

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І 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 «Виділення фітопатогенних бактерій *Solanum tuberosum* L.»**

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

**Гарант освітньої програми**

Кандидат біологічних наук,  
доцент, завідувач кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття

**Олена КВАСКО**

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи**

Кандидат біологічних наук,  
доцент, завідувач кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття

**Олена КВАСКО**

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Виконав

**Антон ТИНЬЧУК**

\_\_\_\_\_  
(підпис)

**КИЇВ – 2025**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

к.б.н., доцент \_\_\_\_\_ **Олена КВАСКО**

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту**

Тиньчуку Антону Олександровичу

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи «Виділення фітопатогенних бактерій *Solanum tuberosum* L.», затверджена наказом ректора НУБіП України від «22» жовтня 2024р. №1880

Термін подання завершеної роботи на кафедру 20 травня 2025 року

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: бульби *Solanum tuberosum*, протоколи виділення та ідентифікації бактерій, поживні середовища, послідовності праймерів для полімеразно-ланцюгової реакції.

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Відібрати зразки уражених рослин *Solanum tuberosum*, виділити патогенів у чисту культуру та визначити патогенних властивостей виділених ізолятів бактерій.
2. Дослідити морфо-фізіологічні та біохімічні властивості виділених ізолятів бактерій.
3. Провести молекулярно-генетичний аналіз отриманих бактеріальних ізолятів.

Дата видачі завдання 1 вересня 2024 року

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи**

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Олена КВАСКО**

**Завдання прийняв до виконання**

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Антон ТИНЬЧУК**

## РЕФЕРАТ

Бакалаврська дипломна робота виконана на тему «Виділення бактеріальних фітопатогенів *Solanum tuberosum*» в обсязі 53 сторінок друкованого тексту у форматі А4, містить 10 рисунків, 2 таблиці та 67 використаних джерел. Робота складається з наступних розділів:

1. Огляд літератури;
2. Матеріали та методи досліджень;
3. Результати дослідження та їх обговорення.

**Метою даної роботи** було виділення та ідентифікація бактеріальних фітопатогенів *Solanum tuberosum* L.

Згідно до поставленої мети було поставлено наступні **завдання**:

1. Відбір бактеріальних культур з рослин *Solanum tuberosum*, виділення чистої культури фітопатогенів та визначення патогенності виділених фітопатогенних бактерій.
2. Дослідження морфо-фізіологічних та біохімічних властивостей виділених фітопатогенних бактерій.
3. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих фітопатогенних бактерій.

**Об'єктом дослідження** є методи ідентифікації бактеріальних фітопатогенів *Solanum tuberosum*.

**Предметом дослідження** є бактеріальні фітопатогени *S. tuberosum*.

В роботі застосовано такі **методи дослідження** як хімічні, мікробіологічні (виділення фітопатогенних бактерій та їх ідентифікація), молекулярно-генетичні, статистичні та методи спостереження.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Цінність <i>Solanum tuberosum</i> на українському та міжнародному ринках.....	8
1.2. Короткий опис основних бактеріальних патогенів картоплі.....	10
1.2.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> .....	10
1.2.2. <i>Pectobacterium atrosepticum</i> та <i>Dickeya</i> sp.....	14
1.2.3. <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	17
1.3. Діагностика бактеріальних захворювань картоплі.....	19
1.3.1. Морфо-фізіологічні методи .....	21
1.3.2. Біохімічні методи.....	23
1.3.3. Імунологічні методи діагностики .....	26
1.3.4. Молекулярно-генетичні методи діагностики .....	27
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження .....	30
2.1. Відбір зразків з уражених рослин .....	30
2.2. Виділення бактерій в чисту культуру.....	30
2.3. Тест збудників на патогенність.....	31
2.4. Тест на пектолітичну активність.....	31
2.5. Тест на гіперчутливість.....	32
2.6. Визначення морфологічних та біохімічних ознак.....	33
2.7. Молекулярно-генетичний аналіз ізолятів .....	36
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення.....	38
3.1. Визначення патогенності виділених ізолятів бактерій.....	38
3.2. Морфо-фізіологічні та біохімічні показники бактеріальних ізолятів .....	40
3.3. Молекулярно-генетичний аналіз виділених ізолятів .....	43
ВИСНОВКИ.....	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	46

## ВСТУП

*Solanum tuberosum*, більш відома як картопля – рослина родини Пасльонових, яка широко вирощується у світі загалом, і в Україні зокрема, як харчова сільськогосподарська культура за рахунок своїх коренеплодів.

Крім безпосередньо коренеплодів картоплі, відомих як бульби, картоплярські продукти налічують: крохмаль, картопляне борошно, висушену картоплю та напівфабрикати на основі картоплі. Картопля широко використовується як кормова культура, як сировина для виробництва етилового спирту, як джерело органічних речовин в поживних середовищах тощо.

Картопля набула широкого розповсюдження завдяки своїй поживності та, одночасно, більшій стійкості до погодних умов, що робить її особливо популярною в країнах з більш помірним кліматом, таких як Україна. Поживність картоплі зумовлена високим вмістом вітамінів С, В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>9</sub> та інших фолатів, клітковини і таких мікроелементів як калій та залізо. Усі ці фактори роблять картоплю цінним харчовим продуктом.

Одомашнення картоплі та її сільськогосподарське вирощування розпочалося близько 10,000 років тому на території Андського Плато, нині території Перу, Чилі та Болівії. Після завоювання Інкської Імперії іспанськими колонізаторами у XVI ст. н. е. картопля була привезена до Європи, звідки поступово почала поширюватися як продовольча культура. З тих пір картопля стала одним з найважливіших продуктів не лише у Європі, але й у всьому світі.

Хоча картопля загалом не настільки вибаглива до умов ґрунту та клімату, як інші овочі, але вона теж потребує певних умов – нещільних та розораних ґрунтів, а також невисокої вологості ґрунту та повітря. Крім того, картопля потребує високого вмісту калію. Картопля чутлива до вологості, оскільки у вологому ґрунті вона стає чутливою до різноманітних фітопатогенів.

У зв'язку з важливістю картоплі для України, питання епідеміології захворювань картоплі стоїть особливо гостро. Епіфітотії картоплі є особливо небезпечними, адже можуть повністю знищити врожай картоплі через

особливості її вирощування. Для вирішення цих проблем було прийнято Закон України “Про карантин рослин”, який регулює проведення фітосанітарних експертиз, розробку фітосанітарних заходів, виявлення та боротьбу з регульованими шкідливими організмами, міжнародну торгівлю та співпрацю в цій сфері та наукові дослідження. Серед інших пунктів, цей закон затверджує перелік регульованих шкідливих організмів, що включає в себе карантинні організми, відсутні в Україні, перелік карантинних організмів, обмежено поширених в Україні та перелік регульованих некарантинних шкідливих організмів.

**Метою даної роботи** було виділення та ідентифікації фітопатогенів *Solanum tuberosum* L.

Згідно поставленої мети було сформульовано наступні **завдання**:

1. Виділити бактеріальні фітопатогени з уражених рослин та дослідити їх на патогенність.
2. Визначити морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні характеристики виділених ізолятів.
3. Провести молекулярно-генетичний аналіз відібраних ізолятів бактерій.

**Об’єктом дослідження** є ідентифікація фітопатогенів *Solanum tuberosum* L.

**Предметом дослідження** є бактеріальні фітопатогени *S. tuberosum* L.

В роботі застосовано такі методи дослідження як біотехнологічні, мікробіологічні (виділення фітопатогенних бактерій та їх ідентифікація), а також статистичні.

Практична значущість даної роботи полягає у використанні результатів дослідження фітопатогенів та аналізі методів проведення їх ідентифікації для більш ефективного їх проведення у майбутньому.

Робота виконувалась на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Цінність *Solanum tuberosum* на українському та міжнародному ринках

Серед усіх галузей сільського господарства, картоплярство є одним з найбільших та найважливіших в Україні, оскільки картопля – одна з основних продуктів в раціоні українців, а також має багато застосувань поза межами прямого споживання. Через це, будь-які інновації у вирощуванні, зберіганні та контролі якості картоплі є важливими завданнями сучасного українського картоплярства. Серед цих завдань: покращення наявних та розробка нових методів вирощування картоплі та її обробки; виведення насінних сортів, які краще адаптуються до змін клімату в Україні; впровадження міжнародних стандартів контролю якості насіння та плодів картоплі та розробка більш ефективних методів зберігання продукції.

Згідно даним Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO) за 2023 рік, Україна посіла 3 місце серед інших країн за сумарним виробництвом картоплі, з показником в 21,36 млн. т. врожаю [11]. Втім, 95% посівної площі займають домашні господарства – дачні ділянки, особисті городи тощо, і більшість з неї використовується для особистого споживання [66].

Державна служба статистики України надає наступні дані про виробництво картоплі у 2023 році: посівна площа картоплі склала 1210 тис. га, валовий збір з них склав 213586,3 тис. ц, з врожайністю в 176,5 ц/га. З них, підприємства посіяли 14,9 тис. га, з яких зібрали 4220,4 тис. ц, з врожайністю в 287,2 ц/га. За 2024 рік Державна служба статистики України не надала статистики валових зборів по приватним господарствам, наводячи лише посівну площу в 1189,4 тис. га для приватних господарств, але наводить такі дані по картоплярським агропідприємствам: вони посіяли 4,1 тис. га, з яких було зібрано 866,6 тис. ц. картоплі, з врожайністю в 206,2 ц/га [61]. Таке падіння врожайності можна пояснити сильною посухою того року, а також епідеміями фітофторозу та альтернаріозу, що вразили послаблені поганими погодними умовами врожаї [67].

Згідно статистиці Державної митної служби України, експорт картоплі склав 2578 тон на суму 534 тис. доларів США, з якої більшість було експортовано в Молдову та Азербайджан [63].

Порівняно з експортом картоплі з України в 2023 році, коли лише за перше півріччя було експортовано 19,8 тис. тон, нинішній експорт знаходиться на дуже низькому рівні. Причинами є низька якість картоплі, яка вирощується в більшості на приватних фермах чи домашніх ділянках, і через це не відповідає вимогам більшості потенційних країн-імпортерів. Посухи також зменшили кількість доступної для експорту картоплі в 2024 році, через що більшість вирощеної картоплі продається на внутрішньому українському ринку [64].

Найбільш перспективним ринком експорту картоплі для України є Європейський Союз. Для експорту картоплі на територію ЄС, країна-експортер повинна бути визнана як країна з вільними зонами від карантинних організмів, таких як *Clavibacter michiganensis* (кільцева гниль картоплі), *Ralstonia solanacearum* (бура гниль картоплі) та інших, а також бути очищена від ґрунту, залишків побічної рослинної матерії тощо [54].

В Україні доступний широкий ряд послуг з діагностики рослинного матеріалу, як посадкового, так і вирощеного, які надаються різноманітними державними установами та приватними підприємствами. Наприклад, Інститут картоплярства НААН України надає послуги імуноферментного аналізу посадкового матеріалу картоплі [55]. Серед цих послуг є як аналіз обладнання, яке використовується в процесі сільськогосподарчих робіт, на предмет контамінації, так і діагностика самого рослинного матеріалу. Рослини діагностують як простим візуальним аналізом, так і високотехнологічними методами на кшталт імуноферментного аналізу, ПЛР-тестування та ДНК-аналіз на предмет наявності генетичних модифікацій чи вірусних захворювань.

Вищевказані показники нинішнього стану картоплярства в Україні підкреслюють необхідність розвитку методів діагностики захворювань картоплі, адже вона є одним з найбільш вирощуваних культур в Україні. Крім того, проблеми захворювань картоплі погіршуються все більш вираженою

нестійкістю кліматичних умов, що роблять рослини більш вразливими до шкідників і патогенів. Ці проблеми виражені не лише в Україні – наприклад, в Польщі в 2021 році 30% усього насіннєвого врожаю картоплі виявилось заражено *Dickeya solani* [19].

## 1.2. Короткий опис основних бактеріальних патогенів картоплі

У зв'язку з довготривалим перебуванням коренеплодів картоплі у ґрунті та її вегетативним розмноженням, вони є вразливими до зараження фітопатогенами різної природи. Ці патогени можуть вражати як наземну частину рослини в період вегетації, так і коренеплід під час його зберігання.

Вегетативний характер розмноження картоплі призводить до того, що в нових рослинах поступово накопичуються патогени, які не проявляють симптомів протягом довгого часу, однак, в ході подальшого накопичення фітопатогенів, значні частини засаджених ділянок можуть проявити захворювання одночасно [65].

### 1.2.1. *Clavibacter michiganensis*

*Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* є збудником бактеріальної судинної хвороби, відомої як кільцева гниль картоплі.

*C. michiganensis* це грампозитивна, аеробна, коринеподібна, немобільна, неспороутворююча паличкоподібна бактерія з родини *Microbacteriaceae*. Розмір клітини складає приблизно 0,5-1,0 – 0,4-0,6 мкм [4].

*C. michiganensis* - єдиний представник роду *Clavibacter*. Всі шість його підвидів (*Michiganensis*, *Tesselarius*, *Phaseoli*, *Insidiosus*, *Sepedonicus* і *Nebraskensis*) є фітопатогенами [12].

Природними носіями бактерії є *Solanum nigrum*, *S. Trifolium*, *S. douglasii*, *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* та *Datura stramonium*, але вона може розмножуватися і в інших рослинах, таких як картопля [4].

Ця хвороба була вперше описана як *Bacterium Sepedonicum* у 1914 році в Німеччині. Згодом, цю інфекцію було виявлено в 31 країні світу. На даний момент захворювання не є настільки поширеним, як в минулому сторіччі,

завдяки карантинним заходам та сертифікації насіння у більшості вражених районів, але хвороба досі інколи спалахує в різних регіонах. На території США та Європи це захворювання спалахує нечасто завдяки регулюванню якості насіння. Станом на сьогодні *C. michiganensis subsp. sepedonicus* внесено до списку А2 карантинних об'єктів Європейської і Середземноморської організації захисту рослин (ЄОЗР) [20, 65].

Найбільш сприятливі для *C. Michiganensis* умови це помірний, прохолодний та вологий клімат, де втрати врожаю можуть складати від 20 до 40%. В Україні найбільш сприятливими для розвитку цього патогену є Полісся та лісостепи [65].

На верхній частині рослини симптоми проявляються не завжди, і можуть бути видимими лише в кінці періоду вегетації, коли рослина вже старіє, і симптоми можна сплутати зі старінням. Патогенні бактерії викликають хлороз міжжилкових ділянок через закупорювання ксилем. В молодого листя сповільнюється ріст, воно закручується та висихає. Заражене стебло та листя ростуть гірше, або взагалі гинуть [2, 4, 65].



Рис. 1.1. *Solanum tuberosum* L., що уражена *C. michiganensis subsp. sepedonicus*

Хвороба частіше за все проявляється після цвітіння, на бульбах, і вираженість її ознак залежить перш за все від ураження коренеплідів.

Якщо в посадковому матеріалі була незначна кількість патогенних бактерій, ранні симптоми спостерігаються в першій половині вегетації. Ці симптоми проявляються як в'янення і падіння кількох стебел з некрозом їх прикореневих ділянок. Згодом, на листі з'являються хлоротичні плями.

Якщо коренеплід уражено сильно, він сходить вполовину менше, і їх частина згниває у ґрунті. Уражений посадковий матеріал, що проріс, виростає в рослини з малим та плямистим листям, короткими міжвузлями та роздутим стеблом. Ці симптоми можуть варіюватися в різних сортів.

Молода картопля інфікується *C. michiganensis* через приґрунтові пагони рослини, відомі як столони. Першим симптомом такої інфекції, який характерний для патогена, це утворення склянистого кільця на розрізі, яке виділяє густі краплі бактеріального слизу при натисканні. Згодом, тканина може змінити відтінок на світло-жовтий та набути сироподібного вигляду, навіть якщо судинне кільце не повністю уражене.



Рис. 1.2. Характерне кільце на картоплі, інфікованій кільцевою гниллю

В залежності від рівня мікробного навантаження рослини та локалізації навантаження, судини можуть повністю зруйнуватися та набути слизистого, кашистого вигляду. В такому випадку, паренхіми рослини теж можуть стати ураженими, з подальшим ураженням бульби.

Колонії *C. Michiganensis* всередині коренеплоду мають вигляд однорідної маслянистої маси без запаху та з жовтим кольором, зміна кольору може свідчити про ураження вторинною інфекцією, яка потрапляє через вразливі пошкоджені органи рослини. Ці вторинні інфекції менш помітні серед основного ураження, і згодом картопля гниє з утворенням плям та тріщин.

В основному зараження картоплі кільцевою гниллю відбувається під час її збору та перевезення до місця її зберігання, коли патоген потрапляє в бульбу

через пошкодження на шкірці. Таке зараження спричиняє ямчату кільцеву гниль, що не проявляється в перших стадіях інфікування. Симптоми проявляються приблизно через півроку, в період від кінця зими до початку весни, з активізацією біологічних процесів в бульбі. Ці симптоми мають вигляд плям кремового чи жовтого кольору з діаметром в 2-3 мм. Ці плями можуть рости та досягати діаметрів в 1-1,5 см. Якщо до *C. Michiganensis* доєднується сапротрофна мікрофлора, яка поширена в місцях зберігання картоплі, то ця комбінована інфекція утворює ямки, які дістаються судинного кільця картоплі з подальшим інфікуванням.

*C. michiganensis subsp. sepedonicus* є біотрофом, тобто розмноження цієї бактерії може відбуватись тільки в рослині-господарі. Поза такою рослиною бактерія здатна зберігати свою життєдіяльність із зниженням метаболічної активності, наприклад в умовах з низькими показниками відносної вологості і температури.

*C. michiganensis subsp. sepedonicus* здатна довгий час перебувати в інфікованих рештках рослин. Якщо сівозміна відбувається рідко, або не відбувається взагалі, то ця та інші інфекції здатні накопичуватися в ґрунті і вражати здорову картоплю.

Також патоген здатен потрапляти до посівів через контаміновану воду, яка використовується для поливу або іншим чином потрапляє в середовище. Хоча таке зараження можливе, поверхневі води не є основним вектором поширення *C. michiganensis subsp. Sepedonicus*, і ризик такого зараження низький.

Неактивні патогени *C. michiganensis* можуть довгий час залишатися в материнських коренеплодах, і безсимптомно накопичуватися в ході поступового вегетативного розмноження з однієї і тієї ж рослини.

Прояв хвороби залежить від погодних умов, сорту картоплі та мікробного навантаження індивідуальної рослини. У випадку спекотного та сухого літа, прояви кільцевої гнилі більше локалізовані на верхній частині рослини, а бульби пошкоджуються менше. Натомість, якщо літо вологе та помірне, прояви

захворювання більш інтенсивні в бульбі, тоді як верхня частина в'яне повільніше та не проявляє симптоми так сильно.

*C. michiganensis subsp. sepedonicus* проявляється, в залежності від сорту, дуже різноманітно, і в різних сортів спостерігаються різні рівні сприйнятливості до патогену, однак жоден сорт не є імунним до захворювання [65].

### 1.2.2. *Pectobacterium atrosepticum* та *Dickeya* sp.

*Pectobacterium atrosepticum* є збудником взаємопов'язаних хвороб, відомих як чорна ніжка та м'яка гниль картоплі. Ця хвороба повсюдно поширена та передається в ході вегетативного розмноження картоплі.

М'яка гниль та чорна ніжка картоплі викликаються бактеріями родини *Enterobacteriaceae*, головними збудниками є бактерії родів *Dickeya* та *Pectobacterium*. Ці бактерії – грамнегативні факультативні анаероби, які переважно знаходяться в ґрунті. Головна особливість цих бактерій – розкладання пектинів в рослинах, які вони вражають, що прискорює процес їх гниття [44].

Найпоширенішим збудником чорної ніжки та м'якої гнилі картоплі є *P. atrosepticum*, і, на відміну від решти збудників цих захворювань, інфікує лише рослини родини *Solanaceae*. Інші представники *Pectobacterium* та *Dickeya* можуть викликати схожі захворювання не лише в картоплі, а й в інших видах рослин [2].

Поширеність конкретного патогена залежить від кліматичних умов регіону. В умовах помірного клімату найбільше поширення мають *P. carotovorum*, в умовах тропічного клімату – представники роду *Dickeya*, а *P. Atrosepticum* поширена в усіх кліматичних зонах.

Оптимальними умовами для розвитку м'якої гнилі та чорної ніжки є стабільна, помірна температура та висока вологість ґрунту. Через це, в Україні найбільше поширення захворювання спостерігається на півночі та заході, з меншим поширенням в лісостепових центральних регіонах, і з найменшим поширенням на півдні України.

Також умови навколишнього середовища визначають перебіг захворювання – в сухих та теплих умовах інфекція може бути безсимптомною або мати вигляд малих, просочених рідиною осередків, а в більш вологих умовах захворювання проявляється як вологе чи сухе гниття стебла та м'яких тканин, з подальшою загибеллю.

Характерними симптомами під час активного перебігу захворювання є пожовтіння нижнього листа, яке скручується та твердішає, з пожовтінням верхнього листа і подальшим в'яненням всієї рослини.

Приґрунтові ділянки стебла і його коренева система м'якнуть та темнішають, з падінням розм'яклих стебел додолу. Якщо хвороба перебігає інтенсивно, розм'яклі хворі стебла розриваються при спробі висмикнути їх в прикорінній шийці. У випадку більш легкого захворювання, кущ відстає в рості, з меншим ураженням стебла.



Рис. 1.3. Ураження приґрунтової ділянки стебла *P. atrosepticum*

М'яка гниль та чорна ніжка картоплі – це судинні захворювання, з високою імовірністю системного ураження рослини. Зараження відбувається через паренхіму, з подальшим її гниттям і поширенням хвороби. З поширенням інфекції бактеріальні клітини закупорюють судини рослини, з подальшою зупинкою транспірації та руху поживних речовин і накопиченням бактеріальних токсинів.

Головним джерелом цих інфекцій є заражені бульби, і її прояв залежить від умов навколишнього середовища рослини, з можливістю як латентного, так і активного перебігу. Латентне зараження чорною ніжкою в основному локалізується в столонах, з можливим зараженням самої бульби, тоді як м'яка гниль локалізується в бульбах.

В холодних умовах ця інфекція характеризується гниттям верхніх тканин стебел, які стають покритими темно-зеленим бактеріальним слизом. Якщо умови теплі та сухі, рослина може не проявляти зовнішніх симптомів захворювання в процесі своєї вегетації.

В бульбоутворювальний період вегетації можливе зараження бульб. В бульби бактерії потрапляють через пошкоджені столони. Коли інфекція уражає бульбу та стolon, в місці їх з'єднання розпочинається підгнивання тканин з набуттям характерного кремового кольору, з подальшим гниттям та утворенням порожнин. Далі це гниття поширюється і починає утворювати характерний запах рослинного гниття. Ці симптоми можуть варіюватися в різних сортах, але загальна картина захворювання лишається тією ж.



*Рис. 1.4.* Ураження бульби м'якою гниллю

Можливе інфікування шляхом контакту здорових та хворих картоплин, особливо у вологому ґрунті. Це інфікування відбувається, коли патоген потрапляє в здорову бульбу через її сочевички, з подальшим місцевим підгниванням. Якщо температура вище 15°C, ці місцеві осередки можуть стати джерелами поширення хвороби.

Різні патогени, які викликають м'яку гниль та чорну ніжку, мають різну контагіозність, що визначає перебіг хвороби і потенціал перетікання її латентної

форми в активну. Менш стійкі сорти можуть заражатися навіть невірулентними штамми, тоді як більш стійкі – високовірулентними.

Після потрапляння невірулентних штамів патогенів, вони можуть накопичуватися і набувати хвороботворних властивостей, що може викликати захворювання там, де його перебіг був латентним. В купі з відсутністю сівозміни та тривалим вирощуванням одного сорту в одному місці, це може викликати спалахи захворювання [65].

### 1.2.3. *Ralstonia solanacearum*

*Ralstonia solanacearum* – другий за поширенням бактеріальний фітопатоген у світі, який викликає буру гниль, і завдає найбільшої шкоди. Ця бактерія уражає понад 310 видів рослин з 42 родин, з втратами від 20 до 100% врожаїв [18]. Попри це, цей патоген загалом не є характерним для України, і останні спалахи бурої гнилі спостерігалися 17 років тому. Однак, кліматичні умови України стають сприятливими для розвитку інфекції, і імпорт потенційно інфікованих рослин та продуктів харчування на їх основі створює ризики потрапляння цієї інфекції в Україну [4].

Усі представники роду *Ralstonia* – це грамнегативні, паличкоподібні, неспороутворюючі аеробні протеобактерії, які є каталазо- та оксидазопозитивними. Їх розмір становить 0,5-0,7 на 1,5-2,0 мкм, і в основному вони знаходяться у воді або ґрунті [27, 42].

Ареалом розповсюдження *R. solanacearum* є тропічні та субтропічні кліматичні зони, з певним поширенням в теплих помірних регіонах. В цих регіонах картоплярство сильно обмежене поширеністю цього патогену.

Цей патоген традиційно розділяють на п'ять так званих “рас” та біотипів, які залежать від регіону їх розповсюдження та метаболічних особливостей. Картоплю уражають перша та третя раси *R. solanacearum* [13].

Перша раса, від першого до четвертого біотипів, загалом уражає значну частину пасльонових, включно з картоплею, і вона є поширеною в тропічних та

субтропічних районах. Третя раса, другий біотип *R. solanacearum* поширена в більш помірних районах, і заражає в основному саме картоплю та томати. Помірні кліматичні умови України створюють підвищений ризик поширення третьої раси *R. solanacearum*.

Перебіг захворювання розпочинається під час цвітіння картоплі і утворення перших бульб, і є дуже швидким – за два-три дні кущ в'яне і його столон та прикореневі частини стебла згнивають. Стебла при цьому можуть лишатися зеленими, але згодом жовтіють.

*R. solanacearum* викликає буру гниль картоплі, яка є судинним захворюванням. Цей патоген заражає рослини через пошкодження на стеблах та коренях, і бульби картоплі через столони. Бактерії розмножуються в основному у ґрунті, де вони виділяють значну кількість бактеріального слизу, який закупорює судини рослини. Це спричиняє зміну їх кольору на коричневий, через що на молодих стеблах проявляються хворі повздовжні смуги. Крім того, темно-коричневі судинні кільця утворюються на поперечному зрізі зараженої рослини, з утворенням бактеріальних виділень. При натисканні на уражені ділянки, з них виділяється слиз коричневого кольору. Ці симптоми є результатом закупорювання судин з подальшим порушенням руху речовин по рослині, що призводить до загибелі рослини.

В бульбах інфекція проявляється як розм'якшення судинних кілець, з набуттям ними характерного бурого кольору. З цих уражених ділянок при натисканні виділяється бурий бактеріальний слиз. Дотичні до судинного кільця тканини також можуть уражатися та гнити, з подальшим потемнінням та гниттям. Зовнішні тканини картоплі при цьому лишаються цілими, та не проявляють слідів зараження.



Рис. 1.5. Рання та пізня стадії ураження бурою гниллю

Також характерним симптомом бурої гнилі, яка відрізняє її від кільцевої гнилі, спричиненої *C. michiganensis* є виділення бактеріального ексудату з вічок та інших відкритих ділянок бульби, що виглядає як налипання грудок землі при викопуванні ураженої бульби з ґрунту.

В молодих рослинах інкубаційний період становить 6 днів, а в дорослих – близько 20 днів. Інкубаційний період та перебіг захворювання залежать від різних характеристик рослини – кліматичних умов, стійкості рослини та її сорту.

*R. solanacearum* поширена в усіх видах ґрунтів, як цілинних, так і сільськогосподарчих. Цей патоген потрапляє в ґрунт з зараженими рослинами, водами або через інший заражений ґрунт, а також патоген може переноситись нематодами. Ця бактерія може накопичуватися в ґрунті через латентну інфекцію кореневої системи картоплі.

Для розвитку *R. solanacearum* оптимальними температурними умовами повітря є 27°C, з мінімумом в 10-12°C, однак за таких низьких температур бактерія розвивається повільно. За температури в 40°C бактерія здатна продовжувати життєдіяльність 5 днів. Третя раса *R. solanacearum* розвивається за температури в 20-24°C. Хоча сам патоген не чутливий до змін вологості ґрунту, посуха або висока вологість можуть послабити рослину, і тим самим сприяти зараженню рослини патогенами.

Усі сорти картоплі сприйнятливі до *R. solanacearum*, але деякі сорти, наприклад, Енержі, Сінгаївка та Королева Анна, мають кращу стійкість до цього патогену [65].

### **1.3. Діагностика бактеріальних захворювань картоплі**

Оскільки бактерії різних таксономічних груп можуть мати подібну морфологію, дослідження морфології не є єдиним методом діагностики. Разом з нею проводять дослідження культуральних особливостей бактерії, їх фізіології та патогенних показників [18].

Першими методами ідентифікації та опису бактеріальних захворювань, як і будь-яких інших захворювань, є неівазивні методи. Це методи спостереження

симптомів, які не включають в себе втручання в об'єкт дослідження, і зазвичай проводяться неозброєним оком. Характерними симптомами можуть бути зав'ядання рослини, гниття її окремих частин, зміна кольору листя та інших частин рослини, зміна їх форми та характеристик, всихання рослини та її частин або утворення певних бактеріальних виділень.

В якості зразків можна відбирати уражені частини рослини – її бульби, стебла, листя й інші частини, які можуть містити патоген. Також можна відбирати ґрунт і воду з місця вирощування рослини.

Рослинні зразки, з яких буде виділятися патоген, спершу промивають чистою водою від ґрунту та бруду, після чого чисту рослину стерилізують розчином етилового спирту чи гіпохлориту натрію. Дезінфекцію гіпохлоритом натрію можна проводити кілька раз, з різними концентраціями розчину. Після цього залишки дезінфектантів змивають дистильованою водою. Рослинні зразки потім кладуть на фільтрувальний папір для підсушування і розрізають на невеликі шматки. Після, ці зразки розтирають в стерильній ступці з дистильованою водою до стану гомогенності. Також можна замочити дрібно нарізаний уражений рослинний матеріал в стерильній воді, в результаті чого буде отримано бактеріальну рідину [23, 27, 28].

Отриману рідину чи гомогенізатор наносять інокуляційною петлею на поживне середовище і інкубують. Склад поживного середовища та параметри інкубації залежать від потенційного захворювання, що визначається симптомами на рослині.

Оскільки при первинному засіванні очікується велика кількість різних колоній, після першої інкубації частину отриманих колоній відбирають та пересівають на свіже поживне середовище, і цей процес повторюють кілька разів до отримання чистої культури [37].

Після отримання чистої бактеріальної культури, її можна ідентифікувати морфо-фізіологічно, імунологічно та молекулярно-генетично.

### *1.3.1. Морфо-фізіологічні методи*

Морфо-фізіологічні характеристики бактерій включають в себе дослідження морфології, фізіології та культуральних властивостей мікроорганізмів.

Морфологічними ознаками є характеристики будови бактерії – їх розмір та форма; наявність, рухливість та розміщення джугитків; здатність до спороутворення; будова клітини тощо.

Найпоширенішими формами будови бактерій є плачикова (бацильна), куляста (кокова), спіральна та нитчаста. Окрім цих, бактерії можуть також мати інші, менш поширені, форми [59].

Рухливість бактерій визначають через пряме спостереження життєдіяльності бактеріальної культури під мікроскопом з достатньо великим збільшенням [37].

#### *Фарбування за Грамом*

Головний первинний тест для ідентифікації бактерії – це фарбування за Грамом, який дозволяє визначити наявність пептидоглікану у бактеріальній клітинній стінці.

В основі методу лежить утримування комплексу генціанфіолетового барвника та йоду пептидогліканом грампозитивних бактерій. Це досягається фіксацією зразку на предметному склі і почерговим фарбуванням зразку генціановим фіолетовим, розчином Люголю та фуксином, з поступовим промиванням спиртом та водою між фарбуваннями і подальшою мікроскопією отриманого зразку.

Грампозитивні бактерії, за умови правильного проведення фарбування за Грамом, набувають синьо-фіолетового забарвлення, оскільки в них клітинні стінки містять до 90% пептидоглікану, який зв'язується з генціанфіолетовим барвником і утримує його. Якщо вміст пептидоглікану в клітинній стінці низький (не більше 10%), то генціанфіолетовий не затримується в стінці, і натомість

бактерії фарбуються фуксином і набувають його рожево-червоного кольору [27, 6].

#### *Культуральні властивості мікроорганізмів*

Культуральні властивості мікроорганізмів – це характеристики їх росту та розвитку в поживних середовищах. Для визначення цих властивостей зразки відбирають та готують до вирощування на певних поживних середовищах, з подальшим спостереженням за ростом колоній та їх описом.

Склад поживного середовища, на якому визначатимуть культуральні особливості, залежить від культури та мети її вирощування. В діагностиці в основному використовують диференційно-діагностичні та селективні середовища, для виділення конкретних бактеріальних культур.

Якщо немає можливості попередньо обмежити коло можливих патогенів, наприклад, через відсутність симптомів або у випадку відбору зразків води та ґрунту, то тоді використовують напівселективні поживні середовища. Ці середовища дозволяють виділити широкий спектр бактерій, однак вони не пригнічують сторонні бактерії і не підтримують усі штами.

Для ідентифікації *R. solanacearum* використовують середовище з вмістом трифенілтетразолій хлориду (ТТС) [27]. Згідно методики Кельмана, середовище для визначення цього патогену має такий склад на 1 літр середовища: 10 г пептону, 1 г гідролізату казеїну, 5 г глюкози, 17 г агар-агару, 5 мл 1% розчину 2,3,5 трифенілтетразолію хлориду. Значення рН середовища має бути в межах 6,7 – 7,3. Всі складові середовища потрібно перемішати в дистильованій воді та стерилізувати в автоклаві. Важливо зауважити, що трифенілтетразолій хлорид додається наприкінці, перед розливом середовища по чашках Петрі [29].

На цьому середовищі патогенні раси *R. solanacearum* утворюють слизисті колонії неправильної, текучої форми кремового кольору і рожевими осередками. Непатогенні раси утворюють округлі, маслянисті колонії з гладкими краями. Ці колонії мають яскраво-червоний колір через утворення формозану на цьому середовищі [30].

### *1.3.2. Біохімічні методи*

Ці методи базуються на якісному та кількісному аналізі біохімічних процесів, які відбуваються в бактеріальних клітинах. Ці методи дозволяють більш точно ідентифікувати конкретні патогени.

#### *КОН тест*

Для цього тесту на скло наносять малу кількість 3% розчину гідроксиду калію, після чого частину вирощеної культури бактерій розмішують в нанесеному лужному розчині.

Цей тест дозволяє швидко визначити якісний вміст пептидоглікану. Грамнегативні бактерії під дією лугу утворюють густу суспензію, яка тягнеться при піднятті її петлею. Грампозитивні бактерії не утворюють такої суспензії [26].

#### *Тест на пектолітичну активність*

Для цього тесту до 80 мл дистильованої води додають 1,5 г натрій поліпектату, 0,5 г дріжджового екстракту, 0,005 г бромтимолового синього та 2 мл 10% розчину кальцій хлориду дигідрату. За потреби, рН доводять до 7,2. Цю суміш автоклавують та охолоджують при кімнатній температурі.

В приготований розчин додають 100 мкл бактеріальної суспензії та інкубують його при температурі в  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  протягом 7 днів. Якщо бактерія здатна розкласти пектин, середовище змінить забарвлення з синього на жовтий [37].

### *Оксидазний тест*

Цей тест проводять шляхом нанесення 5 крапель оксидазного реактиву (1% тетраметил-п-фенілендіамін дигідрохлориду) на фільтрувальний папір з подальшим внесенням бактеріальної культури і їх розтиранням. Якщо протягом 10 секунд зразок набув фіолетового забарвлення, реакція є позитивною [31, 37].

### *Каталазний тест*

Цей тест вказує на здатність досліджуваної бактерії синтезувати каталазу, що розщеплює перекис водню. Його проводять шляхом внесення культури в 3% розчин перекису водню. Якщо бактерія містить каталазу, вона розщеплятиме перекис водню на воду та кисень, який виділятиметься у вигляді бульбашок газу, які можна спостерігати неозброєним оком або під мікроскопом.

### *Тест на виділення кислот*

Цей тест базується на особливостях метаболізму деяких бактерій. Ці бактерії в ході обміну речовин розщеплюють пептон і цукри, які містяться в поживних середовищах, з утворенням стабільних органічних кислот, таких як молочна, оцтова та мурашина кислоти. Це зсонує рН середовища до 4,0-4,5. Для визначення цих змін, середовище аналізують за допомогою хімічних рН-індикаторів. Ці зміни можна спостерігати через хімічні індикатори. Для цього бактерію інкубують в рідкому поживному бульйоні з показником рН 7,0. Після цього, в пробірку з інкубованою культурою додають метиловий червоний. Якщо середовище змінює колір на червоний, це свідчить про окиснення середовища та виділення кислот. Цю реакцію можна проводити з іншими нетоксичними хімічними індикаторами.

### *Тест на виділення сірководню*

Бактерії, які осаджують важкі метали, в ході метаболізму утворюють сірководень, що дозволяє проводити тест на сірководень. Для цього, культуру вносять в пробірки з 3% пептонним поживним середовищем. Також, готують паперові смужки, які вимочені в ацетаті свинцю, і потім висушені. Ці смужки потім вставляють у пробірки без занурення в рідину, фіксують та слідкують за

ними. Якщо бактерії виділяють сірководень, його реакція з ацетатом свинцю зафарбує смужки в чорний колір.

#### *Гідроліз крохмалю*

Якщо бактерії здатні гідролізувати крохмаль, це можна визначити реакцією на йод. Для цього бактеріальну культуру вносять до крохмального агару та інкубують. Після цього на бактеріальні культури наносять розчин Люголя. Якщо крохмаль не гідролізується, він реагує з розчином Люголя з утворенням характерного темно-синього кольору, але якщо гідролізується, то зона з бактеріями лишилась прозорою.

#### *Інокуляційний тест*

Цей тест дозволяє перевірити наявність патогену і його здатність заражати інші рослини. Для цього використовується два методи: ґрунтове замочування та занурення насіння.

Ґрунтове замочування – це метод внесення інкубованої бактеріальної суспензії, отриманої з хворої рослини. Ця суспензія вноситься під кущ картоплі віком в приблизно 30 днів, з контролем у вигляді неінокульованого куща подібної картоплі.

Занурення насіння базується на висаджування вимоченої в бактеріальній суспензії картоплі. Для цього бульбу картоплі з попередньо стерилізованою поверхнею занурюються в бактеріальну рідину чи суспензію на 72 години, після чого висаджують з подальшим спостереженням за проростанням та вегетацією.

У методі замочування використовується бульба картоплі, поверхня якої була попередньо простерилізована. Затим бульби занурювали у бактеріальну суспензію на 72 години, а після того висаджують у горщики для дослідження проростання та вегетації [27].

Окрім вищевказаних тестів, використовується велика кількість інших біохімічних тестів, таких як уреазний тест, казеїновий тест, цитратний тест, тест на розрідження желатину і інші. Ці тести дозволяють більш точно ідентифікувати патогени за детальними і специфічними характеристиками.

### 1.3.3. Імунологічні методи діагностики

Імунологічні, або ж серологічні, методи діагностики засновані на реакції антиген-антитіло, що дозволяє виявляти конкретні патогени без необхідності покладатися на зведення результатів біохімічних тестів. В цих методах діагностики використовується зв'язування антитіл зі специфічними епітопами антигенів. В ході цієї реакції утворюється кон'югат, в який потім додають флуоресцентні мітки, ферменти чи інші реагенти, які дозволяють зафіксувати реакцію.

Специфікою діагностування бактерій є необхідність використання екстракційних буферів з лізоцимом та ЕДТА. Ці сполуки сприяють вивільненню ліпополісахаридів, що посилює взаємодію антигена та антитіла без збільшення фонових показників зв'язування. Для отримання достатньої кількості зразку необхідно інкубувати бактерії на селективному середовищі.

#### *Імуноферментний аналіз (ІФА)*

Метод імуноферментного аналізу (ІФА) базується на взаємодії антитіла, цільового антигену та антитіла, міченого ферментами. Для цього в лунки на спеціальних планшетах наносять антитіло, яке специфічне до цільового антигену. Після цього до кон'югату антитіла та антигену наносять мічені антитіла, які зв'язуються з іншими епітопами антигену. Після цього отриманий імунокомплекс піддають колориметричному аналізу [48].

Нині, серед інших методик, для виявлення бактерій використовується множинний ІФА. Цей метод заснований на одночасній реакції зв'язування кількох ферментних міток в одній лунці. Цей метод використовується для виявлення *C. michiganensis*, *X. Axonopodis* та інших фітопатогенів.

Компанією Agdia, Inc був запропонований метод виявлення більше одного виду бактерій за допомогою множинного ІФА. Такий аналіз передбачає внесення в лунки одразу кількох ферментних міток в одному планшеті. В даний час такий метод використовується для виявлення бактерій *C. michiganensis* і *X. axonopodis* [45].

Компанія Agdia, Inc. розробляє методи множинного ІФА для багатьох видів рослинних фітопатогенів, і виробляє набори для ІФА для таких збудників як *Pectobacterium atrosepticum* (Patro), *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* (Cms), *Ralstonia solanacearum* (Rs) і інших фітопатогенів картоплі [31, 45].

Оскільки ІФА має низьку чутливість до бактеріальних клітин (оптимальна кількість клітин -  $10^5 - 10^6$  КУО/мл), цей метод не придатний для ранньої діагностики захворювання, і використовується для підтвердження діагнозу з вираженими симптомами [33].

#### *1.3.4. Молекулярно-генетичні методи діагностики*

Для того, щоб підтвердити результати інших тестів, використовують молекулярно-генетичні методи діагностики, які базуються на визначенні послідовностей нуклеїнових кислот. Ці методи точні та дозволяють конкретно визначити збудника захворювання. Основним методом молекулярно-генетичної діагностики є полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР), але також існують такі методи, як гібридизаційні масиви, ізотермічна ампліфікація, діагностика на основі CRISPR-Cas, а також РНК і ДНК-секвенування.

##### *Полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР)*

Полімеразно-ланцюгова реакція широко використовується для діагностики багатьох хвороб, в тому числі бактеріозів. Окрім поширеного ПЛР в реальному часі (Real-time PCR), також використовують зворотньо-транскрипційну ПЛР (RT-PCR) та мультиплексну ПЛР у випадку необхідності ідентифікувати кілька патогенів [48].

ПЛР – це високотехнологічний метод досліджень, і не є придатним для дослідження патогенів в польових умовах чи з польових зразків. Чутливість та специфічність методу також залежать від чистоти екстрагованих нуклеїнових кислот, їх концентрації, активності використовуваної полімерази, наявності

інгібіторів та від буферу, в якому проводиться реакція. Окрім того, реакція потребує специфічних праймерів, які ініціюють реплікацію цільової ДНК.

Хоч ПЛР і має високу чутливість та специфічність і є надійним методом діагностики, проте існують фактори, що обмежують широке використання цього методу. ПЛР на пряму залежить від ефективності екстракції нуклеїнової кислоти, її концентрація, наявність інгібіторів, активність полімерази та буфер для проведення реакції. Також для застосування цього методу вимагається розробка специфічних праймерів для ініціації реплікації ДНК. Ці умови унеможливають проведення польового відбору зразків захворювання [21].

#### *Флуоресцентна гібридизація in situ (FISH)*

FISH – метод молекулярної ідентифікації організмів за допомогою гібридних зондів на основі цільових мішеней з РНК чи ДНК-зондами, які потім відслідковуються флуоресцентною мікроскопією.

Для ідентифікації бактеріальних патогенів використовуються РНК-зонди на основі специфічної бактеріальної рибосомальної РНК. Цей метод має високу афінність та специфічність, адже ці зонди зв'язуються з окремими рибосомами [35]. Сам зонд залежить від бактерії, для якої його використовують – для *S. michiganensis* використовують 16S-рРНК-зонди, а для *R. solanacearum* використовують 23S-рРНК-зонди. Далі, ці зонди аналізують методом імуофлуоресценції, на основі чого і підтверджують результат [23].

#### *Секвенування*

Секвенування – це метод діагностики на основі порівняння послідовностей нуклеїнових кислот зразка та зразків в базах даних. На рівні з ПЛР, цей метод є високоточним та надійним, але також вимагає високотехнологічного обладнання.

Станом на 2025 рік, найпоширенішим є секвенування за Сангером, яке використовується для діагностики рослинних патогенів. Для цього секвенування використовують секвенатори 2-го та 3-го покоління.

Цей метод секвенування генерує считування послідовностей довжиною в близько 1000 пар нуклеотидів. Пропускна здатність секвенування за Сангером

залежить від покоління секвенатору – третє покоління секвенаторів генерує довгі послідовності, але має низьку пропускну здатність, коли як секвенатори другого покоління створюють зчитування в 100-300 пн, але з високою пропускнуою здатністю [48].

Оскільки в бактерій однією з найбільш специфічних послідовностей є 16S-rРНК, вона використовується в секвенуванні бактеріального геному. Кожен вид бактерії містить гіперваріабельну послідовність цієї РНК, і вона мутує мінімально. Це робить цю ділянку найкращою для ефективного секвенування і діагностики.

Ген 16S-rРНК має довжину в 1500 пн та складається з дев'яти гіперваріабельних ділянок, від V1 до V9, що розділені дев'ятьма висококонсервативними ділянками. Команда Б. Янга в 2016 році [49] провела оцінку субрегіонів 16S-rРНК на предмет чутливості до ідентифікації і дійшла висновку, що ділянки V4-V6 є найоптимальнішими для ідентифікації бактерій [17].

Для проведення цього аналізу необхідно виростити та ізолювати достатню кількість бактерії, яку будуть ідентифікувати, та виділити з вирощеного ізоляту ДНК. Після виділення, цільову ДНК ампліфікують через полімеразно-ланцюгову реакцію. Потім, цю ДНК піддають електрофорезу в агарозному гелі, для підтвердження виділення цільового фрагменту. Отриману цільову ДНК секвенують, і продукти реакцій повторно аналізують через електрофорез, після чого невідому послідовність порівнюють з базами даних. Існують різні комерційні набори для проведення секвенування, які спрощують секвенування, а також можливо розробити нові, індивідуальні протоколи секвенування [38].

## **РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження**

### **2.1. Відбір зразків з уражених рослин**

Зразки картоплі із симптомами ураження бактеріальними фітопатогенами було відібрано в стаціонарних ділянках фермерських господарств у Вишгородському районі Київської області, а також в Шепетівському районі Хмельницької області та Рівненському районі Рівненської області. Було обстежено 3 господарчі ділянки, з яких відібрали по 5 зразків на господарство. Ці зразки було упаковано в пакети та перенесено в лабораторію для подальшого виділення та ідентифікації патогенів. По отриманню, зразки було промито водопровідною водою 5 хвилин і очищено від ґрунту та бруду, після чого поверхню стерилізували 2% розчином гіпохлориту натрію. Наостанок, зразки тричі промили стерильною дистильованою водою.

### **2.2. Виділення бактерій в чисту культуру**

Для виділення бактеріальних збудників, було приготовано поживне середовище на основі картопляного агару. Для приготування 200 г добре помитої, очищеної та здорової картоплі подрібнили, залили 1 л водопровідної води та прокип'ятили протягом 15 хв. Отриманий відвар було профільтровано ватно-марлевым фільтром, додано 0,2% натрій хлориду, 2% агару та доведено до початкового об'єму водопровідною водою. Агар довели до повного розчинення нагрівання середовища та профільтрували ще раз. Значення рН довели до 7,0. Середовище простерилізували в автоклаві за 121°C та 1 атм, протягом 30 хв. Після стерилізації, поживне середовище було розлито в стерильні чашки Петрі в полум'ї пальника та під ламінарним потоком повітря, після чого чашки закрито та відправлено на охолодження. Також було приготовано гомогенізатор з інфікованих зразків. Для цього, ділянки рослинної тканини на межі ураженої та здорової вирізали попередньо фламбованим скальпелем. Ці ділянки протягом 20 хв промивали проточною водою, а потім кілька разів промили стерильною водою і помістили в чашки Петрі. Біля полум'я пальника ці промиті зразки розтерли в попередньо простерилізованій ступці з додаванням стерильної води, та довели

до стану однорідної маси. Після цього, краплю суспензії було внесено до чашки Петрі з твердою платівкою поживного середовища КА, приготованого раніше, і засіяно методом виснажуючого штриха від одного краю чашки Петрі до іншого. Засіяні чашки Петрі перевернули, щоб уникнути накопичення конденсату, і помістили в термостат за температури 26 – 28°C. Чашки Петрі щодня, протягом 5 діб, перевіряли на предмет розвитку бактеріальних колоній та, за їх наявності, перенесли ці колонії в пробірки на скошений картопляний агар того самого складу з метою подальшого визначення їх патогенних, морфо-фізіологічних, культуральних та біохімічних показників.

### 2.3. Тест збудників на патогенність

Патогенність збудників визначали шляхом внесення бактеріальних культур в здорові бульби картоплі. Для цього їх було промито проточною водою і згодом дезінфіковано 70% розчином етанолу. Бактеріальні культури, патогенність яких потрібно було визначити, вирощували в поживному бульйоні LB (склад: 10 г/л пептону, 5 г/л дріжджового екстракту, 10 г/л хлориду натрію, рН=7,5-8,0) протягом ночі. В здорові бульби ввели по 1 мл бактеріальної рідини, а також відібрали бульби для негативного контролю, в які ввели 1 мл стерильної води. Ці бульби було перенесено у поліетиленові пакети і поміщено у вологе середовище за кімнатної температури на 2-5 днів для розвитку патогену.

Також патогенність перевірили шляхом інокуляції здорових бульб через поранення. Для цього в бульбі піпеткою зробили отвір глибиною в 1 см. Після цього утворену рану інокулювали бактеріальною рідиною і закупорили вазеліном. Ці інокульовані бульби помістили в поліетиленові пакети і зберігали у вологих умовах за кімнатної температури протягом 2-5 днів для розвитку патогену [26].

### 2.4. Тест на пектолітичну активність

Патогени, що викликають м'які гнилі рослин, такі як *P. atrosepticum*, мають пектолітичні ферменти, які викликають пом'якшення рослинних тканин. Активність цих ферментів можна визначити завдяки спостереженню за

швидкістю мацерації тканин картоплі. Для цього, промиті в стерильній і проточній воді, а потім дезінфіковані 96% спиртом бульби очистили і нарізали на скибочки розмірами в  $15 \times 15 \times 10$  мм стерильним скальпелем, після чого помістили ці скибки в чашки Петрі. Також з фільтрувального паперу вирізали паперові диски діаметром в 30 мм, стерилізували їх та замочили в бактеріальній культурі з концентрацією клітин в  $1 \times 10^8$  КУО/мл на 10 хв. Потім ці диски помістили на скибки картоплі та поставили на інкубацію за температур в 20, 25 і 30°C впродовж 2-3 днів, разом з негативним контролем у вигляді стерильної води. Потім ступінь розм'якшення визначали за дотиком петлею. Чим активніша культура, тим швидше рослинна тканина втрачала структурну цілісність.

### 2.5. Тест на гіперчутливість

Для визначення агресивності отриманих ізолятів бактерій, було проведено тест гіперчутливої реакції (ГЧР) на основі бактеріальної інокуляції тютюну (*Nicotiana tabacum*). Для цього чотири кущі тютюну сорту Самсун посадили в теплиці на автоклавований ґрунт і вирощували за температури близько 20°C з регулярним поливом. Для інокуляції приготували бактеріальну рідину на основі рідкого поживного середовища. Після інкубації в поживному середовищі бактерії осадили центрифугуванням і, користуючись спектрофотометрією, довели концентрацію бактеріальних клітин до  $OD_{600} = 0,1$  ( $\sim 10^8$  КУО/мл). Інокуляти різних ізолятів потім внесли в розгорнуті листки 55-денних рослин за допомогою стерильних шприців [30]. Також було підготовано стерильну воду для негативного контролю та стандартний штам *Pectobacterium carotovorum* в якості позитивного контролю. Кожен інокулят на основі ізолятів було внесено на два листки кожної з чотирьох рослин. Позитивні результати проявлялись як некроз та пожовтіння інфікованого листя в точках внесення патогенів, з контролем цих заражених рослин кожен день протягом двох тижнів.

## 2.6. Визначення морфологічних та біохімічних ознак

*Дослідження фенотипових характеристик.* Ізольовані патогени було досліджено на предмет форми клітин та наявності спор за допомогою виготовлення препаратів мікроорганізмів та *світлової мікроскопії*.

*Фарбування за Грамом.* Для визначення типу клітинної стінки було проведено фарбування за Грамом згідно протоколу, доданого до набору для фарбування. Було приготовано мазки добових культур бактерій, які термічно зафіксували над полум'ям пальника. Потім на ці фіксовані зразки нанесли розчин генціанфіолету і витримували його протягом 2-3 хвилин. Після цього додатково нанесли розчин Люголя, який теж витримували 2-3 хвилини і змили спочатку водою, а потім розчином етанолу для деколоризації. Після цього нанесли розчин фуксину для контрастування, який змили водою. Зразки висушили та помістили під оптичний мікроскоп зі збільшенням в  $\times 90$  та з використанням імерсійної олії. Окрім визначення вмісту пептидоглікану, отримані пофарбовані зразки було використано для доповнення морфологічної ідентифікації патогенів, оскільки фарбування дозволило краще визначити форму, розміри та прозорість бактерій. Також було проведено ідентифікацію за характеристиками колоній, такими як розмір, форма, колір, вигляд країв колоній тощо.

*Тест на каталазу.* Каталазну активність визначили за виділенням  $O_2$  після додавання 1 мл 1,5% розчину перекису водню до молодих колоній, які виростили на поживному середовищі на основі дріжджового екстракту. Через п'ять хвилин, бактерії з високою каталазною активністю почали виділяти бульбашки кисню, що є позитивною реакцією на тест. Відповідно, каталазонегативні колонії не виділяли видимих бульбашок кисню [23].

*Тест на оксидазу.* Тест на активність цитохромоксидази проводили за допомогою диметил-п-фенілендіаміну виробництва компанії Sigma-Aldrich. Для цього тесту, диски з фільтрувального паперу вимочили в реактиві, потім змочили їх стерильною водою та, в асептичних умовах, нанесли на них невелику кількість бактеріальної культури. Після цього, протягом трьох хвилин, на дисках, де були бактерії з високою активністю цитохромоксидази, спостерігали зміну

забарвлення диску з темно-синього на темно-червоний, що свідчило про позитивну реакцію. Там, де зміни кольору не було, реакція була негативна [31].

*КОН тест.* Окрім фарбування за Грамом, для визначення вмісту пептидогліканів було проведено тест гідроксидом калію. Для цього, на предметні скельця нанесли кілька мілілітрів 3% розчину гідроксиду калію. Потім, на кожне скельце нанесли колонію виділених патогенів. Грамнегативні бактерії утворили густу масу, яка тягнулась при піднятті краплі суспензії, а грампозитивні колонії не піддалися дії лугу. Це співпало з результатами фарбування за Грамом.

*КОН тест.* На предметне скло наносили кілька крапель 3% КОН. Потім петлею брали частину культури і розмішували у приготовленому лузі. У випадку грамнегативних бактерій відбувалося утворення густої суспензії та мукоїдної нитки при піднятті петлі. У грампозитивних бактерій такої реакції не відбувалося [26, 44].

*Тест на виділення кислот.* Для визначення змін рН середовища, які відбуваються в ході метаболізму деяких бактерій, які розщепляють цукри та пептон з утворенням органічних кислот, середовище аналізують за допомогою хімічних рН-індикаторів. Було використано культури, які виростили в пробірках на середовищі Кларка, яке складається з 5г/л пептону, 5 г/л гідроортофосфату калію та 5 г/л глюкози, з рН доведеним до 7,0. В ці пробірки потім додали 2-3 краплі метилового червоного, який слугував індикатором. Потім спостерігали зміну забарвлення – утворення червоного або рожевого забарвлення свідчило про зниження рН до 2,5-5,0; утворення світло-рожевого та помаранчевого забарвлення – про зниження рН до 5,2-5,5; відсутність зміни забарвлення зі звичайного жовтого свідчила про рН 6,0-7,0 [33].

*Тест на гідроліз желатину.* Цей тест засновано на діяльності позаклітинних бактеріальних протеаз, які здатні частково або повністю розщеплювати желатин. Для цього тесту приготували поживне середовище на основі желатину, який складається з 2 г/100мл м'ясо-пептонного бульйону та 6-15 г/100 мл желатину, де кількість желатину визначає швидкість отримання результату. Це середовище потім автоклаували 20 хв за 0,5 атм. Це середовище

залили в пробірки та уколом засіяли туди культури бактерій. Посіяні культури інкубували у термостаті за температури 37°C протягом 1-7 діб, за потреби – 14 діб. Окрім того, інкубували також негативний контроль. Після завершення інкубації пробірки переносять в холодильник для застигання желатину. Якщо бактерії здатні гідролізувати желатин, то після охолодження пробірки середовище буде рідким. В негативному контролі, а також в культурах, які не гідролізують желатин, середовище застигає та не витікає при перевертанні пробірок [10].

*Тест на утворення сірководню.* Цей тест використовують для визначення здатності бактерій до утворення сірководню. Для цього їх вирощують на середовищах з цистеїном, метіоніном та цистином, а також сульфатами і тіосульфатами. Для індикації використовують сполуки заліза чи свинцю, сульфіді яких утворюють темно-коричневий осад. Бактеріальні культури посіяли на поживне середовище, яке містить 10 г/л м'ясо-пептонного бульйону, 10 г/л пептону, 2 г/л кальцій хлориду, 2 г/л дріжджового екстракту, додані до дистильованої води. Це середовище перед посівом розлили в пробірки по 8 мл та автоклаували 20 хв при 0,5 атм. Після посіву, над кожною пробіркою повісили смужки, просякнуті ацетатом свинцю. Одночасно з цим, повісили індикаторні смужки на індол, які просякнуті 20% розчином ацетату свинцю з додаванням 2 мл крижаної оцтової кислоти. Ці смужки просочувались 15 хв. Посіяні пробірки зі смужками інкубували в термостаті за температури 37°C протягом 24 год. В зразках, які виділяли сірководень, спостерігалось почорніння смужок з нижнього краю, що є позитивною реакцією [3].

*Тест на антибіотикорезистентність.* Цей тест визначає чутливість бактерій до антибіотиків. Для цього тесту використовуються диски, просякнуті антибіотиками. Для тесту приготували чашки Петрі з картопляним агаром, в які помістили просякнуті еритроміцином та спектиноміцином диски. Потім, ці чашки Петрі засіяли отриманими ізолятами та бактеріальним консорціумом та відправили на інкубацію за температури 37°C протягом 24 годин. Далі спостерігали затримку росту колоній навколо дисків. Якщо ріст затримався на 15

мм порівняно з рештою колоній – бактерія слабо чутлива до антибіотиків, якщо на 15-24 мм – чутлива, якщо на 25 мм і більше – дуже чутлива. Відсутність пригнічення росту свідчить про резистентність до цих антибіотиків [44].

## 2.7. Молекулярно-генетичний аналіз ізолятів

Для проведення молекулярно-генетичних досліджень необхідно виділити чисту ДНК бактерії. Для цього використовують метод розділення фаз. Для виділення ДНК за цим методом було зроблено по 1 мл бактеріальної суспензії, які потім осаджували в центрифугі 2 хв із силою обертання в 13 000 g. Після видалення надосадової рідини осаджені бактерії двічі промили 400 мкл буферу STE (склад: 100 мМ хлориду натрію, 10 мМ Tris/HCl, 1 мМ ЕДТА, рН – 8,0). Після цього в пробірки додали 100 мл тринасиченого фенолу з рН 8,0, і ретельно перемішали вихровою мішалкою протягом хвилини для лізису бактерій. Потім ці зразки знову центрифугували протягом 5 хвилин при 4°C та 13 000 g. для відокремлення водної та органічної фаз. Верхню водну фазу відібрали та перенесли в чисто 1,5 мл пробірку, після чого в неї додали 40 мл буферу TE до об'єму, щоб довести об'єм суміші до 200 мл. До суміші додали 100 мл хлороформу та центрифугували при 13 000 g та 4°C протягом 5 хв. Отриманий лізат очистили екстракцією хлороформом, з повторенням процедури тричі. Потім до нього додали 40 мл буферу TE та 5 мл РНКазі. Потім суміш 10 хв інкубували при 37°C для розщеплення РНК. Далі в суміш додали 100 мл хлороформу, розмішали та центрифугували при 13 000 g та 4°C протягом 5 хв. Отриману водну фазу з очищеною ДНК перенесли в пробірку об'ємом 1,5 мл та відправили на зберігання при -20°C.

Чистоту та кількість отриманої ДНК оцінили за допомогою спектрофотометра шляхом розрахунку співвідношення A260 до A280, а значення A260, яке показало концентрацію ДНК та кількість домішок білка [9].

Отримані молекули ДНК були використані для проведення полімеразно-ланцюгової реакції з метою ідентифікації та визначення виділених ізолятів. У випадку

Виділену ДНК було використано для проведення полімеразно ланцюгової реакції для підтвердження видової приналежності виділених ізолятів. У випадку бактерій роду *Erwinia*, цільовим фрагментом ДНК був ген *pelY*, довжиною в 434 пар нуклеотидів. Цей ген потім ампліфікували за допомогою генетичних праймерів Y1 (5'TAACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT3') та Y2 (5'CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT3') [47].

ПЛР проводилась в 25 мкл реакційної суміші, що складалась з Taq 2X Master зі стандартним буфером виробництва New England Biolabs, 0,2 мкМ кожного праймеру та 2 мкл ДНК-шаблону 5 мкг/мкл. Реакція ампліфікації проходила в автоматизованому термоциклері

ПЛР проводили в 25 мкл реакційної суміші, що містила: Один Taq 2X Master зі стандартним буфером (New England, Biolabs), 0,2 мкМ кожного праймера і 2 мкл шаблону ДНК з концентрацією 5 мкг/мкл. Ампліфікацію проводили в автоматизованому термоциклері марки Eppendorf AG. На термоциклері було встановлено такі параметри: цикл денатурації протягом 3 хв при 94°C, потім 35 циклів денатурації при 94°C протягом 30 с, потім 30 с відпалу при специфічній для кожного праймера температурі та 30 с пролонгації при 72°C. Наостанок провели елонгацію протягом 5 хв при 72°C.

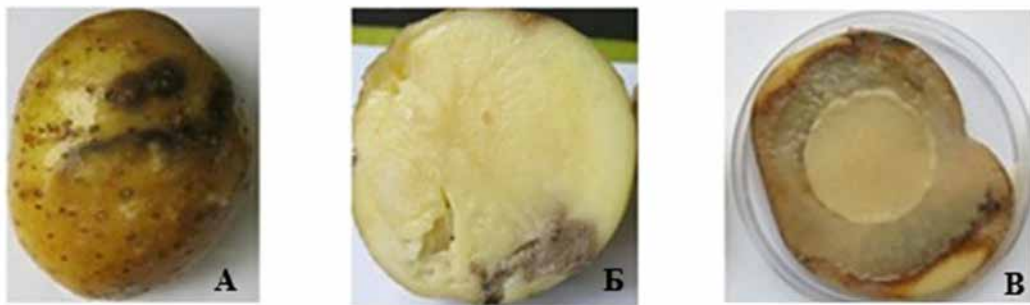
Потім отримані продукти ПЛР розділили електрофорезом в 1% агарозному гелі з буфером трис-ацетат-ЕДТА, який було забарвлено 0,5 мкг/мл броміду етидію.

## РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення

### 3.1. Визначення патогенності виділених бактерій

В ході виділення патогенів з відібраних зразків картоплі, було відібрано та визначено 4 культури, які є потенційно патогенними, до ідентифікації їх було умовно позначено як StI, StII, StIII та StIV. В першу чергу, було проведено тести на патогенність, пектолітичну активність та надчутливість.

Тести на патогенність показали, що культури StI, StII та StIII здатні інфікувати бульби картоплі (Рис. 3.1.1. та таблиця 3.2.2.), з розвитком симптомів протягом 1-3 днів після інокуляції. На заражених бульбах було зафіксовано круглі та вологі плями, які збільшувались у вологих умовах, що з часом призвело до гниття бульби.



*Рис. 3.1.1.* Результати тестів на патогенність (А, Б) та пектолітичну активність (В) виділених ізолятів.

StI, StII та StIII також проявили позитивні результати в тестах на пектолітичну активність, з явною мацерацією заражених скибок картоплі (Рис. 3.1.1. та таблиця 3.2.2.). На більшості картопляних скибок утворились набряки навколо дисків, і в деяких вони набували чорного забарвлення. За умов високої вологості тканини ще сильніше розм'якали та гнили, і виділяли характерний неприємний запах.

Пектолітична активність сильно залежала від температури інкубації, і проявлялася неоднорідно. За температури інкубування в 20°C мацерація була повільною та неінтенсивною, тим часом як за температури в 25°C та 30°C мацерація відбувалась швидко.



Рис. 3.1.2. Пектолітична активність виділених патогенів за різних температур:  
А - 20°C; Б - 25°C; В - 30°C.

Культури StI, StII та StIII в ході тесту на гіперчутливість також показали реакцію на інфікованому тютюновому листі, що свідчить про потенційну агресивність та вірулентність цих культур, оскільки гіперчутлива реакція є захисним механізмом рослин для запобігання подальшому зараженню рослини. Цей механізм характеризується швидкою загибеллю клітин, які оточують точку проникнення патогену, що запобігає їх поширенню [43]. Згідно досліджень, тютюн та інші рослини-господарі мають реакцію надчутливості на більшість фітопатогенних бактерій, що використовується в скринінгу.

Повідомляється, що більшість патогенних бактерій викликають реакцію надчутливості у листках тютюну або інших рослин-господарів, і це часто використовується як метод попереднього скринінгу в аналізах вірулентності [24]. У фітопатогенних бактерій гени патогенності та гіперчутливості *hrp* приймають участь в індукції одночасно розвитку інфекційних процесів, так і в індукції гіперчутливості в рослин, навіть в мутантних за цим геном штаммах, які не викликають симптоми в сприйнятливих рослинах. Тому реакція гіперчутливості дозволяє досліджувати ізоляти методом інокуляції [5].



*Рис. 3.1.3.* Реакція надчутливості в інфікованому отриманими ізолятами листі тютюну: А — неінфіковане листя; Б — негативний контроль (стерильна вода); В, Г, Д — Реакція надчутливості на листах тютюну, інфікованого ізолятами StI, StII та StIII.

Тести на пектолітичну активність, патогенність та надчутливість показали, що культури StI, StII та StIII, виділені із заражених зразків, проявили ознаки патогенності на всіх проведених тестах – вони здатні інфікувати інші рослини через інокуляцію, проявляють виражену пектолітичну активність, особливо за температур в 25°C та 30°C, і при інокуляції кущів тютюну спричиняють реакції гіперчутливості.

### **3.2. Морфо-фізіологічні та біохімічні показники бактеріальних ізолятів**

Відібрані патогени піддали багатьом біохімічним аналізам, а також було проведено огляд морфології вирощених колоній, фарбування за Грамом з подальшим оглядом морфології бактеріальних клітин. Окрім того, було проведено тести з метиловим червоним, каталазні тести, тести на гідроліз желатину, тест на гідроксид калію та тест на сірководень.

Огляд морфології вирощених колоній показав утворення опуклих, слизистих, жовто- або кремово-білих колоній (табл. 3.2.1., рис. 3.2.1.). Фарбування за Грамом показало рожеве забарвлення отриманих бактерій, що свідчить про їх грамнегативність. Максимальний ріст було зафіксовано за температури 37°C після 48 годин інкубування. Значення OD при 620 нм склало 1,627-1,733 у всіх ізолятів.

**Таблиця 3.2.1.**

### Морфологічні характеристики вирощених культур

№ штаму	Колір колоній	Текстура колоній
StI	Жовто-білий	Глянцеві, випуклі
StII	Жовто-білий	Глянцеві, випуклі
StIII	Жовто-білий	Глянцеві, випуклі
StIV	Кремове-білий	Глянцеві

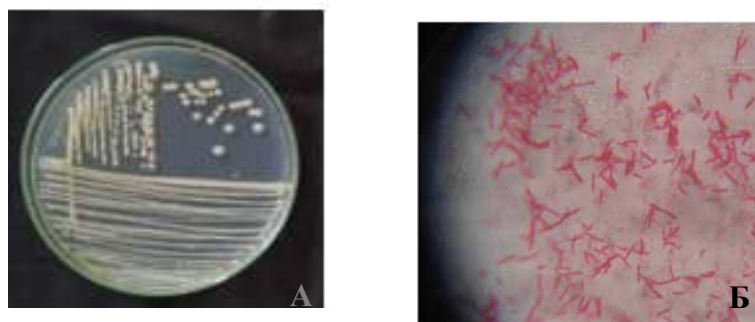


Рис. 3.2.1. Морфологічні особливості виділених культур: А — колонії при культивуванні на картопляному агарі; Б — пофарбовані за Грамом бактерії (грамнегативні).

Тести біохімічних показників вказують, що ізоляти StI, StII та StIII показали позитивну реакцію на метиловий червоний, активний ріст за температури в 36-37°C, виділяли сірководень, гідролізували желатин, позитивно пройшли тест на каталазу, калію гідроксид та пектолітичну активність. Згідно дослідженням Де Бура та Кельмана, проведеним в 2001 році [12], вищевказані результати, а також оптимальна температура росту в 37°C, співпадають з результатами ідентифікації *Pectobacterium* та *P. carotovorum*, що свідчить про те, що ізоляти StI, StII та StIII належать до роду *Pectobacterium*.

Також було проведено тести на антибіотикорезистентність до еритроміцину та стрептоміцину. Ці тести показали, що навколо диску зі стрептоміцином була наявна зона пригнічення, коли як навколо диску з еритроміцином такої зони не було. Це вказує на стійкість до еритроміцину та чутливість до стрептоміцину. Згідно досліджень Акбар та ін. [8], *Pectobacterium*

*carotovorum* проявляють стійкість до еритроміцину, але чутливі до стрептоміцину, що підкріплює результати вищевказаних досліджень.

Ізоляти StIV, в свою чергу, не проявили реакцій на гідроксид калію, каталазу, виділення кислот чи гідроліз желатину. Ці бактерії, однак утворювали сірководень, активно росли при 36-37°C та проявили чутливість до еритроміцину і стійкість до стрептоміцину.

**Таблиця 3.2.2.**

**Результати біохімічних тестів отриманих культур**

№	Біохімічний тест	StI	StII	StIII	StIV
1.	Фарбування за Грамом	-	-	-	-
2.	Утворення сірководню	+	+	+	+
3.	Каталазний тест	+	+	+	-
4.	Оксидазний тест	-	-	-	-
5.	Тест на гідроксид калію	+	+	+	-
6.	Гідроліз желатину	+	+	+	-
7.	Ріст при 36-37°C	+	+	+	+
8.	Пектолітична активність	+	+	+	+
9.	Тест на виділення кислот	+	+	+	-
10.	Чутливість до еритроміцину	-	-	-	+
11.	Чутливість до стрептоміцину	+	+	+	-

Вищевказані результати біохімічних тестів співпадають з результатами досліджень Рахмана та ін. [8], а також Рагаві та ін. [34]. Команда Мутурі [26] виявила, що цей патоген здатен руйнувати клітинні стінки рослин внаслідок пектолітичної активності.

Відповідно, 3 з 4 виділених культур сформували жовто-білі випуклі колонії, виявилися грамнегативними бацилами, що проявляють позитивну реакцію на метиловий червоний, гідроксид калію та каталазу, ростуть при 36-

37°C, виділяють сірководень, гідролізують желатин, мають пектолітичну активність та виявили чутливість до стрептоміцину при стійкості до еритроміцину. Відповідно до досліджень, культури StI, StII та StIII повинні належати до фітопатогенів роду *Pectobacterium*.

### 3.3. Молекулярно-генетичний аналіз виділених ізолятів

В ході попередніх досліджень ізолятів на їх патогенність, пектолітичну активність, гіперчутливість до них в тютюну та їх морфо-фізіологічних та біохімічних показників, було припущено, що StI, StII та StIII є бактеріями роду *Pectobacterium*.

Для підтвердження цих припущень та визначення конкретної приналежності патогенів було проведено ампліфікацію послідовності гена *pelY* через полімеразно-ланцюгову реакцію. Цей консервативний ген, який кодує синтез пектат-ліази і є характерним для бактерій роду *Pectobacterium*. Позитивний контроль було зроблено на основі ДНК стандартного штаму *P. carotovorum*, а негативний контроль – на основі ДНК стандартного штаму *E. chrysanthemi*, які не синтезують пектат-ліазу.

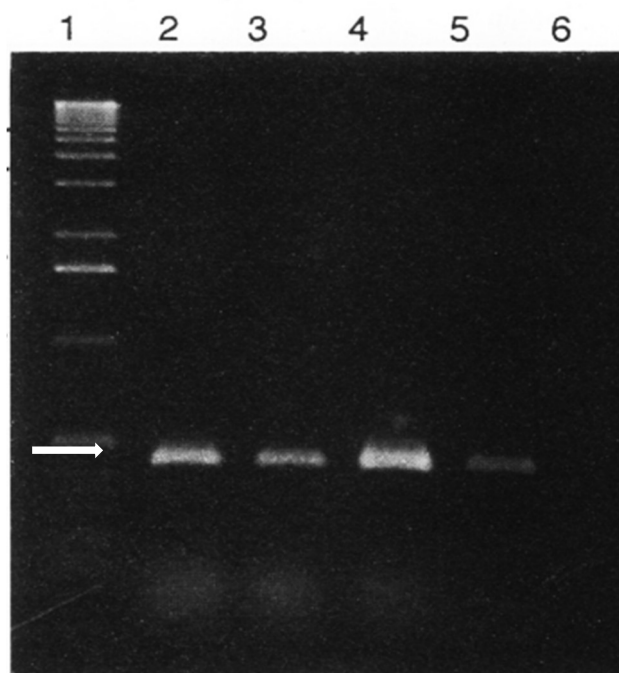


Рис. 3.3.1. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних культур (стрілкою вказано фрагмент довжиною 434 пн): 1 –

ДНК маркер; 2-4 – ДНК досліджуваних культур; 5 – позитивний контроль; 6 – негативний контроль.

Згідно результатам електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК, ізоляти бактерій містили ділянку ДНК довжиною в 434 пари нуклеотидів, що співпадало з довжиною гену *pelY*, що співпало з показниками позитивного та негативного контролю.

Враховуючи використання специфічних праймерів, результати дозволяють стверджувати, що ізоляти StI, StII та StIII належать до роду *Pectobacterium*, імовірно за все – *P. Carotovorum*.

## ВИСНОВКИ

1. Доведено, що ізоляти бактерій StI, StII та StIII, що були виділені із заражених зразків картоплі, проявляють патогенність та, зокрема, спричиняють розвиток бактеріального захворювання на інокульованих бульбах картоплі, проявляють пектолітичну активність на скибках картоплі, з найвищою активністю при інкубуванні за температури в 25 та 30°C, а також викликають реакцію надчутливості у кущів тютюну після їх інокуляції суспензіями досліджуваних бактеріальних ізолятів. Ізолят StIV не проявляє ознак патогенності, отже не належить до збудників бактеріозів *Solanum tuberosum*.

2. Визначено, що ізоляти StI, StII та StIII формували жовто-білі випуклі колонії, є грамнегативними та проявили позитивні реакції на метиловий червоний, тест на каталазу, тест на КОН і тест на пектолітичну активність, росли при 36-37°C, виділяли сірководень, гідролізували желатин, та негативно реагували за Грамом, проявили стійкість до еритроміцину та чутливість до стрептоміцину. Такі результати дали можливість припустити, що дані ізоляти належать до фітопатогенів роду *Pectobacterium*.

3. В результаті ампліфікації ДНК зі специфічними праймерами для послідовності гена *pelY* виявили, що отримані ізоляти бактерій (StI, StII та StIII) належать до роду *Pectobacterium*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria / Umesha S. et al. // *Journal of Microbiological Methods*. 2008. Vol. 72, № 1. P. 95-97.
2. Bacterial diseases of potato / Charkowski A. et al. *The Potato Crop*. Cham. 2020. P. 351–388. URL: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_10)
3. Biochemical methods for the detection of *Erwinia carotovora var carotovora* from onion seeds / Sendhilvel V. et al. // *Madras Agricultural Journal*. 2005. Vol. 92 P. 234- 237.
4. Biotechnological approaches to increase the bacterial and fungal disease resistance in potato / Kvasko O. et al. *The Open Agriculture Journal*. 2022. Vol. 16, № 1. URL: <https://doi.org/10.2174/18743315-v16-e2210070>
5. Boucher C., Genin S., Arlat M. Current concepts on the pathogenicity of phytopathogenic bacteria. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III: Sciences de La Vie*. 2001. Vol. 324, № 10. P. 915–922.
6. Brucker M. Gram staining a useful laboratory technique. *Journal of Nurse-Midwifery*. 1986. Vol. 31, № 3. P. 156–158. URL: [https://doi.org/10.1016/0091-2182\(86\)90154-0](https://doi.org/10.1016/0091-2182(86)90154-0)
7. Characterization and identification of soft rot bacterial pathogens in Bangladeshi potatoes / Rahman M.M. et al. // *African journal of microbiology research*. 2012. Vol. 6, № 7. P. 1437-1445.
8. Characterization of the causal organism of soft rot of tomatoes and other vegetables and evaluation of its most aggressive isolates / Akbar A. et al. *American Journal of Plant Sciences*. 2015. Vol. 6, № 4. P. 511.
9. Cheng H.-R., Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology letters*. 2006. Vol. 28, № 1. P. 55–59.
10. Clarke S.K.R. A simplified plate method for detecting gelatinliquefying bacteria. *Journal of clinical pathology*. 1953. Vol. 6, № 3. P. 246–248.

11. Crops and livestock products / Food and Agriculture Organization of the United Nations : веб-сайт URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
12. De Boer S. and Kelman A. Gram-negative bacteria. Erwinia Soft Rot Group in *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* by N. W. Schaad et al. APS, St. Paul, Minnesota, 2001. Vol. 3. P. 56-72.
13. Denny T. Plant pathogenic *Ralstonia* species. *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht. 2006. P. 573–644. URL: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_16)
14. Detecting pathogenic bacterial wilt disease of potato using biochemical markers and evaluate resistant in some cultivars / Khairy A. M. et al. *Saudi journal of biological sciences*. 2021. Vol. 28, № 9. P. 5193–5203. URL: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.045>
15. Detection of the bacterial potato pathogens *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. using conventional and real-time PCR / Humphris S. N. et al. *Plant Pathology*. New York. 2015. P. 1–16. URL: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2620-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2620-6_1)
16. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review / Czajkowski R. et al. *Annals of Applied Biology*. 2014. Vol. 166, № 1. P. 18–38. URL: <https://doi.org/10.1111/aab.12166>
17. DNA barcoding of phytopathogens for disease diagnostics and bio-surveillance / Choudhary P. et al. *World journal of microbiology and biotechnology*. 2021. Vol. 37, № 3. URL: <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03019-0>
18. Eichenlaub R., Gartemann K.-H., Burger A. *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht, 2006. P. 385–421. URL: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_12)
19. Emerging potato diseases around the world: A global look at old and new threats to the potato crop / Potato News Today : веб-сайт. URL: <https://www.potatonewstoday.com/2025/03/21/emerging-potato-diseases-around-the-world-a-global-look-at-old-and-new-threats-to-the-potato-crop/>

20. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests / European and Mediterranean Plant Protection Organization : веб-сайт. URL: [https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A2\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list)
21. Fang Y., Ramasamy R. Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors*. 2015. Vol. 5, № 3. P. 537–561. URL: <https://doi.org/10.3390/bios5030537>
22. Gilchrist-Saavedra L., Fuentes-Davila G., Martinez-Cano C. Practical guide to the identification of selected diseases of wheat and barley. Mexico : CIMMYT, 1997. P.74.
23. Hayward A.C. Identification of *Pseudomonas solanacearum*. In: SAVERNET Bacterial Wilt Training Course held on October 5 to November 16 AVRDC. 1992.p 101
24. Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene / Poussier S. et al. // *Mol Microbiol*. 2003. Vol. 49, № 4. P. 991-1003.
25. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria / Lopez M. M. et al. *International Microbiology*. 2003. Vol. 6, № 4. P. 233–243. URL: <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0143-y>
26. Isolation and characterization of pectolytic bacterial pathogens infecting potatoes in Nakuru County, Kenya / Muturi P. et al. // *Journal of Applied Microbiology*. 2018. Vol. 124, № 6. P. 1580-1588.
27. Isolation and characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of potato in Konkan region of Maharashtra / Phondekar U. R. et al. *International journal of current microbiology and applied sciences*. 2020. Vol. 9, № 10. P. 136–142. URL: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.910.018>
28. Isolation and identification of endophytic bacteria from potato tissues and their effects as biological control agents against bacterial wilt / Bahmani K. et al. *Physiological and molecular plant pathology*. 2021. Vol. 116. № 6. 101692. URL: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101692>

29. Kelman A. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology*. 1954. Vol. 44, № 12. P. 693–695.
30. Klement Z., Farkas G.L., Lovreicovich L. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*. 1964. Vol. 54. P. 474–477.
31. Kovacs N. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. *Nature*. 1956. Vol. 178, № 4535. P. 703.
32. Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. / National Research Council. 1989. Washington, DC: The National Academies Press. URL: <https://nap.nationalacademies.org/read/1398/chapter/2#3>
33. McDevitt S. Methyl red and voges-proskauer test protocols. *American Society for Microbiology*. 2009.
34. Molecular detection of the causative agent of soft rot (*Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum*) in banana (*Musa sp.*) / Ragavi G. et al. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2019. Vol. 8, № 11. P. 1854 - 1868.
35. Morphological, Pathological, biochemical and molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* isolates in Bangladesh / Razia S. et al. *American Journal of Molecular Biology*. 2021. Vol. 11, № 04. P. 142–164. URL:
36. Moter A., Göbel U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 2000. Vol. 41, № 2. P. 85–112.
37. Nawar H. H., Al-Juboory H. H. Isolation and diagnosis of the bacterium *Pectobacterium Caratovorium*, the causative agent of soft rot disease on potatoes, macroscopically and biochemically. *IOP Conference series: earth and environmental science*. 2023. Vol. 1262, № 3. 032062.
38. Patel J. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular diagnosis*. 2001. Vol. 6, № 4. P. 313–321.

39. *Pectobacterium* and *Dickeya* responsible for potato blackleg disease in New York State in 2016 / Ma X. et al. *Plant Disease*. 2018. Vol. 102, № 9. P. 1834–1840.
40. Potato Test Kits. Agdia : website. URL: <https://orders.agdia.com/potato-test-kits>.
41. *Ralstonia mannitolilytica*, an unusual pathogen in the neonatal intensive care unit: a case of neonatal sepsis and literature review / Lampropoulos P. et al. *Infectious Disorders - Drug Targets*. 2020. Vol. 20.
42. *Ralstonia solanacearum* – A soil borne hidden enemy of plants: Research development in management strategies, their action mechanism and challenges / Wang Z. et al. *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14.
43. Recognition and response in the plant immune system / Nimchuk Z. et al. *Annual Review of Genetics*. 2003. Vol. 37, № 1. P. 579-609.
44. Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. *American Phytopathological society*. 2001. Vol. 3.
45. Tewari S., Sharma S. Molecular techniques for diagnosis of bacterial plant pathogens. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. 2019. P. 481–497.
46. The nutritional value in potatoes / European Food Information Council (EUFIC) : веб-сайт. URL: <https://www.eufic.org/en/healthy-living/article/the-goodness-in-potatoes>
47. Toth I.K., Avrova A.O., Hyman L.J. Rapid identification and differentiation of the soft-rot *Erwinias* by 16S-23S intergenic transcribed spacer PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. Vol. 67. P. 4070-4076
48. Venbrux M., Crauwels S., Rediers H. Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection. *Frontiers in Plant Science*. 2023. Vol. 14.
49. Yang B., Wang Y., Qian P.-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*. 2016. Vol. 17, № 1.

50. Артюх Т., Безсмертна О., Мельник Д. Проблеми та перспективи розвитку ринку картоплі в Україні з врахуванням зональної спеціалізації галузі. *Економіка та суспільство*. 2022. № 39.

51. Ач К. Моніторинг збудників інвазійних хвороб картоплі. *Проблеми збереження біорізноманіття українських Карпат* : Матеріали ІХ регіон. конф. молодих вчен. та студентів із міжнар. Участю. Ужгород, 2016. С. 12.

52. Вербицька О. «Картопляна майстерня» – ми за безпечність! У фокусі якість та безпечність. *Майстерня аграрія*. 2019. № 1. С. 117–119.

53. Державна служба статистики України : вебсайт. URL: <https://www.ukrstat.gov.ua/>

54. До уваги виробників та експортерів картоплі: умови експорту продовольчої картоплі до країн ЄС. Головне управління Держпродспоживслужби в Чернігівській області : вебсайт. URL: <https://dpssc.gov.ua/fitosanitariia-kontrol-u-sferi-nasinnystva-ta-rozsadnystva/aktualna-informatsiia/2926/do-uvahy-vyrobnykiv-ta-eksporteriv-kartopli-umovy-eksportu-prodovolchoi-kartopli-do-krain-yes.html>.

55. Імуноферментний аналіз картоплі / Інститут картоплярства НААН України : веб-сайт. URL: <https://www.ikar.org.ua/проведення-іфа-картоплі>

56. Кернасюк Ю. Глобальний ринок картоплі. *Агробізнес сьогодні*. URL: <https://agro-business.com.ua/agro/ekonomichnyi-hektar/item/24051-hlobalnyi-rynok-kartopli.html>.

57. Кривцова М.В., Ніколайчук М.В. Екологія мікроорганізмів: навч. посіб. Ужгород, 2011. 184 с.

58. Крим І. В., Зея А. Г. Пошук джерел стійкості картоплі до збудника бурої бактеріальної гнилі. *Картоплярство: Міжвідомчий тематичний науковий збірник*. 2019. № 44. С. 100–110.

59. Мікробіологія : підручник у 2 т./ Сергійчук М. Г. та ін. Київ : ФОП Маслаков. 2020. Т. 1. 500 с.

60. Несмачна М. Наскільки Україна забезпечена овочами: посівні площі, експорт, імпорт і сценарії виробництва у 2022 році. Куркуль – онлайн-асистент

фермера : вебсайт. URL: <https://kurkul.com/spetsproekty/1282-ovochi-v-umovah-viyni-planove-virobnitstvo-posivni-ploschi-zalishki>

61. Площі, валові збори та урожайність сільськогосподарських культур за їх видами та по регіонах / Державна служба статистики України : веб-сайт. URL: <https://www.ukrstat.gov.ua>

62. Про карантин рослин : Закон України від 30.06.1993 р. № 3348-XII : станом на 1 травня 2025 року. *Відомості Верховної Ради України*. 1993. № 34. ст.352. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3348-12#n426>

63. Статистичний експорт та імпорт товарів / Державна митна служба України : веб-сайт. URL: <https://customs.gov.ua/statistika-ta-reiestri>

64. Україна рекордно збільшила експорт картоплі у 2023 році, але є неприємний нюанс / East Fruit : веб-сайт. URL: <https://eastfruit.com/uk/novyny/ukrayina-rekordno-zbilshyla-eksport-kartopli-u-2023-rotsi-ale-ye-nepryuemnyu-pyuanis/>

65. Фітопатогенні бактерії. *Бактеріальні хвороби рослин* : монографія у 3 т. / Гвоздяк Р.І. та ін. / за ред. В. П. Патика. Київ : ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. Т. 1. 444 с.

66. “Цей рік не олімпійський, а суперолімпійський”. Найбільший картопляний фермер про дефіцит та зростання цін / Економічна правда : веб-сайт. URL: <https://pravda.com.ua/publications/2024/11/5/721412/>

67. Ціна картоплі зросла в разі і лишиться високою — огляд стану ринку / Куркуль.com: онлайн-асистент фермера : веб-сайт. URL: <https://kurkul.com/spetsproekty/1652-tsina-kartopli-zroslo-v-razi-i-lishitsya-visokoyu--oglyad-stanu-rinku>