

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
_____ **Олена КВАСКО**

« ____ » _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Дослідження змін індукції флуоресценції хлорофілу для ранньої
діагностики глободерозу картоплі»**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної
роботи**

Кандидат біологічних наук,
старший викладач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

_____ **Оксана ТАРАН**
(підпис)

Виконала

_____ **Поліна ШЕВЦОВА**
(підпис)

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології
Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття
Освітній ступінь «Бакалавр»
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**

«___» _____ 2025 р.

ЗАВДАННЯ НА ВИПУСКНУ БАКАЛАВРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНКИ

_____ **Шевцової Поліни Миколаївни**

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Дослідження змін індукції флуоресценції хлорофілу для ранньої діагностики глободерозу картоплі _____

керівник роботи к.б.н., старший викладач, Таран О.П.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом НУБіП України від «22» жовтня 2024 р. № 1880 «С»

2. Строк подання студентом роботи 19 травня 2025

3. Вихідні дані до роботи Список іноземних експериментів з раннього виявлення хвороб за допомогою змін індукції флуоресценції хлорофілу; перелік морфологічних особливостей та молекулярних методик для ідентифікації *Globodera rostochiensis*; список параметрів флуоресценції, що підлягають аналізу

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Виділення нематод, їх ідентифікація; інокуляція картоплі *Globodera rostochiensis*; дослідження змін параметрів індукції флуоресценції хлорофілу.

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	к.б.н., старший викладач Таран О.П.	11.09.2024	11.09.2024
2	к.б.н., старший викладач Таран О.П.	04.12.2024	04.12.2024
3	к.б.н., старший викладач Таран О.П.	08.02.2025	08.02.2025
Висновки	к.б.н., старший викладач Таран О.П.	01.05.2025	01.05.2025

6. Дата видачі завдання 1 вересня 2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів випускної бакалаврської роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Опрацювання літературних джерел згідно з темою роботи	Вересень-листопад	
2.	Розділ 2. Матеріали та методи дослідження	грудень-січень	
3	Розділ 3. Результати дослідження	лютий-квітень	
4.	Висновки та оформлення списку використаних джерел	травень	

Студентка _____ **Поліна ШЕВЦОВА**
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ **Оксана ТАРАН**
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Робота складається з 52 сторінок та містить перелік умовних позначень, вступ, три розділи, висновки, список використаних джерел та додатки. Окрім цього, в роботі наведено 14 рисунків та 6 таблиць.

Мета роботи – вимірювання параметрів індукції флуоресценції хлорофілу для виявлення глободерозу картоплі до виникнення морфологічних змін структур рослинних організмів.

Завдання:

- Проведення огляду літератури для вивчення впливу нематод на культури, визначення біологічних особливостей *Globodera spp*, дослідження методів ідентифікації паразитів, виокремлення вже існуючих іноземних експериментів з ранньої діагностики хвороб на основі зміни параметрів флуоресценції хлорофілу, зазначення нематодостійких сортів картоплі як одного з підходів для боротьби з глободерозною інвазією.
- Здійснення виділення нематод з ґрунтового середовища, проведення їх ідентифікації на основі морфологічних ознак та молекулярних методів. Виконання інокуляції попередньо вирощених рослин картоплі *Globodera spp.*
- Дослідження змін основних параметрів індукції флуоресценції хлорофілу – Fm, Fv та коефіцієнтів K1, K2, K3 для наочного представлення впливу екзо- і ендогенних факторів на уражені рослини, коливання активності основних фотосинтетичних ферментів.

Об'єкт дослідження – рослини картоплі сорту “Скарбниця”.

Предмет дослідження – зміна параметрів індукції флуоресценції хлорофілу (Fm, Fv, коефіцієнти K1, K2, K3) в ролі індикатора раннього виявлення глободерозу.

Результати дослідження:

- На основі аналізу літературних даних визначено особливості нематод, їх вплив на рослинні організми, досліджено біологічні особливості *Globodera*

spp., методи ідентифікації паразитів. Проаналізовано експерименти з виявлення зараження за допомогою параметрів флуоресценції. Окрему увагу приділено нематодостійким сортам картоплі.

- З метою виділення *Globodera spp.* з ґрунтового середовища застосовано метод паперових смуг. Проведено інокуляцію картоплі сорту «Скарбниця» фітопаразитами.
- Базуючись на морфологічних особливостях та застосовуючи молекулярні методи, а саме мультиплексний ПЛР-тест Булмана і Маршалла, проведено ідентифікацію нематод. Встановлено, що аналізованим видом є *Globodera rostochiensis*.
- Виявлено, що в уражених рослин коефіцієнт K1 знаходився на рівні 90%, тому на картоплю доволі сильно впливають екзогенні фактори. Значення показника K2 становило 65%, тобто через збільшення активності фотосинтетичних ферментів індукція флуоресценції хлорофілу була високою. Коефіцієнт K3 складав 19% через те, що в ході ураження відбувається послаблення метаболічних перетворень, порушення ендогенного статусу картоплі.
- Досліджено, що при ураженні фіксувалось підвищення рівнів Fm – на 11,2% та Fv – на 15,8%. Встановлено, що подібні зміни характеризують пригнічення фотосинтезу при інвазії *Globodera rostochiensis*, оскільки відомо, що за умов максимальної флуоресценції в точці Fm на індукційній кривій, фотосинтез знаходиться на мінімальному рівні.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	9
ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1. Нематоди – небезпечні шкідники культурних рослин.....	12
1.1.1. Загальна характеристика нематод як фітопатогенних організмів.....	12
1.1.2. Біологічні особливості <i>Globodera rostochiensis</i> та <i>Globodera pallida</i>	15
1.2. Основні методи діагностики фітонематод.....	17
1.2.1. Біохімічні методи виявлення фітопаразитичних нематод.....	17
1.2.2. Молекулярна ідентифікація <i>Globodera rostochiensis</i> та <i>Globodera pallida</i>	18
1.3. Виявлення зараження рослинних організмів з допомогою визначення параметрів флуоресценції хлорофілу	22
1.3.1. Діагностика цукрових буряків, уражених <i>Heterodera schachtii</i> за допомогою флуоресценції хлорофілу.....	22
1.3.2. Рання діагностика захворювань, спричинених сосною нематодою на основі параметрів флуоресценції хлорофілу	23
1.3.3. Флуоресцентна візуалізація взаємодії рослин та патогенів за допомогою хлорофілу.....	26
1.4. Нематодостійкі сорти картоплі.....	28
1.4.1. Генетика стійкості картоплі до нематод.....	28
1.4.2. Урожайність сортів, стійких до нематод, на ґрунтах, що заражені <i>Globodera rostochiensis</i>	29
1.4.3. Ефективність застосування нематодостійких сортів картоплі з метою зниження глободерозної ґрунтової інвазії.....	30
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	32
2.1. Обраний сорт картоплі та умови вирощування.....	32

	8
2.2. Виділення глободер з ґрунтового середовища	33
2.3. Ідентифікація <i>Globodera rostochiensis</i>	34
2.4. Інокуляція нематодами	38
2.5. Вимірювання флуоресценції хлорофілу	39
2.6. Оцінка показника флуоресценції хлорофілу	41
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	44
3.1. Морфологічна та молекулярна ідентифікація	44
3.2. Зміни індукції флуоресценції хлорофілу рослин картоплі при ураженні <i>Globodera rostochiensis</i>	45
ВИСНОВКИ.....	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	49
ДОДАТКИ.....	53

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- dNTPs – дезоксинуклеотидтрифосфати
ETR – швидкість транспорту електронів
ITS – внутрішній транскрибований спейсер
NPC – негативний контроль процесу
NPQ – нефотохімічне згасання
NSC – негативний контроль специфічності
NTC – контроль без шаблонів
PC – позитивний ПЛР контроль
PPC – позитивний контроль процесу
ØPSII – квантовий вихід
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
НАН – Національна академія наук України
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
США – Сполучені Штати Америки

ВСТУП

Актуальність. Нематоди – червоподібні тварини невеликого розміру, що характеризуються трофічним різноманіттям і можуть споживати найпростіших, гриби, бактерії, водорості або вести хижий спосіб життя відносно інших нематод. Фітопаразитичні нематоди уражають велике число культур – зернові, бобові, цитрусові, овочеві. Одними з найнебезпечніших є картопляні цистоутворюючі нематоди Найвідоміші види шкідників – *Globodera pallida* та *Globodera rostochiensis*. В деяких країнах, що характеризуються тропічним кліматом, внаслідок ураження картоплі золотистою нематодою втрати врожаю становили майже 80%. Морфологічні ознаки ураження кореневої системи супроводжуються формуванням великої кількості невеликих коричневих цист.

Одним з підходів, що передбачає виявлення захворювання до появи візуальних симптомів є визначення параметрів індукції флуоресценції хлорофілу. Як відомо, під дією стресів різного походження відбувається зростання рівнів Fm, Fv, зміна коефіцієнтів K1, K2, K3. Отже, важливість теми обумовлена необхідністю раннього розпізнавання захворювання для унеможливлення ураження великої кількості рослин.

Мета роботи – вимірювання параметрів індукції флуоресценції хлорофілу для виявлення глободерозу картоплі до виникнення морфологічних змін структур рослинних організмів.

Завдання:

- Проведення огляду літератури для вивчення впливу нематод на культури, визначення біологічних особливостей *Globodera spp*, дослідження методів ідентифікації паразитів, виокремлення вже існуючих іноземних експериментів з ранньої діагностики хвороб на основі зміни параметрів флуоресценції хлорофілу, зазначення нематодостійких сортів картоплі як одного з підходів для боротьби з глободерозною інвазією.
- Здійснення виділення нематод з ґрунтового середовища, проведення їх ідентифікації на основі морфологічних ознак та молекулярних методів.

Виконання інокуляції попередньо вирощених рослин картоплі *Globodera spp.*

- Дослідження змін основних параметрів індукції флуоресценції хлорофілу – Fm, Fv та коефіцієнтів K1, K2, K3 для наочного представлення впливу екзо- і ендогенних факторів на уражені рослини, коливання активності основних фотосинтетичних ферментів.

Об'єкт дослідження – рослини картоплі сорту “Скарбниця”.

Предмет дослідження – зміна параметрів індукції флуоресценції хлорофілу (Fm, Fv, коефіцієнти K1, K2, K3) в ролі індикатора раннього виявлення глободерозу.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Нематоди – небезпечні шкідники культурних рослин

1.1.1. Загальна характеристика нематод як фітопатогенних організмів

Нематоди – це червоподібні тварини, що відзначаються малим розміром (0,2-2,5 мм) та належать до типу *Nematoda*. Згідно з науковими даними, наведений тип виник на ранніх стадіях кембрійського періоду (приблизно 550 млн років тому). Місцем первинного поширення вважають як морські, так і прісноводні водойми. Тип є частиною надтипу *Ecdysozoa*, що включає усіх линяючих тварин. Окрім водного середовища нематоди мешкають в надземних системах (прикоренева зона, чи корені, водні плівки, що прикріплені до ґрунтових сегментів), а їх щільність не перевищує 1 млн/м². Зважаючи на рухливість та розмір, цих тварин легко вилучити з місця розповсюдження, на відміну від мікроміцетів, бактеріальних агентів та найпростіших.

Тип *Nematoda* характеризується значним трофічним різноманіттям, тобто представники здатні харчуватись найпростішими, грибами, водоростями, бактеріями, чи навіть іншими нематодами. Спостерігається також компонування споживання кількох класів організмів, ведення паразитичного способу життя в рослинах та тваринах. Різноманітність джерел живлення обумовлює простоту виявлення на всіх 3 рівнях харчового ланцюга. Види, що паразитують на рослинах, вважаються травоїдними та розташовуються на першому рівні, основне місце локалізації – кореневі структури вищих рослин. Грибоїдні знаходяться на другому рівні, оскільки вони харчуються первинними редуцентами. Хижі види споживають інших представників типу *Nematoda* через що їх віднесено на третій трофічний рівень. Фітопатогенні нематоди складають невелику частину від загального розмаїття спираючись на малу кількість особин в популяції та незначне число видів [1].

Картопляні цистоутворюючі нематоди мають найбільш згубну дію на цю культуру. Найвідоміші види шкідників – *Globodera pallida* та *Globodera rostochiensis*. В деяких країнах, що характеризуються тропічним кліматом, внаслідок ураження картоплі золотистою нематодою втрати врожаю становили майже 80%. Інші відомі представники, які паразитують на картоплі – *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Nacobbus*, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*. Стеблова картопляна нематода уражає надземну частину рослини (черешки, листя, пагони). Нематода картопляної гнилі в основному викликає пошкодження стебел. *Meloidogyne chitwoodi* – галова нематода, що є причиною формування коричневих плям на листі та стеблах. Інші нематоди, окрім наведених, є менш поширеними та не чинять фатального ефекту [2].



Рис. 1.1. Цисти *Globodera rostochiensis* на коренях картоплі [3].

Найнебезпечнішою для цитрусових культур виступає *Tylenchulus semipenetrans*. Іншою нематодою, що уражає ці рослини є *Radopholus similis*. Кокос зазвичай пошкоджує *Rhadinaphelenchus cocophilus*. Місце локалізації – корені, стебла та стовбур кокосових пальм. Кукурудзяні цистоутворюючі нематоди розповсюджені в Індії, США, Єгипті, Пакистані. Таким чином, через дію *Heterodera zeaе* понесено численні економічні збитки. Хоча більшість хлопкових культур хворіють на фузаріоз (фітопатоген – *Fusarium oxysporum*), що

є грибковою інфекцією, а не нематодним ураженням, поширення кореневих нематод підвищує частоту фузаріозу, робить перебіг захворювання більш тяжким.

Бобові уражають *Heterodera goettingiana* та *Cajanus cajan*. Цистоутворюючі та галові нематоди віднесено до списку ключових шкідників гороха та нуту. Внаслідок дії нематод арахісу щорічні втрати врожаю сягають 12%. На арахісі паразитують *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus brachyurus*. Найбільші економічні збитки одержують від нематод, які уражають рис. До них слід віднести *Ditylenchus angustus*, *Aphelenchoides besseyi*, *Heterodera oryzae*, *Hirschmanniella spp.*. Варто зазначити, що на коренях рисових культур паразитують *Heterodera elachista*, *Heterodera sacchari*, *Heterodera oryzae*, *Heterodera oryzicola*. Морфологічні зміни включають зміну забарвлення кореневих структур на чорне, чи коричневе. У рослин наявні деформація листової пластини, хлороз та утворення зерна неправильної форми.

Соєва цистоутворююча нематода нанесла величезні збитки США у 1994 році. При ціні сої 220,5 доларів оціночна ціна врожаю становила 30,39 доларів. Було втрачено 1990000 метричних тон культури. Бурякова нематода спричиняє зниження виробництва цукру на одиницю площі. Боротьба зі шкідником є складною через стійкість нематоди до змін умов середовища. Кореневі нематоди паразитують на рослинах тютюну. Найбільшого поширення вони набули в регіонах США. Галові нематоди несуть шкоду для томатів у субтропічних та тропічних районах. При комплексному впливі нематод та інфекційних агентів фіксується загибель культури. На злакових культурах (в основному ячмінь та пшениця) паразитують *Anguina tritici*, *Heterodera avenae*. Сою найчастіше уражає *Heterodera glycines*. Під час паразитування даного виду нематод спостерігається хлороз, затримка росту. З метою уникнення втрат врожаю застосовують сівозміну із злаковими рослинами [2].

1.1.2. Біологічні особливості *Globodera rostochiensis* та *Globodera pallida*

Самки відзначаються округлим тілом та малою за розміром виступаючою шийкою. Діаметр 450 мкм, а стандартне забарвлення – біле, чи жовте. Цисти мають подібний колір, чи трохи темніший (ближче до коричневого). Поверхня кутикулярної структури характеризується наявністю зигзагоподібного малюнку. До того ж, спостерігається виразний d-шар. Область проміжності включає єдине коло поблизу вульварної щілини, бугорки біля вульви, що мають форму півмісяця. Анус субтермінальний, а фенестра відсутня. Яйця зберігаються у цисті. Личинки другої стадії розвитку є червоподібними, кільчастими, їх тіло звужується на кінцях. Довжина тіла варіює від 445 до 510 мкм залежно від умов середовища, конкретної видової належності. Довжина хвоста в середньому становить 37-55 мкм, а розмір стилету – 19-25 мкм. Гіалінова частина має довжину 21-31 мкм [4].

Цисти *Globodera pallida* субсферичні, білі, проте з часом набувають коричневого забарвлення. У самців C-, чи S-подібна форма тіла. Задній його сегмент зазвичай закручений на 90-180 °С навколо поздовжньої осі. Кутикула з концентричними кільцями. Лабіальна область округла, зміщена, має 6-7 кілець, склеротизований шестипроменевий каркас. Стилет направлений назад, розвинений, має конус, що займає 45% стилету та базальні бугорки. Форма хвоста неоднакова у осіб різних популяцій, проте хвіст короткий та має заокруглений кінчик. Гемізонід має 2 кільця, еліпсоїдна глоткова частина відзначається присутністю клапанних пластин, що з'єднані перешийком. Навколо перешийка знаходиться доволі широке нервово кільце та вентрально розташована глоткова доля. Сім'яник починається з колпачкової клітини, що займає 40-65% довжини тіла від голови. В свою чергу, сім'яник закінчується протокою, яка характеризується залозистими стінками.

Личинки *Globodera pallida* другої стадії розвитку мають потовщену на перших 7-8 кільцях тіла кутикулу. У губній області є 4-6 кілець. Ця область

зміщена та має округлу форму. Залоза займає 35% розміру тіла. Гемізонід локалізується на 1 кільце вперед від екскреторної пори та на 5-6 кільце назад від неї. Гіалінова область займає 50% хвоста, а генітальний зачаток – 60% довжини тіла від переднього кінця [5].

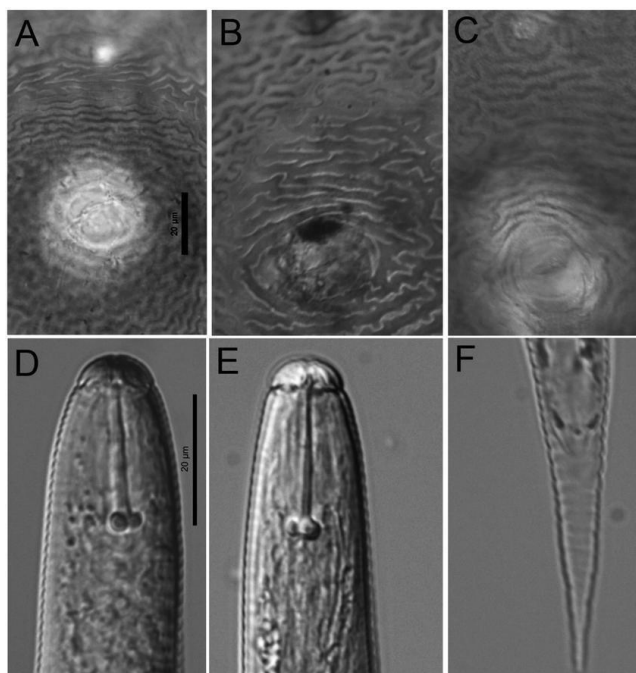


Рис. 1.2. Морфологія *Globodera pallida*. А, В, С – візерунок цисти; D, Е – передня частина личинок другої стадії; F – задня частина личинок другої стадії [6].

Колір самок *Globodera rostochiensis* змінюється з білого до світло-золотистого, чи жовтого. Каркас губної області особливо не розвинений. Стиллет прямий, чи трохи вигнутий. Глоткові залози не видно неозброєним оком. Екскреторна пора знаходиться біля основи шиї, доволі помітна. Анальний отвір відсутній, проте вульва та анус розташовані у вульварній впадині. Навколо анальної області не фіксуються кутикулярні кільця. Вульва еліпсоїдна, а анус коротший за неї. Циста жовта на початкових етапах та коричнева на пізніх, у неї відсутні вульварні тіла як у самок. Субкристалічного шару немає. Кожна циста має 200-1000 яєць.

Тіло самця червоподібне, кутикула має кільце, каркас губ склеротизований, стиллет відзначається виразними виступами, цефаліди присутні. Екскреторна

пора знаходиться на відстані 2 кілець назад від гемізонада. Спікули дугоподібні, їх кінці округлі. Хвіст короткий, наявний 1 сім'яник. Личинки *Globodera rostochiensis* другої стадії розвитку мають добре виражене кутикулярне кільце. Область губ складається з 4-6 кілець, трохи зміщена, вона ширша поблизу основи, а не спереду. Стилети розвинені, має круглі виступи. Для виду характерні глоткові залози та перешийок. Екскреторна пора знаходиться позаду гемізонада. Генітальний зачаток майже всередині тіла, поділений на 4 сегменти [5].



Рис. 1.3. Морфологія *Globodera rostochiensis* [7].

1.2. Основні методи діагностики фітонематод

1.2.1. Біохімічні методи виявлення фітопаразитичних нематод

Мультилокусний ферментний електрофорез належить до методів фенотипування ферментів. Він включає транспорт ізоферментів та виникнення зміни зарядів, конформацій, молекулярних об'ємів внаслідок модифікації амінокислотного складу. Переваги методу включають точність, високі стабільність та поліморфізм. Перший випадок застосування названого підходу датується початком 1970-х років. Тоді метод використовували з метою ідентифікації доволі поширених *Meloidogyne spp.* (галові нематоди). З допомогою ізоферментного аналізу ідентифікують *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne*

exigua, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne paranaensis*, *Meloidogyne arenaria*. Не зважаючи на те, що метод досліджували і для ідентифікації *Ditylenchus trifurcatus*, *Heterodera glycines*, *Aphelenchus avenae*, вчені визначили, що цей підхід краще застосовувати відносно корневих видів. Подібне рішення приймали на основі можливості експресії важливих білків лише на деяких стадіях життєвого циклу нематод. Таким чином, екстракція ізоферментів має ряд вимог щодо стану нематод. Частіше всього для аналізу відбирають молодих самок.

Часопролітна мас-спектрометрія з матрично-активованою лазерною іонізацією, чи десорбцією застосовується при ідентифікації нематод в лабораторних умовах. В ході аналізу вивчають складні молекули за допомогою одержання білкових відбитків з білкових екстрактів, що містяться в організмі. Основні переваги підходу – швидкість, висока чутливість, надійність. Також даним методом ідентифікують мікроміцетів, віруси, членистоногих, бактерії та мікобактерії, найпростіших. Перелік фітопаразитичних нематод яких ідентифікують за допомогою методу включає *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Anguina funesta*, *Anguina tritici* [8].

1.2.2. Молекулярна ідентифікація *Globodera rostochiensis* та *Globodera pallida*

Виявлення *Globodera rostochiensis* і *Globodera pallida* зазвичай проводиться за допомогою ПЛР. Найрозповсюдженішим способом є застосування мультиплексного ПЛР-тесту Булмана і Маршалла [9]. Для початку проводять видове визначення згідно з встановленими морфометричними характеристиками, а вже надалі виконують молекулярну ідентифікацію. Зважаючи на цистоутворюючу здатність нематод, ДНК виділяють не лише з ювенільних особин, а й з цист. Під час перебігу методу відбувається ампліфікація частини гена рибосомальної ДНК 18S разом із ділянкою внутрішнього транскрибованого спейсера ITS1 із залученням обраних праймерів. Варто зазначити, що останнім часом як аналог використовують метод ПЛР в реальному

часі відносно генетичного матеріалу, який виділяють з личинок другої стадії розвитку [11].

Для універсального ПЛР-тесту Тьєрі і Магнері [10]. застосовують 18S-26S праймери. Метод відкриває шлях не лише для виявлення *Globodera spp.*, а й є ефективним для встановлення наявності ампліфікованої ДНК при негативному результаті, що отриманий під час проведення ПЛР-тесту Булмана і Маршалла [11].

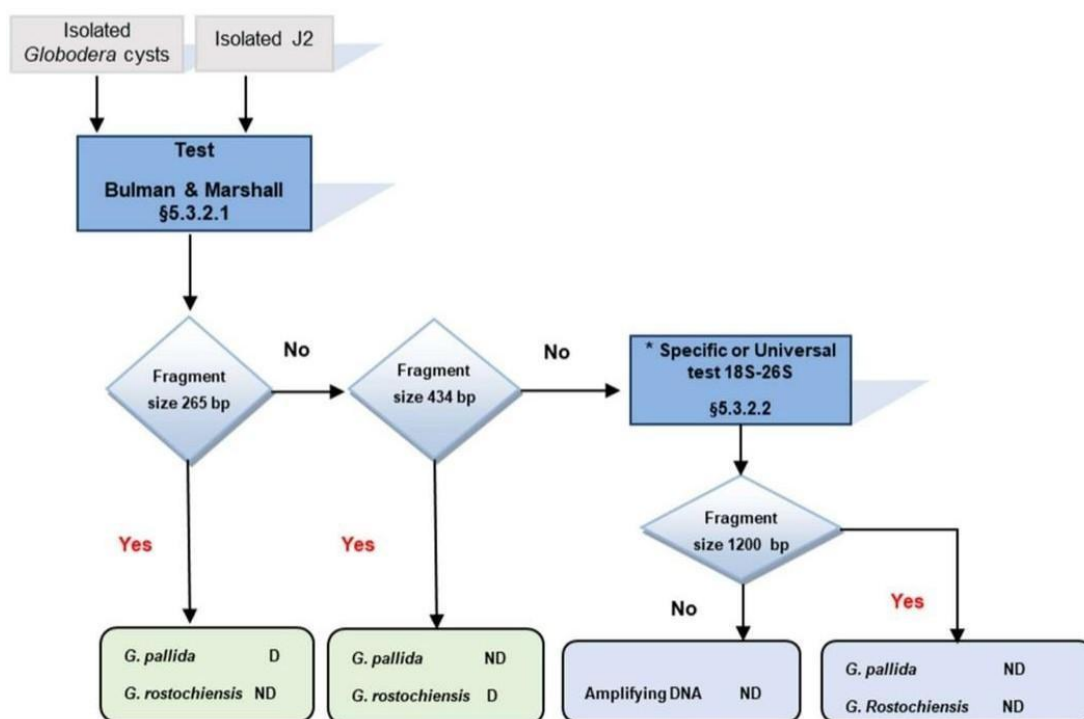


Рис. 1.4. Схема молекулярної ідентифікації [11].

Таблиця 1.1

Праймери для ПЛР [11,12].

Цільові організми	Тест	Праймери	Послідовність 5'-3'
<i>G. pallida</i> і <i>G. rostochiensis</i>	Булмана і Маршалла	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
		PITSr3	AGCGCAGACATGCCGCAA
		PITSp4	ACAACAGCAATCGTCGAG
Всі нематоди	Тьєрі і Магнері	18S	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT
		26S	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG

Окрім позитивного контролю процесу (PPC) також існують інші елементи контролю, які прийнято вважати більш важливими для перевірки правильності виконання ПЛР-тестів та послідовних етапів екстракції ДНК [11].

Таблиця 1.2

Елементи контролю [11].

Елемент	Ціль	Очікуваний результат
Негативний контроль процесу (NPC)	Буфер для екстракції ДНК кондиціонується і тестується так само, як і зразок. Потрібно виключити можливість забруднення під час виділення ДНК.	Негативний
Позитивний контроль процесу (PPC)	ДНК, яку вилучили з цисти <i>Globodera</i> (циста виступає матрицею), кондиціонована та протестована таким же чином як і аналізований зразок. Обов'язкова умова – відсутність дефектів в ході процесу.	Позитивний
Позитивний ПЛР контроль (PC)	Включає в себе усі елементи реакційної суміші ПЛР, в тому числі екстракт ДНК з кожної цисти, чи личинок другого покоління. Зазначений контроль підтверджує правильність перебігу ПЛР, тому стає можливою ампліфікація зразків, що містять цільову групу.	Позитивний
Контроль без шаблонів (NTC)	Містить усі елементи реакційної суміші ПЛР, проте не включає ДНК. Наведений контроль перевіряє відсутність забруднень під час підготовки ПЛР та перебігу реакції.	Негативний

Негативний контроль специфічності (NSC)	Містить всі елементи реакції ПЛР, включаючи нецільову ДНК. Подібний підхід дозволяє перевірити відсутність перехресної реакції при ПЛР. Під час проведення універсального ПЛР-тесту цей контроль не є необхідним.	Негативний
---	---	------------

Зафіксовані в ході молекулярної діагностики результати є загальним зібранням результатів, що отримані з кожної пробірки, яку розглядали. Інтерпретація даних є можливою завдяки спостереженню за ампліконом, що був одержаний після проведення відповідних ПЛР-тестів та перевірки контролів. В разі дотримання усіх зазначених умов аналіз є дійсним:

- NPC, NTC та NSC: амплікацію не виявлено ні в одному з повторів.
- Усі повтори PC: ампліфікація амплікона проходить відповідно до існуючих вимог.

Аналіз вважається недійсним в разі, якщо результати отримані в ході одного, чи більше проведених контролів не співпадають з очікуваними. Залежно від розбіжностей в результатах потрібно повторити або частину аналізу або ж навіть весь цілком [11].

Таблиця 1.3

Очікувані розміри ділянок ампліконів [11].

Вид нематод	Тест ITS5-R3-P4	Тест ITS5-R3	Тест ITS5-P4	Тест 18S-26S
<i>G. pallida</i>	~265 п.н.	-	~265 п.н.	~1200 п.н.
<i>G. rostochiensis</i>	~434 п.н.	~434 п.н.	-	~1200 п.н.

Для кожного з чотирьох наведених ПЛР-тестів, реакцій в ході аналізу і після перевірки контролів повинен бути отриманий наступний результат:

- Негативний в разі, коли ампліфікація не фіксується.
- Негативний якщо ампліфікація передбаченого розміру не фіксується.
- Позитивний за умови фіксації фрагменту очікуваної довжини [11].

1.3. Виявлення зараження рослинних організмів з допомогою визначення параметрів флуоресценції хлорофілу

1.3.1. Діагностика цукрових буряків, уражених *Heterodera schachtii* за допомогою флуоресценції хлорофілу

В ході проведення експерименту [13] було використано два методи, а саме: лазер-індуковану та імпульсно-модульовану флуоресценцію хлорофілу. Аналізованими об'єктами виступали нематода *Heterodera schachtii* та цукровий буряк, який був уражений паразитом. Обидва методи спрямовані на виявлення захворювання, яке спричиняє нематода, оцінку рівня пошкодження рослинного організму.

Личинки нематод вилучали із уражених рослин ріпаку сорту Akela. Одержані ізоляти інкубували в розчині хлориду цинку, а надалі їх очищали від залишків хімічної речовини та вносили в ґрунтове середовище. В якості дослідного матеріалу взяли два сорти цукрового буряка, а саме: Масарена та Рента. В тепличних умовах поблизу рослин навмисне ввели 500, 1000 та 1500 личинок *Heterodera schachtii* на 100 см³ ґрунту. Для порівняння результатів залишили здорову контрольну групу. Загалом за час проведення експерименту п'ять разів здійснювали вимірювання параметрів флуоресценції, газообміну, кількісно визначали відсоток хлорофілу і азоту в листі. Дослідження тривало 35 діб.

З першого тижня фіксувалося зниження фотосинтетичної активності рослин. Виявлено, що сорт цукрового буряку Масарена був не настільки сильно схильний до порушення фотосинтезу (зменшення на 47% порівняно з початковими даними), як сорт Рента (зниження показників на 85%). Окрім того,

помічено проблеми з газообміном, що обумовлені низькою провідністю продихів та зменшенням транспірації. Розглядаючи підземну частину рослини, зафіксовано пошкодження кореневої системи паразитичними організмами. Приблизно через 3 тижні від початку експерименту фотосинтетична активність все ще була низькою, відсоток хлорофілу зниженим, а засвоєння азоту – достатньо поганим. Більш детально аналізуючи вміст азоту, варто зауважити, що сорт Масарена виявився більш стійким (зниження показників на 40-50%), в той час як сорт цукрового буряку Penta більш сприйнятливий до зниження рівня азоту (зменшення на 62%). Нестача хлорофілу спричинила морфологічні зміни, які характеризувались утворенням хлоротичних осередків.

На початкових етапах ураження в рослин фіксували підвищену флуоресценцію при довжині хвиль F686 і F740. Після появи візуальних симптомів співвідношення F686/F740 поступово підвищувалось, через що необхідно було зробити висновок про деструкцію хлорофілу. Спостерігалось підвищення фонові флуоресценції. Фотохімічна ефективність (Fv/Fm) навпаки знижувалась, що підтверджує пошкодження фотосистеми II.

За допомогою використання лінійного дискримінантного аналізу встановлено, що спільне застосування лазер-індукованої та імпульсно-модульованої флуоресценції хлорофілу спричинило 60-100% розпізнавання заражених цукрових буряків. Всі рослини контрольної групи ідентифіковані як цілком здорові [13].

1.3.2. Рання діагностика захворювань, спричинених сосною нематодою на основі параметрів флуоресценції хлорофілу

Bursaphelenchus xylophilus – це вид фітопатогенних нематод, які уражають рослини сімейства соснових в лісових біоценозах [14]. В даному експерименті [15] досліджували інфікованих представників *Pinus hwangshanensis*. Оскільки розвиток і поширення захворювання є достатньо стрімкими, то першочерговою

задачею є швидка діагностика. Метод флуоресценції хлорофілу дозволяє не лише виявити хворобу, а й оцінити ступінь ураження рослин.

Модельним організмом слугували соснові виду *Pinus hwangshanensis* вік яких складав сім років. Названі рослини навмисно інфікували нематодами у кількості 20000 штук на кожне дерево. Для порівняння залишили контрольну групу рослин, яку обробили лише стерильною водою. Також існувала група, що зазнала проведення сильного механічного пошкодження (попереднє видалення кори). Подібний крок застосовували перед інокуляцією задля фіксації швидких результатів ураження. Морфологічні та фізіологічні зміни вчені спостерігали на 1, 5, 9, 13, 17 і 21, 38, 55, 120 день від початку проведення дослідження. Як вже раніше зазначалось, в ході проведення експерименту вимірювали параметри флуоресценції хлорофілу (коефіцієнти використання світлового потоку, розподілу енергії).

Згідно з результатами, через 2,5 тижні (17 день дослідження) відбулась зміна забарвлення сосни в групі, де деревам попередньо видалили кору. Після 3 тижнів перший представник *Pinus hwangshanensis* втратив свій стандартний зелений колір (індекс ураження фіксувався на рівні 12,5). Через 4 місяці (120 днів) хвороба спричинила фатальну шкоду для чотирьох дерев, а інші об'єкти дослідження набули виражених візуальних змін (індекс ураження досяг значення 78,13). Рослини, які лишили для порівняння (контрольна група) ніяких змін не зазнали.

Розглядаючи показники флуоресценції хлорофілу було виявлено серйозну зміну аналізованих параметрів. Зниження рівнів F_m , Psi_o та Pi_Abs корелюється з порушенням у фотосистемі II електронного транспорту. Натомість, підвищення показників Phi_Do , ABS/RC , TRO/RC та DIO/RC вказує на менш ефективне застосування світла і наявність компенсаторної реакції на стресовий фактор. Наостанок варто зазначити, що параметри Qp_L1 , Qp_L2 , QY_L1 , QY_L2 та QY_Lss постійно підвищувались в ході проведення дослідження. Подібна

динаміка обумовлена активацією механізмів теплового розсіювання надлишкової енергії [15].

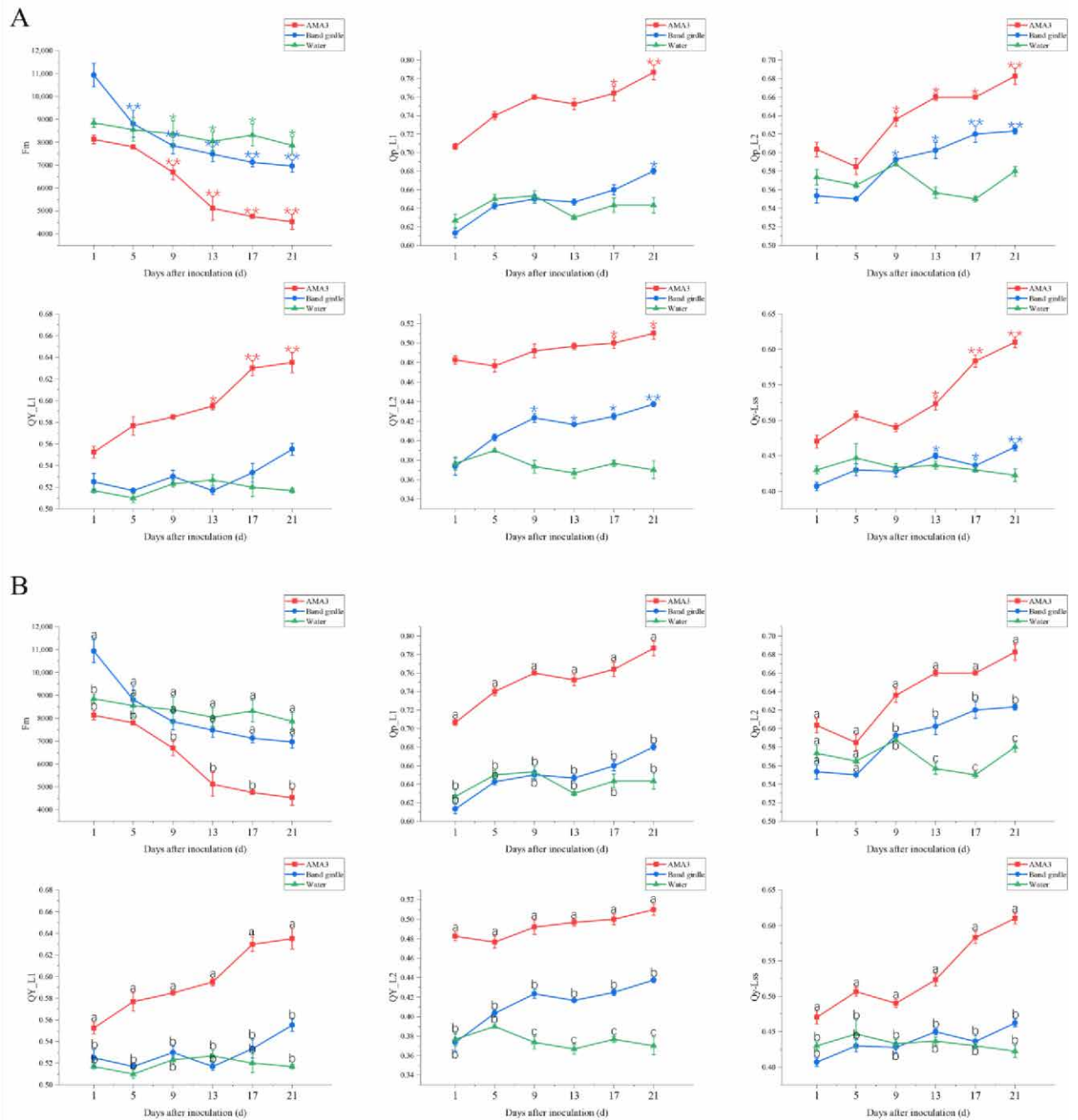


Рис. 1.5. Зміни параметрів під час дослідження *Pinus hwangshanensis* [15].

Отже, згідно з експериментальними даними, ураження представників *Pinus hwangshanensis* нематодою виду *Bursaphelenchus xylophilus* супроводжується морфологічними змінами через втрату зеленого пігменту та відповідне підвищення, чи зниження окремих аналізованих показників. Доведено

порушення у роботі реакційних центрів фотосистеми II та виявлено наявність оксидативного стресу в соснових рослин.

1.3.3. Флуоресцентна візуалізація взаємодії рослин та патогенів за допомогою хлорофілу

Окрім хвороб рослин, що викликані паразитичними нематодами, метод флуоресценції хлорофілу застосовують для дослідження взаємодії рослина-патоген відносно вірусних, бактеріальних і грибних агентів. Зараження фітопатогенами супроводжується фізіологічними змінами фотосинтетичного апарату. Аналіз окремих параметрів флуоресценції хлорофілу дозволяє виявити хворобу до настання масового ураження та необоротних морфологічних і метаболічних перетворень.

Як і в попередніх експериментах, в даному дослідженні оцінювали стан фотосистеми II різних рослинних організмів. Для одержання показників флуоресценції застосовували комерційні флуориметри. Окрім того, використовували комбінації відомих підходів, як от термічна візуалізація та виявлення змін у процесі газообміну. З метою фіксації зниження фотохімічної активності рослини знаходились під різноманітними типами освітлення з неоднаковим фотоперіодом.

До основних аналізованих в ході проведення експерименту параметрів слід віднести F_v/F_m (максимальна квантова ефективність фотосистеми II в умовах відсутності світла), що досліджувалась в якості реакції на стресовий фактор, Φ_{PSII} (ефективність роботи фотосистеми II під час застосування стандартного фотоперіоду), ETR (швидкість електронного транспорту через фотосистему II), NPQ (рівень нефотохімічного згасання) для вимірювання розсіювання надлишкової світлової енергії рослиною

Відповідно до отриманих даних, зменшення співвідношення F_v/F_m відбувалось достатньо швидко, а точніше на 3-5 день після інокулювання рослини патогенним організмом. Залучення комбінації використовуваних

методів поліпшує діагностику уражених рослин. Після інфікування тютюну вірусом тютюнової мозаїки (*Tobacco mosaic virus*) спостерігалася знижена ефективність роботи фотосинтетичної системи. Показники флуоресценції сої, яка також була заражена вірусом мозаїки (*Soybean mosaic virus*) знизились (Φ_{PSII}), що корелювалось з підвищенням запасання активних форм кисню. Останні, в свою чергу, активували фотодеструктивні процеси [16].

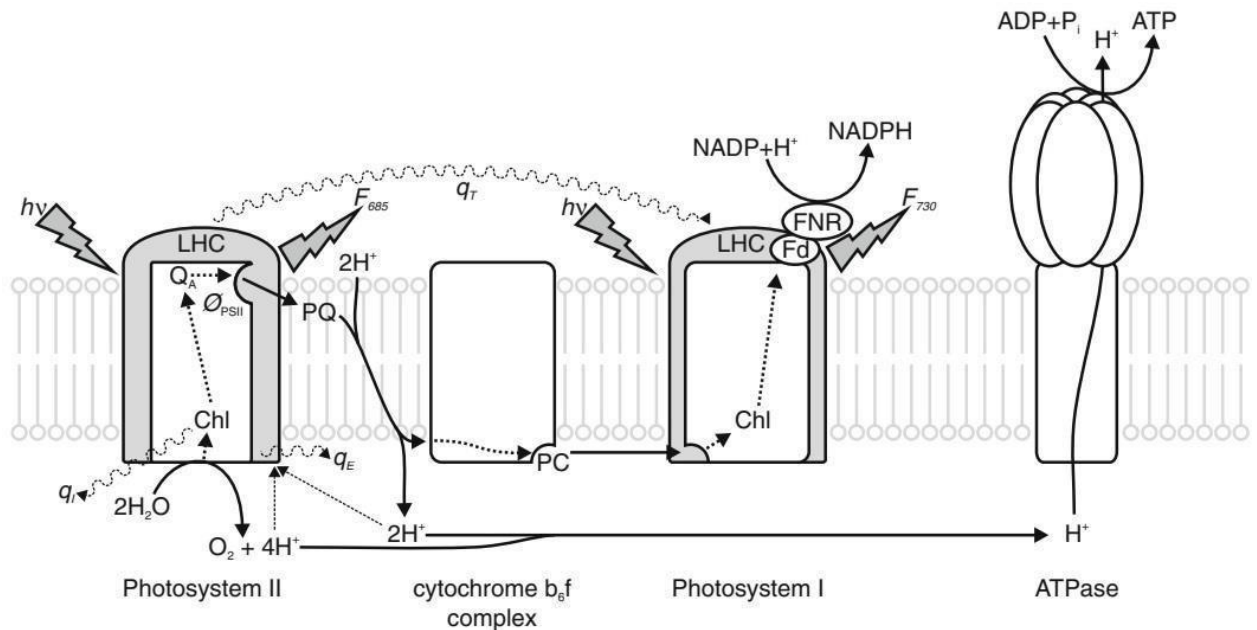


Рис. 1.6. Фотосинтетичний ланцюг перенесення електронів [16].

Навмисне зараження модельного організму *Arabidopsis thaliana* бактеріальним агентом *Pseudomonas syringae* супроводжувалось зменшенням параметрів флуоресценції хлорофілу (ETR та Φ_{PSII}) до настання видимих морфологічних змін. Під час вимірювання окремого показника (NPQ) в ураженому листі фіксувалось його підвищення, що є захисною реакцією рослини на вплив стресового фактору.

Після зараження борошнистою росю (*Blumeria graminis*) у рослин спостерігалось зменшення співвідношення F_v/F_m , що є прямою вказівкою на руйнування хлорофілу та відповідне порушення фотосинтетичної активності. Інфікування грибним агентом *Botrytis cinerea*, який є збудником сірої гнилі, супроводжувалось місцевим збільшенням параметра ETR безпосередньо в

ураженій ділянці та в невеликому діаметрі навколо неї. Наведена реакція є відповіддю на стрес [16].

Таким чином, застосування методу флуоресценції хлорофілу є дієвим для діагностики не тільки нематод, а й у разі необхідності виявлення хвороб, які спричиняють бактеріальні, грибні й вірусні представники. Спільною ознакою для всіх інфікованих рослин є зниження рівнів Fv/Fm та $\Phi PSII$, а у деяких модельних організмів – підвищення показника NPQ.

1.4. Нематодостійкі сорти картоплі

1.4.1. Генетика стійкості картоплі до нематод

За нематодостійкість картоплі відповідає реакція надчутливості, яка, в свою чергу, обумовлена наявністю у культури оліго- та полігенів. Прикладом слугує *S. andigenum*, оскільки в неї ідентифіковано домінуючий ген H_1 , що інгібує цистоутворення. Така пенетрантність є причиною формування лише 0-10 цист на картоплі. Варто зазначити, що ген H_1 контролює резистентність до патотипу R_0-1 , ген H_2 , який знайдений у *S. multidissectum Hawk* – стійкість до патотипу R_0-2 . Існують й інші сорти, котрі мають гени нематодостійкості. Таким чином, у *S. spagazzinii* ідентифіковано гени F_a , F_b , у *S. vernei* за дану ознаку відповідають гени V_1 , V_2 , V_3 , V_4 , а у *S. oplocense* – гени O_1 , O_2 .

Відповідно до літературних даних, для патотипів стійкості не притаманна окрема межа, тобто стійкість культур напряду пов'язана з ланцюгом біохімічних перетворень, що контролюються багатьма генами. Мінливість за ознакою стійкості проти фітопатогенів залежить від двох чинників, а саме: особливостей генетичного апарату та умов навколишнього середовища. Кореляція між фенотипом достатньо варіюється, через що причини різного ступеня стійкості не є цілком вивченими [17].

Генетичний контроль адаптації полягає у саморегуляції ланцюгів як морфогенетичних, так і метаболічних процесів за допомогою взаємодії продуктів

генів на неоднакових рівнях біологічної організації, що є реакцією на кількісний вплив чинників навколишнього середовища. Регуляція здійснюється через те, що для екосистеми живитель-паразит необхідно притримуватись сталості функцій та властивостей. Гомеостаз постає основним при взаємодії між різними організмами, чи між організмом та середовищем, яке його оточує. Спираючись на те, що гомеостаз є генетично детермінованим, він характерний для всіх культур та їх сортів [18].

1.4.2. Урожайність сортів, стійких до нематод, на ґрунтах, що заражені *Globodera rostochiensis*

Зважаючи на нематодостійкість певних сортів картоплі визначено, що вони не втрачають урожайність на ґрунтах, які заражені *Globodera rostochiensis*. Згідно з експериментальними даними, урожайність стійких сортів на 19-63% вища за урожайність звичайної картоплі. Спостерігається відсоткова залежність урожайності від рівня інвазії. На слабо зараженому ґрунті урожайність нематодостійких культур більша тільки на 19%, тоді як на середньо- та високозаражених ґрунтах показник становить 44% і 63% відповідно.

Варіація результатів пов'язана з різними реакціями на стресовий фактор – нематодне ураження. Звичайні сорти відзначаються сповільненим ростом та розвитком, зниженням продуктивності, а сорти, що мають резистентність, формують нові корені на заміну ураженим. Подібне пристосування є причиною збереження нормального живлення, вологозабезпечення, росту та маси рослини. Таким чином, кількість врожаю є більшою, порівняно зі сприйнятливими сортами.

Корені всіх видів картоплі здатні інтенсифікувати вихід личинок до ґрунтового середовища з цист. Не зважаючи на це, на коренях звичайний сортів формуються зрілі цисти, які спричиняють більше інвазійне навантаження, тоді як корені нематодостійкої картоплі не підходять для росту і успішного розвитку личинок *Globodera rostochiensis* внаслідок утворення некротичних осередків, що

не є придатними для живлення. Некроз клітин прийнято вважати захисним механізмом рослини, який призводить до загибелі нематод ще до настання зрілості, що перешкоджає розмноженню, накопиченню цист.

На світовому ринку представлено приблизно 3000 сортів картоплі, більша половина з яких має резистентність до нематод. В межах нашої держави існує лише 40 подібних сортів, проте деякі з них (Седнівська та Чернігівська рання, Обрій, Водограй, Пекурівська) характеризуються високим урожаєм як при високих, так і при низьких значеннях інвазії. Ознаки толерантності та стійкості не обов'язково підлягають успадкуванню в одному сорті. При висаджуванні нематодостійких сортів потрібно враховувати рівень інвазійного навантаження ґрунту та критичний показник, при настанні якого врожайність обраного сорту падає [19].

1.4.3. Ефективність застосування нематодостійких сортів картоплі з метою зниження глободерозної ґрунтової інвазії

Перевагою нематодостійких сортів картоплі є не тільки підвищення показника врожайності, а й здатність очищувати ґрунтове середовище від цист. Відповідно до досліджень, в коренях стійких сортів лише 12% личинок проходять повний цикл розвитку, тоді як у клітинах звичайної картоплі закінчують розвиток 96%. Окрім того, в стійких сортах личинки стають самцями, а число самиць складає 1-4%.

В німецьких сортах нематодоочищувальна здатність сягає 95-99%, в нідерландських – 82-85%, а в українських – 85-88%. Серед вітчизняних стійких сортів картоплі найбільш ефективними прийнято вважати Обрій, Доброчин, Чернігівську та Седнівську ранню, Пекуровську. Нижчі показники притаманні для сортів Водограй та Дзвін.

При вирощуванні стійких сортів відбувається посилене зменшення кількості яєць та личинок, а не цист. Така динаміка обумовлена виходом личинок

зі стану цисти, а також знаходженням личинок в цистах, зберігаючи при цьому життєздатність. В разі однорічного вирощування число цист знижується не так швидко, як кількість яєць та личинок. Розглядаючи літературні дані, частка цист зменшувалась у 2-24 рази при вирощуванні нематодостійкої картоплі, на що впливала інтенсивність інвазії. На противагу, при посадці звичайних сортів культури в ґрунт число цист збільшувалось в 1,5-5 разів, а яєць та личинок – в 2-5 разів. Єдина думка щодо тривалості вирощування стійких сортів з метою ліквідації нематодного зараження відсутня. Деякі вчені вважають, що одного року застосування нематодостійкої картоплі достатньо, а інші – що необхідно хоча б 3-4 роки вирощування стійкої культури та один рік вирощування звичайної для фіксації результатів [19].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Обраний сорт картоплі та умови вирощування

Для експерименту застосовували картоплю сорту «Скарбниця», оскільки її вважають сприйнятливою до нематодного ураження, в тому числі й інфікування *Globodera rostochiensis*. Даний сорт є достатньо розповсюдженим, характеризується високою врожайністю, стійкий до фітофторозу, раку, іржі, мокрої бактеріальної гнилі. Не зважаючи на численні переваги, вид все більше потерпає від золотистої картопляної нематоди, тому рання діагностика захворювання є важливою для запобігання ураження великої кількості рослин в межах природного ґрунтового середовища [20].

Насінневу картоплю пророщували з використанням вологого методу. Для цього бульби розкладали в один шар на попередньо зволоженій тирсі, переносили в темне місце та підтримували температуру 15 °С. Картоплю перевертали один раз на кілька діб.



Рис. 2.1. Полив картоплі

Через три тижні бульби висаджували у вісім горщиків з піщаним ґрунтом рН якого становив 5. Злегка кислий ґрунт є придатним для росту та розвитку нематод. Під ємності підкладали папір, полив рослин відбувався із застосуванням води, яка була відстояна добу та більше. Частота поливу – один раз на тиждень. Надалі вирощування картоплі здійснювалось за температури 20-21 °С під теплим світлом лампи (241 люмен), яке подібне до денного. Обрано стандартний фотоперіод 16/8 (світло/темрява), відносну вологість повітря 34%.

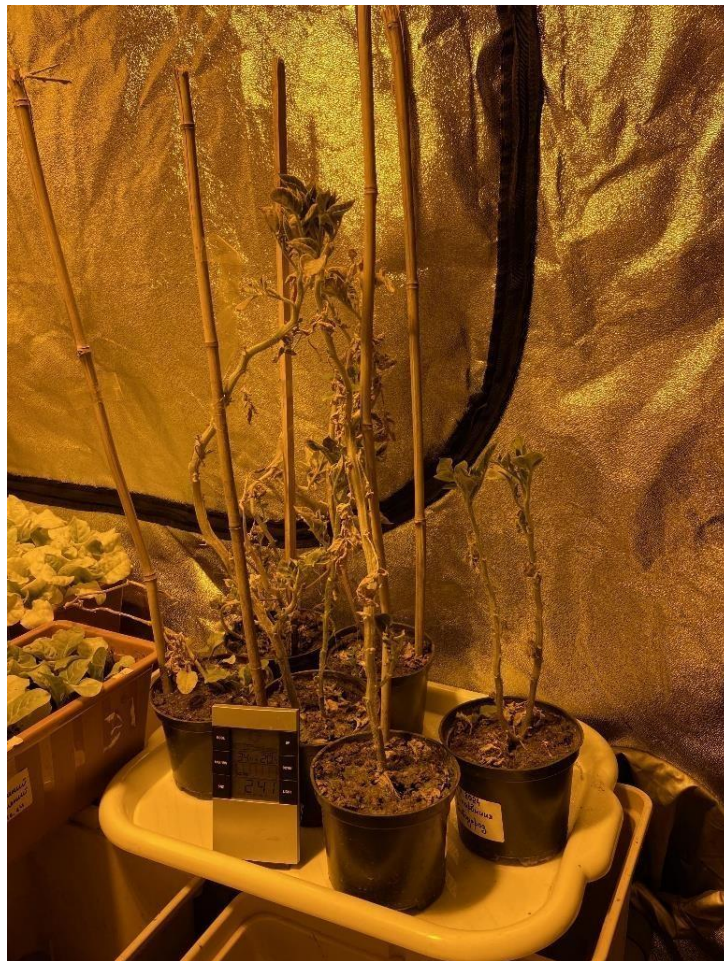


Рис. 2.2. Параметри вирощування картоплі

2.2. Виділення глободер з ґрунтового середовища

Зразки ґрунту відбирали в селі Лісники, що знаходиться в південній частині Київської області. Культура, яка потерпала від зараження глободерами – картопля сорту «Пролісок». Зважаючи на те, що рослина мала низький рівень стійкості до

хвороб, шкідників та несприятливих факторів середовища, її корені підлягали впливу картопляної цистоутворюючої нематоди.

З метою виділення *Globodera spp.* було застосовано метод паперових смуг. Вибір методики обумовлений її придатністю для відбору цист цистоутворюючих нематод з ґрунтового середовища. Перший крок – аналіз загальної проби, яка взята з трьох виїмок (об'єм 400 см³). Зразок ґрунту перемішували для досягнення вищої однорідності, просіювали через лабораторне дрібнопористе сито (матеріал – метал) та висушували в сушильній шафі за температури 30 °С. Час процесу не був чітко фіксований, тому що потрібно досягти максимального видалення вологи.

Надалі брали хімічну склянку, яка мала об'єм 1 л та прикладали до неї листок фільтрувального паперу згинаючи його таким чином, щоб він зміг дістати до дна посудини. При цьому кінці фільтрувального паперу, який застосовували для дослідження, заходили один за інший приблизно на 2 см. Склянку заповнювали водою на 70%, вносили 80 см³ відібраного ґрунту. Отриману суміш ретельно перемішували 3 хв використовуючи скляну паличку та відстоювали готову суспензію 15 хв для осідання часточок. Під час досягнення прозорості верхнього шару води фільтрувальний папір вилучали з посудини, розправляли на скляній пластинці. Цисти нематод та залишки органічної речовини формували невелику смугу на папері. Фільтр, який містив осад, переносили під біноклярну лупу з 32-кратним збільшенням та застосовуючи препарувальну голку збирали цисти на прозоре предметне скельце для подальшої ідентифікації [21].

2.3. Ідентифікація *Globodera rostochiensis*

Першочергово ідентифікацію проводили відповідно до морфологічних особливостей нематод роду *Globodera*. При проведенні мікроскопії для встановлення видової належності аналізованого матеріалу розглядали цисти та личинки другої стадії розвитку [22].



Рис. 2.3. Проведення мікроскопії

Таблиця 2.1

Морфологічні особливості для розпізнавання цист *Globodera rostochiensis* та відмінності від цист інших видів роду [22].

Вид	Довжина (мкм)	Ширина (мкм)	Відстань вувльва-анус (мкм)	Кількість кутикулярних складок
<i>G. artemisiae</i>	452-493	356-461	26-56	8
<i>G. millefolii</i>	480-639	380-479	24-29	6
<i>G. pallida</i>	510-675	451-648	48-54	12
<i>G. rostochiensis</i>	445-690	382-559	51-70	17-20
<i>G. tabacum</i>	536-767	459-558	41-52	7-9

Морфологічні особливості для розпізнавання личинок *Globodera rostochiensis* другої стадії розвитку та відмінності від личинок інших видів роду [23].

Вид	Довжина тіла (мкм)	Довжина стилету (мкм)	Форма головки стилету	Довжина хвоста (мкм)	Довжина гіалінової частини (мкм)
<i>G. artemisiae</i>	413-524	21-24	Округла	40-55	23-26
<i>G. millefolii</i>	483-516	25	Округла	49-55	23-30
<i>G. pallida</i>	452-486	23-24	Витягнута	50-53	26-27
<i>G. rostochiensis</i>	392-468	20-22	Округла	44-51	20-27
<i>G. tabacum</i>	476-551	21-25	Варіюється	50-56	21-28

Другим етапом ідентифікації було проведення мультиплексного ПЛР-тесту Булмана і Маршалла. Для цього 20 відібраних цист подрібнювали у пробірках, які містили 200 мкл розчину (5 М гуанідінізотіоціанату, 10 мМ ЕДТА, 50 мМ Tris-HCl (рН 7,5), та 8% меркаптоетанол). Суміш інкубували за кімнатної температури протягом 45 хв, розчин з ДНК одноразово екстрагували за допомогою хлороформ-ізоамілового спирту та фенолу (24:1), а потім – один раз хлороформ-ізоаміловим спиртом. Проводили осадження з використанням 0,3 М ацетату натрію та двох об'ємів етилового спирту. ДНК ресуспендували в 100 мкл молекулярно очищеної води

Універсальним праймером виступав ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), а специфічним для *Globodera rostochiensis* – PITSr3 (5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3'). Останній спричиняв ампліфікацію 434 п.н.. Тақ ДНК-полімераза застосовували для проведення

процесу ампліфікації, а кінцева концентрація нуклеотидів (dNTPs) складала 0,16 мМ для кожного. Молекулярно очищена вода додавалась з метою компенсації реакції розчину [22].

Таблиця 2.3

Об'єми реагентів, які необхідні для проведення ПЛР [22].

Реагент	Робоча концентрація	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
MgCl ₂	25 мМ	2	2 мМ
Tris-HCl	500 мМ	1	20 мМ
KCl	500 мМ	2,5	50 мМ
dNTPs	10 мМ	0,4	0,16 мМ для кожного
Універсальний праймер (ITS5)	10 мкМ	0,63	250 мкМ
Резервний праймер (PITSr3)	10 мкМ	0,63	250 мкМ
Тақ ДНК-полімераза	5 од мкл ⁻¹	0,12	0,6 од
Молекулярно очищена вода		Довести до 24	
Кількість екстрагованої ДНК		1	
Загалом		25	

Основні параметри – 2 хв за температури 94 °С, 35 циклів 30 с при температурі 94 °С, 30 с при значенні 55 °С та 30 с при 72 °С. Кінцева елонгація тривала 7 хв за температури 72 °С. Фрагменти ДНК розділяли за допомогою електрофорезу на агарозному гелі, використовуючи ультрафіолетове випромінювання [22].

2.4. Інокуляція нематодами

Основний матеріал для проведення інокуляції – личинки другої стадії розвитку та яйця. Екстракцію цист здійснювали за допомогою модифікованого методу Аюба. Відповідно до нього, нематодний матеріал поміщали у $MgSO_4$, який характеризувався щільністю 1,28 г/мл. Надалі проводили очищення із використанням сита та осадження із застосуванням чашки Петрі в яку поміщали фільтрувальний папір. З метою інтенсифікації вилуплення личинок другої стадії розвитку взято реактив $ZnCl_2$ (5 мМ). В підготовлений розчин занурювали цисти. Процес тривав рівно добу. Одержану суспензію фільтрували через дрібнопористе сито. Для приблизного визначення кількості личинок в інокуляті використовували стереоскопічний мікроскоп [24].

Картоплю заражали *Globodera rostochiensis* через 1,5 місяці від дати висадки. Концентрація суспензії для інокуляції становила 10 личинок другої стадії розвитку на 1 мл води. Чотири рослини з восьми інокулювали різною кількістю матеріалу золотистої картопляної нематоди, а інші чотири – відігравали роль контролю:

- Контроль (4 рослини) – 0 личинок другої стадії розвитку та 0 мл суспензії.
- Варіант 1 (1 рослина) – 100 личинок другої стадії розвитку та 10 мл суспензії.
- Варіант 2 (1 рослина) – 200 личинок другої стадії розвитку та 20 мл суспензії.
- Варіант 3 (1 рослина) – 300 личинок другої стадії розвитку та 30 мл суспензії.
- Варіант 4 (1 рослина) – 400 личинок другої стадії розвитку та 40 мл суспензії.

Личинки *Globodera rostochiensis* другої стадії розвитку вносили в ґрунтове середовище як можна ближче до коренів картоплі, створюючи перед цим маленьке заглиблення. Внесений інокулят присипали піщаним ґрунтом,

обережно та максимально рівномірно поливали рослину задля рівномірного розподілу збудників глободерозу поблизу кореневища.

2.5. Вимірювання флуоресценції хлорофілу

Портативний прилад «Флоратест» використовується в разі необхідності проведення експрес-діагностики різноманітних видів рослин, які зазнали впливу різного роду стресових факторів (як несприятливі зміни навколишнього середовища, так і шкода від людської діяльності). Робота флуориметра ґрунтується на обробці кривої індукції флуоресценції хлорофілу в режимі реального часу. Варто зазначити, що інтенсивність індукції флуоресценції хлорофілу за допомогою «Флоратесту» не призводить до негативних наслідків для рослинного матеріалу [25].

Як прилад, так і діагностичні методи, які лежать в основі його роботи, використовуються відносно біологічних об'єктів для фіксації зміни їх біофізичних властивостей, в тому числі й індукції флуоресценції нативного хлорофілу. Даний флуориметр являє собою інтелектуальний біосенсор, який включає в себе чутливий елемент – частину живої рослини.

Експрес-діагностика відмінностей між нормальним та патологічним станом рослин ґрунтується на застосуванні особливостей обраних специфічних ділянок кривої індукції флуоресценції хлорофілу як основних діагностичних критеріїв. Необхідно зауважити, що вони є частиною окремих областей ланцюгів фотосинтезу. Відповідно до вигляду кривої індукції флуоресценції хлорофілу зовсім не важко визначити силу впливу фактора, який аналізується, на загальний стан дослідного матеріалу [26].

Процеси фотосинтезу та індукції флуоресценції хлорофілу вступають в пряму конкурентну взаємодію за остаточний пул поглиненої енергії світла. Будь-яка зафіксована зміна застосування енергії під час перебігу одного процесу викликає комплементарну модифікацію іншого. Згідно з описаними

властивостями, використання індукції флуоресценції хлорофілу виступає швидким та одночасно з цим надійним методом неінвазивної оцінки фотосинтетичної активності. Ключове призначення «Флоратесту» – реєстрація флуоресцентного випромінювання хлорофілу безпосередньо з листових пластин. Основні характеристики, які надають перевагу флуориметру – широкий динамічний діапазон, низька робоча напруга, висока швидкість роботи та феноменальна точність.



Рис. 2.4. Прилад «Флоратест»

Сфери застосування приладу «Флоратест»:

- Швидка оцінка стану культур та показників їх життєздатності після впливу наднизьких та надвисоких температур, хімічних засобів захисту рослин, шкідників різних видів.
- Визначення оптимальних концентрацій добрив та різноманітних біологічно активних добавок з метою зменшення рівнів нітратів та нітритів у плодах рослин.

- Оптимізація технологічної складової землеробства за допомогою використання флуориметра в якості приладу для дистанційного спостереження за сільськогосподарськими землями.
- Швидка оцінка перевищення рівнів шкідливих речовин (важкі метали, пестициди, побічні продукти промислової галузі) в орних ґрунтах та їх прямий вплив на культури.
- Зменшення кількості води, яка застосовується при поливі.
- Прогнозування майбутніх врожаїв.
- Автоматизація експериментів з фізіології рослин в різних установах (в основному – університети та дослідницькі інститути [27]).

2.6. Оцінка показника флуоресценції хлорофілу

Для проведення експерименту між пластинами приладу «Флоратест» розташовували листок картоплі сорту «Скарбниця». Частина листка культури, що знаходилась між пластинами флуориметра, лишалася ізольованою від світла, а час темної адаптації рослинного матеріалу складав 3 хв. Згідно з властивістю сенсора (випромінювання синього світла на ділянку листка діаметром до 5 мм), відбувалось збудження червоної флуоресценції в природному пігменті. Сигнал передавався на фотоприймач сенсора через червоний світлофільтр. Для цього етапу характерним було перетворення сигналу на електричний та його посилення. Вже одержаний електричний сигнал фотоприймача, пропорційно до флуоресценції хлорофілу, передавався в процесорний модуль приладу «Флоратест», де проходила його обробка [28].

Оцінку стану листя картоплі проводили за основними показниками індукційної кривої:

- F0 – фоновий рівень флуоресценції хлорофілу під час відкриття затвору. Відображає первинний стан молекул пігменту у листку, який щойно пройшов стадію адаптації.

- F_1 – рівень флуоресценції хлорофілу в момент настання тимчасової затримки росту сигналу (ефект плато). Відповідає стадії тимчасової стабілізації сигналу на початкових етапах дослідження. Є параметром стрімкого накопичення первинного акцептора електронів QA у відновленому стані всередині фотосистеми II.
- F_r – максимальний рівень флуоресцентності. Фіксується під час закриття реакційних центрів фотосистеми II. Через дефіцит відтоку електронів настає процес відновлення QA та QB. При відновленні QA всіх комплексів фотосистеми II флуоресценція є найбільшою.
- F_m – квазістаціонарне значення флуоресценції хлорофілу. Параметр встановлюється після нетривалого потрапляння світла на листову пластину. При цьому реакційні центри фотосистеми II залишаються закритими.
- F_{st} – стаціонарний рівень флуоресценції хлорофілу. Виступає своєрідним балансом між фотохімічними й нефотохімічними процесами які проходять всередині листка. Засвідчує стабілізацію рівня флуоресценції в фотосистемі [29].



Рис. 2.5. Вимірювання показників флуоресценції хлорофілу

До того ж, було проведено аналіз додаткових параметрів:

- К1 – коефіцієнт впливу екзогенних факторів. Є числовим свідченням впливу умов зовнішнього середовища на рослинний матеріал.
- К2 – коефіцієнт індукції флуоресценції хлорофілу. Показує активність основних ферментів, що приймають участь у циклі Кальвіна (оксигеназа та рибулозобісфостфаткарбоксилаза).
- К3 – показник впливу ендогенних факторів. Відображає фізіологічні та біохімічні процеси (фітогормональна регуляція, забезпеченість поживними речовинами) [30].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Морфологічна та молекулярна ідентифікація

Спочатку оцінювали морфологічні особливості нематод. Відібрані цисти мали довжину 479-651 мкм. Дане значення дає можливість припустити, що аналізований вид не належить до *Globodera artemisiae* та *Globodera millefolii*, оскільки їх цисти зазвичай менші. Ширина цист становила 393-507 мкм, що також не є притаманним для *Globodera artemisiae* та *Globodera millefolii*. Кількість кутикулярних складок складала 17-19. Як відомо, подібне число є лише у одного виду *Globodera spp.* – *Globodera rostochiensis*. У інших видах роду кількість кутикулярних складок варіюється в межах 6-12. До того ж, виміряна відстань від вульви до ануса – 54-68 мкм. Колір цист був жовтим, чи коричневим. Спираючись на зазначені характеристики, цисти можуть належати до виду *Globodera rostochiensis*.



Рис. 3.1. Анально-вульварна пластинка цисти

Личинки другої стадії розвитку відзначались білим та жовтим забарвленням. У них форма головки стилету була округлою, а не витягнутою, як у *Globodera pallida*. Довжина гіалінової частини хвоста становила 21-26 мкм, що не властиво *Globodera artemisiae*, *Globodera pallida* та *Globodera millefolii*, оскільки розмір цієї структури у них більший. Довжина тіла і довжина стилету складала 398-457 мкм і 20-22 мкм відповідно. Одержані значення дають можливість припустити, що личинки є частиною виду *Globodera rostochiensis*, тому що личинки інших видів мають менший розмір сегментів тіла.

Для підтвердження видової належності нематод проводили мультиплексний ПЛР-тест Булмана і Маршалла. Внаслідок застосування видоспецифічних праймерів спостерігалась поява смуги ДНК, що мала розмір 434 п.н. Саме це значення характерне для *Globodera rostochiensis*. На противагу, при використанні методу відносно *Globodera pallida* розмір смуги ДНК зазвичай складає 265 п.н.

3.2. Зміни індукції флуоресценції хлорофілу рослин картоплі при ураженні *Globodera rostochiensis*

Після досягнення рослинами картоплі розміру 20-25 см проводили вимірювання флуоресценції хлорофілу приладом «Флоратест» (Інститут кібернетики імені В. М. Глушкова НАН України). Довжина хвилі освітлення в максимумі становила 450-470 нм. Спектральний діапазон вимірювання флуоресценції – 670-770 нм.

Згідно з результатами, в уражених *Globodera rostochiensis* рослин коефіцієнт K1, який відображає вплив зовнішніх умов на тест-організм, знаходився на рівні 90%. Таким чином виявлено, що на картоплю доволі сильно впливають екзогенні фактори, стрес, що спричиняє погіршення стану рослини. Значення показника K2, що відповідає за індукцію флуоресценції хлорофілу та вказує на активність оксигенази та рибулозобісфостфаткарбоксілази, становило

65%. Отже, через збільшення активності ключових фотосинтетичних ферментів індукція флуоресценції хлорофілу відповідно була високою. Ще один аналізований коефіцієнт K3 (демонструє вплив ендогенних факторів – забезпеченість поживними речовинами, фітогормональна регуляція) склав 19%. Встановлено, що в ході ураження відбувається послаблення метаболічних перетворень, порушення ендогенного статусу картоплі.



Рис. 3.2. Визначення коефіцієнтів K1, K2, K3

Результати досліджень показали, що інвазія нематодами *Globodera rostochiensis* рослин картоплі сорту Скарбниця призводила до підвищення показників флуоресценції хлорофілу (рис. 3.3).

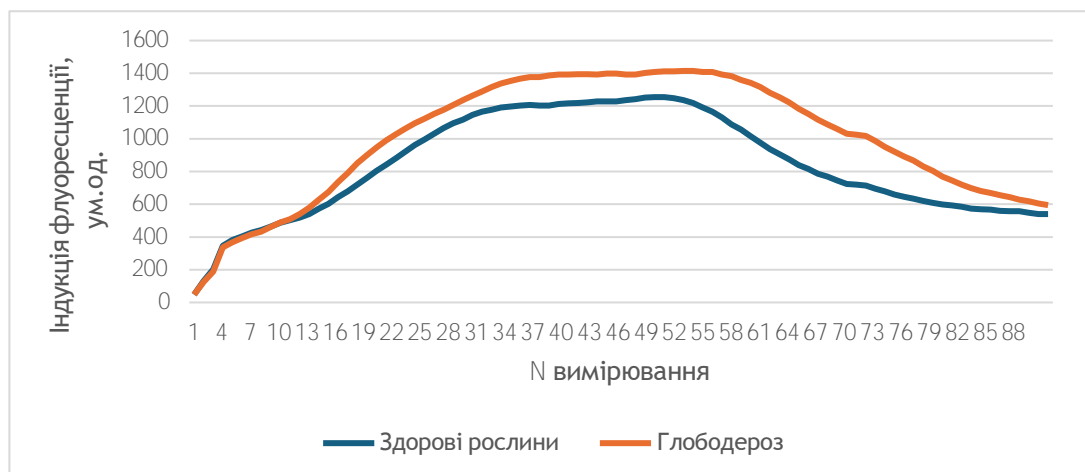


Рис. 3.3. Індукція флуоресценції хлорофілу в листках картоплі сорту Скарбниця за інвазії нематодами *Globodera rostochiensis*

При ураженні фіксувалось підвищення наступних показників флуоресценції: F_m – на 11,2%; F_v (відображає різницю F_p та F_0) – на 15,8%. Подібні зміни характеризують пригнічення фотосинтезу при інвазії нематодами, оскільки відомо, що за умов максимальної флуоресценції в точці F_m на індукційній кривій, фотосинтез знаходиться на мінімальному рівні. Збільшення показника F_v є реакцією на пошкодження, що чинять паразити та стрес, який переживає картопля під час цього процесу. Тобто відбувається накопичення хлорофілу, що знаходиться у збудженому стані, проте енергія, одержана від молекули не може нормально застосовуватись у фотохімічних реакціях. Окрім морфологічних змін ураження *Globodera rostochiensis* спричиняє порушення звичного електронного транспорту в фотосистемі II, відбуваються зміни структури хлоропластів та метаболічних шляхів. Таким чином рослини адаптуються до інвазії, переживають стресовий стан.

Таким чином, застосування підходу є доцільним для виявлення нематодної інвазії до появи морфологічних змін у рослинних організмів. Зростання рівнів F_m , F_v , а також зміна показників K_1 , K_2 , K_3 є відповіддю на ураження з боку фітопатогенів.

ВИСНОВКИ

1. На основі аналізу літературних даних визначено особливості нематод, їх вплив на рослинні організми, досліджено біологічні особливості *Globodera spp.*, методи ідентифікації паразитів. Проаналізовано експерименти з виявлення зараження за допомогою параметрів флуоресценції. Окрему увагу приділено нематодостійким сортам картоплі.
2. З метою виділення *Globodera spp.* з ґрунтового середовища застосовано метод паперових смуг. Проведено інокуляцію картоплі сорту «Скарбниця» фітопаразитами.
3. Базуючись на морфологічних особливостях та застосовуючи молекулярні методи, а саме мультиплексний ПЛР-тест Булмана і Маршалла, проведено ідентифікацію нематод. Встановлено, що аналізованим видом є *Globodera rostochiensis*.
4. Виявлено, що в уражених рослин коефіцієнт K1 знаходився на рівні 90%, тому на картоплю доволі сильно впливають екзогенні фактори. Значення показника K2 становило 65%, тобто через збільшення активності фотосинтетичних ферментів індукція флуоресценції хлорофілу була високою. Коефіцієнт K3 складав 19% через те, що в ході ураження відбувається послаблення метаболічних перетворень, порушення ендогенного статусу картоплі.
5. Досліджено, що при ураженні фіксувалось підвищення рівнів Fm – на 11,2% та Fv – на 15,8%. Встановлено, що подібні зміни характеризують пригнічення фотосинтезу при інвазії *Globodera rostochiensis*, оскільки відомо, що за умов максимальної флуоресценції в точці Fm на індукційній кривій, фотосинтез знаходиться на мінімальному рівні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Helder J., Vervoort M., Megen H., Rybarczyk-Mydłowska K. Phytopathogenic Nematodes. Principles of Plant-Microbe Interactions. 2015. с. 91–102.
2. Handoo Z. Plant Parasitic Nematodes. Mycology and Nematology Genetic Diversity and Biology Laboratory. 1998. с. 1.
3. *Globodera rostochiensis*. EPPO Global Database. 2025. с. 1.
4. Wainer J., Dinh Q. Taxonomy, Morphological and Molecular Identification of the Potato Cyst Nematodes, *Globodera pallida* and *G. Rostochiensis*. Plants. 2021. с. 1–21.
5. *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. Diagnostic protocols for regulated pests – European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2004. с. 309–314.
6. Širca Š., Stare B., Strajnar P., Urek G. PCR-RFLP diagnostic method for identifying *Globodera* species in Slovenia. *Phytopathologia Mediterranea*. 2010. с. 361–369.
7. Zunke U. Potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*). Center for Invasive Species and Ecosystem Health. 2018. с. 1.
8. Shao H., Zhang P., Peng D., Huang W., Kong L., Li C., Liu E., Peng H. Current advances in the identification of plant nematode diseases: From lab assays to in-field diagnostics. *Plant Pathogen Interactions*. 2023. с. 1–12.
9. Vossenbergh B., Voogd J., Westenberg M., Karssen G. Comparison of three conventional PCR test (Bulman & Marshall) versions for the molecular identification of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* cysts and juveniles. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2014. с. 27–32.
10. Grenier E., Blok V., Jones J., Fouville D., Mugniery D. Identification of gene expression differences between *Globodera pallida* and *G. mexicana* by suppression subtractive hybridization. *Molecular Plant Pathology*. 2002. с. 217–226.

11. Protocol for the identification of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*: Morphological and molecular methods. European Union Reference Laboratory for Plant Parasitic Nematodes. 2021. с. 1–34.
12. Pehlivan H., Kaşkavalcı G., Uludamar E., Toktay H. Identification and prevalence of potato cyst nematodes and root-knot nematodes in the potato production areas of İzmir Province, Turkey. *Turkish Journal of Entomology*. 2020. с. 259–272.
13. Schmitz A., Tartachnyk I., Kiewnick S., Sikora R. Detection of *Heterodera schachdi* infestation in sugar beet by means of laser-induced and pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence. *Nematology*. 2006. с. 273–286.
14. Соснова стовбурава нематода (*Bursaphelenchus xylophilus*) – небезпечний карантинний організм, який відсутній на території країни. Головне управління Держпродспоживслужби в Тернопільській області. Тернопіль. 2024. с. 1.
15. Shen L., Lin X., Liu F., Huang Y., Ye J., Tan J. Early Diagnosis of Pine Wood Nematode Disease Based on Chlorophyll Fluorescence Parameters and Organic Acids. *Forests*. 2023. с. 1–11.
16. Rolfe S., Scholes J. Chlorophyll fluorescence imaging of plant–pathogen interactions. *Protoplasma*. 2010. с. 163–175.
17. Стеблова нематода картоплі – прихована загроза для врожаю картоплі. Державна установа Тернопільська обласна фітосанітарна лабораторія. 2022. с. 1–6.
18. Методологія оцінювання сортозразків картоплі на стійкість проти основних шкідників і збудників хвороб. Інститут захисту рослин. Київ. 2021. с. 151-152.
19. Сігарьова Д., Борзих О., Максим'юк В., Лихач Є., Галаган Т., Бучик С. Рекомендації з використання нематодостійких сортів картоплі в осередках глободерозу Волинської області. Інститут захисту рослин. Київ. 2012. с. 10–11.

20. Картопля сорту «Скарбниця». Інститут картоплярства НААН. Київ. 2023. с. 1.
21. Методи фітогельмінтологічної експертизи об'єктів регулювання – ДСТУ 7406:2013. Національний стандарт України – власник ТОВ «Інститут Агробіології» ЄДРПОУ 42039674. Київ. 2014. с. 1–8.
22. Діагностичні протоколи для регульованих шкідливих організмів. Європейська та Середземноморська організація захисту рослин. 2012. с. 1–33.
23. Urek G., Širca S., Meglič V. Morphological characteristics and distribution of *Globodera* species in Slovenia. *Plant Protection Science*. 2002. с. 354–357.
24. Ayoub S. *Plant Nematology: An Agricultural Training Aid*. NemaAid Publication. 1980. с. 1–195.
25. Єршов С. Портативний комп'ютерний прилад сімейства «Флоратест». Національна академія наук України. 2020. с. 23.
26. Romanov V. Portable device «Floratest». Data acquisition system department – V.M.Glushkov's Institute of Cybernetics National Academy of Sciences of Ukraine. Київ. 2023. с. 1.
27. Галелюка І. «Флоратест» – прилад для визначення стану рослин. Національна академія наук України. 2016. с. 1.
28. Романов В., Галелюка І., Сарахан Е. Портативний флуориметр флоратест и особенности его применения. Биосенсоры – Институт кибернетики им. В.М. Глушкова НАН Украины. Київ. 2010. с. 39–44.
29. Пінчук А., Стародуб М., Ковалишин І., Таран М., Швець Р. Індукція флуоресценції хлорофілу листків у представників роду *Clematis* L. в умовах Києва. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Київ. 2016. с. 176–184.
30. Мідія К. Формування ризосферного мікробного біому ячменю ярого за різних систем удобрення в чорноземі типовому. Дисертація –

Національний університет біоресурсів і природокористування України.
Київ. 2024. с. 1–203.

ДОДАТКИ

Додаток А

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ****ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ
І ЕКОЛОГІЇ****ЗБІРНИК**

матеріалів доповідей

**XI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ****І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ****«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ
ЛЮДСТВА»****23-24 квітня 2025 р.**

Київ – 2025

<i>Сергійчук В.Ф., Сербенюк Г.А.</i> АНАЛІЗ ЗАПОДІЯНОЇ ШКОДИ ДОВКІЛЛЮ, ЕКОНОМІЦІ ПРИ НЕСАНКЦІОНОВАНОМУ ВИДОБУТКУ БУРШТИНУ	155
<i>Скряга В.О., Клепко А.В.</i> ЕКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ВПЛИВУ БОЙОВИХ ДІЙ НА СТАН НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «СВЯТІ ГОРИ» В ДОНЕЦЬКІЙ ОБЛАСТІ	156
<i>Софієнко І.В., Бережнюк Є.М.</i> ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «ГОЛОСІЇВСЬКИЙ» В РАЙОНІ КАСКАДУ ГОРІХУВАТСЬКИХ СТАВКІВ	158
<i>Терзєман В.В., Юрасов С.М.</i> ПРОГНОЗ РИЗИКУ ПОГІРШЕННЯ ЯКОСТІ ВОД РІЧКИ ДУНАЙ (КІЛІЯ)	160
<i>Тимошевська Д., Новікова О.І., Бережнюк Є.М.</i> ЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «ГОЛОСІЇВСЬКИЙ» ЛОКАЦІЇ ДІДОРІВСЬКОГО СТАВУ	162
<i>Тишкевич М.І., Романчук М.С.</i> ОЦІНКА ЯКОСТІ ВОДИ ВОДОСХОВИЩА ЯЛПУГ-КУГУРЛУЙ ЗА ІНДЕКСОМ ЗАБРУДНЕННЯ (ІЗВ)	164
<i>Турзін І.П., Таран О.П.</i> ВИКОРИСТАННЯ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ ДЛЯ СТИМУЛЮВАННЯ РОЗВИТКУ РОСЛИН КВАСОЛІ	166
<i>У Жофань, Ладика М.М.</i> ЩОДО ЯКОСТІ ПОВЕРХНЕВИХ ВОД ЗАТОПЛЕНОЇ ЗАПЛАВИ Р. ІРПІНЬ	168
<i>Урбановський С.М., Субін О.В.</i> ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ <i>DIANTHUS BARBATUS</i> В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i>	170
<i>Федоров М.Ю., Нагаєва С.П.</i> ВПЛИВ БОЙОВИХ ДІЙ НА ЕКОСИСТЕМУ НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ «БІЛОБЕРЕЖЖЯ СВЯТОСЛАВА»	171
<i>Філоненко Д.А.</i> ЗМІНИ ВМІСТУ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ В ТКАНИНАХ КОРОПА ЗА ДІЇ МІКОТОКСИНУ T2	173
<i>Чінікулов О.Р., Табас С.Ю., Кудрявицька А.М.</i> ЗАБРУДНЕННЯ ПРОДУКЦІЇ РОСЛИННИЦТВА – ЕКОЛОГІЧНИЙ ФАКТОР РАДІАЦІЙНОЇ НЕБЕЗПЕКИ УКРАЇНИ	175
<i>Шандра В.В., Федунішина В.В., Кудрявицька А.М.</i> АГРОЕКОЛОГІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВНЕСЕННЯ ДОБРИВ НА РОБОТУ ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ ЯРОЇ ПШЕНИЦІ	177
<i>Шевцова П.М., Таран О.П.</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ІНДУКЦІЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ РОСЛИН КАРТОПЛІ ПРИ УРАЖЕННІ ПАРАЗИТИЧНИМИ НЕМАТОДАМИ	179
<i>Шишкіна Д.С., Кляченко О.Л.</i> ОЦІНКА І ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ ORCHIDACEAE VANDA	181

УДК 632.651; 632.6.04/08

**ДОСЛІДЖЕННЯ ІНДУКЦІЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ РОСЛИН
КАРТОПЛІ ПРИ УРАЖЕННІ ПАРАЗИТИЧНИМИ НЕМАТОДАМИ**

Шевцова П.М., студентка 4 курсу, факультет захисту рослин, біотехнології та екології

Таран О.П., кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Нематоди є розповсюдженими шкідниками сільськогосподарських рослин, які уражують велику кількість культур. Найнебезпечніші нематоди для культури картоплі – це *Globodera rostochiensis* та *Globodera pallida*, а їх особливістю є здатність до утворення цист. Візуальні зміни верхньої частини рослини включають карликовість та пожовтіння листя, його в'янення. Морфологічні ознаки ураження кореневої системи супроводжуються формуванням великої кількості невеликих коричневих цист. Це, в свою чергу, викликає зниження маси та розмірів бульб на 30-80%, послаблення кореневої системи, наслідком якого виступає порушення обміну речовин, спостерігається загальна виснаженість рослини, підвищена ймовірність зараження іншими фітопатогенами [1]. Заходи боротьби з цистоутворюючими нематодами на картоплі включають застосування хімічних нематоцидів, стратегію удосконалення культивування рослин та використання природної резистентності хазяїна до патогена.

Раннє виявлення інвазії нематод, своєчасне визначення сприйнятливих сортів та моніторинг поширення епідемії є важливими засобами контролю захворювання. Одним із методів, що дозволяє встановити статус рослин при дії стресів різного походження є вимірювання флуоресценції хлорофілу. Метод може швидко відобразити зміну здатності листя рослин поглинати світлову енергію під час стресу, використовуючи хлорофіл як зонд. Це є ефективним засобом швидкого аналізу стану рослин під час різних типів стресу, як спричинених екологічними чинниками так, і біотичними, наприклад, ураженням паразитичними організмами [2].

Метою роботи була оптимізація методики використання методу індукції флуоресценції хлорофілу для виявлення змін у рослин картоплі при інвазії нематодами роду *Globodera*. У дослідженнях використовували рослини картоплі сорту Скарбниця. Бульби картоплі пророщували з використанням вологого методу. Для цього бульби розкладали в один шар на попередньо зволоженій тирсі, переносили в темне місце та підтримували

температуру 15°C. Потім пророщені бульби висаджували у ґрунт, контамінований цистами нематоди роду *Globodera*. Контрольні рослини вирощували у ґрунті без контамінації нематодою. Рослини культивували у фітокамері «Silverbox evolution» (Франція). Для освітлення використовували лампу ДНаТ, 600 Вт. Температуру підтримували на рівні 22±2 °С. Режим освітлення - світло/темрява становив 16/8 годин. Вологість повітря у камері підтримували на рівні 70-80%,

Після досягнення рослинами розміру 20-25 см проводили вимірювання флуоресценції хлорофілу приладом «Флоратест» (Інститут кібернетики імені В.М. Глушкова НАН України). Зміни значень виходу флуоресценції на фоні постійного освітлення реєстрували за трихвилинної темної адаптації. Довжина хвилі освітлення в максимумі становить 450–470 нм. Спектральний діапазон вимірювання флуоресценції – 670–770 нм. Встановлювали основні кінетичні параметри флуоресценції: F_0 – фонові флуоресценція, F_m – максимальний вихід флуоресценції, F_{st} – стаціонарна флуоресценція [3].

Результати досліджень показали, що інвазія нематодою роду *Globodera* рослин картоплі сорту Скарбниця призводила до підвищення показників флуоресценції хлорофілу (рис.1).

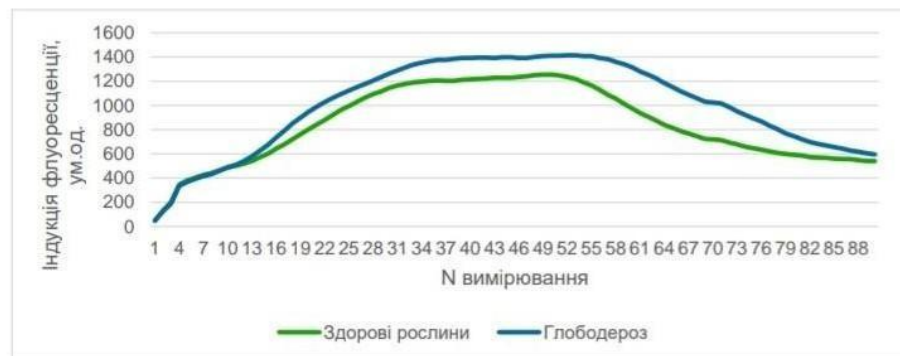


Рис. 1. Індукція флуоресценції хлорофілу в листках картоплі сорту Скарбниця за інвазії нематодами роду *Globodera*

Підвищення показників флуоресценції: F_m – на 11,2%, F_v – на 15,8%; характеризує пригнічення фотосинтезу при інвазії нематодою, оскільки відомо, що за умов максимальної флуоресценції в точці F_m на індукційній кривій, фотосинтез знаходиться на мінімальному рівні. Таким чином, показано можливість виявлення впливу інвазії нематодою роду *Globodera* на ранній стадії розвитку рослин методом індукції флуоресценції хлорофілу. Подальші дослідження необхідні для виявлення можливості застосування методу при виявленні стійких до глободерозу сортів картоплі.