

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри фітопатології
імені академіка В.Ф. Пересипкіна
_____ Дмитро ГЕНТОШ

« ____ » _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «Особливості діагностичних методів дослідження збудників
бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур у лабораторних умовах»

Спеціальність 202 «Захист і карантин рослин»

(код і назва)

Гарант освітньої програми

доктор сільськогосподарських наук,
професор, професор кафедри фітопатології
ім. акад. В.Ф. Пересипкіна,

_____ Мирослав ПІКОВСЬКИЙ

(підпис)

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

доктор сільськогосподарських наук,
професор, академік НААН,
професор кафедри фітопатології
ім. акад. В.Ф. Пересипкіна

_____ Микола ПАТИКА

(підпис)

Виконав

_____ Дмитро СМОЛЯР

(підпис)

КИЇВ-2025

біологічними методами досліджень.

– Встановити критерії оцінки якості та достовірності діагностичних методів, які важливі для моніторингу агроценозів та оперативного прийняття рішень щодо заходів контролю фітопатогенних бактерій.

4. Консультанти розділів роботи (проекту)

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1. Огляд літератури			
2. Матеріали та методи досліджень			
3. Результати досліджень та їх обговорення			
4. Загальні висновки			
5. Список використаних джерел			

5. Дата видачі завдання «__» _____ 2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів випускної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Аналіз та узагальнення літературних даних із різних джерел щодо теми досліджень (інформаційні ресурси: Pubmed, Medscape, Elsevier, Scopus, Web of Science та інші). Оформлення розділу «Огляд літератури», виявлення актуальності, проблемних питань наукового напрямку.		
2	Підбір лабораторно-діагностичних методик, протоколів дослідження; розроблення плану науково-дослідної роботи; підготовка до експерименту, лабораторна діагностика бактеріозів рослин за допомогою сучасних підходів.		
3	Проведення наукових досліджень, обговорення та опис результатів.		
4	Встановлення основних критеріїв оцінки якості та достовірності діагностичних методів дослідження фітопатогенних бактерій.		
5	Підбиття підсумків досліджень. Обробка та аналіз результатів. Формулювання висновків. Написання та оформлення роботи.		

Студент _____
(підпис)

Смоляр Д.О.
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Патика М.В.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Бакалаврська робота як кваліфікаційне дослідження на тему «Особливості діагностичних методів дослідження збудників бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур у лабораторних умовах» виконана в обсязі 60 сторінок комп'ютерного тексту формату А4, містить 5 таблиць, 7 рисунків. Використано 51 джерело інформаційних ресурсів, літератури.

Робота складається з наступних розділів:

1. Огляд літературних даних.
2. Матеріали та методи досліджень.
3. Результати досліджень та їх обговорення.
4. Загальні висновки науково-дослідної роботи.
5. Список використаних джерел.

Дослідження проведено на кафедрі фітопатології імені академіка В.Ф. Пересипкіна Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Мета роботи – виявити особливості науково-методичних підходів при діагностики бактеріозів сільськогосподарських культур в лабораторних умовах та оцінити ефективність виявлення інфікування рослин за сучасними методами полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР).

Об'єкт досліджень – чутливість, стабільність та поріг виявлення ДНК збудників бактеріальних хвороб рослин при ПЛР-діагностиці.

Предмет досліджень – оцінка ефективності використання молекулярно-біологічних методів для ідентифікації ізолятів бактеріальних культур-фітопатогенів; підтверджуюче тестування щодо виявлення «позитивних» результатів.

Завдання досліджень:

1. Провести лабораторну діагностику збудників бактеріальних хвороб овочевих та зернових культур за сучасними методами ПЛР (на прикладі зразків-ізолятів з роду *Xanthomonas* spp., наданих із робочої колекції непатогенних мікроорганізмів сільськогосподарського призначення від академіка НААН Миколи Патики).
2. Здійснити аналіз продуктів ПЛР методом електрофорезу в агарозному гелі.
3. Встановити основні критерії оцінки якості та достовірності діагностичних тестів, які базуються на сучасних молекулярно-біологічних методах ідентифікації та виявлення збудників бактеріальних хвороб в рослинному матеріалі.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	9
ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	13
1.1. Використання комплексного підходу у сучасних лабораторних практиках з діагностики та ідентифікації основних збудників бактеріальних хвороб сільськогосподарських рослин	13
1.2. Застосування діагностичних методів на основі полімеразно-ланцюгових реакцій (ПЛР)	20
1.3. Основні характеристики експрес діагностики фітопатогенних бактерій в агроекосистемах.....	24
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	30
2.1. Об'єкт та предмет дослідження.....	32
2.2. Методи проведення лабораторних досліджень.....	36
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	41
3.1. Дослідження ізолятів з роду <i>Xanthomonas</i> spp. за методом ПЛР	41
3.2. Основні критерії оцінки якості та достовірності діагностичних тестів на основі різновидів ПЛР	46
ВИСНОВКИ
.....
.....	Ошибка! Закладка не определена...
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	56

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ПЛР / PCR – полімеразно-ланцюгова реакція

ІФ – імунофлюоресцентний аналіз

ІФА – імуноферментний аналіз

г – грам

мл – мілілітр

X. campestris – *Xanthomonas campestris*

рv. – патологічний варіант

кл./мл – клітин на один мілілітр

LB – середовище Лурія Бертані

об./хв – обертів за одну хвилину

мкл – мікролітр

мкг/мл – мікрограм на один мілілітр

мкМ – мікромоль

нм – нанометр

п.н. – пар нуклеотидів

К+ – позитивний контроль

ВСТУП

В останні роки науковий інтерес становлять дослідження, спрямовані на використання досягнень мікробіології, фітопатології, молекулярної біології, генетики, інформаційних технологій у сільському господарстві, зокрема у рослинництві. Суттєвий вплив на продуктивність та якість сільськогосподарських культур мають біотичні, стресові фактори довкілля (фітопатогенні мікроорганізми, фітофаги, бур'яни) [1, 2].

При взаємодії патогену та рослини-господаря відбувається їх інтеграція, яка виявляється у формуванні патологічної системи. У термінах інфекційної патології «патологічна система» – це функціональна сукупність реакцій окремих клітин, тканин, органів, систем або організму в цілому, що виникає внаслідок впливу на організм патогенного фактору (біотичного або абіотичного), що характеризується тривалою активністю та депресією з генетичними механізмами, що має у своїй основі порушення інформаційного процесу та призводить до поглиблення порушення рівноваги хворого організму з навколишнім середовищем [3]. Слід зазначити, що загальне визначення патологічної системи не враховує деяких особливостей, характерних для патосистем, що складаються з більш ніж одного організму (систем паразит-господар), у тому числі і рослинно-мікробних [2, 4].

З літературних джерел відомо, що фітопатогенні бактерії можуть спричиняти розвиток серйозних патологій у сільськогосподарських культур і призводити до значних втрат урожаю. Основними причинами пошкодження, псування агропродукції вважали фітопатогенні гриби, а бактеріям при цьому приділяли значно меншу увагу. Однак останніми роками в різних регіонах країни захворювання, викликані фітопатогенними бактеріями, вийшли на рівень епіфітотій [5]. Внаслідок повсюдного поширення та значної економічної шкоди бактеріози рослин зараз стали називати хворобами XXI століття. На перших місцях за ураженістю фітопатогенними бактеріями знаходяться овочеві та зернові культури. Наприклад, серед бактеріозів картоплі найбільших збитків

завдають кільцева гниль (збудники роду *Clavibacter*), а також гнилі (м'яка або мокра), викликані фітопатогенними бактеріями родів *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Ralstonia*. Широке поширення набув судинний бактеріоз капусти, що викликається деякими фітопатогенними *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. arboricola*). Крім цього, велику шкоду (до 40,0-70,0% врожаю) завдають фітопатогени *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (чорна бактеріальна плямистість томату та деяких інших культур), *Clavibacter michiganensis* (бактеріальний рак), а також представники роду *Pseudomonas*, що викликають некрози рослин [5-7]. За останні роки відбувається збільшення випадків ураження рослин «традиційними» для кліматичних зон країни фітопатогенними бактеріями, а також фіксується поява нових збудників фітобактеріозів.

Таким чином, вирішення проблеми бактеріозів рослин передбачає використання комплексного підходу. Необхідно здійснювати оптимізацію агротехнологічних заходів, оскільки більша частина сільськогосподарської продукції інфікується фітопатогенними бактеріями при збиранні, сортуванні або зберіганні врожаю. Тому актуальна розробка науково-практичних підходів, які дозволять зменшити випадки контамінації рослинного матеріалу патогенами при відповідних процедурах. Недотримання правил сівозміни та технологій обробітку культурних рослин також може спричинювати спалах бактеріозів. Застосування підвищених доз мінеральних добрив часто провокує розвиток хвороб рослин, а використання пестицидів (на додаток до негативного впливу на довкілля та організм людини, тварин, ентомофауни) може призводити до появи важкоконтрольованих штамів патогенів, стійких до засобів захисту рослин [8-10].

Надзвичайну важливість для контролю за хворобами рослин має ефективна сучасна діагностика фітопатогенів у агрофітоценозах. У цьому зв'язку дослідження особливостей вчасної та грамотної лабораторної діагностики та ідентифікації збудників бактеріозів сільськогосподарських культур мають як науково-теоретичне, так і практичне значення для захисту рослин.

Для досягнення поставленої мети вирішували такі завдання:

1) Провести лабораторну діагностику збудників бактеріальних хвороб овочевих та зернових культур за сучасними методами ПЛР.

Для роботи обрано виділені культури бактерій (ізоляти з посівів пшениці озимої), які за класичними мікробіологічними та фізіолого-біохімічними методами діагностики вже були ідентифіковані вченими як представники роду *Xanthomonas* spp.). Зразки зберігаються у робочій колекції непатогенних мікроорганізмів сільськогосподарського призначення та надані науковим керівником роботи – академіком НААН Миколою Патика).

2) Здійснити аналіз продуктів ПЛР методом електрофорезу в агарозному гелі.

3) Встановити основні критерії оцінки якості та достовірності діагностичних тестів, які базуються на сучасних молекулярно-біологічних методах ідентифікації та виявлення збудників бактеріальних хвороб в рослинному матеріалі.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Використання комплексного підходу у сучасних лабораторних практиках з діагностики та ідентифікації основних збудників бактеріальних хвороб сільськогосподарських рослин

Сучасний захист рослин спирається на значний обсяг інформації, що характеризує поширення, розвиток, економічне значення хвороб. Тільки в результаті своєчасного одержання і повноцінної обробки цієї інформації можна прийняти оптимальні рішення, що забезпечують профілактичну спрямованість захисних заходів і їх високу рентабельність [11, 12]. Ключовою основою інтегрованого захисту рослин є фітосанітарний моніторинг, система прогнозування та контролю шкочинних організмів (збір, накопичення, аналіз та використання отриманої інформації з метою цілеспрямованого і оптимального проведення заходів захисту рослин).

Необхідність комплексного підходу щодо аналізу бактеріозів сільськогосподарських культур, що включає аналіз ймовірності проникнення їх на територію нашої країни з різними видами продукції, аналіз ймовірності акліматизації в конкретних регіонах з урахуванням специфічних абіотичних і біотичних факторів, аналіз ймовірності різниці раннього впливу на економічні показники аграрної галузі, стан довкілля та об'єктивну обстановку в господарстві, конкретному агроценозі, націлює на розробку сучасних методів діагностики різних культур. Особливо актуально і те, що наша країна експортує агропродукцію, зерно в різні країни, які мають відповідні фітосанітарні вимоги, серед яких відсутність збудників бактеріальних захворювань у зернових, зернобобових (наприклад, для насінництва) та інше.

Діагностика хвороб рослин дозволяє правильно вибрати та застосовувати ефективні методи, сучасні засоби захисту рослин. Багато хвороб рослин (різні види гнилей, плямистостей та інше) визначають за макроскопічними симптомами за допомогою визначників. При неможливості

поставити точний діагноз у такий спосіб роблять мікроскопічний аналіз хворих рослин, досліджують збудників хвороб (форму, розміри, забарвлення, особливості органів розмноження, морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості, внутрішньоклітинні включення тощо).

Для маловивчених фітопатогенів перевіряють паразитичну спеціалізацію та вірулентність по відношенню до різних рослин. Високочутливий метод діагностики фітопатогенних вірусів та бактерій, заснований на штучному зараженні ними індикаторних рослин. Віруси та бактерії у рослин з явними та прихованими ознаками хвороби дозволяє розпізнавати серологічна діагностика. Сьогодні дослідники використовують такий напрямок у серологічному методі як імунолюмінесцентний аналіз (допомагає виявляти збудників безпосередньо у клітинах та тканинах рослин). У комплексі діагностики хвороб рослин широко застосовують також люмінесцентний аналіз, електронно-мікроскопічні методи та інші. Неінфекційні хвороби, що викликаються порушенням режиму мінерального живлення, діагностують переважно візуальним та хімічними методами.

Мікроскопічний метод є найбільш поширеним у практиці спеціалізованих лабораторій. Точну ідентифікацію збудника проводять головним чином з морфології (морфолого-культуральні ознаки патогену) із застосуванням методів мікроскопії та культивування на поживних середовищах. Однак морфологічні характеристики у близькоспоріднених видів мікроорганізмів можуть збігатися, а всередині одного виду значно варіювати. Крім того, симптоми хвороби можуть проявлятися нетипово або захворювання може проходити у прихованій формі. У разі проблематичного виявлення патогену прямою мікроскопічною діагностикою хвороб цей метод доповнюють мікологічними дослідженнями (наприклад, пересіванням фітопатогенних організмів з рослинних тканин на спеціальні штучні поживні середовища – створення культур ізолятів *in vitro*). Недоліками дослідження фітопатогенів шляхом пересівів (пасажів) інфекційного агенту в чисту культуру є тривалість досліджень, їх

трудомісткість та відсутність специфічних середовищ для кожного конкретного виду збудника хвороби [4, 13, 14].

Патогенні мікроорганізми можуть довгий час зберігатися в латентній формі в вегетуючих рослинах і репродуктивних органах. Це одна із екологічних ніш фітопатогенів як первинного джерела інфекції.

Розпочатий вітчизняними науковцями моніторинг поширення бактеріозів сільськогосподарських рослин (пшениці, сої) в різні роки свідчить про потенційну небезпечність розширення кола агресивних фітопатогенних бактерій. Збудники бактеріальних хвороб пшениці наведені в табл. 1.1.

Таблиця 1.1 – Бактеріальні хвороби пшениці та їхні збудники [15]

Бактеріальна хвороба	Збудник
<i>В Україні:</i>	
Базальний бактеріоз (базальна гниль лусочок, базальна плямистість лусочок, гниль колоска)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>
Бактеріальний опік (бактеріальна плямистість, некроз листя)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Чорний бактеріоз (блек-чаф, чорноплівчастість, штрихуватість)	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i> , <i>X. translucens</i> pv. <i>cerealis</i>
Бактеріальна гниль (стеблова гниль)	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
Плямистий бактеріоз	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Бактеріальна плямистість	<i>Pantoea agglomerans</i>
Рожевий бактеріоз зерна	<i>Erwinia rhapontici</i>
<i>У світі:</i>	
Жовтий слизовий бактеріоз	<i>Rathayibacter tritici</i>
Біла плямистість	<i>Bacillus megaterium</i> pv. <i>cerealis</i>
Стебловий меланоз	<i>Pseudomonas cichorii</i>
Бактеріальна мозаїка	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i>
Бактеріальне гниття піхв	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>

Повідомляється, що збудники бактеріальних хвороб можуть спричинювати як моноінфекції (рис. 1.1), так і комплексні із збудниками мікроміцетного та вірусного походження.

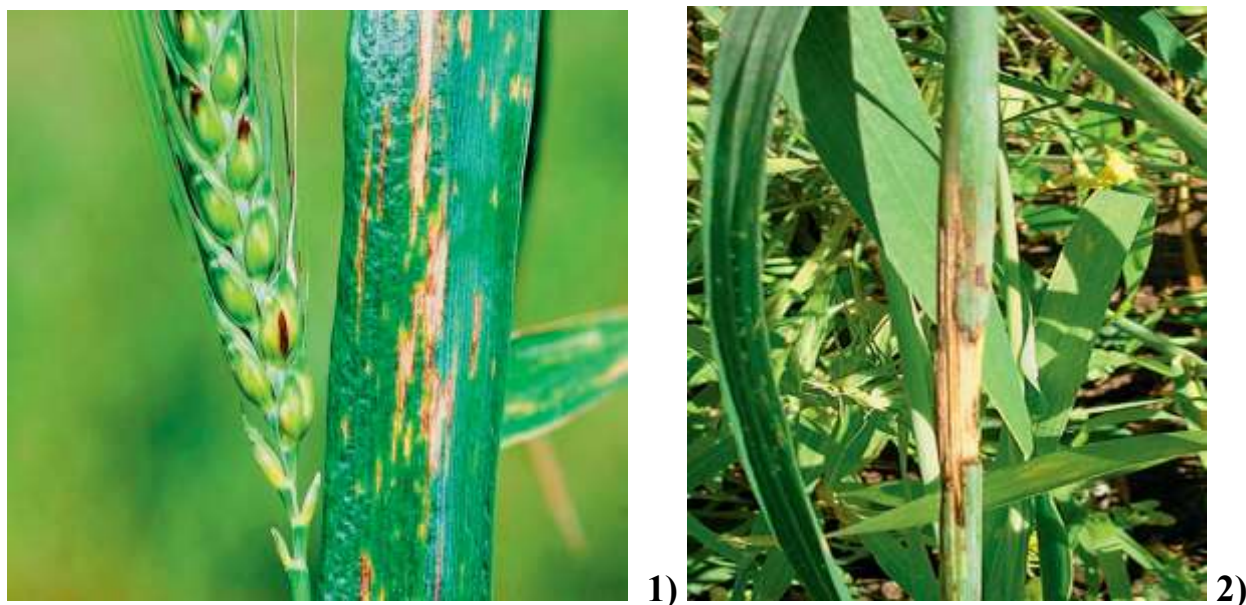


Рисунок 1.1. Чорний бактеріоз, патоген *Xanthomonas translucens* (1); Базальний бактеріоз, патоген *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (2)

За дослідженнями науковців [16] встановлено, що вивчення та визначення ураження рослин фітопатогенними бактеріями відбувається значно складніше, ніж іншими паразитами (грибами, вірусами, фітофагами). На різних фазах росту рослини, різних циклах розвитку бактеріальної популяції, у разі зміни погодних умов симптоми бактеріального ураження можуть бути схожі між собою, із ураженням грибними захворюваннями, а також нагадувати стан, зумовлений абіотичними чинниками. Тобто тільки ізоляція паразита зможеть забезпечити правильну лабораторну діагностику. Остаточне визначення бактеріальних патогенів культурних рослин можливе за поєднання методів візуального фітопатологічного обстеження і лабораторної діагностики.

З огляду літературних джерел повідомляється, що в результаті щорічного екосистемного моніторингу посівів сої у 8 областях України визначено перерозподіл акцентів серед видового складу основних і другорядних збудників

бактеріозів сої. Визначено, що до кола фітопатогенних бактеріальних збудників, які уражують сою, належать: *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Pantoea agglomerans*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Xanthomonas fuscans* pv. *fuscans*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* та *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Виявлено взаємозв'язок між поширенням основних, другорядних і нетипових бактеріальних фітопатогенів [17].

На сьогодні у різних діагностичних бактеріологічних лабораторіях використовуються наступні методи:

- 1) імуно-флуоресцентний аналіз;
- 2) імуноферментний аналіз;
- 3) ПЛР з детекцією методом електрофорезу;
- 4) флуоресцентний ПЛР з детекцією «прикінцевої крапки» FLASH ПЛР);
- 5) класичні мікробіологічні аналізи (метод поживних середовищ та біохімічні тести);
- 6) тест Уайта на недозрілих плодах (тест на патогенність);
- 7) секвенування 16S rRNA.

Спеціалісти різних фітолабораторій, фахівці науково-дослідних установ співпрацюють з європейськими колегами в напряму бактеріальних хвороб рослин, беруть участь у розробці, вдосконаленні та валідації методів діагностики, гармонізації діагностичних протоколів тощо. Активно створюються колекції виділених штамів фітопатогенів та випробовуються різні препаративні форми проти збудників бактеріозів рослин [18, 19].

Для багатьох досліджуваних рослинно-мікробних патосистем описаний такий сценарій взаємодії паразита та господаря, при якому, незважаючи на активне розмноження патогену *in planta*, виражені симптоми хвороби не розвиваються та продуктивність рослин не знижується. Встановлено, що для дикорослих видів рослин розвиток захворювання при колонізації патогеном є взагалі рідкісним винятком із правил. Це означає, що у будь-кого агресивного патогену та його рослини-господаря існують такі програми взаємодії, які

дозволяють обом партнерам спільно проходити стадії життєвого циклу, не завдаючи значної шкоди один одному. З'ясування того, як регулюються такі програми та що є причиною переходу патогенів до агресивної «поведінки», є важливим науковим завданням [4, 20].

Робиться припущення, що фітопатогенні бактерії можуть використовувати два основних типи фітотоксинів (факторів вірулентності фітопатогенів). Один із них здатний викликати швидку загибель клітин господаря (забезпечення патогена поживним субстратом, що вивільняється з мертвих клітин). Інший тип фітотоксинів, не вбиваючи клітин рослини, забезпечує кондиціонування внутрішнього середовища господаря, формуючи з нього сприятливу екологічну нішу для патогенів [21-23].

Основні діагностичні характеристики родів фітопатогенних бактерій наведені в табл. 1.2. Складність діагностики збудників бактеріозів та їх ідентифікації за набором стандартних фенотипових властивостей потребує залучення додаткових ознак, з метою встановлення їхнього таксономічного положення. Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів є ще одним важливим хемотаксономічним критерієм на рівні виду, а інколи і патовару та біовару.

Розвиток високопродуктивних методів молекулярної діагностики дозволив встановити, що різноманітність та кількість бактерій в навколишньому середовищі значно більша, ніж можна виявити з використанням класичних мікробіологічних методів [24, 25]. Завдяки потужному розвитку молекулярно-біологічних методів з'явилася можливість досліджувати видову структуру змішаних культур та асоціацій мікроорганізмів у таких складних природних середовищах, як вода та ґрунт, не виділяючи їх у чисту культуру. Молекулярно-біологічні дослідження показали, що форми, які культивуються на поживних середовищах становлять 1,0-10,0% від загальної кількості прокаріотних видів, присутніх у будь-якому окремому зразку ґрунту. На фоні невідомих видів, недостатнього вивчення пулу мікробних генів та генних продуктів функції більшості мікроорганізмів залишаються

нез'ясованими [26]. Вкрай важливим є розвиток інструментів біоінформатики, необхідних для оцінки величезної кількості інформації, що генерується на основі повногеномного, метагеномного і метатранскриптомного підходів.

Таблиця 1.2 – Диференційні ознаки деяких представників фітопатогенних бактерій [27]

Характеристики	Фітопатогенні бактерії, роди			
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Pectobacterium</i> , <i>Erwinia</i>	<i>Clavibacter</i>
Симптоми хвороб	Листова плямистість, судинний вилт, гниль	Листова плямистість, судинний вилт, рак стебла	Судинний вилт, сухі некрози, листова плямистість, гнилі	Вилт і/або листова плямистість
Забарвлення за Грамом	–	–	–	+
Рухливість	+	+	+	Варіабельно
Джгутики	Один або декілька полярних	Один полярний	Перитрихи	Полярні або бокові
Колір колоній	Білий або жовтий	Жовтий (рідко білий)	Білий або жовтий	Оранжевий, жовтий чи блакитний
Пігмент	Флуоресціюючий чи феназин, або відсутній	Зазвичай відсутній	Зазвичай відсутній, рожевий чи блакитний в деяких видів	Зазвичай відсутній
Полі-β-гидроксибутират	варіабельно	–	–	–
Оксидаза за Ковачем	Варіабельно, – (патовари <i>P.syringae</i>)	– (або слабкий +)	–	–
Метаболізм глюкози	Окисний	Окисний	Ферментативний	Слабкий окисний або інертний
Гідроліз крохмалю	Варіабельно	Варіабельно	–	Варіабельно
Редукція нітратів	–	–	+ (<i>P.carotovorum</i> і інші м'якогнилісні види) ; – (більшість інших <i>Erwinia</i> sp.)	–
3-кетолактоза	–	–	–	–
ГЦ в ДНК	58–70	63–69	50–58	65–75

Таким чином, дотримання всіх перерахованих вище прийомів в комплексі можуть сприяти в значній мірі зниженню зараженості збудниками бактеріозів, підвищенню врожайності сільськогосподарських культур і поліпшенню їх якості.

1.2. Застосування діагностичних методів на основі полімеразно-ланцюгових реакцій (ПЛР)

Застосування більш чутливих методів є актуальним та затребуваним у діагностиці фітопатогенів. В останні роки для ідентифікації та детекції фітопатогенних мікроорганізмів все частіше застосовується метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

ПЛР /Polymerase chain reaction, PCR/ – це ферментативна реакція, в результаті якої відбувається накопичення великої кількості копій не великого (найчастіше, 200-1500 пар нуклеотидів) фрагменту ДНК. Вона була розроблена американським біохіміком Кері Мюлліс і стала однією з найбільш визнаних подій у галузі молекулярної біології у 1983 році, а у 1993 році за це відкриття вчений був удостоєний Нобелівської премії в галузі хімії [29, 30].

Унікальна властивість ДНК знаходиться в її здатності подвоюватися після розплітання спіралі та розходження ниток ДНК. Подвоювання ДНК (реплікація) здійснюється (за принципом компліментарності) ензимом (ДНК-полімеразою). Для того, щоб ензим розпочав свою роботу потрібна наявність початкового дволанцюгового фрагмента ДНК. Такий фрагмент утворюється за взаємодії короткого одноланцюгового фрагмента ДНК, що зветься праймером, із комплементарною ділянкою відповідного ланцюга батьківської ДНК. Реплікація відбувається на двох нитках ДНК, але нарощуються вони в протилежних напрямках. У результаті реплікації із однієї дволанцюгової молекули ДНК утворюється дві дволанцюгові, кожна з яких містить один ланцюг від материнської молекули ДНК та другий, дочірній, — новосинтезований.

Так, цикл реплікації ДНК включає три основні стадії: 1) розплітання спіралі ДНК і розходження ланцюгів (денатурацію); 2) приєднання праймерів і 3) добудову дочірнього ланцюга ДНК. У ПЛР вказані процеси здійснюються в пробірці у циклічному режимі. Перехід від однієї стадії реакції до іншої досягається зміною температури інкубованої суміші, рис. 1.2 [29, 31].

Polymerase chain reaction - PCR

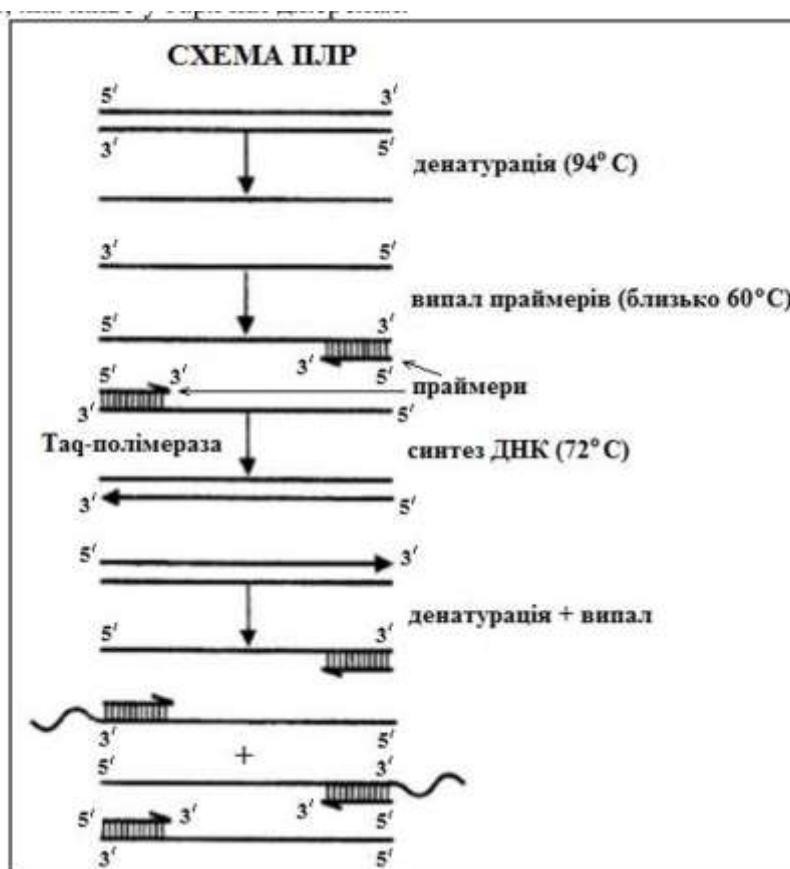
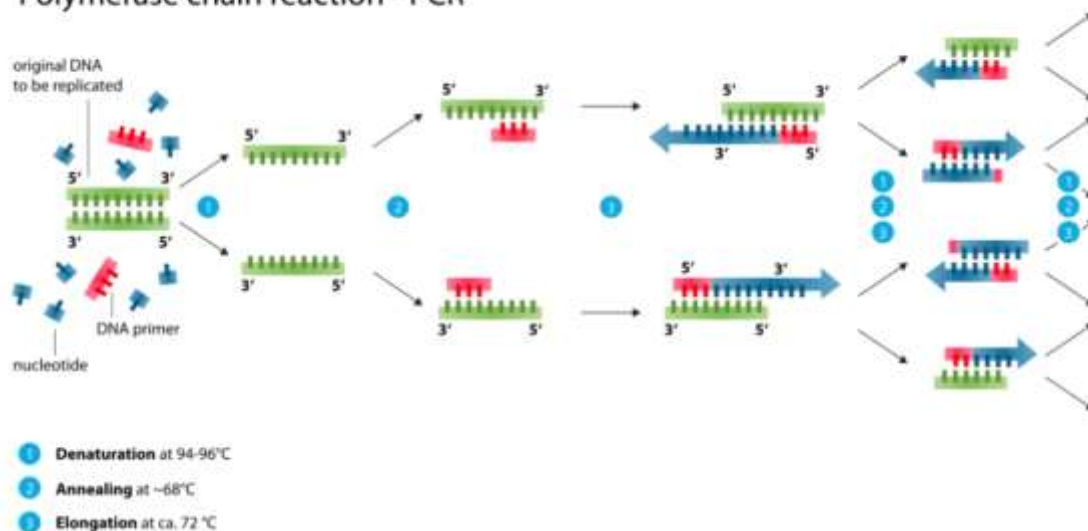


Рисунок 1.2. Схема ПЛР /Polymerase chain reaction, PCR/ [31]

Так як ДНК будь-якого організму містить як варіабельні (відмінні навіть у близькоспоріднених організмів), так і консервативні (подібні до еволюційно далеких видів) ділянки, можливо на основі вибору діагностичної ділянки варіювати специфічність реакції.

Метод ПЛР перевершує традиційні методи за специфічністю, чутливістю, швидкістю проведення аналізу, продуктивності і служить їх суттєвим доповненням. На даний момент найбільш сучасними та перспективними способами діагностики та видової ідентифікації патогенів є методи, засновані на застосуванні технологій молекулярної генетики. Загальні засади діагностики збудників інфекційних хвороб зводяться до виявлення генетичного матеріалу патогенів в тканинах господаря або зразках ґрунту, води, повітря, пилу і т.д. за допомогою специфічних реактивів та обладнання. Отже, застосування методів високоефективного тестування фітопатогенів на основі ПЛР є пріоритетним у лабораторних дослідженнях. На відміну від традиційних і серологічних методів аналізу, що дають лише опосередковані свідчення наявності інфекції (наприклад, відомості про наявність білків-антигенів діагностованих патогенів), метод ПЛР безпосередньо доводить присутність збудника інфекції, специфічно виявляючи наявність конкретної послідовності нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) патогену, що виявляється. Крім того, метод ПЛР, завдяки своїй високій чутливості, дозволяє виявляти поодинокі копії геномів патогенів, виявляючи цим їх наявність тоді, коли іншими методами (імунологічними, бактеріологічними, мікроскопічними) це зробити практично неможливо [15, 24].

Позитивними характеристиками методу ПЛР є можливість здійснювати кількісне визначення збудника за модифікаціями (метод ПЛР у реальному часі). Висока чутливість ПЛР є як перевагою, так і недоліком методу, створюючи низку проблем, однією з яких є висока ймовірність появи хибнопозитивних і хибнонегативних даних. Крім того, коректність проведених ПЛР-тестів значною мірою залежить від адекватності методів виділення нуклеїнових кислот із рослинного матеріалу; чутливість детекції залежить від впливу присутніх у рослинному матеріалі інгібіторів ПЛР.

Отже, є питання, які необхідно вирішувати при проведенні процедури ПЛР-детекції, наприклад, постановка додаткових контрольних тестів чи використання модифікацій методу ПЛР. При молекулярній діагностиці

фітопатогенних організмів (грибів, вірусів та бактерій) застосовують такі модифікації ПЛР:

- ✓ метод конкурентної ПЛР;
- ✓ кооперативної ПЛР (Co-PCR);
- ✓ ПЛР-гібридизація *in situ* з використанням флуоресцентних зондів;
- ✓ метод мультиплексної ПЛР;
- ✓ метод множинної (або групової) мультиплексної ПЛР (multiplex nested RT-PCR);
- ✓ метод ПЛР в реальному часі (real-time PCR).

Існуючі способи діагностики фітопатогенів постійно вдосконалюються, з'являються нові методи [28]. Таким чином, удосконалення методів секвенування та створення електронних баз даних, що зберігають інформацію про структуру геномів різних фітопатогенів дає можливість (при розробці видоспецифічних праймерів) найбільш повно враховувати та використовувати варіабельність аналізованих послідовностей нуклеотидів. Це забезпечує високу специфічність діагностичних систем, які розробляються на їх основі.

Процедура молекулярної діагностики складається з наступних стадій:

- виділення сумарної ДНК з інфікованих рослин;
- ампліфікація локусів бактеріальної ДНК методом ПЛР;
- секвенування (розшифрування структури ампліфікованих локусів);
- ідентифікація (порівняльний аналіз у базі).

З метою отримання передбаченого продукту необхідно підібрати оптимальні умови проведення ПЛР (кількість циклів, температура випалу, тривалість випалу, тривалість синтезу тощо) та оптимальний склад реакційної суміші (концентрації компонентів). Вимоги до організації праці в ПЛР лабораторіях узагальнені і сформульовані у нормативних документах і методичних вказівках. Правильна організація ПЛР-лабораторії має принципове значення для отримання вірогідних результатів і суттєво залежить від методу детекції продуктів ампліфікації [31, 32].

На сьогодні використання методу полімеразної ланцюгової реакції у комплексі з імунохімічними, цитологічними, біохімічними, мікробіологічними та іншими методами досліджень доповнить характеристику біоматеріалу.

1.3. Основні характеристики експрес діагностики фітопатогенних бактерій в агроекосистемах

Для виявлення фітопатогенів необхідна розробка та оптимізація для практичного використання високочутливих лабораторних методів. Дані методи мають дозволяти ефективно контролювати збудників бактеріозу на ранніх та наступних стадіях насінництва, забезпечувати виробництво високоякісним насінневим матеріалом. Сучасна бактеріологічна експертиза включає дослідження рослинного матеріалу з метою встановлення його фітосанітарного стану, ідентифікації збудників регульованих та інших бактеріальних хвороб рослин. Для проведення бактеріологічної експертизи використовуються анатомічний, макроскопічний, біологічний, люмінесцентний, імунофлюоресцентний (ІФ), імуноферментний аналізи (ІФА), полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) методи.

Застосування імуноферментного аналізу (ІФА) та імунохроматографічних тест-систем у схемах контролю якості рослинної продукції дозволяє ефективно виявляти зараженість тестованого матеріалу прихованою формою найбільш шкідливих бактеріальних хвороб [6, 15]. Водночас у збудників бактеріозів рослин можуть виявлятися великі штамові відмінності у складі верхніх клітинних антигенів, що ускладнює їх ідентифікацію та кількісне визначення імунологічними методами.

ІФ-аналіз рекомендується використовувати як перший відбірний тест. В основі методу лежить специфічна реакція «антиген-антитіло». Проводять його зі свіжоприготовленим екстрактом, який фіксують на предметному склі. У ході досліджень використовують моноклональні або поліклональні антитіла.

Межею надійного виявлення методом імунофлуоресцентного аналізу вважають концентрацію клітин 10^3 кл./мл (порог чутливості), для зразків з більшою концентрацією результат аналізу вважається позитивним. Для зразків з концентрацією менше 10^3 кл./мл або зі слабо флуоресціюючими клітинами результат імунофлуоресцентного аналізу можна вважати невизначеним [15].

Імуноферментний аналіз заснований на специфічному зв'язуванні антитіла з антигеном, при цьому один з компонентів кон'югованих з ферментом, в результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворюється забарвлений продукт. За допомогою рідера або імуноферментного аналізатора спектрофотометрично визначається шукане в матеріалі з'єднання або речовина.

Постійне технічне вдосконалення методики призвело до появи можливості іммобілізації антигену і антитіла на різних носіях із збереженням їх зв'язуючої активності. У сучасних імуноферментних наборах широко використовують моноклональні антитіла. Надзвичайно широке коло завдань, що стоять перед дослідниками з розробки нових тест-систем для визначення біологічно активних речовин (БАР) послужило подальшому розвитку методу, підвищенню його чутливості і специфічності.

Теоретична основа імуноферментного аналізу сформована на даних сучасної імунохімії та хімічної ензимології, знаннях фізико-хімічних закономірностей реакції антиген-антитіло, а також на головних принципах аналітичної хімії. Чутливість методу ІФА і час проведення методики визначається кінетичними і термодинамічними характеристиками реакції антиген-антитіло, співвідношенням реагентів, активністю ферменту і роздільною здатністю методу його детекції.

Універсальність ІФА полягає в тому, що його можна застосовувати в основному як скринінговий експрес-метод, він дозволяє оперативно виявити наявність патогенів і варіювати великою кількістю зразків. До цього слід додати легкість виконання робіт (забезпечується завдяки стандартизованому

протоколу дослідження та не потребує високої кваліфікації персоналу). Позитивні переваги даного експрес-аналізу полягають у відносно невеликому бюджеті технічного рішення (враховуючи точність і межі чутливості методу).

При проведенні ІФА для попередження нелабораторних помилок необхідно:

- дотримання умов збору та підготовки проб;
- дотримання умов зберігання проб;
- дотримання умов транспортування та зберігання тест-систем;
- проведення вхідного контролю тест-систем: визначення якості тест-систем (чутливість, специфічність, відтворюваність за допомогою контрольних матеріалів);
- попередження перехресних реакцій.

При проведенні ІФА для попередження внутрішньолабораторних помилок необхідно виконання наступних заходів [41, 42]:

- дотримуватися правил безпеки в діагностичній лабораторії;
- оформляти відповідну документацію;
- здійснювати контроль за дотриманням або виконанням інструкції із застосування тест-системи, вкладеної безпосередньо в комплект до використовуваного набору реагентів;
- виключити помилки при підготовці тест-систем і проб до аналізу, а саме: не змішувати реагенти різних серій, контролювати якість і чистоту лабораторного посуду, наконечників мікропіпеток і дозаторів, контролювати температуру реагентів, виключити помилки на етапі обліку результатів;
- контроль роботи обладнання;
- оцінка якості роботи лаборантів.

Для прискорення проведення рутинних мікробіологічних аналізів використовують також біохімічні тест-системи API 20 NE (Biomérieux) або НЕФЕРМтест 24 (Erba Lachema) за інструкцією виробника.

LORAT-тест ґрунтується на визначенні 5-ти ознак: L – здатності до утворення левану; O – наявності оксидази; P – здатності мацерувати рослинні тканини; A – наявності аргініндегідролази; T – індукції реакції надчутливості в листках тютюну. Наприклад, бактерії виду *P. syringae* продукують леван на середовищі з сахарозою, оксидазонегативні, не продукують пектатліазу й аргініндегідролазу та спричинюють реакцію надчутливості на листках тютюну (LORAT +- - - +) [33]. Для поділу фітопатогенних бактерій на групи запропоновано систему за п'ятьма основними біохімічними тестами LORAT-тесту (табл. 1.3).

Таблиця 1.3 – Приклад LORAT-тесту для ідентифікації фітопатогенних бактерій [15]

Група	Біохімічні тести					Представники
	L	O	P	A	T	
I	+	-	-	-	+	Патогари <i>P. syringae</i> , <i>P. savastanoi</i>
II	-	-	+	-	+	<i>P. viridiflava</i>
III	-	+	-	-	+	<i>P. cichorii</i> і <i>P. agarici</i>
IV	+	+	+	+	-	Патогари <i>P. marginalis</i>
V	-	+	-	+	-	<i>P. talaasii</i>

На даний час пропонуються різні тест-системи, зокрема API набори фірми Biomerieux, MIKRO-LA TEST® фірми Erba Lachema (для ідентифікації різних фізіологічних груп бактерій). Так, API 20 NE (Biomerieux) або НЕФЕРМтест 24 (Erba Lachema) – для неферментуючих грамнегативних бактерій, а API 20 E (Biomerieux) або ЭНТЕРО-Рапид 24 (Erba Lachema) – для факультативно анаеробних грамнегативних бактерій. На підставі отриманих даних за допомогою комерційних тест-систем для ідентифікації бактерій є можливість достатньо швидко ідентифікувати збудників бактеріальних хвороб рослин родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*.

Серологічні методи визначення включають у себе метод імунофлюоресценції (IF), непрямого імунофлюоресцентного фарбування

колоній (IFC) та імуномагнітну сепарацію (IMS). Для імунофлуоресцентного (IF) аналізу певні бактеріальні клітини прикріплюються до скла мікроскопу через нагрівання або фіксацією спиртом. Флуорофор-кон'юговані антитіла зв'язуються з зовнішньою клітинною стінкою і флуоресцентні клітини візуалізуються з використанням епіфлуоресцентної мікроскопії [43].

Повногеномне секвенування ДНК ізолятів бактеріальних патогенів відкрило нові можливості для молекулярної діагностики збудників хвороб. Використання методу ПЛР крім виявлення мінімальних кількостей патогенів дозволяє проводити видову ідентифікацію бактерій. За підібраними специфічними праймерами досліджують поширення видового складу мікроорганізмів в агроценозах. Також для дослідження генотипових властивостей зі специфічними праймерами використовують: AFLP-ПЛР (Amplified fragment length polymorphism), ISSR-ПЛР (Inter Simple Sequence Repeats), REP-ПЛР (Repetitive element PCR fingerprinting).

Відомо про специфічну експрес-діагностику на основі плазмидної ДНК. Популярні плазмиди, які використовують для ідентифікації фітопатогенних бактерій є Ti плазіда *Agrobacterium tumefaciens* та рEA29 *Erwinia amylovora*.

Повідомляється, що на основі висококонсервативних нуклеотидних послідовностей геномів деяких мікроорганізмів (*A. tumefaciens*, *S. michiganensis*, *P. carotovorum*, *P. syringae*), що кодують фактори патогенності та вірулентності, можна розробити праймери для детекції та ідентифікації даних видів бактерій – збудників хвороб овочевих культур, успішно підтвердити високу специфічність та чутливість ПЛР з обраними праймерами. Існує можливість використання видоспецифічних праймерів у форматі стандартної та мультиплексної ПЛР [34-36].

Багато компаній розробили діагностичні набори для діагностики ряду карантинних фітопатогенів методом ПЛР із флуоресцентною детекцією результатів (FLASH-ПЛР, ПЛР у реальному часі). Застосування таких діагностичних наборів дозволяє впродовж декількох годин одержати надійні,

швидкі й достовірні результати, що дозволяють проводити перевірку продукції на наявність регульованих шкідливих організмів. Метод ПЛР є лідером серед сучасних технологій дослідження продуктів рослинного походження на наявність або відсутність патогенів.

Набувають розвитку неінвазивні методи діагностики хвороб рослин з використанням сенсорних технологій, робототехніки, комп'ютерного зору та машинного навчання. Вони мають високу продуктивність, дозволяють отримувати дані в режимі реального часу та аналізувати інформацію про цілий спектр фізіологічних параметрів. Нові цифрові технології включають аналіз зображень у різних областях спектру. Реєстрація зображень здійснюється за допомогою таких оптичних сенсорів, як гіперспектральні, термальні та RGB-камери, сенсори флуоресценції, томографи. Гіперспектральний аналіз поєднує в собі методи оптичної спектроскопії та методи аналізу зображень, дозволяючи одночасно оцінювати як фізіологічні, так і морфологічні параметри [37-40].

Отже, аналіз спектру відображення рослинної тканини дозволяє проводити класифікацію здорових та хворих рослин, оцінювати тяжкість захворювання, диференціювати види патогенів та виявляти симптоми біотичних стресів на ранніх стадіях. У зв'язку з великим обсягом інформації найбільш перспективними методами для обробки гіперспектральних даних є машинне навчання та нейронні мережі. З розвитком сенсорних технологій та методів аналізу даних очікується, що сучасна спектральна візуалізація стане одним із важливих інструментів для вивчення хвороб рослин.

Таким чином, комплексне використання мікробіологічних, серологічних та молекулярно-біологічних діагностик фітопатогенів створює перспективи для розробки і реалізації в практиці контролю за бактеріальними хворобами рослин принципово нових технологічних рішень, особливо у частині досліджень поширення збудників і попередження розвитку епіфітотій.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Науково-дослідна робота щодо вивчення особливостей діагностичних методів дослідження збудників бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур у лабораторних умовах виконана на кафедрі фітопатології імені академіка В.Ф. Пересипкіна Національного університету біоресурсів і природокористування України.

У модельних дослідженнях використано перспективний напрям діагностики фітопатогенних бактерій на основі молекулярно-біологічних методів досліджень, а саме використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка сприяє проведенню швидкої та достовірної ідентифікації патогенів в рослинному матеріалі. Допоміжна база – відділ фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного Національної академії наук України.

Методи, засновані на ПЛР, дозволяють ідентифікувати патогенні види мікроорганізмів, як у чистій культурі, так і безпосередньо в рослинному матеріалі, минаючи етап ізоляції. У роботі було використано ізоляти бактерій, виділені з агроценозів овочевих та зернових культур (огірок, посіви пшениці озимої) з роду *Xanthomonas* spp. (Хан 01, Хан 06), наданих із робочої колекції непатогенних мікроорганізмів сільськогосподарського призначення від академіка НААН Миколи Патики, а також типовий штам бактерій *Xanthomonas* spp. 7696.

Відомо, що бактерії *Xanthomonas* spp. по відношенню до рослин-господарів поділяють на різні патовари, які можуть бути серйозною загрозою для виробництва зернових культур. Наприклад, вид *Xanthomonas translucens*:

X. translucens pv. *translucens*, збудник чорного бактеріозу ячменю, вражає, крім ячменю, пшеницу та жито, а також лугові злакові трави;

X. translucens pv. *graminis*, збудник бактеріального в'янення зернових культур, що вражає злаки, включаючи пшеницу, жито та ячмінь;

X. translucens pv. *cerealis*, збудник чорного бактеріозу жита, вражає пшеницю, жито, ячмінь та овес;

X. translucens pv. *undulosa*, збудник чорного бактеріозу пшениці, вражає пшеницю та ячмінь [44, 45].

У цьому зв'язку актуальні дослідження щодо лабораторної діагностики та удосконалення методичного забезпечення процесу ідентифікації фітопатогенних бактерій (у тому числі *X. translucens*), оскільки методи за класичними мікробіологічними аналізами не дають повної характеристики та достовірності зі специфічної ідентифікації до видової патоваріації, а геномний аналіз вимагає фаховості від спеціалістів, спеціального обладнання та навичок.

Для проведення ПЛР необхідно:

1) два синтетичних олігонуклеотидних праймери (довжиною приблизно по 20 нуклеотидів), які комплементарні до ділянок ДНК із протилежних ланцюгів, що фланкують послідовність – мішень (праймери обмежують фрагмент ДНК, який буде мільйони разів скопійований ензимом Таq-ДНК-полімеразою, що приєднується до 3'-кінців праймерів для добудови їх заданої довжини (в декілька сотень пар основ);

2) ДНК-мішень;

3) термостабільну ДНК-полімеразу, яка не втрачає активності при температурі 95⁰С;

4) чотири дезоксирибонуклеотиди;

5) буферну систему для ефективної роботи ДНК-полімерази, що обов'язково містить іони магнію.

Основними етапами проведення діагностичних тестів за ПЛР були наступні три:

1) підготовка проби біоматеріалу, тобто виділення ДНК;

2) власне полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР-ампліфікація);

3) детекція продукту ПЛР (ампліфікованої нуклеїнової кислоти).

2.1. Об'єкт та предмет дослідження

Об'єкт досліджень – чутливість, стабільність та поріг виявлення ДНК збудників бактеріальних хвороб рослин при ПЛР-діагностиці.

Предмет досліджень – оцінка ефективності використання молекулярно-біологічних методів для ідентифікації ізолятів бактеріальних культур-фітопатогенів; підтверджуюче тестування щодо виявлення «позитивних» результатів.

Пробопідготовку (виділення ДНК із ізолятів Хан 01, Хан 06) проводили набором реагентів для виділення нуклеїнових кислот, який рекомендовано для лізису клітин (агент гуанідину тіоцианату GuSCN), та з наступною сорбцією ДНК на носії [15, 29].

Отриманий розчин ДНК зберігали протягом тижня за температури 2-8⁰С або відразу ж використовувати у дослідженнях. Виділену ДНК також зберігали у морозильній камері за температури -20⁰С.

Для виділення ДНК використовували 20 годинну культуру фітопатогенних бактерій *Xanthomonas* spp., вирощених на поживному середовищі Лурія Бертані (LB) за температури 28-30⁰С в умовах ресуспендування (160 об./хв) [15, 32].

Стадії проходження ПЛР включають цикли ампліфікації, які складаються із: 1 – денатурації (розплетення подвійного ланцюга ДНК, що знаходиться в зразку), 2 – відпалі (приєднання праймерів до одноланцюгової ДНК – мішені), 3 – елонгації (синтез 2-ой ланцюга ДНК з максимальною ефективністю).

I) Денатурація зразка ДНК шляхом витримування його при температурі 94-95⁰С. Крім ДНК, у реакційній суміші мають бути в надлишку два праймери, термостабільна ДНК-полімераза Таq (виділена із *Thermus aquaticus*) і чотири дезоксирибонуклеотиди.

II) Ренатурація ДНК, яка відбувається за зниженої температури 50-60⁰С. За ренатурації відбувається відпал праймерів, а саме вони гібридизуються з комплементарними послідовностями ДНК (розпавленої ДНК-матриці) з

утворенням коротких дволанцюгових ДНК-фрагментів, які необхідні для початку роботи ензиму полімерази. Кожен із праймерів гібридується на одному з двох ланцюгів ДНК-матриці таким чином, щоб кінці праймерів, які здатні видовжуватися були спрямовані назустріч один одному. Приєднавшись до протилежних ланцюгів молекули ДНК, праймери обмежують собою ту її ділянку, яка в подальшому буде багатократно подвоєна (ампліфікована). Довжина такого фрагменту, що називається ампліконом, зазвичай складає декілька сотень нуклеотидів.

III) Синтез фрагмента комплементарного дочірнього ланцюга ДНК (за 70-72°C, тобто оптимальної температури для активності ДНК-полімерази Taq). У якості будівельного матеріалу використовують чотири дезоксинуклеотидтрифосфати, що знаходяться в суміші. Синтез фрагментів дочірніх ланцюгів ДНК відбувається одночасно на обох ланцюгах материнської ДНК. Далі цикл повторюється знову.

Таким чином, нові створені фрагменти виступають матрицями для синтезу нових ланцюгів ДНК у наступному циклі ампліфікації, тобто відбувається ланцюгова реакція.

В цілому, кількість копій фрагмента збільшується в геометричній прогресії та відбувається накопичення ампліконів у розчині за формулою:

$$2 \times n, \text{ де}$$

n – кількість циклів ампліфікації.

Для синтезу праймерів, які є специфічними до певної ДНК-мішені, потрібно знати нуклеотидну послідовність ДНК відповідного патогенного мікроорганізму. Основним критерієм підбору праймерів є комплементарність матриці. У цьому випадку в ході ПЛР буде ампліфікуватися тільки специфічна ділянка ДНК, довжина якої рівна сумарній довжині двох праймерів і фрагмента ДНК між ними.

Підбір оптимальної температури, відпал праймерів на матриці – це важливий фактор при дослідженні, який впливає на ефективність і специфічність ампліфікації.

Для проведення ампліфікації підготували наступні компоненти:

- ДНК-матеріал (матриця, зразок, що аналізується) – підготовлений до внесення в реакційну суміш препарат, який може містити дослідну ДНК мікроорганізмів, що служить мішенню для наступного багаторазового копіювання. За відсутності ДНК – мішені специфічний продукт ампліфікації не утворюється;
- праймери – штучно синтезовані олігонуклеотиди, які мають розмір від 15 до 30 п. н., ідентичні відповідним ділянкам ДНК-мішені. Вони відіграють ключову роль в утворенні продуктів реакції ампліфікації та забезпечують специфічність та чутливість тест – системи. Праймери комплементарні ділянкам ДНК, між якими знаходиться послідовність-мішень. Праймер є обов'язковим компонентом, необхідним для роботи ДНК-полімерази. Праймер до 5'-кінця гена називають прямим (forward, For), до 3'-кінця гена – зворотним або зустрічним (reverse, Rev). У базах даних нуклеотидних послідовностей наведено лише один ланцюг ДНК – це те, що транскрибується у вигляді мРНК. По ній підбирають прямий праймер, тобто. той праймер, від якого зростатиме саме цей ланцюг. Зворотний праймер підбирають для комплементарного ланцюга, але також у напрямку 5'→3'.
- суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ) – дезоксигуанозитрифосфату (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфату (дЦТФ) та дезокситімінтрифосфату (дТТФ) – «будівельний матеріал», використовуваний Taq – полімеразою для синтезу другого ланцюга ДНК;
- фермент Taq-полімераза – термостабільний фермент, забезпечує добудову 3'-кінця другого ланцюга ДНК згідно з принципом комплементарності.
- буферний розчин (суміш катіонів і аніонів у певній концентрації, що забезпечують оптимальну умову реакції, а також стабільне значення рН (реакційне середовище), містить іони Mg^{2+} для підтримки активності ферменту. Для отримання достатньої кількості копій цільового фрагменту ДНК ампліфікація включає декілька (20-40) циклів.

Основні принципи підбору праймерів:

1. Праймери мають бути специфічні. Якщо їхня специфічність недостатня, то, ймовірно, що у пробірці з реакційною сумішшю будуть відбуватися небажані процеси, а саме синтез неспецифічної ДНК. Частина праймерів витрачається на синтез неспецифічної ДНК, що призводить до значної втрати чутливості.

2. Праймери не повинні утворювати димери та петлі, тобто не має утворюватися стійких подвійних ланцюгів внаслідок відпалу праймерів самих на себе чи один з одним.

3. Область відпалу праймерів повинна знаходитися поза зонами мутацій, делецій або інсерцій у межах видової чи іншої, взятої як критерій під час виборів праймерів, специфічності.

В результаті проведення ПЛР можна кваліфікувати дані як позитивні або негативні (залежно від того, виявлена в зразку послідовність-мішень, що цікавить нас, чи ні). Однак порушення нормального перебігу ампліфікації, недостатня чутливість методу та непередбачуваний поліморфізм послідовності-мішені в області зв'язування праймерів може дати помилково-негативний результат. У разі забруднення зразків виходять хибнопозитивні результати. Можуть бути проблеми, що виникають у зв'язку з перехресними реакціями за участю праймерів та можливим поліморфізмом.

Важливу увагу приділяли етапу щодо правильної інтерпретації результатів та вибору контролів. Позитивні та негативні контролі мають бути добре охарактеризовані. У кожному аналізі потрібні щонайменше три контролі: позитивний контроль; негативний контроль; бланк-контроль (реакційна суміш, в якій присутні всі компоненти, крім ДНК; він індикатор забруднень). Отже, один тип позитивного контролю повинен містити максимальну кількість послідовностей-мішеней, інший – невелике число. Це дозволяє визначити чутливість та ефективність ПЛР.

2.2. Методи проведення дослідження

Для реалізації визначених завдань застосовані загальні методи наукового дослідження: емпіричні, комплексні та теоретичні.

Використано методи порівняльного та системного аналізу для зіставлення різних поглядів на досліджувану проблему, визначення понятійно-категоріального апарату дослідження, ознайомлення з літературними джерелами, а також обґрунтування теоретико-методичних підходів щодо вивчення особливостей діагностичних методів дослідження збудників бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур у лабораторних умовах.

Використано методи спостереження, вимірювання, розрахунку та експерименту, зокрема у частині постановки полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР).

В лабораторних умовах проведено ПЛР за наступним протоколом: реакцію ампліфікації проводили в об'ємі 25 мкл, що містила 20 – 30 нг ДНК, 1× ПЛР буфер, 1 мкМ праймер 1, 1 мкМ праймер 2, 0,2 мМ кожного дНТФ, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,25 ОА JumpStart™ TaqDNA Polymerase (Sigma, США).

ПЛР проводили на ампліфікаторі Gene Amp PCR System 2400 за програмою: первинна денатурація – 5 хв. за 95°C; 30 циклів, що включали 30 с за 95°C для денатурації, 30 с за 59 – 60°C для гібридизації праймерів, 45 с за 72°C для елонгації; кінцева елонгація 7 хв. за 72°C. Повторність експерименту дворазова.

Продукти ПЛР аналізували в 1,5% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію (0,5 мкг/мл). Даний метод електрофорезу заснований на розподілі молекул ДНК за розміром. Для цього готували пластину агарозного гелю (це застигла після розплавлення в електрофорезному буфері агароза в концентрації 1,5-2,0% з додаванням спеціального барвника ДНК (бромистого етидію). Застигла агароза утворює просторову решітку. При заливанні за допомогою гребінок у гелі формують спеціальні лунки, які в подальшому вносять продукти ампліфікації.

Пластину гелю поміщали в апарат для горизонтального гел'єлектрофорезу та підключали джерело постійної напруги. Негативно заряджена ДНК починала рухатися в гелі від мінусу до плюсу. При цьому короткі молекули ДНК рухаються швидше, ніж довгі.

Як відомо, на швидкість руху ДНК у гелі впливає концентрація агарози, напруженість електричного поля, температура, склад електрофорезного буферу і меншою мірою ГЦ-склад ДНК. Усі молекули одного розміру рухаються з однаковою швидкістю. Барвник вбудовується (інтеркалює) площинними групами в молекули ДНК. Після закінчення електрофорезу, що триває від 10 хв. до 1 години, гель поміщають на фільтр трансільюмінатора, що випромінює світло в ультрафіолетовому діапазоні (254, 310 нм). Енергія ультрафіолету, що поглинається ДНК в області 260 нм, передається на барвник, змушуючи його флуоресціювати в оранжево-червоній ділянці видимого спектру (590 нм).

У процесі візуалізації результатів за електрофорезом здійснювали експозицію у 30 хв. за напруги 100 В. Розміри продуктів ампліфікації визначали із залученням маркерів з молекулярною масою GeneRuler 100 bp DNA Ladder та GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, рис. 2.1.

Специфічні праймери для постановки ПЛР обрано для збудника чорної бактеріальної плямистості *X. vesicatoria* – RST2 та RST3 згідно рекомендацій [15] (табл. 2.1).

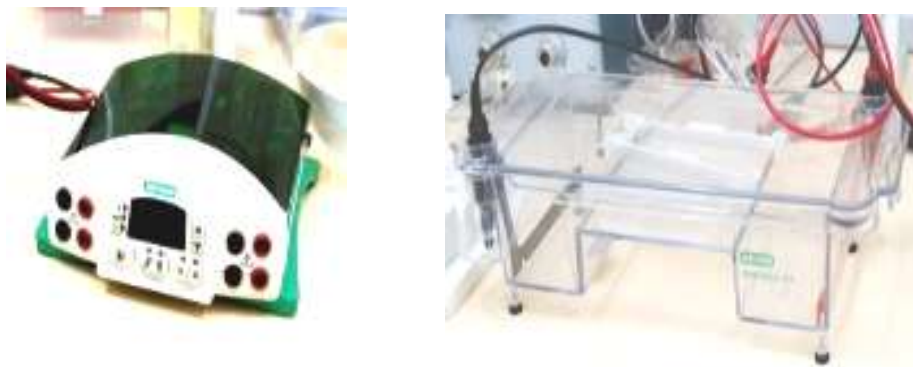


Рисунок 2.1. Обладнання для електрофорезу: джерело живлення та електрофоретична камера Mini-SubCell GT System, США, BioRad

Таблиця 2.1 – Основна характеристика специфічного праймеру до геномних ділянок збудника *Xanthomonas* spp. (на прикладі *X. vesicatoria* – чорної бактеріальної плямистості)

Родова приналежність фітопатогену / вид	Праймер / ген інтересу	Характеристика послідовності	Температура відпалу, °C	GC склад, %
<i>Xanthomonas</i> spp. / <i>X. vesicatoria</i>	RST2 RST3 / <i>hrpB</i> ділянка гена	RST2: AGGCCCTGGAAGG TGCCCTGGA RST3: ATCGCACTGCGTA CCGCGCGCG	62	RST2 68% RST3 73%

Потенційно висока чутливість ПЛР робить необхідним особливо ретельну організацію та роботу у ПЛР-лабораторії. Це пов'язано з найбільш гострою проблемою методу – контамінацією.

Для мінімізації прояву та недопущення контамінації кожен експеримент супроводжувати негативним контролем. Як негативний контроль використовували воду з кімнати пробопідготовки, а усі реактиви зберігали розлитими на окремі порції (аліквоти).

Ізоляти бактерій *Xanthomonas* spp. (Хан 01, Хан 06) вирощували впродовж 24-48 годин на ротаційній качалці (100 об./хв., 28°C) на загальноприйнятому поживному середовищі LB.

Штам *Xanthomonas campestris* 0720 використовували як позитивний контроль. Вода – негативний контроль. Відомо, що *Xanthomonas campestris* – бактеріальний збудник, який викликає різноманітні захворювання у багатьох сільськогосподарсько цінних культур. *X. campestris* – збудник чорної гнилі представників родини *Brassicaceae*, є найпоширенішим фітопатогеном рослин цієї родини у всьому світі [50]. Бактерія може переноситься з насінням, проникати в рослини крізь продихи та гідатоди і поширюватися в мезофілі

листіків. Крім того, *X. campestris* може поширюватися через молоді сіянці. Почорніння жилок листків або стебла, в тому числі крайовий хлороз листків і характерний V-подібний некроз, є типовою ознакою проявів чорної гнилі. Ураження рослин чорною гниллю, особливо у регіонах з високою вологістю й температурою, можуть призвести до значних втрат у плодово-овочевому виробництві.

Загальний протокол приготування розчинів для молекулярно-біологічного аналізу:

1. ПЛР-буфер (200мМ Tris-HCl, pH 8,4; 500мМ KCl; 0,01% Tween 20) – 2 мкл;
2. 2 мМ dNTP міх (суміш із усіх 4-х дезоксирибонуклеозидтрифосфатів с концентрацією по 2 мМ кожного) – 2 мкл;
3. 25мМ розчин MgCl₂ – 2 мкл;
4. Праймер For: 2 мкл;
5. Праймер Rev: 2 мкл;
6. ДНК-мішень: загальна ДНК *Xanthomonas* spp. (40 нг/мкл) – 3 мкл;
7. Вода деіонізована – 6,8 мкл;
8. Taq-полімераза – 0,2 мкл.

У стерильній пластиковій тонкостінній пробірці на 0,5 (0,2) мл змішували зазначені вище компоненти, доводили об'єм за допомогою деіонізованої води до 20 мкл. Фермент (Taq-полімераза) додавали останнім.

Проводили центрифугування упродовж 15 с. Наносили поверх реакційної суміші небагато мінеральної олії для запобігання випаровування (30 мкл піпеткою або краплею). Якщо ДНК-ампліфікатор має кришку, що нагрівається, то масло додавати не потрібно. Поміщали пробірки ДНК в ампліфікатор. Запускали режим ПЛР.

Проведення електрофоретичного аналізу: на даному етапі проводиться розподіл суміші продуктів ампліфікації методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі. Аналіз продуктів ПЛР методом електрофорезу в агарозному гелі. Електрофорез проводитиме в

електрофоретичній камері. Продукти ПЛР розділяють електрофорезом у 1,5-2,0% агарозному гелі в трис-ацетатному буфері (40 мМ трис(гідроксиметил)амінометану, 20 мМ крижаної оцтової кислоти та 1 мМ EDTA) при постійній напрузі 10 В/см. При розподілі фрагментів ДНК електрофорез проводять при напрузі 120 В протягом 1 години – 1 годину 30 хв. Для визначення молекулярної ваги ампліфікованих фрагментів використовували маркер ДНК 100-1000 п.н. з кроком 100 п.н. GeneRuler («Fermentas», Литва).

Заливка агарозного гелю: зважити необхідну кількість агарози (1,5-2,0%), долити буфер до потрібного об'єму, агарозу довести до кипіння, кип'ятити 30-60 хв. (виймати з мікрохвильової печі обережно, оскільки може різко скипіти), охолодити до 50-60; «пролити» спейсери, дати агарозі застигнути до 1 хв., залити плашки, дати агарозі застигнути протягом півгодини (гребінку не виймати).

Візуалізація продуктів електрофорезу проводиться забарвленням гелевих пластин у розчині бромистого етидію. Гелева пластина поміщається в розчин бромистого етидію (0,5 мкг/мл) і витримувалася в фарбнику протягом 15 хв. Потім гель виймався і промивався в дистильованій воді видалення залишків барвника. Для візуального спостереження гель містився в УФ-транслюмінатор. Фотодокументування продуктів електрофорезу досягалося за рахунок відеосканування в УФ-світлі спеціальною системою Image Master (фірма Amersham Pharmacia Biotech). Розрахунок розмірів зон, що виявляються, здійснюється за допомогою програмного забезпечення Quantity One (фірма «Biorad»). Аналіз розмірів ампліконів, одержуваних під час ПЛР-діагностики, проводиться за допомогою різних програм (програмне забезпечення системи Bio-Rad Gel-Doc, Gene Mapper). Обробка даних у програмах Microsoft Office Excel і StatSoft STATISTICA за загальноприйнятими методиками [46].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження ізолятів з роду *Xanthomonas* spp. за методом ПЛР

На сьогоднішній день існує понад 50 протоколів визначення бактерій роду *Xanthomonas*, заснованих на методах класичної ПЛР, ПЛР-РЧ. Усі системи детекції на основі ПЛР здатні розрізняти організми на наступних рівнях: рід, вид, патоваріант та штам. Варіабельність цільового гена є основою для його вибору. З опублікованих даних з'ясовано, що використання тест-систем на основі послідовностей гена *gyrB* дозволило ідентифікувати такі види, як *X. fragariae*, *X. oryzae*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. translucens*, *X. axonopodis*, *X. citri* та інші [47]. Для виявлення різних патоваріантів *X. campestris* і деяких інших видів роду *Xanthomonas* використовуються гени T3SS, для детекції *X. arboricola* розроблені тест-системи на різні ділянки *hrp* генів [48, 49].

У результаті проведених ПЛР аналізів для ізолятів бактерій *Xanthomonas* spp. (Хан 01, Хан 06) виявлена наявність продуктів ампліфікації, розмір яких відповідав очікуваному для штаму *Xanthomonas campestris* 0720 (позитивний контроль, К+).

За наявності будь-якого продукту ампліфікації, розмір якого відрізнявся від контролю, фіксували приблизну довжину отриманого фрагменту. Результат ПЛР вважали негативним (-) / negative (-) при відсутності будь-якого продукту ампліфікації, включаючи неспецифічні продукти реакції та дімери. Результат ПЛР вважали недостовірним (н/д) / unreliable (n/a) за наявності неспецифічних продуктів реакції. За наявності ПЛР-продукту лише однієї довжини у таблицю даних заносили відомості про розмір продукту.

Отже, у ході проведення аналізів зафіксовано утворення продуктів очікуваної довжини при використанні як матриці ДНК штаму *X. campestris* 0720. Для видової ідентифікації бактерій *Xanthomonas* показана можливість застосування обраного праймеру (RST2 RST3), рис. 3.1.

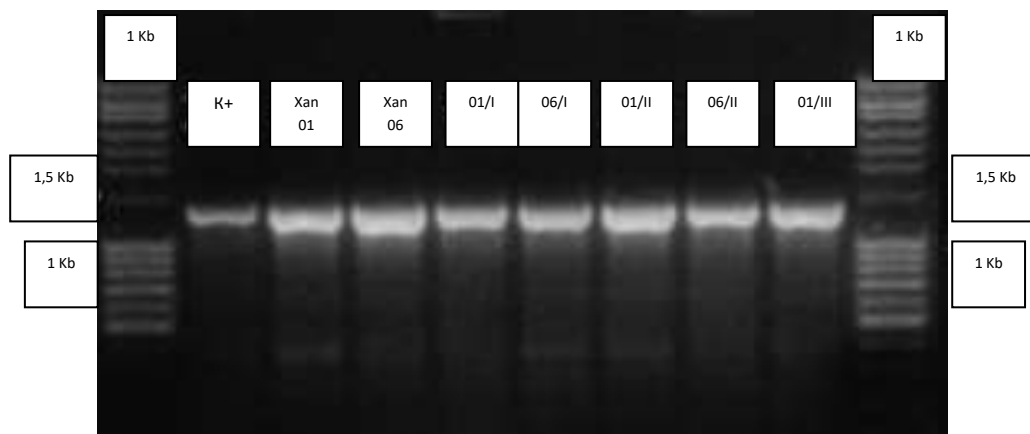


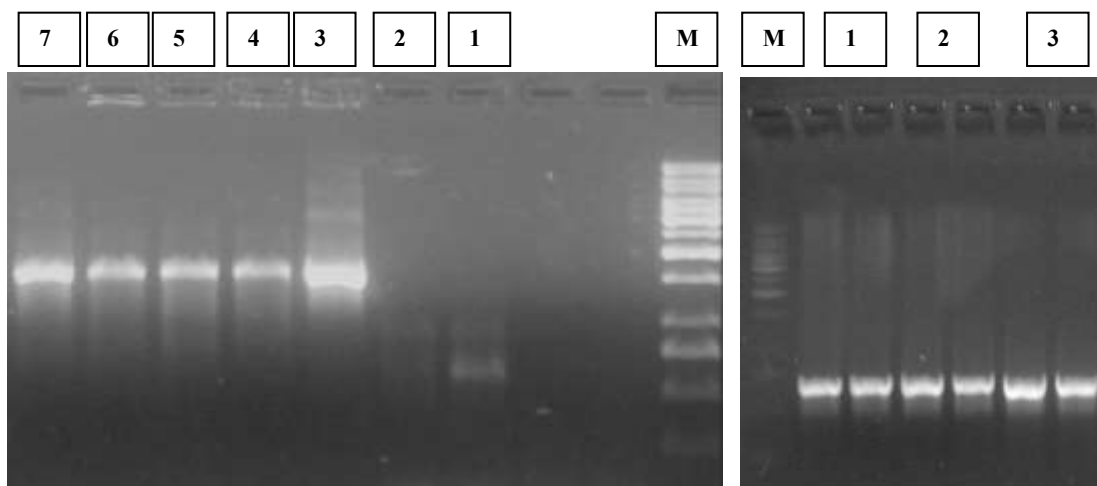
Рисунок 3.1. Результати ПЛР для ізолятів бактерій *Xanthomonas* spp. (Xan 01, Xan 06) після ампліфікації

В ході проведених аналізів отримали амплікон 1,4 Кб для протестованих ізолятів Xan 01, Xan 06 за триразовим повторенням проб.

Таким чином, праймери RST2 (5'AGGCCCTGGAAGGTGC CCTGGA 3') та RST3 (5'ATCGCACTGCGTACCGCG CGCGA3') показали ефективність при застосуванні в діагностиці збудників бактеріозів зернових культур, зокрема для ампліфікації *Xanthomonas* spp.

З таким видоспецифічним праймером ДНК *Xanthomonas* синтезується 1 ПЛР-продукт очікуваного розміру. Але наявність інших ПЛР-продуктів, що утворюються в ході ампліфікації ДНК, демонструє різницю за розміром від *Xanthomonas campestris*, що свідчить про необхідність оптимізації умов ПЛР (рис. 3.2).

Маркери довжини ДНК використовували стандартні (визначення довжини дволанцюгових молекул ДНК за допомогою електрофорезу в агарозному гелі). Маркери складються із фрагментів дволанцюжкової ДНК строго певної довжини (рис. 3.3).



М – маркер молекулярних мас, 1500 б.р.; 1-7 – візуальна детекція виділених фрагментів 16S рРНК різновидів *Xanthomonas* spp.

Рисунок 3.2. Продукти ПЛР для різних ізолятів *Xanthomonas* spp.

При ПЛР аналізах маркери можуть бути використані для приблизної оцінки маси фрагмента ДНК у зразку шляхом порівняння інтенсивності смуги зразка зі смугою маркера тієї ж довжини.

Використано маркер генетичної ваги GeneRuler 1 kb DNA Ladder ready-to-use, компанія Thermo Fisher Scientific (США).

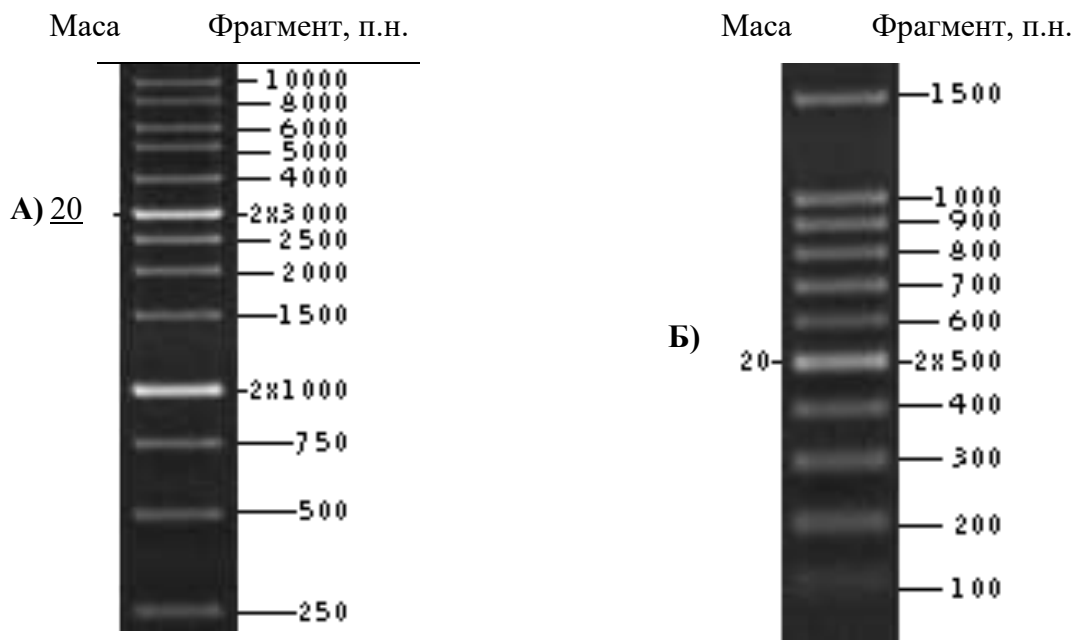


Рисунок 3.3. Візуалізація маркерів за допомогою електрофорезу:

А. DNA 1 kb (125 н.п. на дорожку, 1,3-1,5% ТАЕ агароза).

Б. DNA 100+ бр (125 н.п. на дорожку, 1,3-1,5% ТВЕ агароза).

При розробці різних способів діагностики бактеріальних інфекцій рослин доцільно здійснювати поетапні аналізи:

- ✓ Підбір двох пар праймерів, що оптимально поєднуються між собою (на підставі проведеного літературного пошуку та комп'ютерного аналізу).
- ✓ Моделювання складу реакційної суміші для діагностичної системи, що розробляється (склад реакційної суміші підбирали таким чином, щоб концентрація іонів $MgCl_2$ забезпечувала оптимальну швидкість і точність роботи ферменту Taq-полімерази, а концентрація дНТФ, праймерів та обсяг проби сприяли підвищенню специфічності реакції).
- ✓ Підбір умов температурно-часового режиму проведення ПЛР.

Таким чином, пошукові роботи необхідні у зв'язку з відсутністю інформаційного забезпечення щодо місця молекулярно-генетичних методів в практиці сучасної агрономії та біології і в проведенні науково-дослідних робіт з вивчення інфекційних агентів (фітопатогенів) та механізмів їх впливу на живий організм, створення засобів діагностики та профілактики хвороб. У рамках виконання наукових проєктів щодо стримування біологічних загроз і ризиків вченими відмічається значне збільшення ролі саме молекулярно-генетичних досліджень: виникли нові та були вдосконалені існуючі методи молекулярної діагностики та біотехнології.

Розвиток методів повногеномного секвенування нового покоління (next generation sequencing, NGS) відкрив нові перспективи у дослідженні не просто окремих збудників, але й у розгортанні дослідження цілих мікробіомів. Це дозволило заглибитись у вивчення механізмів співіснування та впливу на макроорганізми мікробіоценозів, охарактеризувати цілий ряд нових видів мікроорганізмів, включаючи некультивовані форми тощо.

Аналіз результатів проведеної ПЛР показав перспективність застосування конструйованих праймерів, а нові ПЛР-тести можуть стати частиною вирішення проблеми встановлення фітосанітарного стану рослинної продукції.

Системи індикації та ідентифікації фітопатогенів за допомогою молекулярно генетичних методів у процесі розроблення проходять різні наукоємні та технічні етапи.

ПЛР-діагностикуми розподіляють за методиками на основі класичної ПЛР: моноступневої (індикація одного виду мікроорганізму за одним геном у одноцикловій реакції), дуплексної – duplex-ПЛР (індикація одного збудника за двома генами з метою підвищення специфічності детекції), мультиплексної – multiplex (індикація одного збудника 8 за кількома (більше двох) генами, або індикація кількох різних збудників) та nested-ПЛР (індикація одного збудника в двостадійній реакції з метою підвищення чутливості детекції, або індикація з наступним типуванням), а також ПЛР у режимі реального часу (підрозділяється на прості, одностадійні варіанти ПЛР, мультиплексні, напівкількісні та кількісні). Означені діагностикуми забезпечують швидку, високочутливу та високоспецифічну детекцію патогенів за виявленням нуклеїнових кислот. За таким же сценарієм розробляється і ряд інших форматів молекулярно-генетичних діагностикумів на основі ампліфікаційних методів. Значно варіює їх ціновий діапазон, що залежить від використовуваної платформи, лінійки та виробника витратних матеріалів, трудомісткості та потреб в обладнанні лабораторій.

Завдяки інтеграції сучасних методів молекулярної генетики в мікробіологію, біотехнологію стало ймовірним значно розширити можливості щодо селекції та паспортизації виробничих штамів, контролювання біотехнологічних процесів і готової продукції, а також створення нових форм препаратів на основі синтетичних послідовностей нуклеїнових кислот та продуктів рекомбінантних біотехнологій (нуклеїнових кислот, діагностичних та імуногенних антигенів, антитіл рекомбінантного походження).

3.2. Основні критерії оцінки якості та достовірності діагностичних тестів на основі різновидів ПЛР

На сьогоднішній день полімеразна ланцюгова реакція є першоосновою комплексу методів молекулярної діагностики з загальнобіологічним значенням. Потужним інструментом молекулярної діагностики є не лише лабораторні тести, а й численні методи обробки даних, які, використовуючи інструменти біоінформатики, дозволяють проводити множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей, їх аналізувати та анотувати, порівнювати, вивчати філогенетичні зв'язки, а також здійснювати дизайн праймерів та плазмідних векторів тощо [32, 51].

Про діагностичну точність застосовуваних тест-систем (методів) судять, у першу чергу, на підставі оцінки їхньої чутливості та специфічності (основні критерії якості та достовірності робіт).

При систематизації опублікованих результатів з дослідження особливостей діагностичних тестів за ПЛР було встановлено, що окрім чутливості, методам молекулярної діагностики властивий високий рівень специфічності. Зокрема, на теперішній час розроблені та впроваджуються у лабораторну практику родо-, видо- і серотипоспецифічні ПЛР-тест-системи.

Пряме визначення наявності збудника бактеріальних хвороб рослин. Традиційні методи, наприклад, імуноферментний аналіз (ІФА), виявляють продукти життєдіяльності біоагентів та антитіла до них, що дає опосередковане свідчення про наявність інфекції. Виявлення специфічної ділянки ДНК-збудника методом ПЛР безпосередньо вказує на наявність збудника інфекції.

Висока чутливість. Аналітична чутливість тест-систем для ПЛР проявляється можливістю детекції від 10 до 100 клітин у пробі, а чутливість імунологічних і мікроскопічних тестів (ІФА і РІФ) дозволяє виявляти лише збудника при його вмісті на рівні 10000 – 1000000 клітин у пробі.

Діагностична чутливість ПЛР складає 98,0%. При дослідженні встановлено, що у зразках виявляється характерний тільки для даного виду

збудника фрагмент ДНК, що зводить до мінімуму можливі хибнопозитивні реакції. Специфічність ПЛР становить до 98,8 %.

Експресність виконання визначається як тривалість аналізу за допомогою ПЛР та становить лише 6-12 годин. За допомогою ПЛР при скринінгу щодо бактеріозів рослин та різної сільськогосподарськї продукції є можливість проведення групових досліджень.

Важливу роль при оптимізації методик щодо виявлення патогенів відіграє кількість зразка для проведення досліджень. Звичайною практикою є застосування ДНК екстрактів у об'ємах від 2 до 10 мкл, що вміщують середню кількість нуклеїнової кислоти збудника, адекватну до біологічних зразків. Як оптимальну обирають ту кількість зразка, яка забезпечує утворення максимально контрастної смуги специфічної довжини за відсутності неспецифічних шлейфів і смуг.

Полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу – метод, заснований на ампліфікації (примноженні кількості) копій ДНК-послідовностей-аналітів за допомогою олігонуклеотидних праймерів (затравок, стартерів реакції), індукованій ферментом Таq-полімеразою. Інтенсивність утворення копій обліковується автоматично завдяки утворюваному флуоресцентному сигналу зондів, компліментарних матриці.

Умовно на практиці лабораторної діагностики використовують платформи детекції ПЛР-продуктів, представлені на рис. 3.4.

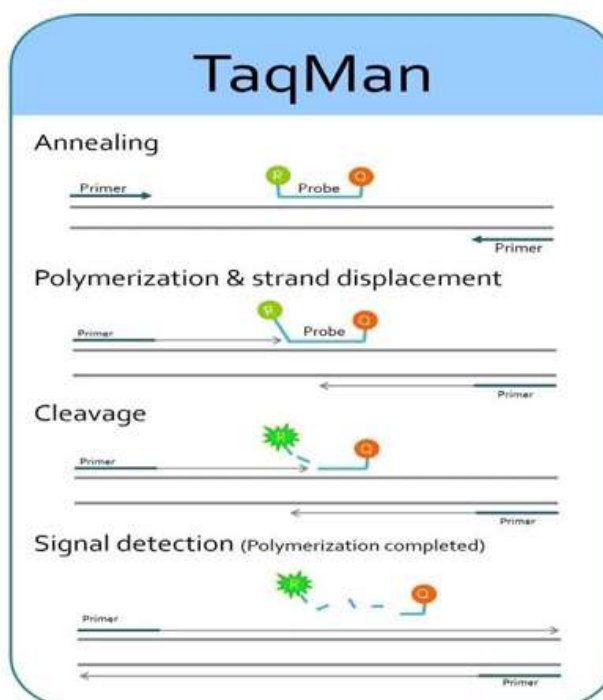
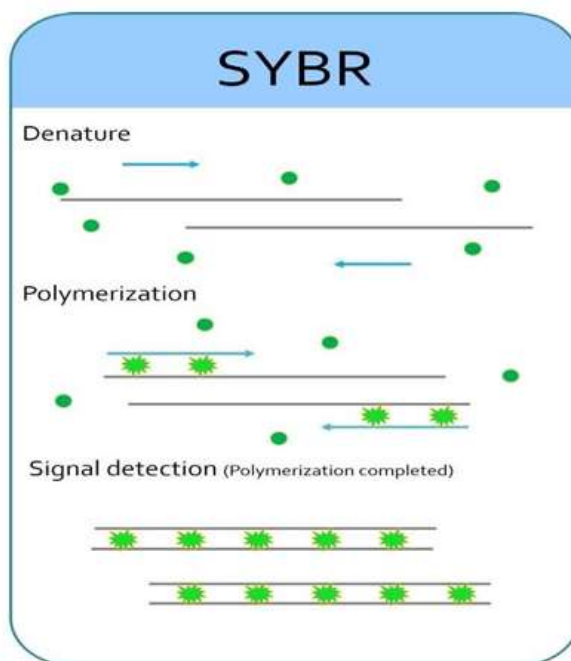


Рисунок 3.4. Схеми ПЛР-РЧ з використанням платформ SYBR-Green (флуоресцентний інтеркалюючий барвник) та TaqMan (зонд)

Зонд TaqMan являє собою олігонуклеотид, довший, ніж праймер (довжина 20-30 п.н. із значенням T_m на 10^0C вище), містить флуоресцентний

барвник на 5' кінці і гаситель флуоресценції (зазвичай TAMRA або нефлуоресцентний гаситель (NFQ) на 3'-кінці.

За ПЛР-аналізу з використанням зондів типу TaqMan використовуються універсальні параметри теплового циклу та інші умови реакції.

Великим кроком вперед є те, що при створенні Real-time-ПЛР-технологій з'явилася можливість контролювати процес збільшення концентрації ампліконів у реальному часі, на кожній стадії кожного термального циклу. Постановка ПЛР при цьому стає менш затратною з точки зору реактивів, оскільки об'єм реакційної суміші суттєво знижується.

Із основних критеріїв якості та достовірності ПЛР у реальному часі можна виділити наступні, табл. 3.1:

Таблиця 3.1 – Виявлені критерії для ПЛР тестування в модифікації (ПЛР-РЧ)

<i>Характеристичні критерії тестування</i>	<i>Впливові критерії тестування</i>
1. Реєстрація інтенсивності флуоресценції	1. Вказує на кількість інфекційного агенту в пробі
2. Виключення головної причини хибнопозитивних результатів	2. розсіювання продуктів ампліфікації з аерозолями і персоналом у процесі гель електрофоретичної детекції
3. Швидкість аналізу	3. Потрібно лише декілька годин для отримання результату
4. Наявність додаткового специфічного зонду (який є комплементарним внутрішній ділянці фрагмента, що ампліфікується)	4. Знижує ризик отримання хибнопозитивних результатів і збільшує чутливість аналізу
5. Можливість проводити множинну ПЛР	5. Реєстрація в одній пробірці наявності декількох інфекційних агентів, використовуючи різні флуорисцентні барвники
6. Ідентифікація продуктів ампліфікації	6. Дослідження продуктів ампліфікації - поодиноких нуклеотидних замін.

На сьогодні розроблено кілька модифікацій РТ-ПЛР, у тому числі Real time-nested-ПЛР та Real-time-multiplex-ПЛР.

Завдяки високій чутливості та специфічності методу ПЛР існує проблема отримання хибнопозитивних або неспецифічних результатів аналізу внаслідок можливості попадання до реакційної пробірки слідових кількостей специфічних продуктів ампліфікації ДНК – ампліконів, одержуваних у великій кількості протягом щоденної роботи; ДНК-стандарту (позитивного контролю); позитивної ДНК дослідного зразку. Тому проведення ПЛР досліджень до завершення деконтамінаційних заходів не допускається.

При проведенні експерименту було встановлено, що на точність діагностики впливає низка чинників. Причинами хибнонегативних результатів молекулярних тестів ми виявили недостатню кількість генетичного матеріалу бактерій (ізолятів) в пробі, терміни та похибки при відборі біологічних зразків.

Питання точності лабораторного дослідження нерозривно пов'язані з особливостями виконання преданалітичного та аналітичного етапів діагностики. Можна виділити такі фактори, що багато в чому визначають точність діагностичного аналізу, які необхідно враховувати під час планування та виконання робіт.

1. Розмір виборки для забезпечення достатньої статистичної потужності дослідження, підготовка зразків для ПЛР аналізу (чистота ізоляту).
2. Порядок відбору та зберігання пробі (недостатня кількість біоматеріалу в пробі, довготривале зберігання при плюсових показниках температурного режиму).
3. Ефективність підібраних праймерів. Вплив дизайну праймерів на ефективність специфічної ампліфікації.
4. Порівняльна точність лабораторного аналізу з іншими методами (діагностична точність молекулярних методів, інструментальних методів та ін., diagnostic specificity).
5. Виявлення недоліків та переваг методу, lack of method / advantages of the method.

Як і для інших методів прямого виявлення маркерів патогенного мікроорганізму при ПЛР-аналізі, важливе значення має ймовірність знаходження збудника інфекції у досліджуваному матеріалі, чистота культури. Саме цей фактор нами враховувався при плануванні досліджень та інтерпретації одержуваних за допомогою ПЛР результатів.

Комплексний підхід з використанням ПЛР та інших молекулярно-біологічних, мікробіологічних, біохімічних, інструментальних методів, з урахуванням факторів, що впливають на точність діагностики, дозволяє забезпечити отримання достовірних результатів, правильно інтерпретувати їх, що необхідно як для встановлення правильної діагностики, ідентифікації конкретних фітопатогенів, так і для отримання об'єктивних даних про фітосанітарний стан агроценозів, своєчасне прийняття рішень щодо проведення необхідних профілактичних заходів.

Для досягнення максимально високої чутливості та специфічності дослідження при діагностиці бактеріозів рослин в лабораторних умовах оптимальним є поетапний алгоритм лабораторної діагностики, що включає поєднання методів. Багатоетапна лабораторна мікробіологічна діагностика є адекватною стратегією, при якій варто зазначити відносно низьку вартість скринінгового дослідження та швидкість його виконання.

Таким чином, ПЛР залишається актуальним як тест при скринінгових дослідженнях матеріалів, що вміщують ймовірних збудників бактеріальної природи в об'єктах довкілля та об'єктах експертизи. У випадку дослідження діагностичних матеріалів, чия патогенність (інфекція) не доведена за класичними методами, позитивний результат є приводом для занепокоєння та загострення моніторингових заходів, а не може інтерпретуватись як остаточне діагностування і висновок.

Місце ПЛР та інших діагностичних методів молекулярної генетики в системі контролю бактеріальних хвороб рослин може бути визначене як неодмінна складова в системі ідентифікації, типування патогенів після ізолювання та охарактеризування за мікробіологічними методами.

Проаналізувавши наявні джерела, можна зробити висновок про те, що з огляду на інструментальні можливості, потреби у впровадженні та сенс застосовуваних тестів існує велика потреба в широкій імплементації методів молекулярної діагностики, яка при використанні у практичних установах має базуватись на традиційній ПЛР. Для забезпечення належного наукового рівня досліджень потребується покращення матеріально-технічної бази лабораторій в частині засобів детекції в режимі реального часу та ДНК-аналізу (секвенування).

ВИСНОВКИ

Згідно з результатами проведеної науково-дослідної роботи застосування сучасних молекулярно-біологічних методів досліджень бактеріальних хвороб рослин (на прикладі виділених ізолятів бактерій *Xanthomonas* spp. із рослин пшениці озимої, огірка) сприяє отриманню об'єктивних даних про фітосанітарний стан агроценозів, своєчасному прийняттю рішень щодо проведення необхідних заходів. Саме комплексний підхід з використанням ПЛР та інших мікробіологічних, біохімічних, інструментальних методів діагностики бактеріозів сільськогосподарських культур дозволяє забезпечити достовірні результати, правильно інтерпретувати їх та здійснити кваліфіковану ідентифікацію фітопатогенів.

1. Узагальнення та систематизація інформаційних джерел дозволила встановити, що для сучасних лабораторних процедур з діагностики, детекції та диференційованої ідентифікації фітопатогенних бактерій, які спричиняють хвороби зернових та овочевих культур, ефективними та рекомендованими методами є імуно-флуоресцентний, імуноферментний аналізи, ПЛР з детекцією методом електрофорезу, флуоресцентний ПЛР з детекцією «прикінцевої крапки» FLASH ПЛР, а також класичні мікробіологічні аналізи (метод поживних середовищ, фізіолого-біохімічне тестування та інші), проби на виявлення патогенності, секвенування 16S rRNA. З одночасним вдосконаленням методик та валідації методів діагностики, гармонізації діагностичних протоколів до умов Європейського Союзу.

2. Доведено, що складність діагностики збудників бактеріозів сільськогосподарських культур та їх ідентифікації за набором стандартних протоколів потребує залучення додаткових методичних підходів з метою встановлення комплексу властивостей та таксономічного положення фітопатогену. Так, висока чутливість ПЛР є як перевагою, так і недоліком методу, створюючи низку проблем, однією з яких є висока ймовірність появи хибнопозитивних і хибнонегативних даних. В результаті проведених ПЛР для фітопатогенних бактерій з роду *Xanthomonas* spp. встановлено, що для

коректного дослідження потребується постановка додаткових контрольних тестів (ізолятів чистих культур Хан 01, Хан 06 або референтних штамів бактерій), а також оптимізовані умови проходження ПЛР. До них відносяться кількість циклів, температура випалу, тривалість випалу, тривалість синтезу та оптимальний склад реакційної суміші (концентрації компонентів).

3. Показано, що для належної лабораторної практики можна використовувати метод ПЛР за різними модифікаціями, а також скринінгові експрес-методи діагностики бактеріозів в агроecosистемах: анатомічний, макроскопічний, біологічний, люмінесцентний, імуофлюоресцентний (ІФ), імуоферментний аналізи (ІФА), імуохроматографічні тест-системи, біохімічні тест-системи типу API 20 NE (Biomerieux) та інші сучасні спектральні візуалізації.

4. Досліджено особливості основних етапів проведення діагностичних тестів за ПЛР, які складались з підготовки проб ізолятів *Xanthomonas* spp., виділення ДНК, постановки ПЛР (ампліфікації) та візуальної детекції продуктів ПЛР (ампліфікованої нуклеїнової кислоти). Апробовано специфічний праймер до геномних ділянок збудника чорної бактеріальної плямистості (*Xanthomonas* pv. *X. vesicatoria* – RST2 RST3).

5. В результаті проведених ПЛР аналізів для ізолятів бактерій *Xanthomonas* spp. (Хан 01, Хан 06) виявлена наявність продуктів ампліфікації, розмір яких відповідав очікуваному для типового штаму *Xanthomonas campestris* 0720 (як матриця ДНК).

6. Встановлено, що за видоспецифічним праймером RST2 (5'AGGCCCTGGAAGGTGC CCTGGA 3') та RST3 (5'ATCGCACTGCGTACCGCG CGCGA3') ДНК *Xanthomonas* spp. синтезується один ПЛР-продукт, амплікон розміром 1,4 Kb).

7. Доведено, що наявність різних ПЛР-продуктів, що утворюються в процесі ампліфікації ДНК (відмінності від типового штаму *Xanthomonas campestris*), можуть свідчити про доцільність та необхідність оптимізації протоколів та умов проведення ПЛР.

8. Встановлено основні критерії оцінки якості та достовірності діагностичних тестів на основі різновидів ПЛР, які характеризуються високим рівнем чутливості (аналітична чутливість тест-систем з детекцією від 10 до 100 клітин у пробі; діагностична чутливість 98,0%), експресністю виконання (від 6 до 12 годин) та специфічністю (пряме визначення наявності збудника бактеріальних хвороб рослин).

9. Встановлено, що хибнонегативні результати молекулярних тестів з'являються внаслідок недостатньої кількості генетичного матеріалу бактерій (ізолятів) в пробі, похибки при приготуванні реакційної пробірки.

10. Поетапний алгоритм лабораторної діагностики бактеріозів рослин, що включає поєднання різних методів (молекулярно-біологічних, мікробіологічних, фітопатологічних, інструментальних) на сьогодні є неодмінною складовою в контролі збудників хвороб рослин та системі скринінгових, індикаторних, ідентифікаційних досліджень фітопатогенних бактерій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Агроекологія : навч. посіб. / О.Ф. Смаглій, А.Т. Кардашов, П.В. Литвак [та ін.]. Київ : Вища освіта, 2006. 671 с.
2. Гадзало Я.М., Патыка Н.В., Заришняк А.С. Агробиологія ризосфери растений: монографія. К.: Аграрна наука, 2015. 386 с.
3. Ghatak A., Ansar M. (Eds.). 2017. The phytopathogen: evolution and adaptation. Apple Academic Press, USA.
4. Агромікробіологія з основами біотехнології: монографія / Я.М. Гадзало, М.В. Патыка, А.С. Заришняк, Т.І. Патыка. К.: Аграрна наука, 2019. 204 с.
5. Патыка В. П. Фітопатогенні бактерії: фундаментальні і прикладні аспекти / В.П. Патыка, Л.А. Пасічник. Вісник Уманського національного університету садівництва. 2014. № 2. С. 7-11.
6. Гвоздяк Р.Л., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гриник І.В., Патыка В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: [монографія: в 3-х т.]. Т.1. К.: ТОВ «НВП «Лнтерсервіс», 2011. 444 с.
7. Мікробіологія: Підр. для студ. / І.Л. Дикий, І.Ю. Холупяк, Н.Ю. Шевельова, та ін. 2-е вид. Х. : Професіонал, 2006. 433 с.
8. Бегей С.В., Шувар І.А. Екологічне землеробство : підручник. Львів : «Новий Світ 2000», 2012. 432 с.
9. Борзих О.І., Ткаленко Г.М., Сергієнко В.Г. Вплив комплексного застосування біологічних і хімічних препаратів на розвиток хвороб та врожайність картоплі. Вісник аграрної науки. 2021. № 8. С. 15-25.
10. Напрямки екологізації землеробства / Ящук В.У., Корецький А.П., Ковбасенко Р.В., Дмитрієв О.П., Ковбасенко В.М. Київ, 2016. 139 с.
11. Моніторинг хвороб сільськогосподарських культур: навч. посіб. / С.В. Станкевич, В.М. Положенець, Л.В. Немерицька, І.А. Журавська. Житомир: Видавництво «Рута», 2022. 301 с.
12. Писаренко В. В. Захист рослин. Фітосанітарний моніторинг, методи захисту

рослин, інтегрований захист рослин / В.М. Писаренко, П.В. Писаренко. Полтава, 2007. 256 с.

13. Мікробіологія. Том 1: підручник / Сергійчук М.Г., Сківка Л.М., Сергійчук Т.М. та ін., Київ: ФОП Маслаков, 2020. 500 с.

14. Мікробіологія. Том 2: підручник / Сергійчук М.Г., Сківка Л.М., Сергійчук Т.М. та ін., Київ: ФОП Маслаков, 2020. 348 с.

15. Діагностика і контроль збудників бактеріальних хвороб пшениці. Методичні рекомендації. Буценко Л.М., Пасічник Л.А., Калініченко А.В., Патица В.П. Київ: ЦП Компринт, 2019. 37 с.

16. Діагностика бактеріальних патогенів сої / Н.В. Житкевич, Т.Т. Гнатюк, В.Ф. Петриченко, В.П. Патица. Корми і кормовиробництво. 2009. Вип. 64. С. 62-69.

17. Збудники бактеріальних хвороб сої та їх моніторинг. В.П. Патица, Т.Т. Гнатюк, Н.В. Житкевич. Вісник аграрної науки. 2015. Червень, 2015. С. 15-19.

18. Лихочвор В.В., Петриченко В.Ф., Іващук П.В., Корнійчук О.В. Рослинництво. Технології вирощування сільськогосподарських культур: за ред. Лихочвора В.В., Петриченка В.Ф. 3-є вид., виправ., допов. Львів: НВФ «Українські технології»; 2010. 1088 с.

19. Diversity, pathogenicity and biocontrol efficacy of *Pseudomonas syringae* isolated from plants in northern Jordan / F. A. Almomani [et al.] Romanian Biotechnological Letters. 2022. 27(1). P. 3264-3269.

20. Toth I.K., Van Der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Elphinstone J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant Pathology. 2011. 60(3): 385-399.

21. Arrebola E., Cazorla F. M., Perez-García A., Vicente A. D. Chemical and metabolic aspects of antimetabolite toxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars. Toxins. 2011. 3(9): 1089-1110.

22. Li M., Xu L., Sun Z., Li, Y. Isolation and characterization of a phytotoxin from *Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus*. Chinese Journal of Chemical Engineering. 2007. 15(5): 639-642.

23. Zhou J.N., Zhang H.B., Lv M.F., Chen Y.F., Liao L.S., Cheng Y.Y., Jiang Z.D.

SlyA regulates phytotoxin production and virulence in *Dickeya zeae* EC1. *Molecular Plant Pathology*. 2016. 17(9): 1398-1408.

24. Пати́ка М.В., Коло́дяжний О.Ю., Борко́ Ю.П. Сучасні молекулярно-біологічні методи вивчення мікробного біому та метагеному ґрунтів аграрного використання. *Агрохімія і ґрунтознавство*. 2017. 86: 116-124.

25. Пати́ка М.В., Коло́дяжний О.Ю., Іба́тулін І.І. Оцінка метагеному та детекція функціонально значущих поліморфізмів прокаріот ґрунту з використанням методу піросеквенування. *Мікробіологічний журнал*. 2016. Т. 78, № 2. С. 43-51.

26. Zhou J., Xia B., Huang H. Microbial Diversity and Heterogeneity in Sandy Subsurface Soils. *Applied and environmental microbiology*. 2004. Vol. 70, № 3. P. 1723-1734.

27. Пасі́чник Л.А., Пати́ка В.П., Ходо́с С.Ф., Ві́нничук Т.С. Базальний бактеріоз пшениці та вплив агротехнічних прийомів на його поширення. *Мікробіологічний журнал*. 2012. 74(4):37-44.

28. International Rules for Seed Testing. 7-023: Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* in *Phaseolus vulgaris* (bean) seed. Validated Seed Health Testing Methods. 2018.

29. Влі́зло В.В. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / В.В. Влі́зло, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич та ін. ; за ред. В. В. Влі́зла. Львів : СПОЛОМ, 2012. 764 с.

30. Developing Methodologies for the Use of Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis and Monitoring of Trypanosomosis: Prepared under the Framework of an RCA Project with the Technical Support of the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture / IAEA-TECDOC-1559. IAEA, 2007. 294 p.

31. Т.М. Дима́нь, В.І. Гла́зко Полімеразна ланцюгова реакція: Методичні рекомендації. Біла Церква. 2004. 62 с.

32. Стегні́й Б.Т. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях : наук.-метод. посіб. / Б.Т. Стегні́й, А.П. Гері́лович, О.Ю. Лима́нська ; ред. Б.Т. Стегні́й, А.П. Гері́лович. Х. : НТМТ,

2010. 227 с.

33. Буценко Л.М., Решетніков М.В. Бактеріальні хвороби соргових культур. Вісник аграрної науки. 2022. 1(826): 20-25.

34. Clonal populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* are responsible for the outbreaks of bacterial canker in greenhouse tomatoes in Italy / G. M. Ialacci [et al.]. Plant Pathol. 2016. Vol. 65. P. 484–495.

35. Host-multi-pathogen warfare: pathogen interactions in co-infected plants / A. S. Abdullah [et al.]. Frontiers in Plant Sci. 2017. Vol. 8. Art. 1806.

36. Genomics based approaches towards management of plant diseases with emphasis on in silico methods as a prudent approach. S. Tiwari [et al.]. J. Agricult. Sci. Food Tech. 2017. Vol. 3, № 3. P. 39–51.

37. Singh A., Ganapathysubramanian B., Singh A.K., Sarkar S. Machine learning for highthroughput stress phenotyping in plants. Trends Plant Sci. 2016. 21(2):110124.

38. Singh D., Sao R., Singh K.P. A remote sensing assessment of pest infestation on sorghum. Adv. Sppace Res. 2007;39:155163.

39. Zheng C., AbdElrahman A., Whitaker V. Remote sensing and machine learning in crop phenotyping and management, with an emphasis on applications in strawberry farming. Remote Sens. 2021. 13:531.

40. Li J., Zhang R., Li J., Wang Z., Zhang H., Zhan B., Jiang Y. Detection of early decayed oranges based on multispectral principal component image combining both bidimensional empirical mode decomposition and watershed segmentation method. Postharvest Biol. Technol. 2019. 158:110986110996.

41. ДСТУ EN ISO/IEC 17025 Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій.

42. Наказ Міністерства охорони здоров'я Про затвердження державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» від 24.01.2008 № 26 (електронний ресурс). Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0088-08#Text>.

43. Olivier V., Baloché A., Drouin A., Audusseau C., Paillard S., Soubelet H.

Internal methods comparison study and interlaboratory study on *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds¹. EPPO Bull. 2010. 40, 248-256.

44. Sharma A., Sharma D., Verma S. Zinc binding proteome of a phytopathogen *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Royal Society Open Science, 2019. 6(9): 190369.

45. Ledman K., Curland R., Ishimaru C., Dill Macky R., *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* identified on common weedy grasses in naturally infected wheat fields in Minnesota. Phytopathology. 2020. DOI: 10.1094/PHYTO-08-20-0337-R.

46. Статистичний аналіз даних вимірювань: навч. посіб. Єременко В.С., Куц Ю.В., Мокійчук В.М., Самойліченко О.В. К.: НАУ, 2013. 320 с.

47. Parkinson N., Aritua V., Heeney J., Cowie C. et al. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 2007. 57(12):2881-2887.

48. Hasan S.Z., Hossain F., Zaoti Z.F., Hasan F. et al (2018) PCR amplification of DNA sequence related to the *hrpD* gene of *Xanthomonas cucurbitae* in leaf spot disease of pumpkin and their antagonism by soil bacteria. Arch Phytopathol Pflanzenschutz. 2018. 51(5–6):252-266.

49. Palacio-Bielsa A., López-Soriano P., Bühlmann A., van Doorn J. et al. (2015) Evaluation of a real-time PCR and a loop-mediated isothermal amplification for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in plant tissue samples. J Microbiol Methods. 2015. 112:36-39.

50. Pecenka J., Bytesnikova Z., Kiss T., Penazova E., Baranek M., Eichmeier A., Adam V. Silver nanoparticles eliminate *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage seeds more efficiently than hot water treatment. Materials Today Communications. 2021. 27:102284.

51. Герілович А.П., Єрошенко Г.А., Коровін І.В., Кінаш О.В., Герілович І.О., Родина Н.С. Молекулярно-генетичні методи діагностики. Полтава, 2022. 148 с.