита и карантин растений, 1996. № 5. С. 41–42.

11. Чернюк С. О., Бойко А. Л., Корнєєв Д. Ю., Маменко П. М. Вплив вірусу смугастої мозаїки пшениці на параметри індукованої флюоресценції рослин *Triticum aestivum*. : Биополимеры и клетка. 1999. Т. 15, № 5. С. 445–448.

12. Пат. 91452 Україна, МПК (2009) G01N21/64, A01G7/00/Спосіб виявлення вірусних уражень рослин / Артеменко Д. М., Васюта С. О., Войнович І. Д., Китаєв О. І., Клочан П. С., Колесник Ю. С., Міщенко Л. Т., Романов В. О., Скряга В. А., Таранухо Ю. М., Федак В. С.; заявник і патентовласник Інститут кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України. – published 26.07.2010, № 14.

13. Clinostation influence on microspectral parameters of fluorescence in Healthy and virus infected Apogee wheat variety leaves / Mishchenko L.T., Kitaev O. I., Mishchenko I. A., Yanishevska G. S. // J. Gravitational Physiology. 2003. Vol. 10 (1). – P. 31–32.

14. Paplomatas E. J. Molecular Diagnostics of Fungal Pathogens Arab. J. Pl. Prot. 2006. 24, 147–158.

15. Riley M. B., Williamson M. R., Maloy O. Plant disease diagnosis The Plant Health Instructor. 2002. doi: 10.1094 / PHI-I-2002-1021-01.

References

1. Voytovych I. D., Kytayev O. I., Klochan P. S., Romanov V. O. (2006). A device for the determination of the state of native chlorophyll. Patent of Ukraine for useful model G09B 23/28 (2006.01) G01N 21/64; (19)(UA)(11). № 12382 (51), published 15.02.2006, № 2.

2. Brayon O. V., Kornyeyev D. YU., Snyehur S. S., Kytayev O. I. (2000). Instrumental study of a photosynthetic apparatus by induction of chlorophyll fluorescence. Methodological instructions for students of the biological faculty, Kyiv, Publishing and Printing Center "Kyiv University, 25.

3. Karapetyan N. V., Bukhov N. H. (1986). Chlorophyll fluorescence variable as an indicator of the physiological state of plants. Physiology of plants, 33(5), 1013 – 1026.

4. Kytayev O., Klochan P., Romanov V. (2005) Chronofluorometer for Express-Diagnostics of Photosynthesis "Floratest". Collection of the conference. Report on the comprehensive program of fundamental research of NAS of Ukraine in the field of sensor systems and technologies, Kyiv, Ukraine, 59.

5. Korneev D. YU. (2002) Ynformatsyonnye vozmozhnosty ynduktsyy fluorestsentsyy khlorofylla [Information Opportunities for the Induction of Fluorescence of Chlorophyll]. Kyiv, Ukraine: Al`terpres, 15–28.

6. Kytaev O. Y., Skryaha V. A., Matvyenko N. V., Bublyk N. A., Dolyd

A. V. (2009). Luminescent spectral method of diagnosis of sortimentally-dual compatible pears. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference "Achievements of Science and Innovation in Horticulture". Ministry of Agriculture of the Russian Federation Michurinsky State Agrarian University, Mychurynsk, Russia. 14-16.10.2009, 94-96.

7. Merzlyak M. N. (1989) Aktyvyrovannyy kyslorod y okyslytelnye protsessy v membranakh rastytelnoy kletky [Activated oxygen and oxidation processes in the membranes of the plant cell]. Series: Physiology of plants. Moscow, Russia: VYNYTY, 6, 167.

8. Kyray Z., Klement Z., Shoymonsh F., Veresh Y. (1974). Metody fytopatolohyy [Methods of phytopathology]. Moscow, Russia: Kolos, 3–40.

9. Myuller É., Lëffler V. (1995) Mykolohyya: perevod. s nemetskogo [Mycology]. Moscow, Russia: Myr, 343.

10. Petrenkova V. P., Dolhova E. M. (1996). Diseases of sunflower in Ukraine. Protection and quarantine of plants, 5, 41–42.

11. Chernyuk S. O., Boyko A. L., Kornyeyev D. YU., Mamenko P. M. (1999). Influence of the straw-mosaic virus of wheat on the parameters of induced fluorescence of plants of *Triticum aestivum*. Biopolymers and a cell, 15 (5), 445–448.

12. Artemenko D. M., Vasyuta S. O., Voynovych I. D., Kytayev O. I., Klochan P. S., Kolesnyk YU. S., Mishchenko L. T., Romanov V. O., Skryaha V. A., Taranukho YU. M., Fedak V. S. (2009). A method for detecting viral plant lesions Patent of Ukraine, (2009) G01N21/64, A01G7/00. № 91452. Applicant and patent holder Institute of Cybernetics V.M. Glushkov of the National Academy of Sciences of Ukraine. Published. Jul 26, 2010, 14.

13. Mishchenko L.T., Kitaev O. I., Mishchenko I. A., Yanishevska G. S. (2003). Clinostation influence on microspectral parameters of fluorescence in Healthy and virus infected Apogee wheat variety leaves. Gravitational Physiology, 10 (1), 31–32.

14. Paplomatas E. J. (2006). Molecular Diagnostics of Fungal Pathogens. Arab. J. Pl. Prot. 24, 147–158.

15. M. B. Riley, Williamson M. R., Maloy O. (2002) Plant disease diagnosis. The Plant Health Instructor. doi:10.1094 / PHI-I-2002-1021-01.

ЭКСПРЕССНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГРИБНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

Е. В. Сиводед, Н. Н. Кирик, О. И. Китаев, В. А. Кривошапка, С. Н. Грисюк, В. Н. Пелехатый

Анатоция. *Данная работа посвящена разработке методики ранней диагностики грибных болезней сельскохозяйственных растений, что повысит эффективность защитных мероприятий против них.*

Целью исследования является разработка экспрессного метода ранней диагностики грибных заболеваний подсолнечника путем модификации методов регистрации

индукции флуоресценции хлорофилла и флуоресцентной микроскопии.

Исследования проводились на протяжении 2016–2018 годов в полевых условиях на территории научно-производственной фирмы «Дриада» Генического района Херсонской области, Херсонской областной фитосанитарной лаборатории и в лаборатории физиологии растений и микробиологии Института садоводства НААН Украины. Объектами исследований были растения подсолнечника однолетнего Helianthus annuus L.

В результате предложенной нами модификации и совместного использования методов фотоиндукции флуоресценции и люминесцентной микроскопии установлено наличие скрытой грибной инфекции у растений подсолнечника однолетнего.

Установлено, что у растений подсолнечника при наличии скрытой грибной инфекции, происходят изменения форм индукционных кривых и значительный рост их интенсивности на уровне Fpl, Fp и Ft.

Определено, что для анализа влияния грибной инфекции наиболее объективными показателями фотоиндукции флуоресценции является параметр Kpl.

Подтверждением наличия скрытой грибной инфекции является появление вспышек желто-зеленой флуоресценции, при условии предварительной обработки листьев растений температурой 60 °С.

Грибное заболевание было выявлено визуально через 12–18 суток после определения его с использованием методов фотоиндукции флуоресценции и люминесцентной микроскопии и было идентифицировано как Phomopsis helianthi M.

Ключевые слова: *подсолнечник однолетний, грибные болезни, диагностика, индукция флуоресценции хлорофилла, Phomopsis helianthi* M.

EXPRESS FUNGAL DISEASES DIAGNOSIS METHOD OF SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

Ye. V. Syvoded, M. M. Kyryk, O. I. Kytayev, V. A. Krivoshapka, S. M. Hrysiuk, V. M. Pelekhatyy

Abstract. *This work is devoted to development of early diagnosis methods of fungal diseases in agricultural plants, which will increase effectiveness of protective measures against them.*

The aim of study is developing an express method for early sunflower fungal diseases diagnosis by modifying the methods for recording induction of chlorophyll fluorescence and fluorescence microscopy.

The research was conducted during 2016-2018 in field conditions on the territory of the Research and Production firm "Dryad" in Genicheskiy district of Kherson region, the Kherson regional phytosanitary laboratory and in the laboratory of plant physiology and microbiology in Horticulture Institute of National Academy of Sciences of Ukraine. Research objects were sunflower Helianthus annuus L.

As a result of our proposed modification and joint use of fluorescence photoinduction and luminescent microscopy methods,

presence of latent mushroom infection in annual sunflower plants is established.

It has been established that in sunflower plants in presence of a latent fungal infection, changes in the shapes of induction s and a significant increase in their intensity at the level of Fpl, Fp and Ft occur.

It is determined that for analysis of fungal infection effect most objective indices of fluorescence photoinduction are the parameter Kp.

Latent fungal infection presence confirmation is occurrence of yellow-green fluorescence flashes, provided that the leaves are pre-treated with a 60 °C temperature.

The fungal disease was detected visually in 12-18 days after its determination using fluorescence photoinduction and fluorescence microscopy methods and was identified as Phomopsis helianthi M.

Keywords: *annual sunflower, fungal diseases, diagnosis, fluorescence induction of chlorophyll, Phomopsis helianthi* M.