

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

ПОГОДЖЕНО
Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології
Юлія КОЛОМІЄЦЬ
“ ” _____ 2025 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
Фізіології, біохімії рослин та
біоенергетики
Світлана ПРИЛУЦЬКА
“ ” _____ 2025 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Моніторинг грибкових захворювань листя та плодів *Quercus robur*
методом ПЛР в межах міста Києва»

Спеціальність G21 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми Освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

д.с.-г.н., професор

(підпис)

Микола ЛІСОВИЙ

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

к. с.-г. наук, доцент

(підпис)

Анна ДАЩЕНКО

Виконала

(підпис)

Софія ЛИТВИНЕНКО

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

**Завідувач кафедри фізіології, біохімії
рослин та біоенергетики**

**д.б.н., професор _____ Світлана
ПРИЛУЦЬКА**

« ____ » _____ 2025 р.

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Литвиненко Софії Анатоліївни

Спеціальність G21 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма “Екологічна біотехнологія та біоенергетика”

Орієнтація освітньої програми Освітньо професійна _____

Тема магістерської кваліфікаційної роботи: «Моніторинг грибкових захворювань листя та плодів *Quercus robur* методом ПЛР в межах міста Києва»

затверджена наказом від «07» листопада 2024 р. № 2005 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 листопада 2025 року.

Вихідні дані: рослинний матеріал *Quercus robur*, відібраний у різних районах Києва з міських парків та зелених насаджень. Експериментальна частина базується на використанні протоколів екстракції ДНК з рослинного матеріалу, стандартних підходів до ПЛР-діагностики грибкових патогенів, а також методів інтерпретації кривих ампліфікації та електроферограм для підтвердження наявності специфічних послідовностей ДНК.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Провести систематичний відбір проб листя та плодів дуба звичайного (*Quercus robur*) у різних районах Києва.
2. Задokumentувати місця та умови відбору проб, враховуючи тип зелених насаджень.
3. Провести початкову оцінку фітопатологічного стану листя та плодів за зовнішніми ознаками.
4. Підготувати рослинний матеріал до молекулярного аналізу та провести виділення ДНК.
5. Оптимізувати умови полімеразної ланцюгової реакції для діагностики грибкових збудників.

6. Провести ПЛР-аналіз для виявлення ДНК грибкових збудників у зразках листя дуба
7. Провести ПЛР-аналіз для виявлення ДНК грибкових збудників у зразках плодів дуоа.
8. Провести порівняльний аналіз частоти інфекції між різними районами міста.
9. Проаналізувати поширеність та структуру грибкових уражень у межах досліджуваних локацій.
10. Визначити просторові закономірності поширення грибкових захворювань дуба в міському середовищі.
11. Узагальнити результати молекулярної діагностики фітопатологічного стану дубових насаджень.
12. Оцінити можливості використання ПЛР як інструменту моніторингу грибкових інфекцій у міських екосистемах.
13. Сформувати науково обґрунтовані висновки щодо поширеності грибних хвороб *Quercus robur* у межах міста Києва.

Дата видачі завдання 02 вересня 2024 року.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

_____ Анна ДАЩЕНКО

(підпис)

Завдання прийняв до виконання

_____ Софія ЛИТВИНЕНКО

(підпис)

РЕФЕРАТ

Магістерська робота на тему «Моніторинг грибкових захворювань листя та плодів *Quercus robur* методом ПЛР в межах міста Києва» виконана на 70 сторінках друкованого тексту. Містить 53 рисунків та 5 таблиць. Опрацьовано 72 літературних джерел.

Робота складається з розділів: зміст, вступ, літературний огляд, огляду методів та результатів дослідження, висновків та списку використаної літератури.

Досліди проводились на базі лабораторно-виробничого комплексу ТОВ «ФАРМЕР.УА» в лабораторії фітопатології та молекулярно-генетичних досліджень.

Мета: визначити спектр грибкових патогенів, що уражають листя та плоди *Quercus robur* у межах Києва, використовуючи метод ПЛР.

Об'єкт: грибкові захворювання листя та плодів *Quercus robur*.

Предмет: молекулярно-генетичне виявлення методом ПЛР та аналіз грибкових захворювань *Quercus robur* в місті Києві.

Методи дослідження: польовий, морфологічний аналіз, молекулярно-генетичний метод ПЛР, статистичний та картографічний.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.2 Ботанічна характеристика та морфологічна будова <i>Quercus robur</i>	10
1.3 Інфекційні грибкові хвороби дуба звичайного (<i>Quercus robur</i>).....	14
1.3.1 <i>Microsphaera alphitoides</i>	15
1.3.2 <i>Gloeosporium quercinum</i>	17
1.3.3 <i>Ascochyta quercus</i>	19
1.3.4 <i>Stromatinia pseudotuberosa</i>	21
1.3.5 <i>Phomopsis quercella</i>	23
1.3.6 <i>Cytospora sp.</i>	25
1.4 Метод ПЛР у виявленні та ідентифікації грибкових патогенів дуба ..	27
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	32
2.1 Об'єкт досліджень та умови їх проведення	32
2.2 Місця і методика відбору зразків.....	37
2.3 Підготовка зразків до молекулярних досліджень та виділення ДНК .	38
2.5 Постановка ПЛР у реальному часі.....	41
2.6 Контроль точності та відтворюваності результатів дослідження	45
2.6 Інтерпретація результатів ПЛР	46
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	47
3.1 Результати молекулярної діагностики грибних патогенів у листі дуба (<i>Quercus robur</i>).....	47
3.2 Результати молекулярної діагностики грибкових патогенів у плодах дуба (<i>Quercus robur</i>).....	53
3.3 Аналіз рівня ураженості грибковими захворюваннями листя та плодів дуба звичайного у місті Києві (<i>Quercus robur</i>).....	61
3.4. Карта поширення патогенів дуба звичайного (<i>Quercus robur</i>) у місті Києві.....	64
ВИСНОВКИ	67
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	68
ДОДАТКИ.....	77

ВСТУП

Актуальність теми. Урбанізовані екосистеми, зокрема зелені насадження в місті Києві, відіграють важливу роль у поліпшенні екологічної ситуації, зниження рівня забрудненості повітря та в підтриманні мікроклімату. Одним із основних видів дерев, що широко використовують для озеленення міст, є дуб звичайний *Quercus robur*. Однак, останніми роками стає помітна тенденція ураження грибковими захворюваннями, які не лише погіршують декоративний стан дерев, але й можуть призводити до їх поступового відмирання, зниження екологічної та рекреаційної цінності зелених зон [1].

Для розробки ефективних заходів боротьби проти фітопатогенів, що уражають листя та плоди *Quercus robur*, є їх своєчасне виявлення. Традиційні методи діагностики, засновані на морфологічних ознаках, є малоефективними на ранніх стадіях розвитку зараження та не завжди дозволяють точно ідентифікувати збудника. Внаслідок цього особливої популярності набуло застосування метод молекулярно-генетичних досліджень, зокрема ПЛР, яка здатна забезпечити високу специфічність та чутливість виявлення патогенів [2].

У місті Києві, де зелені насадження зазнають постійного антропогенного впливу, моніторинг фітопатологічного стану дерев є вкрай необхідним. Наразі бракує комплексних досліджень, які присвячені вивченню грибкових захворювань *Quercus robur* із застосуванням сучасних та точних молекулярних технологій, що обмежує можливості своєчасного реагування та профілактики. Тому проведення моніторингу грибкових захворювань методом ПЛР у межах міста Києва є актуальним як з наукової, так і з практичної точки зору. Отримані результати можуть допомогти підібрати ефективні стратегії захисту міських насаджень, підвищення їхньої стійкості до патогенів та збереження біорізноманіття урбаністичних територій [2; 3].

Мета: визначити спектр грибкових патогенів, що уражають листя та плоди *Quercus robur* у межах Києва, використовуючи метод ПЛР.

Для досягнення поставленої в роботі мети необхідно вирішити наступні завдання:

1. Збирання та підготовка зразків листя та плодів *Quercus robur* із симптомами грибкових захворювань.
2. Проведення молекулярної ідентифікації грибкових патогенів за допомогою ПЛР-аналізу.
3. Оцінка видового складу та поширення грибкових захворювань *Quercus robur* у місті Києві.
4. Розробка практичних рекомендацій для моніторингу та профілактики грибкових захворювань дуба звичайного.

Об'єкт: грибкові захворювання листя та плодів *Quercus robur*.

Предмет: молекулярно-генетичне виявлення методом ПЛР та аналіз грибкових захворювань *Quercus robur* в місті Києві.

Методи дослідження: польовий, морфологічний аналіз, молекулярно-генетичний метод ПЛР, статистичний та картографічний.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальні відомості роду *Quercus*

Рід *Quercus* (дуб) належить до родини *Fagaceae* (букові) і є одним із найчисленніших і найпоширеніших родів деревних рослин помірних широт Північної півкулі. Він налічує більш ніж 500 видів, що зустрічаються в Європі, Азії, Північній Америці та Північній Африці. У природних умовах України поширені 3 види, а 43 – інтродуковані. Представниками роду можуть бути як високі дерева, так і чагарники, що ростуть у різних екологічних умовах – від гірських лісів до рівнин і посушливих ділянок [4;5;9].

Дерева роду *Quercus* мають значну екологічну, лісогосподарську та ландшафтно-декоративну цінність. Вони домінують у багатьох типах лісів, утворюють біоценози з високим рівнем біорізноманіття та забезпечують середовище існування для багатьох видів тварин, птахів, комах і мікроорганізмів [8;13;21]. У містах дуби висаджують у парках, скверах та вздовж вулиць завдяки їхній довговічності, вітростійкості, привабливому зовнішньому вигляду та здатності очищати повітря від шкідливих домішок.

Один із найвідоміших представників роду в Європі, дуб черешчатий (*Quercus robur*), – вид, що походить з України. Це довгожителі першої величини, які живуть понад 1000 років, досягають висоти 50 м і діаметра від 3 до 5 м, мають масивний стовбур та глибоку кореневу систему [7]. *Quercus robur* є важливим компонентом листяних та мішаних лісів, а також активно використовується в міському озелененні.

Однак дуби, особливо *Quercus robur*, чутливі до біотичних та абіотичних стресів, особливо в міському середовищі. Однією з головних загроз здоров'ю дерев є грибкові захворювання, які можуть вражати листя, пагони, плоди, кору та навіть кореневу систему. Вивчення фітопатогенів, що вражають представників роду *Quercus*, надзвичайно важливе для підтримки екологічної стійкості зелених насаджень, особливо у великих містах, таких як Київ [2].

1.2 Ботанічна характеристика та морфологічна будова *Quercus robur*

Дуб звичайний (*Quercus robur*) — це листопадне дерево з масивним прямостоячим стовбуром, добре окресленою кроною та значною тривалістю життя. У дорослому віці дуб звичайний може досягати висоти 20–40 метрів, окремі екземпляри перевищують 50 м. Середня тривалість життя цього виду становить 300–400 років, але за сприятливих умов дуби можуть жити понад 500 років (рис. 1.1). У молодому віці крона має виразну пірамідальну форму, яка з роками набуває більш розлогої, округлої або шатроподібної структури [4].



Рис 1.1 Дуб звичайний (*Quercus robur*) [8]

Кора молодих дерев світло-сіра, гладка на дотик, іноді з ледь помітними горизонтальними смугами. Протягом перших десятиліть життя вона залишається тонкою та еластичною, виконуючи переважно захисну функцію. З віком кора поступово темніє, набуваючи сіро-коричневого або темно-коричневого відтінку та розвиваючи глибокі борозни з неправильною сітчастою структурою. У старіших екземплярів кора стає товстою (до 2–3 см), шорсткою та тріщинуватою на вертикальні пластинки. Така структура є не лише однією з основних ознак виду, а й важливим адаптивним механізмом: глибокі тріщини зменшують перегрів стовбура, сприяють утриманню вологи та захищають камбій від механічних пошкоджень, коливань температури, шкідників та грибкових атак.

Кора дуба містить значну кількість танінів, які забезпечують її стійкість до гниття та мікробіологічного розкладання. Саме тому кора *Quercus robur* широко використовується у фармацевтичній та шкіряній промисловості як природне джерело танінів [2;6].

Листова пластина *Q. robur* проста (рис. 1.2), оберненояйцеподібної форми, з 5–7 парами тупих лопатей. Їхня довжина коливається від 7 до 14 см, ширина – до 7 см. Верхня сторона листка темно-зелена, блискуча, нижня сторона світліша, матова. Ця характеристика має таксономічне значення для розрізнення дуба звичайного (*Q. robur*) та дуба черешка (*Q. petraea*): останній має довший черешок (до 2–3 см), а листова пластинка має гостріші виїмки. Ця морфологічна відмінність використовується в дендрологічних дослідженнях та в польовій ідентифікації видів *Quercus* [1;7].

Листя дуба черешкового відрізняються високим вмістом біологічно активних сполук, що обумовлює їх значну екологічну та фармакологічну цінність. Основними компонентами є дубильні речовини (таніни), концентрація яких у молодому листі досягає 10-15%. Ці фенольні сполуки забезпечують дубу природний захист від фітопатогенів, комах та мікроорганізмів, оскільки мають виражену антисептичну та фунгістатичну дію [1;2;6]. Дубильні речовини, полімеризуючись, створюють на поверхні рослинних клітин захисну плівку, що перешкоджає проникненню спор грибів та патогенних бактерій у тканині листової пластинки.

Крім дубильних речовин, листя дуба черешчастого містить флавоноїди (кверцетин, рутин, катехіни), фенольні кислоти (галову, еллагову, кавову), а також антиоксиданти – токофероли та аскорбінову кислоту. Ці сполуки діють як природні захисники клітин від окислювального стресу, що посилюється ультрафіолетовим випромінюванням, підвищеними температурами та забрудненням повітря [20]. Флавоноїди дуба також беруть участь в утворенні пігментів листя, забезпечуючи їх характерний темно-зелений колір.

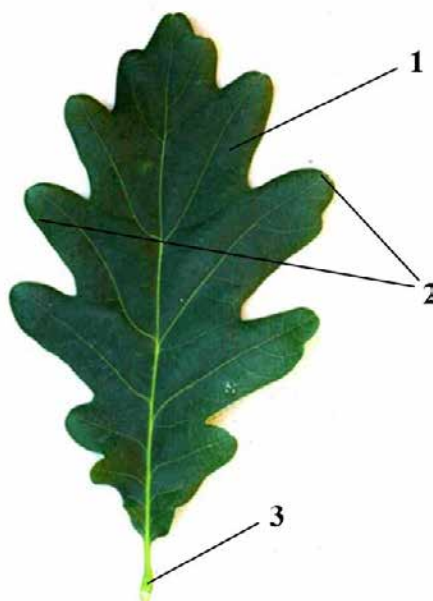


Рис. 1.2 Будова листкової пластини дуба звичайного (*Quercus robur*): 1 – листовая пластинка; 2 – лопаті листка; 3 – черешок листка

Квіти дрібні, одностатеві, непомітні (рис. 1.3). Дуб — однодомна рослина: чоловічі квітки зібрані в тонкі сережки, жіночі — поодинокі або їх кілька в пазухах листків. Запилення відбувається вітром (анемофілія), переважно у квітні–травні, зазвичай до повного розвитку листя [14; 15]. Цвітіння триває близько двох тижнів і супроводжується рясним утворенням пилку, що розноситься потоками повітря. Після запилення жіночі квітки поступово розвиваються в плоди - жолуді, які дозрівають восени цього року.

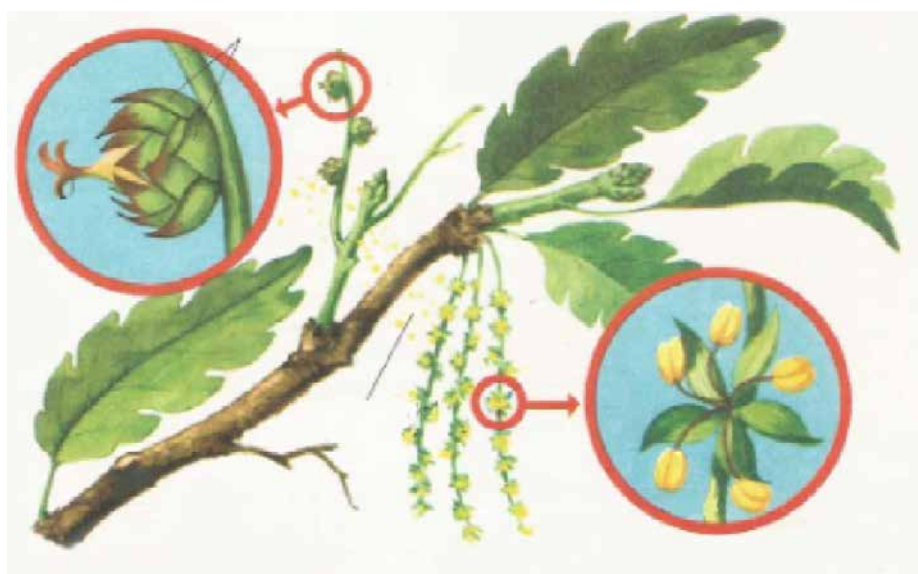


Рис. 1.3 Квіти дуба звичайного (*Quercus robur*) [9]

Після запилення утворюється типовий плід для дубу жолудь (рис. 1.4), який укладений у напівсферичну коробочку (купулу). Плоди дозрівають у вересні–жовтні, після чого жолуді опадають і можуть проростати без вегетативного спокою [19].



Рис. 1.4 Плід дуба звичайного (*Quercus robur*) — жолудь [9]

Коренева система стрижнева та потужна (рис. 1.5). На ранніх стадіях розвитку формується глибокий центральний корінь, який з віком розгалужується на численні горизонтальні та косі бічні корені [1]. Завдяки цьому дуб добре закріплюється в ґрунті, стійкий до виривання, зсувів та здатний видобувати воду з глибоких шарів ґрунту, що забезпечує його високу стійкість до посухи [2;4].

Завдяки високій стійкості, *Quercus robur* є надзвичайно конкурентоспроможним видом, витримуючи значні кліматичні коливання, тимчасові затоплення, механічні пошкодження, вплив забруднюючих речовин та хвороб. Крім того, він здатний до вегетативного розмноження – утворення пагонів з пня або кореневої системи, що дозволяє йому виживати після вирубки лісу або пожеж [1;3;5].



Рис. 1.5 Коренева система дуба звичайного (*Quercus robur*): 1 – головний корінь; 2 – бічні корені

1.3 Інфекційні грибкові хвороби дуба звичайного (*Quercus robur*)

Дуб звичайний (*Quercus robur*) – цінна лісоутворююча деревина, широко представлена в Україні, зокрема в зелених зонах Києва. Однак його фітосанітарний стан значною мірою залежить від грибкових захворювань, які можуть вражати як листя, так і плоди. Ці хвороби значно знижують фотосинтетичну активність листя, зменшують накопичення асимілятів, порушують формування та дозрівання плодів. Це призводить до ослаблення дерев, зниження насінневої продуктивності і навіть загибелі молодих дерев. У літературі наголошується, що грибкові захворювання дуба є значною причиною його занепаду в міських районах, де забруднення повітря, ущільнення ґрунту та зміни мікроклімату є додатковими стресовими факторами [6;7].

Особливу небезпеку для дуба становлять такі групи грибкових патогенів, як борошниста роса (*Microsphaera alphitoides*), антракноз (*Gloeosporium quercinum*), біла плямистість (*Ascochyta quercus*) та некротичні ураження (*Cytospora* sp., *Phomopsis quercella*). Ці патогени поширюються повітряно-крапельним шляхом

або механічними пошкодженнями та часто активуються високою вологістю та ослабленими деревами. Первинне зараження зазвичай відбувається навесні, а протягом літа інфекція розвивається у вигляді плям, некрозу, деформації листя та муміфікації плодів [18;21].

1.3.1 *Microsphaera alphitoides*

Однією з найпоширеніших і найнебезпечніших хвороб дуба звичайного є борошниста роса, збудником якої є *Microsphaera alphitoides* (рис. 1.6), сучасна назва – *Erysiphe alphitoides*. Гриб належить до відділу *Ascomycota*, класу *Leotiomycetes*, порядку *Erysiphales*, родини *Erysiphaceae* та є типовим облігатним біотрофом, тобто паразитом, здатним розвиватися виключно на живих рослинних клітинах, використовуючи продукти їх метаболізму. Масове зараження дубів борошнистою росою вперше було зафіксовано в Європі на початку 20 століття, зокрема у Франції та Німеччині, після чого збудник швидко поширився по всіх країнах ареалу дуба звичайного [23;65;71]. *Microsphaera alphitoides* широко поширена в Україні, особливо пошкоджуючи саджанці та молоді дерева в розсадниках, лісових насадженнях та міських районах.



Рис. 1.6 *Microsphaera alphitoides* [22]

Симптоми борошнистої роси проявляються у вигляді білого, павутиноподібного нальоту на верхній поверхні листя, рідше на черешках та пагонах, який згодом потовщується, буріє та поширюється, покриваючи значну частину поверхні листя. Наліт складається з епіфітного грибного міцелію та ланцюжків конідій, що утворюються протягом усього вегетаційного періоду. Уражене листя поступово жовтіє, скручується та передчасно опадає [22; 50; 57]. Молоді рослини втрачають до 80–90% своєї асиміляційної поверхні, що значно знижує їх ріст і часто призводить до загибелі [58]. У міських районах борошниста роса різко знижує декоративну цінність дерев, що має не лише екологічне, а й соціальне значення, оскільки дуби є ключовим елементом київських парків та прибережних зон [59].

Життєвий цикл збудника характеризується поєднанням кількох форм спороношення. Навесні інфекція поширюється переважно конідіями, які утворюються у великій кількості на поверхні ураженого листя та легко переносяться вітром, спричиняючи повторне зараження. Влітку розвивається масивна вторинна інфекція, яка швидко вражає молоді пагони та листя. Наприкінці літа на ураженому листі формуються клейстотеції — запечатані плодові тіла, що містять аскоспорові асци [62;72]. Ці клейстотеції забезпечують зимівлю гриба на опалому листі та є основним джерелом інфекції наступного року. Таким чином, збудник здатний підтримувати стабільний цикл розвитку навіть за несприятливих умов, що пояснює його виняткову шкідливість.

Шкідливість борошнистої роси відіграє вирішальну роль. Хвороба найчастіше зустрічається в теплі роки з малою кількістю опадів. Оптимальна температура для утворення конідій становить 20–25°C з відносною вологістю повітря 60–80%. На відміну від більшості фітопатогенних грибів, *Microsphaera alphitoides* не потребує вологи для проростання спор, а тому здатна до енергійного росту навіть у посушливі періоди, коли інші збудники пригнічені. Ця характеристика відповідає за її широке поширення в регіонах з континентальним кліматом [70].

Шкідливість борошнистої роси є багатогранною. Втрата листової поверхні та зниження фотосинтетичної активності безпосередньо впливають на ріст деревини, розвиток кореневої системи та життєздатність дуба. Деревина, ослаблені інфекцією, стають більш вразливими до інших патогенів та шкідників, зокрема антракнозу, фомопсису та жолудевої гнилі. Згідно з довгостроковими спостереженнями в центральній Європі, масові спалахи *Microsphaera alphitoides* призвели до загибелі до 50–70% молодих дерев, особливо коли повторні атаки відбувалися протягом кількох років поспіль [68;69].

1.3.2 *Gloeosporium quercinum*

Антракноз дуба, спричинений *Gloeosporium quercinum* Sacc. (рис. 1.7), є однією з найпоширеніших хвороб листя та плодів дуба в Україні та Європі. Збудник належить до групи недосконалих грибів (*Deuteromycota*), класу Целоміцетів, які розмножуються конідіями, що містяться у спеціалізованих плодових структурах, що називаються ацервулами. Грибок переважно вражає листя, молоді пагони та плоди, спричиняючи значне погіршення стану дерев, особливо в умовах високої вологості [43].



Рис 1.7 *Gloeosporium quercinum* [23]

Симптоми антракнозу проявляються у вигляді коричневих або темно-коричневих некротичних плям різної форми на листках. Уражені ділянки мають довгу жовтувату або хлоротичну облямівку. На молодому листку плями розташовані вздовж жилок, поступово розширюючись і можуть об'єднуватися у великі некротичні ділянки, що покривають значну частину листової пластинки. Уражене листя скручується, втрачає тургор і передчасно опадає, що призводить до зниження фотосинтетичної активності дерева. У важких випадках опадання листя може відбуватися вже на початку літа, завдаючи серйозної шкоди молодим деревам [55;56].

Симптоми антракнозу проявляються у вигляді коричневих або темно-коричневих некротичних плям різної форми на листках. Уражені ділянки мають довгу жовтувату або хлоротичну облямівку. На молодому листку плями розташовані вздовж жилок, поступово розширюючись, і можуть об'єднуватися у великі некротичні ділянки, що покривають значну частину листової пластинки. Уражене листя скручується, втрачає тургор і передчасно опадає, що призводить до зниження фотосинтетичної активності дерева [35;37;38]. У важких випадках опадання листя може відбуватися вже на початку літа, завдаючи серйозної шкоди молодим деревам. На плодах *Gloeosporium quercinum* утворюються темні, запалі некрози, поступово покриваючи всю поверхню жолудя. Уражені плоди втрачають життєздатність і не проростають, що створює серйозну проблему для природного відновлення дубових лісів. У лісових розсадниках та міських умовах це проявляється у зменшенні кількості здорових саджанців та зниженні загальної регенераційної здатності популяції дуба [28;30;47].

Життєвий цикл гриба включає зимівлю у вигляді міцелію та плодових структур на опалому листі та уражених плодах. Навесні утворюються конідії, які легко розносяться краплями дощу, вітром або механічним способом. У вологі та прохолодні періоди (оптимальні температури 18–22°C, відносна вологість понад 85%) відбувається масове зараження молодого листя. Протягом вегетаційного періоду можливі багаторазові реінфекції, що призводить до коливального прогресування хвороби [34]. У міських районах Києва антракноз особливо

активний у низинних районах парків, скверів та прибережних зон, де підвищена вологість ґрунту та повітря. Найвища захворюваність спостерігається в роки з малою кількістю опадів навесні та на початку літа. У деяких випадках пошкодження листя може перевищувати 50–60%, що призводить до значного зниження декоративної цінності насаджень [54; 56]. Антракноз дуба є одним із факторів, що посилюють ослаблення та передчасне занепад дубових насаджень у міських районах.

1.3.3 *Ascochyta quercus*

Плямистість листя дуба, спричинена *Ascochyta quercus* Lib. (рис. 1.8), є поширеним грибковим захворюванням, що вражає листя дуба звичайного (*Quercus robur*). Збудник належить до типу *Ascomycota*, класу *Dothideomycetes*, порядку *Pleosporales*, родини *Didymellaceae*. Основним діагностичним симптомом є утворення коричневих плям з темною, чіткою облямівкою на листках. Плями мають круглу або овальну форму, діаметром від кількох міліметрів до одного сантиметра, і іноді зливаються, утворюючи великі некротичні ділянки. У центрі уражень розвиваються дрібні чорні пікніди, з яких вивільняються конідії збудника. Наявність пікнід є однією з найхарактерніших ознак, що відрізняють плямистість листя дуба від інших хвороб дуба [62; 63].

Інфекція поширюється переважно у другій половині літа та восени, коли підвищується вологість, створюючи сприятливі умови для росту грибка. Конідії поширюються краплями дощу, вітром та механічним шляхом [50]. Джерелом інфекції наступного року є опале уражене листя, на якому грибок виживає у вигляді пікнід та міцелію. Тому своєчасне видалення та знищення ураженого листя є ключовим заходом для зменшення поширення аскохітозу [51].



Рис 1.8 *Ascochyta quercus* [24]

Пошкодження дуба аскохітозом суттєво впливає на життєздатність дуба. Листя, вкриті численними плямами, втрачає фотосинтетичну активність, що призводить до зменшення накопичення органічної речовини та ослаблення дерев. Під час активного розвитку хвороби спостерігається передчасне опадання значної частини листя [49; 53]. Молоді дуби та сіянці найбільш схильні до інфекції, оскільки зменшення поверхні листя безпосередньо впливає на їх ріст та виживання. У міських насадженнях це призводить до втрати декоративної цінності дерев, а в розсадниках та культурних рослинах – до зниження якості посадкового матеріалу [55;57].

За даними літератури, інтенсивність розвитку аскохітозу значною мірою залежить від погодних умов року. У роки з теплою та вологою погодою наприкінці літа інфекція може вражати 40-60% поверхні листя. У посушливі роки прояви збудника значно слабші та переважно локалізовані.

Особливо небезпечним є поєднання аскохітозу з іншими хворобами листя дуба, зокрема борошнистою россою та антракнозом. У таких випадках спостерігається синергетичний ефект інфекції, що призводить до швидкого виснаження дерев та створення сприятливого середовища для розвитку

вторинних патогенів та шкідників [53]. Важливо зазначити, що дубовий фітофтороз часто вражає ослаблені дерева, які вже зазнали впливу абіотичних стресових факторів (забруднення повітря, ущільнення ґрунту, дефіцит вологи). Тому дубовий фітофтороз розглядається не лише як самостійна хвороба, а й як важливий компонент загального погіршення фітосанітарного стану дубових насаджень [54; 56].

1.3.4 *Stromatinia pseudotuberosa*

Гниль плодів дуба (*Stromatinia pseudotuberosa*) (рис. 1.9) – одна з найнебезпечніших хвороб насінневих культур, що викликається *Stromatinia pseudotuberosa* (син. *Ciboria batschiana*). Цей гриб належить до типу *Ascomycota*, класу *Leotiomycetes*, порядку *Helotiales*, родини *Sclerotiniaceae*. Він паразитує переважно на плодах дуба, спричиняючи їх гниття та муміфікацію, що значно знижує природне відновлення дубових насаджень. У природних умовах збудник поширений практично у всіх регіонах ареалу дуба звичайного (*Quercus robur*), включаючи Україну [57; 66].

Симптоми хвороби проявляються на жолудях під час їх формування на дереві, але найінтенсивніше хвороба розвивається після опадання плодів на землю. Спочатку темніє оболонка жолудів, з'являються невеликі коричневі западини, які поступово розширюються. Уражена тканина потім розм'якшується, покривається темними плямами та швидко втрачає життєздатність [19; 25]. На пізніх стадіях розвитку плоди повністю розпадаються, зморщуються та муміфікуються. Такі жолуді непридатні для проростання та в умовах розсадника стають джерелом поширеного зараження здорового насіння.



Рис 1.9 *Stromatinia pseudotuberosa* [25]

Життєвий цикл *Stromatinia pseudotuberosa* включає утворення склероцій, які розвиваються всередині уражених плодів. Ці щільні, темні структури можуть підтримувати життєздатність гриба протягом кількох років у ґрунті та в опалих плодах. Навесні склероції утворюють апотеції — невеликі дископодібні плодові тіла, що містять аскоспори. Аскоспори легко розносяться вітром та заражають молоді жолуді під час їх розвитку. Таким чином, гриб здатний підтримувати стабільне середовище інфекції в дубових насадженнях, зберігаючи свій цикл навіть за несприятливих умов [31; 33].

Умови навколишнього середовища відіграють ключову роль у розвитку хвороби. Вона найбільш поширена у вологих місцях з товстим шаром листового опаду, де жолуді залишаються на поверхні ґрунту протягом тривалого часу. У київських парках спалахи гнилі плодів жолудів найчастіше спостерігаються в затінених місцях, поблизу водойм та на ділянках з ущільненим ґрунтом, де затримується волога. Хвороба розвивається особливо інтенсивно в роки з дощовою осінню [71].

Крім того, висока вологість та погана циркуляція повітря в нижній частині крони дерев створюють сприятливі умови для проростання спор та проникнення

збудника в тканини плодів. Оптимальна температура для розвитку *Phomopsis quercella* становить 20–25°C, при якій гриб швидко утворює пікніди та вивільняє інфекційні конідії. Ослаблені дерева, ті, що зазнали механічних пошкоджень або забрудненого повітря, більш схильні до інфекції. За таких умов хвороба може набути широкого поширення, вражаючи значну частину плодів та листя в межах однієї крони [3; 34].

Шкідливість *Stromatinia pseudotuberosa* проявляється, перш за все, у втраті життєздатності насіння. Згідно з європейськими дослідженнями, у роки спалахів патогенів втрати у насіннєвому виробництві дуба сягають 50–70%, а в окремі сезони можуть досягати 90% [25; 37]. Це означає, що практично весь урожай жолудів стає непридатним для природного відновлення або використання в лісових розсадниках. У міських районах, де природне відновлення дуба вже утруднене, гниль плодів має особливо негативний вплив на стійкість насаджень.

Важливим аспектом є взаємодія *Stromatinia pseudotuberosa* з іншими патогенами. Ослаблені плоди, уражені цим грибом, часто стають господарями для вторинних грибів, зокрема представників роду *Phomopsis*. Це призводить до складного ураження, що ще більше погіршує схожість насіння.

1.3.5 *Phomopsis quercella*

Плямистість листя дуба, спричинена грибком *Phomopsis quercella* Sacc. (рис. 1.10) (або *Diaporthe quercella*), – небезпечне захворювання листя та плодів дуба звичайного (*Quercus robur*), поширене в Європі та Україні. Збудник належить до типу *Ascomycota*, класу *Sordariomycetes*, порядку *Diaporthales*, родини *Diaporthaceae*. Характеризується широким спектром пошкоджень, спричиняючи некротичні ураження як на листі, так і на репродуктивних органах дерева [26; 59].



Рис 1.10 *Phomopsis quercella* [26]

Симптоми на листках проявляються у вигляді дрібних темно-коричневих або чорних плям діаметром 2–5 мм, які поступово збільшуються та зливаються, утворюючи великі ділянки некрозу. Уражена тканина стає крихкою, висихає та часто опадає, надаючи листю характерного дірчастого вигляду [62]. Поступове розширення уражень призводить до втрати значної частини поверхні листка, зниження фотосинтетичної активності та ослаблення деревини. Найбільш схильне до захворювання молоде листя, яке більш схильне до інфекції [63].

На плодах дуба *Phomopsis quercella* викликає зморшкуваті, темні некротичні ураження, які поступово поширюються по всій поверхні жолудя. Ці плоди втрачають тургор, темніють, висихають і стають непридатними для проростання. Уражені жолуді часто стають джерелом вторинної інфекції в партіях насіння під час зберігання або в лісових розсадниках. Це значно знижує якість посадкового матеріалу та перешкоджає природному відновленню дуба як у міських, так і в лісових насадженнях [51; 58].

Життєвий цикл патогена включає утворення пікнід — невеликих чорних плодових тіл, в яких розвиваються конідії. Вони виділяються під час дощу та поширюються на сусідні тканини через краплі води. Конідії можуть вражати як молоде листя, так і плоди, викликаючи первинні та вторинні ураження протягом усього вегетаційного періоду. Грибок може виживати на опалому листі,

заражених плодах та гілках, зберігаючи свою інфекційність до наступного року [63; 67].

Умови навколишнього середовища суттєво впливають на тяжкість перебігу хвороби. Оптимальна температура зараження становить 20–25°C з високою відносною вологістю. У роки з теплою, дощовою весною та літом ураження фомопсисом можуть вражати до 40–60% поверхні листя та до 30–40% плодів [40]. У посушливі роки хвороба менш виражена, але не зникає повністю, оскільки гриб може залишатися життєздатним у вигляді міцелію та пікнід на рослинних рештках [53].

Шкідливість фомопсису дубового на дубі пов'язана з його комплексним ослабленням. Втрата листя та пошкодження плодів призводять до зниження асиміляційного потенціалу та втрати регенераційної здатності в насадженнях. Особлива небезпека полягає в тому, що уражені плоди можуть потрапити в насінневі партії, що використовуються для лісовідновлення або озеленення міст, що може поширити інфекцію на нові території. Крім того, патоген часто взаємодіє з іншими грибами, зокрема *Stromatinia pseudotuberosa* та *Ascochyta quercus*, утворюючи складні ураження, які значно знижують життєздатність дубових насаджень [59].

1.3.6 *Cytospora* sp.

Плямистість листя дуба, спричинена представниками роду *Cytospora* (рис. 1.11) (анаморфа *Valsa*), – це небезпечне грибокве захворювання деревних порід, яке викликає некротичні ураження на корі та гілках. Гриби цього роду належать до типу *Ascomycota*, класу *Sordariomycetes*, порядку *Diaporthales*. Це факультативні паразити, які можуть тривалий час виживати як сапротрофи на мертвій деревині, а за сприятливих умов переходять до патогенного способу життя. Хвороба поширена в лісах та міських районах, включаючи зелені зони Києва, де вражає ослаблені екземпляри дуба звичайного (*Quercus robur*) [27; 35].

Симптоми плямистості листя дуба проявляються у вигляді некротичних ділянок на корі гілок та стовбурів. Спочатку уражена кора набуває коричневого

або темно-коричневого відтінку, западає, а потім висихає та відшаровується. Під корою розвивається міцелій, що спричиняє відмирання камбію та прилеглих тканин. На уражених ділянках часто спостерігається камедіоз, захисна реакція дерева [35]. Уражені гілки втрачають листя, засихають і відмирають. На поверхні некротичної кори утворюються численні дрібні чорні пікніди, з яких вивільняються конідії, поширюючи інфекцію. Це одна з найхарактерніших ознак плямистості листя цитоспори, що дозволяє відрізнити її від інших некрозів [46; 49].



Рис 1.11 *Cytospora sp.* [27]

Життєвий цикл цитоспори включає утворення пікнід, які можуть зберігатися в ураженій корі протягом кількох років. Інфекція поширюється під час дощів, коли конідії вивільняються у вигляді слизових мас і розносяться краплями води. Зараження відбувається переважно через механічні пошкодження кори, морозні тріщини, порізи або тріщини. Цитоспороз найчастіше вражає ослаблені дерева, що зазнали стресу, спричиненого посухою, забрудненням повітря або механічними пошкодженнями. Саме тому в міських районах, зокрема в Києві, де дерева постійно піддаються антропогенному впливу, цитоспороз є поширеним і небезпечним явищем [57].

Шкідливість цитоспорозу полягає в поступовому відмиранні гілок та зниженні загальної життєздатності дерев. У молодих дерев сильне зараження може призвести до їхньої загибелі протягом кількох років. У старих дерев

цитоспороз значно знижує декоративну цінність дерева та створює умови для розвитку вторинних патогенів та дереворуйнівних грибів. Крім того, некротичні ураження кори порушують транспортні процеси в стовбурі, що ще більше послаблює дуб [37; 40]. У лісових насадженнях це призводить до втрати частини деревостану, а в міських районах – до втрати цінних зелених насаджень.

1.4 Метод ПЛР у виявленні та ідентифікації грибкових патогенів дуба

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це часто використовуваний лабораторний метод ампліфікації нуклеїнових кислот, який використовує Таq-полімераза, термостабільну ДНК-полімераза, виділену з *Thermus aquaticus*, для синтезу ДНК після термічної денатурації та відпалу праймерів[36]. Кері Малліс представив ПЛР у 1985 році та пізніше отримав Нобелівську премію з хімії за цей внесок. ПЛР дозволяє точно виявляти та аналізувати ампліфіковану ДНК і стала наріжним каменем біомолекулярних досліджень [37].

Принцип ПЛР — це селективна ампліфікація окремих ділянок регіону шляхом циклічного повторення трьох ключових етапів: денатурації, відпалу праймерів і елонгації. Така термостабільність, полімераза Таq зберігає активність навіть після багаторазового нагрівання до високих температур, що робить її незамінною в цьому методі. В даний час ПЛР розглядається як "маленький стандарт" у молекулярній діагностиці, який використовується у виявленні бактеріальних та вірусних інфекцій, як добре в генетичному скринінгу, оскільки метод характеризується високою чутливістю та точністю [38; 39].

Сутність методу полягає у багатоциклічному повторенні трьох основних етапів: денатурації дволанцюгової ДНК, відпалу праймерів та елонгації. Використання специфічних праймерів забезпечує вибіркове копіювання ділянки геному, що належить цільовому організму. Завдяки цьому ПЛР використовується як для ідентифікації патогенів, а й у кількісній оцінці рівня розвитку [45;50].

Серед різновидів методу особливе значення має кількісна ПЛР у реальному часі (qPCR), що дозволяє не лише виявити наявність патогену, а й визначити його

концентрацію у зразку. Крім того, у сучасних дослідженнях активно використовується мультиплексна ПЛР, що дозволяє одночасно виявляти декілька видів патогенів у межах однієї реакції. Це особливо важливо для моніторингу хвороб листя та плодів дуба, де можуть бути задіяні кілька патогенів [61; 68].

Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (ПЛР в реальному часі) — це сучасний метод молекулярної діагностики, що дозволяє не тільки виявити наявність патогенних організмів у зразку, а й оцінити їх кількісний вміст. Принцип методу ґрунтується на використанні специфічних праймерів та флуоресцентно мічених зондах, що забезпечують селективну ампліфікацію цільових ділянок ДНК грибів (рис. 1 12). У процесі ампліфікації термоциклер реєструє збільшення інтенсивності флуоресценції, яке безпосередньо корелює із накопиченням продуктів реакції [32; 37].

Сучасні мультиплексні ПЛР-набори, що використовуються у фітопатології, дозволяють одночасно виявляти кілька грибкових патогенів в одній реакції. У дослідженні використовувалися комерційні суміші праймерів, які забезпечували специфічність для найпоширеніших патогенів дуба — *Microsphaera alphitoides*, *Gloeosporium quercinum*, *Ascochyta quercus*, *Phomopsis quercella*, *Stromatinia pseudotuberosa* та *Cytospora sp.* (HEX, ROX або Cy5) — що дозволяло диференціювати сигнали в окремих каналах термоциклера. Такий підхід значно скорочує час аналізу та мінімізує ризик хибнопозитивних результатів [38; 39].

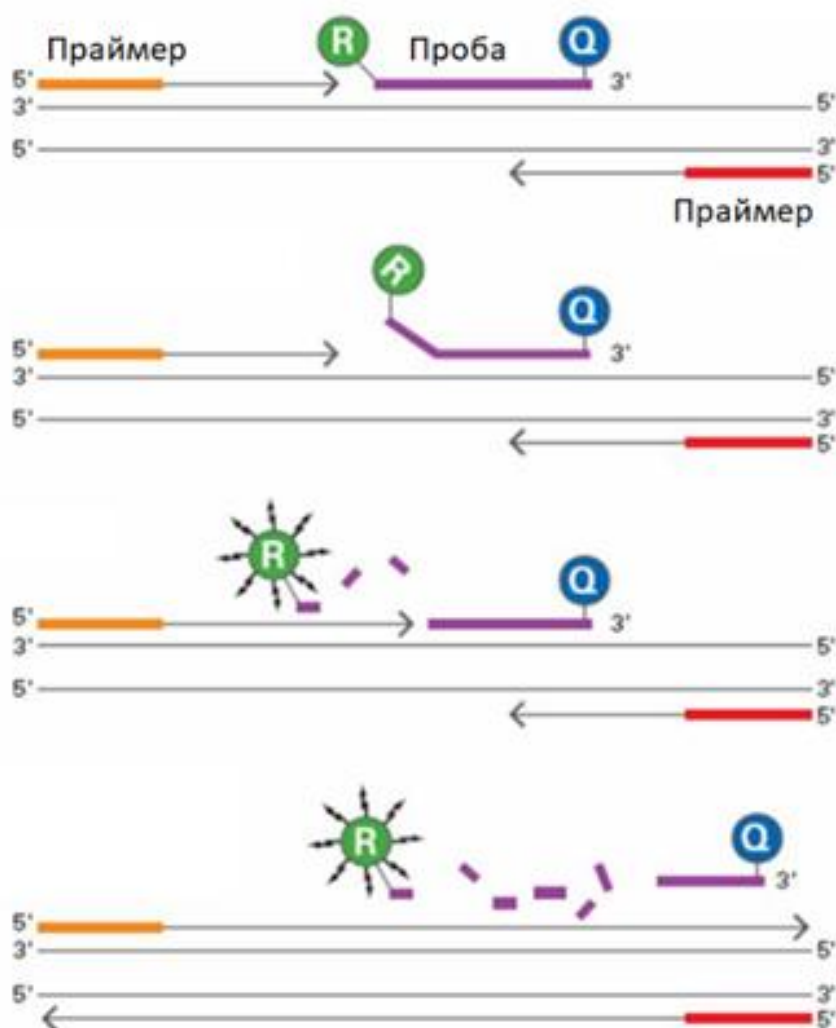


Рис. 1.12 Схема принципу роботи ПЛР в реальному часі (репортер-гаситель, деблокування флуоресценції).

Перед постановкою реакції проводиться пробопідготовка, що включає виділення НК та оцінку якості. Екстракція здійснюється з використанням лізуючого буфера та магнітного сорбенту, після чого ДНК елюється в буфер. Якість та чистота НК перевіряються спектрофотометрично: співвідношення 260/280 має бути 1,65–2,5, а 260/230 – 1,8–3. Недостатня концентрація чи відхилення від цих значень свідчить необхідність повторного виділення [43; 44; 45].

Для визначення наявності грибів у зразку використовується метод ПЛР у реальному часі. Для цього цільова послідовність у геномі патогену

ампліфікується за допомогою пари олігонуклеотид-специфічних праймерів та флуоресцентно міченого зонда [45].

Реакція включає такі етапи:

1. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі помічає 2 праймери (прямий і зворотний), що визначають цільову область у НК патогену та флуоресцентний зонд, що містить флуоресцентний репортер (F) та гасник (Q). Поки зразок цілий, гасник знаходиться досить близько до репортера і пригнічує його флуоресценцію [47; 48].

2. Коли ДНК-полімераза починає синтез комплементарного ланцюга, вона руйнує еталон завдяки нуклеазній активності [48].

3. Фізично відокремлений репортер починає випромінювати флуоресценцію, яку надає термоциклер [47].

4. Відбувається ампліфікація цільового фрагмента, що визначається рівнем флуоресценції репортерних молекул, що вивільняються з гасника [47; 48].

При ПЛР необхідно дотримуватися температурних режимів на кожному етапі (табл. 1.1) [47;48;49].

Таблиця 1.1

Температурний протокол ПЛР

Стадія	Температурний режим, °C	Час, с
Стадія 1 – гарячий старт полімерази	95	600
Стадія 2 – вирівнювання сигналу; 5 циклів	95	10
	54	20
	72	30
Стадія 3 – ампліфікація цільової послідовності; 40 циклів	95	10
	50	20
	72	30

Обов'язковим елементом є контроль: позитивний (синтетичний олігонуклеотид), негативний (TE-буфер) та внутрішній (послідовність рослинної ДНК, що свідчить про коректне виділення нуклеїнової кислоти) [37].

Результати інтерпретуються відповідно до порогового циклу (Ct):

1. Реакція вважається такою, що відбулася, якщо Ct позитивного контролю ≤ 35 ;
2. Відсутність сигналу від мішені в присутності внутрішнього контролю свідчить про негативний результат;
3. Наявність сигналу від мішені з Ct ≤ 35 свідчить про позитивний результат.

Для виявлення патогенів дуба використовуються специфічні праймери та зонди до ДНК патогенів. Використання мультиплексних наборів дозволяє одночасно виявляти кілька патогенів у зразках листя та плодів дуба.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкт досліджень та умови їх проведення

Дослідження проводилося в лабораторно-виробничому комплексі ТОВ «ФАРМЕР.УА», що спеціалізується на біотехнологічних, фітопатологічних та агрохімічних дослідженнях.

Дослідження проводилося самостійно під керівництвом та методичною підтримкою фахівців лабораторії. Робота проводилася за стандартними протоколами, адаптованими для роботи з рослинним матеріалом деревних порід. Використання лабораторної бази дозволило провести повний цикл аналізу – від відбору та підготовки зразків до проведення ПЛР та інтерпретації результатів.

Предметом дослідження стали грибні захворювання листя та плодів дуба черешкового (*Quercus robur*) в умовах міського середовища Києва. У сучасних екосистемах дуби виконують важливі екологічні, рекреаційні та соціальні функції, проте в умовах міського середовища вони особливо вразливі до фітопатогенів. Міське середовище характеризується поєднанням стресових факторів: забрудненням повітря та ґрунту, ущільненням ґрунту, низьким рівнем ґрунтових вод та інтенсивним антропогенним навантаженням, що суттєво знижує природну стійкість дерев до інфекцій.

Після огляду літератури, було обрано хвороби листків та плодів дуба, які є найпоширеніші в кліматичній зоні Північного регіону України, зокрема в Києві:

- *Erysiphe alphitoides* (збудник борошнистої роси);
- *Gloeosporium quercinum* (антракноз, або бура плямистість);
- *Ascochyta quercus* (біла плямистість листя);
- *Stromatinia pseudotuberosa* (муміфікація жолудів);
- *Phomopsis quercella* (біла гниль жолудів);
- *Cytospora spp.* (цитоспороз).

Ці патогени спричиняють некротичні ураження листя та плодів, передчасне опадання листя та зниження декоративної цінності та життєздатності дерев, що особливо небезпечно для зелених насаджень міста.

Відбір проб проводився у десяти адміністративних районах Києва, що охоплюють різні типи урбанізованих екосистем – від центральних парків до периферійних зелених зон. У кожній локації відбирався один зразок листа і один жолудь з різних дерев дуба черешчатого, переважно з того боку, який найбільш схильний до транспортних викидів або підвищеної вологості. Таким чином, були представлені всі основні екологічні умови існування виду в межах міста.

Зразки доставлялися до лабораторії у стерильних поліетиленових пакетах, де проводилися первинний фітопатологічний огляд, фотографування та підготовка матеріалу для подальшої молекулярної діагностики.

Нумерація зразків здійснювалася згідно наступного списку:

1. Голосіївський район – дуб біля 4-го корпусу НУБіП України (рис. 2.1);



Рис. 2.1 Зразки листя та плодів дубу з Голосіївського району

2. Шевченківський район – дуб біля ДП «Державний центр сертифікації і експертизи сільськогосподарської продукції»;



Рис. 2.2 Зразки листя та плодів дубу з Шевченківського району

3. Солом'янський район – дуб у парку «Відрадний»;



Рис. 2.3 Зразки листя та плодів дубу з Солом'янського району

4. Деснянський район – дуб у парку «Кіото»;



Рис. 2.4 Зразки листя та плодів дубу з Деснянського району

5. Дніпровський район – дуб у парку Слави;



Рис. 2.5 Зразки листя та плодів дубу з Дніпровського району

6. Подільський район – дуб на Контрактовій площі;



Рис. 2.6 Зразки листя та плодів дубу з Подільського району

7. Дарницький район – дуб у парку по проспекту Петра Григоренка;



Рис. 2.7 Зразки листя та плодів дубу з Дарницького району

8. Оболонський район – дуб у Куренівському парку;



Рис. 2.8 Зразки листя та плодів дубу з Оболонського району
9. Печерський район – дуб у Хрещатому парку;



Рис. 2.9 Зразки листя та плодів дубу з Печерського району
10. Святошинський район – дуб у парку «Юність».



Рис. 2.10 Зразки листя та плодів дубу з Святошинського району

2.2 Місця і методика відбору зразків

Відбір проб проводився на зелених насадженнях Києва з 23 вересня по 9 жовтня 2024 року. Метою дослідження було отримання репрезентативного матеріалу (листя та плоди дуба звичайного) для подальшої молекулярної діагностики грибкових патогенів.

Для забезпечення об'єктивності дослідження було визначено десять адміністративних районів столиці, що відрізняються рівнем урбанізації та рекреаційного використання. У кожному районі відбір проб проводився з одного дерева дуба звичайного (*Quercus robur*).

Методика відбору проб:

1. У кожному місці було обрано одне зріле дерево дуба звичайного (*Quercus robur*).
2. Відбір проб проводився випадковим чином: з кожного дерева збирали по декілька листків та жолудів.
3. Листя збирали із середнього ярусу крони, щоб виключити вплив зовнішніх факторів (механічні пошкодження, забруднення пилом).
4. Жолуді збирали безпосередньо з дерева або з поверхні ґрунту під кроною, якщо вони щойно впали.
5. Кожен зразок упаковували у стерильні паперові пакети з маркуванням дати, регіону та місця.
6. Транспортування здійснювалося у переносних контейнерах при температурі від +4 до +6°C.
7. У лабораторії зразки зберігали в холодильнику при +4°C не більше 48 годин.

Всього було зібрано 20 зразків, що забезпечило достатній матеріал для подальших молекулярних досліджень за допомогою ПЛР у реальному часі (рис. 2.11).



Рис. 2.11 Зразки листя та плодів дуба

2.3 Підготовка зразків до молекулярних досліджень та виділення ДНК

Для проведення молекулярної діагностики грибкових патогенів нуклеїнові кислоти були виділені з листя та плодів дуба (*Quercus robur*). Якість та концентрація нуклеїнової кислоти є вирішальними факторами для подальшого аналізу методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР), тому всі етапи підготовки зразків виконувалися в стерильних умовах з використанням одноразових інструментів та стерильного лабораторного посуду.

Етапи виділення ДНК:

1. Зразок рослинного матеріалу (листа або жолудя) подрібнювали і переносили в мікропробірку Eppendorf об'ємом 10,0 мл. Обсяг проби становив приблизно третину чи половину обсягу пробірки.
2. Додавали 700 мкл буфера (рис. 2.12), що лізує, після чого пробірку поміщали в термостат при температурі +70 °C на 18 год 30 хв, залежно від щільності матеріалу. На цьому етапі відбувається руйнування клітинних стінок та вивільнення НК.



Рис. 2.12 Зразок рослинного матеріалу

- Лізат переносили до іншої стерильної пробірки об'ємом 1,5 мл, попередньо додавши 30 мкл магнітного сорбенту (рис. 2.13).



Рис. 2.13 Рослинний зразок з доданим магнітним сорбентом

4. Пробірку струшували для рівномірного перемішування, після чого сорбент з нуклеїновими кислотами осаджували на магнітному штативі (рис. 2.14). Надосадову рідину видаляли самплером (рис. 2.15).

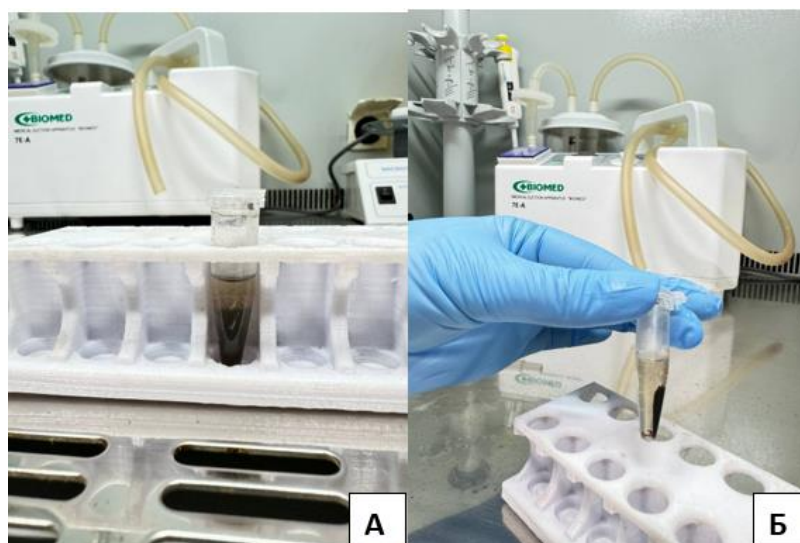


Рис. 2.14 Осадження ДНК: А – суміш з сорбентом на магнітному штативі;
Б – сепарована ДНК



Рис 2.15 Виділення надосадової рідини самплером

Якість виділених нуклеїнових кислот оцінювали на основі результатів ампліфікації в системі ПЛР у реальному часі QuantStudio 5 (Applied Biosystems, США) (рис. 2.16). Вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 260 нм дає концентрацію нуклеїнової кислоти. Для успішної ПЛР мінімальна концентрація зразка була щонайменше 2 нг/мкл.



Рис. 2.16 Оцінка якості виділених нуклеїнових кислот в системі ПЛР реальному часі QuantStudio 5

Чистота нуклеїнової кислоти вимірювалася за співвідношеннями оптичної густини 260/280 та 260/230. Співвідношення 260/280 повинно бути між 1,65 та 2,5; відхилення від цих значень вказують на забруднення білками або фенолом. Співвідношення 260/230 повинно бути між 1,8 та 3; відхилення від цих значень вказують на забруднення хаотропними солями або вуглеводами.

Якщо концентрація занадто низька або значення чистоти відхиляються, зразок повторно виділяли.

2.5 Постановка ПЛР у реальному часі

Для визначення наявності грибів у зразку використовувався метод ПЛР у реальному часі. Для цього цільова послідовність у геномі патогену ампліфікувалася за допомогою пари олігонуклеотид-специфічних праймерів та флуоресцентно міченого зонда.

Реакція включала такі етапи:

1. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі містить два праймери (прямий і зворотний), що визначають цільову ділянку в нуклеїновій кислоті патогену, флуоресцентний зонд, що містить флуоресцентний репортер, і гасник.

Поки зразок не пошкоджений, гасник знаходиться досить близько до репортера та пригнічує його флуоресценцію.

2. Коли ДНК-полімераза починає синтезувати комплементарний ланцюг, він руйнує зразок за рахунок нуклеазної активності.

3. Фізично відокремлений репортер починає випускати флуоресценцію, яка детектується термоциклером.

4. Відбувається ампліфікація цільового фрагмента, що визначається за рівнем флуоресценції репортерних молекул, що вивільняються гасником.

Кожна реакція містила такі компоненти: (табл. 2.1):

Таблиця 2.1

Компоненти для ПЛР у реальному часі

Компонент	Об'єм на одну реакцію, мкл
TE буферний розчин	5
4x ампліфікаційна суміш	5
Суміш праймерів	5
Розчин НК	5

Для виявлення грибкових патогенів дуба за допомогою ПЛР у реальному часі використовували комерційні набори праймерів (набір праймерів 1 для листя дуба, набір праймерів 2 – жолуді дуба) та флуоресцентних зондів (рис. 2.17), специфічних до мішеней відповідних патогенів. Кожна пара праймерів ампліфікує фрагменти ДНК, характерні для певного виду грибів, що інфікують листя або плоди дуба (жолуді). Праймери, спрямовані на консервативну область геному рослини, використовувалися як внутрішній контроль реакції, що дозволяло оцінити якість екстракції нуклеїнових кислот та точність ампліфікації.



Рис. 2.17 Комерційні набори праймерів та флуоресцентних зондів, які використовувалися в дослідженнях

Послідовність праймерів та флуоресцентних зондів, використаних у дослідженні, наведена в таблиці нижче (табл. 2.2). Усі праймери були комерційного походження та підібрані таким чином, щоб забезпечити високу специфічність до цільових ділянок ДНК грибних патогенів дуба черешкового (*Quercus robur*).

Для контролю якості реакції кожна суміш також включала внутрішній контроль, що відповідає фрагменту геному рослини-господаря і що дозволяє оцінити ефективність виділення ДНК та коректність постановки реакції.

Праймери були підібрані на основі послідовностей, опублікованих у міжнародних базах даних (GenBank, NCBI), а їхня специфічність перевірялася *in silico* за допомогою програми BLAST.

Кожен зонд мав флуоресцентну мітку (FAM, HEX, ROX або Cy5) та гасник (BHQ1 або BHQ2), що забезпечувало можливість мультиплексної детекції кількох патогенів в одній реакційній пробірці.

Таблиця 2.2

Послідовність праймерів та флуоресцентних зондів

Мішень	Праймер	Послідовність
Рослина (внутрішній контроль)	Прямий	5'-CAGCTCGCGTTGACTACGTC-3'
	Зворотній	5'-GATCCGAACACTTCACCGGA-3'
	Проба	5'-Cy5-ACACACCGCCCGTTCGCTCC-BHQ2-3'
Хвороби листя (Суміш праймерів 1)		
<i>Microsphaera alphitoides</i>	Прямий	5'-TTCCGACSTTGTGCTCCTC-3'
	Зворотній	5'-CATTTTCGCTGCGTTCTTCATC-3'
	Проба	5'-FAM-ACCATCAAACCTCTGCA-BHQ1-3'
<i>Gloeosporium quercinum</i>	Прямий	5'-GGCGGGTAGGGTCYCCG-3'
	Зворотній	5'- ACTCAGAAGAAACGTCGTAAATCAG-3'
	Проба	5'-HEX-CTCCCGGCCTCCCGCCYC-BHQ1-3'

Таблиця 2.2

Послідовність праймерів та флуоресцентних зондів

Мішень	Праймер	Послідовність
<i>Ascochyta quercus</i>	Прямий	5'-CTTATGGGCTCCGGTCCAAG-3'
	Зворотній	5'-GCTTCCTGTGGTGGTTGTCAG-3'
	Проба	5'-ROX- GACATCCTTGCCCACTTAATAC-3'
Хвороби жолудів (суміш праймерів 2)		
<i>Stromatinia pseudotuberosa</i>	Прямий	5'-CCTACATTCTACTTGATCTAGTA-3'
	Зворотній	5'-GTTGGTAGTTGTGGGTTA-3'
	Проба	5'-FAM- ACTTCCAAGTGAATACCAGGATA-BHQ1-3'
<i>Phomopsis quercella</i>	Прямий	5'-CATCGTTACTGACCTCGACTTT-3'
	Зворотній	5'- ACGAGATTTGAAGACAGGGAATAG-3'
	Проба	5'-HEX-AACCATCTCTGGCGA-BHQ1-3'
<i>Cytospora sp</i>	Прямий	5'-GAGCGCATGAACGTCTACTT-3'
	Зворотній	5'-GGAAGAAAGCGCGTCAGTAA-3'
	Проба	5'-ROX-TCGTCAATCCGGCACATTA-BHQ1-3'

2.6 Контроль точності та відтворюваності результатів дослідження

Для забезпечення достовірності результатів під час полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі в кожній пробі використовували позитивний, негативний та внутрішній контроль.

Було підготовлено три типи пробок:

1. Внутрішній контроль;
2. Позитивний контроль;
3. Негативний контроль.

Позитивний контроль складався із синтетичного олігонуклеотиду з відомою нуклеотидною послідовністю, комплементарною цільовою молекулою відповідного патогену. Він використовувався для перевірки ефективності реакції, функціонування ферментів, праймерів та флуоресцентних зондів, а також для підтвердження коректності умов ампліфікації.

Негативний контроль вмісту НК у ТЕ-буфері, що призвело до забруднення та підтвердження чистоти реакційної суміші.

Внутрішній контроль використовували для перевірки наявності та якості геномної ДНК дуба (*Quercus robur*), яка слугувала індикатором успішності екстракції НК і правильності проведення ампліфікації у тестових зразках.

Процес ампліфікації контролювався в режимі реального часу за допомогою змін інтенсивності флуоресценції, що реєструвалися термоциклером. Графічне відображення кривих флуоресценції на екрані пристрою дозволило оцінити генерацію сигналу в кожному циклі реакції та визначити порогові значення (C_t) для позитивних зразків.

Позитивний контроль виключив точку кривого циклу посилення з пороговим $C_t \leq 35$, що підтверджує функціональність системи.

Негативний контроль містив усі компоненти реакційної суміші, крім ДНК-матриці. Відсутність флуоресцентного сигналу в цьому зразку свідчила про відсутність забруднення реагентів чужорідною ДНК, що могло призвести до хибнопозитивних результатів.

Внутрішній контроль у тестових зразках демонстрував стабільний флуоресцентний сигнал, що підтверджує правильність екстракції ДНК та відсутність інгібіторів у реакційній суміші.

Використання системи з трьох контролів — позитивного, негативного та внутрішнього — забезпечило високу точність, відтворюваність та надійність результатів ампліфікації.

2.6 Інтерпретація результатів ПЛР

Результати ампліфікації оцінювали за пороговим значенням циклу (C_t), що відображає момент появи достовірного сигналу флуоресцентного в ході реакції. Це основний параметр, що вказував на наявність або відсутність цільової ДНК у зразку.

Тестування вважалося коректним, якщо значення C_t для позитивного контролю ≤ 35 у всіх каналах детекції. Цей результат підтверджував працездатність реакційної системи, коректність умов ампліфікації та придатність реагентів для ПЛР-аналізу.

Результати тестування інтерпретували за значенням порогового циклу (C_t):

- 1) Негативний результат фіксували в тому випадку, коли в зразку тесту не спостерігався флуоресцентний сигнал ($C_t \geq 35$), тоді як для внутрішнього контролю значення C_t було ≤ 35 . Це свідчило про відсутність ДНК клітинного патогена в зразку і підтверджувало правильність виконання попередніх етапів — екстракції нуклеїнової кислоти.
- 2) Позитивний результат визначили за значенням $C_t \leq 35$ як для тестового зразка, так і для внутрішнього контролю. В цьому випадку ампліфікація вказувала на наявність ДНК специфічного грибкового патогена в досліджуваному матеріалі.

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Результати молекулярної діагностики грибних патогенів у листі дуба (*Quercus robur*)

Для ідентифікації грибкових патогенів, що спричиняють хвороби листя дуба звичайного (*Quercus robur*), було використано суміш праймерів 1. Цей праймер дозволив виявити *Erysiphe alphitoides* (збудник борошнистої роси), *Gloeosporium quercinum* (збудник антракнозу) та *Ascochyta quercus* (збудник білої плямистості). Дослідження було проведено на десяти зразках листя, зібраних у різних районах Києва, з використанням позитивних та негативних контролів для валідації результатів.

Процес ампліфікації дав характерні криві флуоресценції, що відображають наявність або відсутність ДНК відповідних патогенів у зразках.

Перший зразок не показує флуоресцентних сигналів у каналах FAM, HEX та ROX, тоді як канал Cy5 демонструє стабільну криву внутрішнього контролю.

Це свідчить про адекватну екстракцію ДНК та правильне проведення реакції; проте ДНК цільових грибкових патогенів у зразку не виявлено (рис. 3.1).

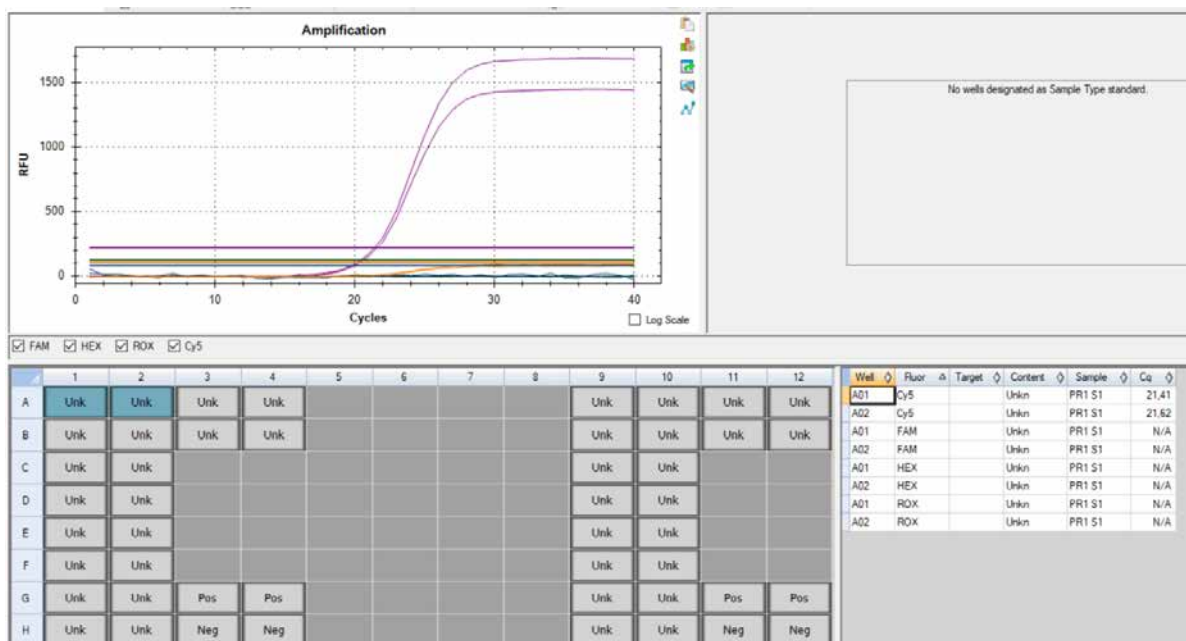


Рис. 3.1 Суміш праймерів 1 зразок 1

У зразку 2 флуоресценцію було виявлено в каналі HEX, що узгоджується з наявністю ДНК *Gloeosporium quercinum*. Не всі ампліфікації були виявлені в каналах FAM та ROX.

Це вказує на наявність цільового фрагмента ДНК, характерного для збудника плямистості листя дуба, тоді як інших збудників у цьому зразку виявлено не було.

Внутрішній контроль Cy5 показав стабільний сигнал, що підтверджує правильність реакції та високу якість виділеної ДНК (рис. 3.2).

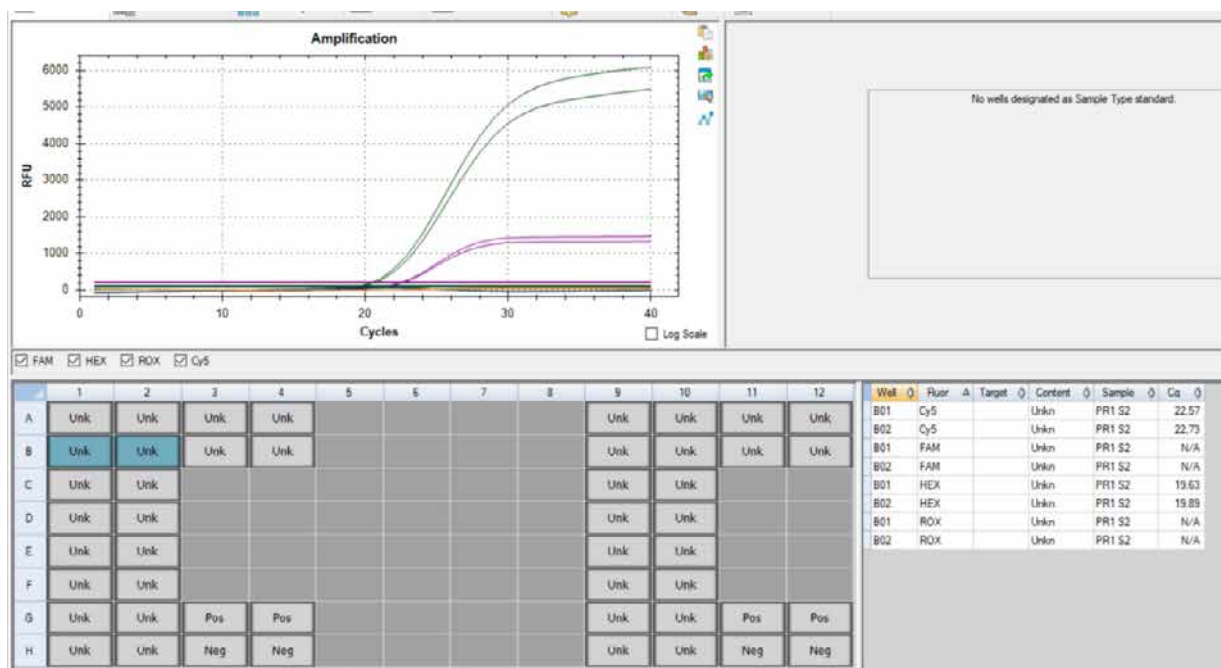


Рис. 3.2 Суміш праймерів 1 зразок 2

У зразку 3 реакція ампліфікації виявила сигнал у каналі HEX, що підтверджує наявність *Gloeosporium quercinum*. В інших каналах сигнал не виявлено (рис. 3.3).

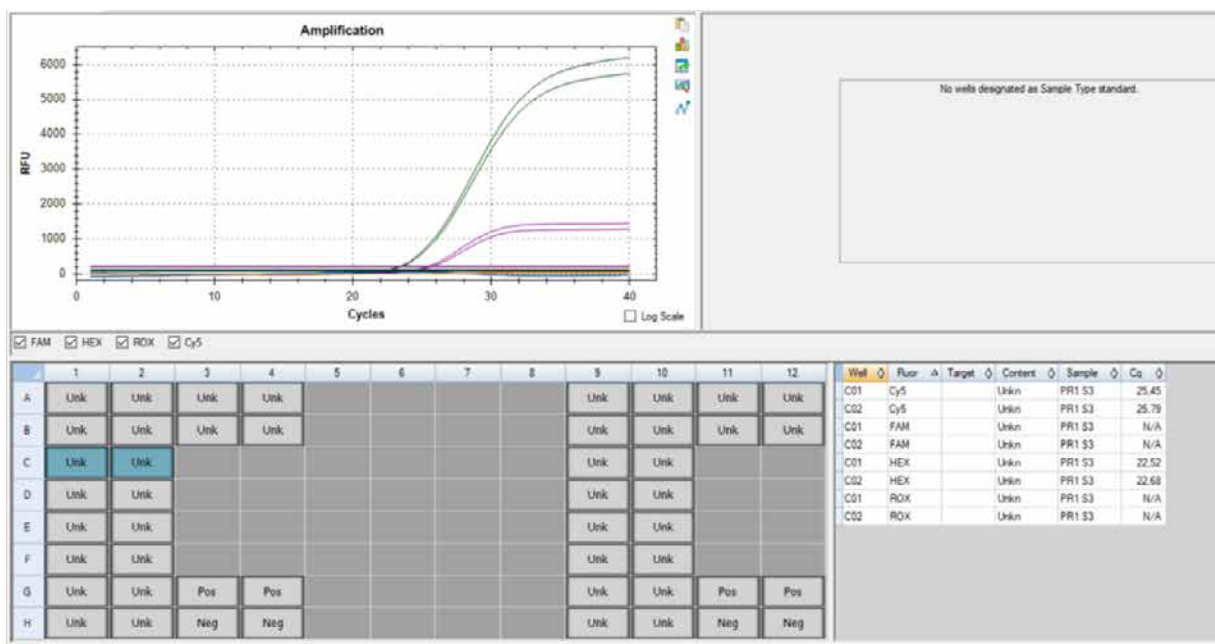


Рис. 3.3 Суміш праймерів 1 зразок 3

У 4 зразку флуоресцентних сигналів у каналах FAM, HEX та ROX зареєстровано не було, але внутрішній контроль (Cy5) був стабільним (рис. 3.4).

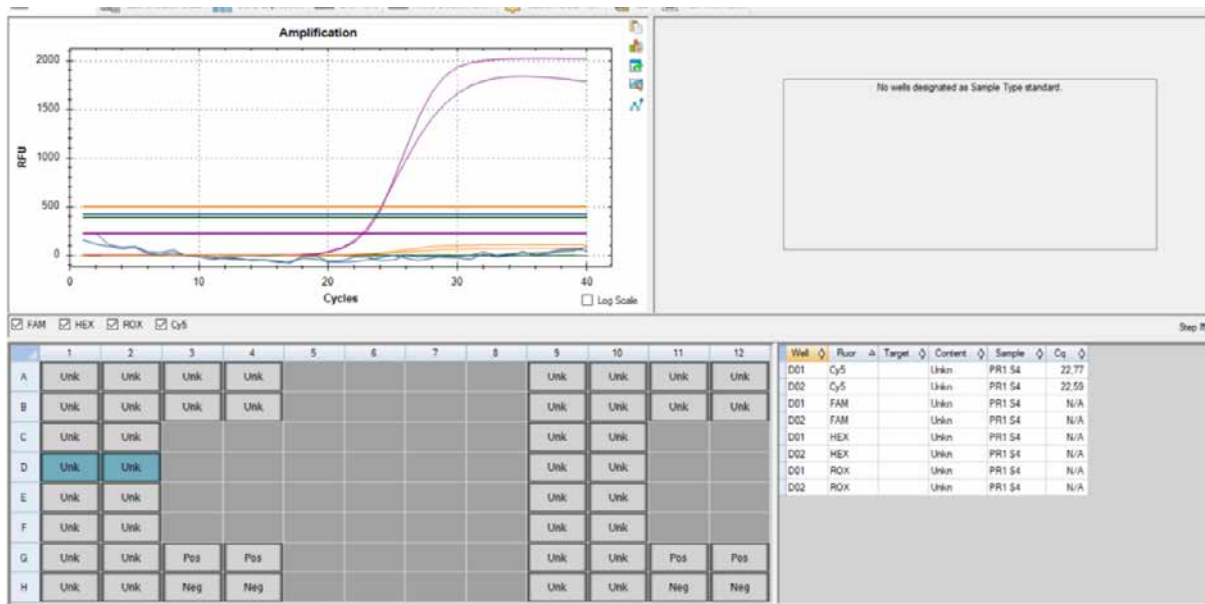


Рис. 3.4 Суміш праймерів 1 зразок 4

У 5 зразку ампліфікацію було виявлено в каналі HEX, що вказує на наявність ДНК *Gloeosporium quercinum*. Інших патогенів виявлено не було (рис. 3.5).

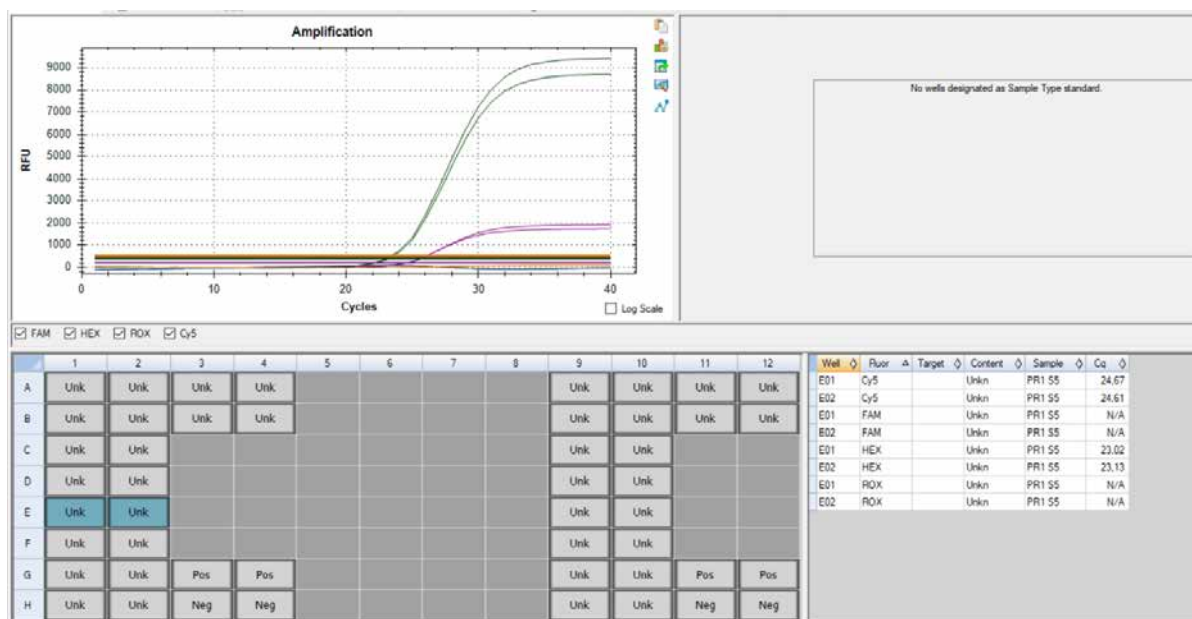


Рис. 3.5 Суміш праймерів 1 зразок 5

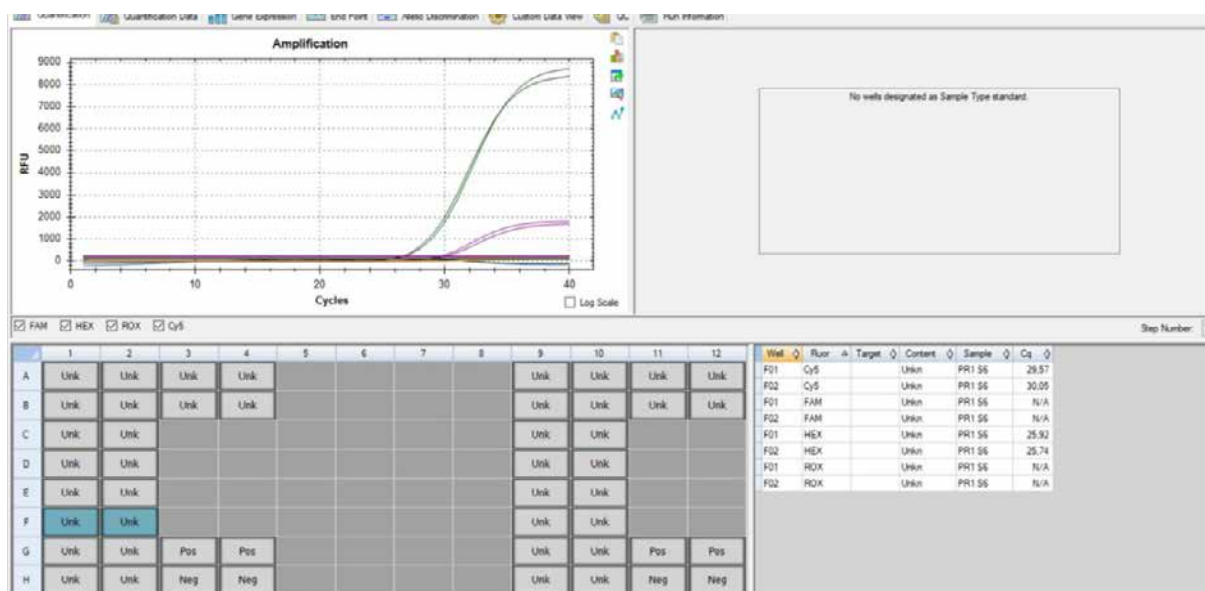


Рис. 3.6 Суміш праймерів 1 зразок 6

У зразку 6 сигнал каналу HEX підтверджує наявність *Gloeosporium quercinum*. Канали FAM та ROX залишаються без сигналу (рис. 3.6).

У 7 зразку флуоресценція у каналах FAM, HEX, ROX не спостерігається, внутрішній контроль спрацював коректно (рис. 3.7).

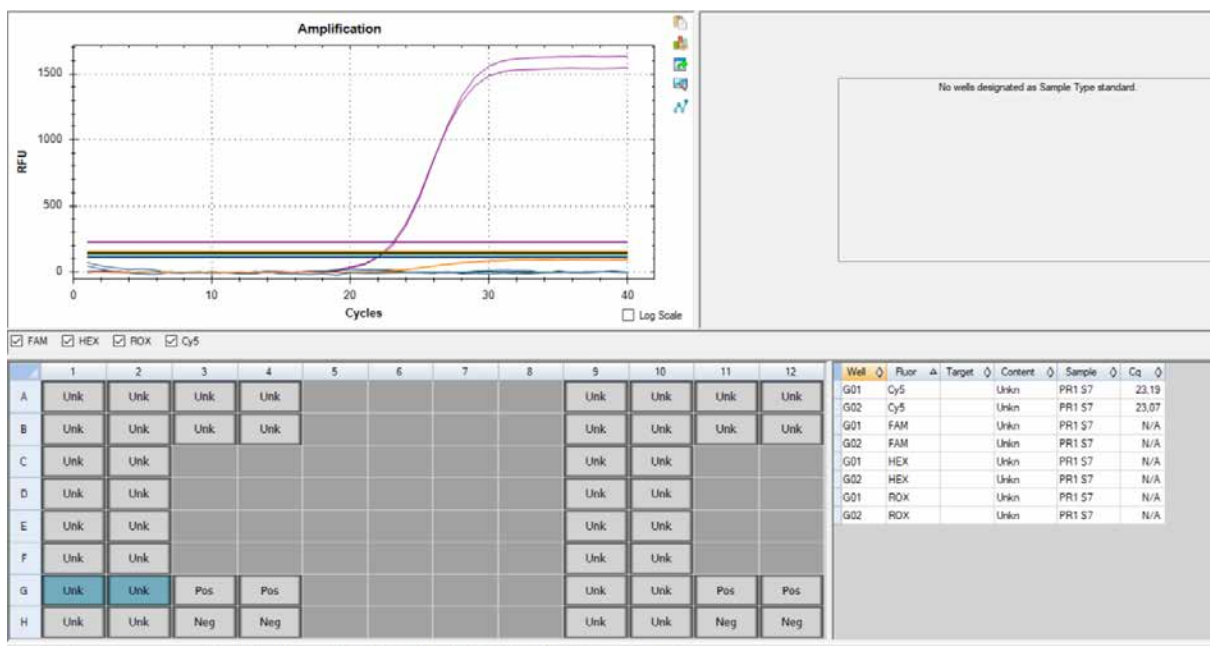


Рис. 3.7 Суміш праймерів 1 зразок 7

У 8 зразку у каналі FAM виявлено ампліфікацію, що вказує на присутність ДНК *Microspheara alphitoides*, збудника борошнистої роси дуба. Інші канали залишилися без сигналу (рис. 3.8).

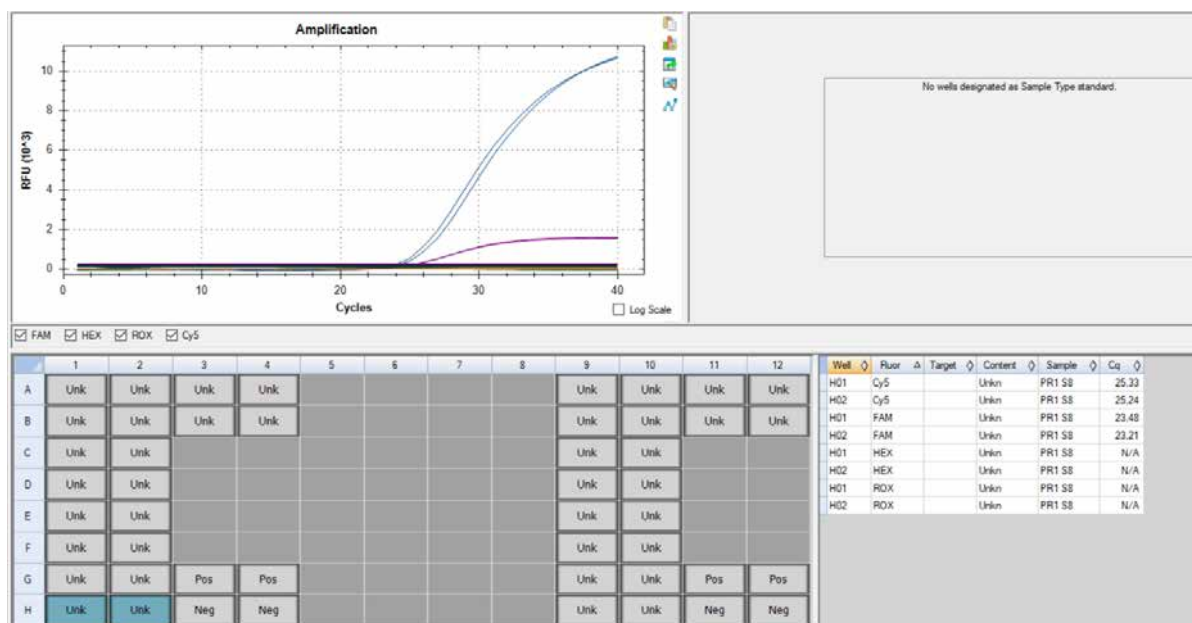


Рис. 3.8 Суміш праймерів 1 зразок 8

У 9 зразку ампліфікації цільових фрагментів не відбулося, присутній сигнал внутрішнього контролю (рис. 3.9).

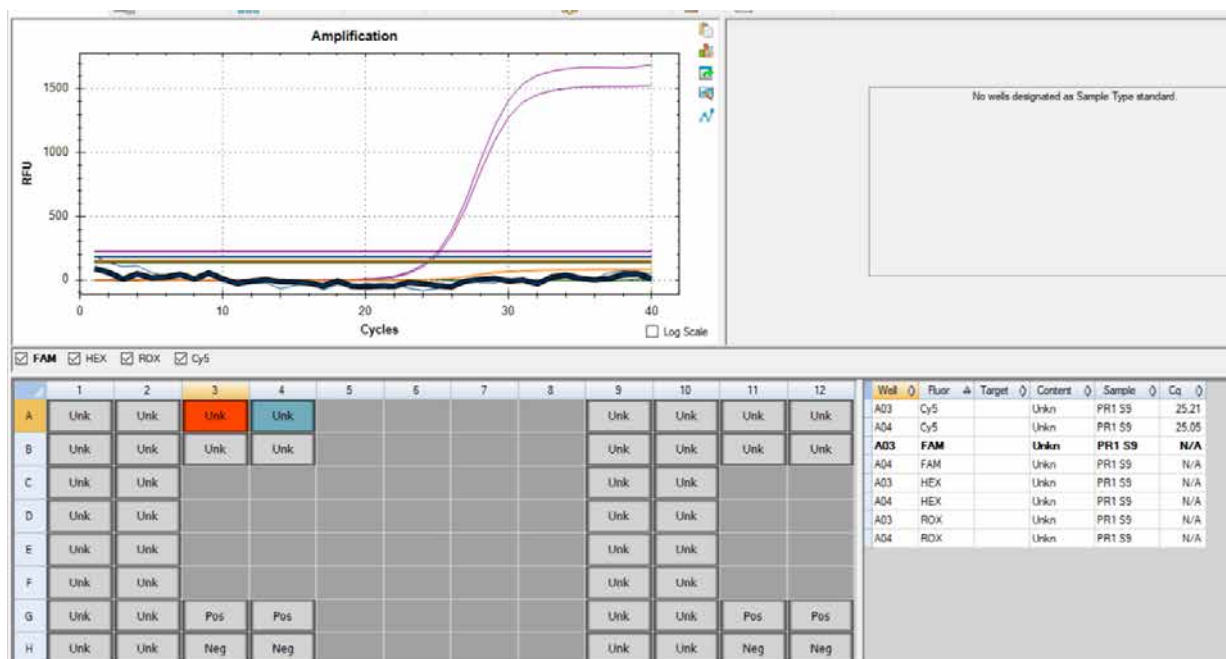


Рис. 3.9 Суміш праймерів 1 зразок 9

У 10 зразку була виявлена флуоресценція у HEX-каналі, характерна для *Gloeosporium quercinum*. Інших сигналів не було виявлено (рис. 3.10).

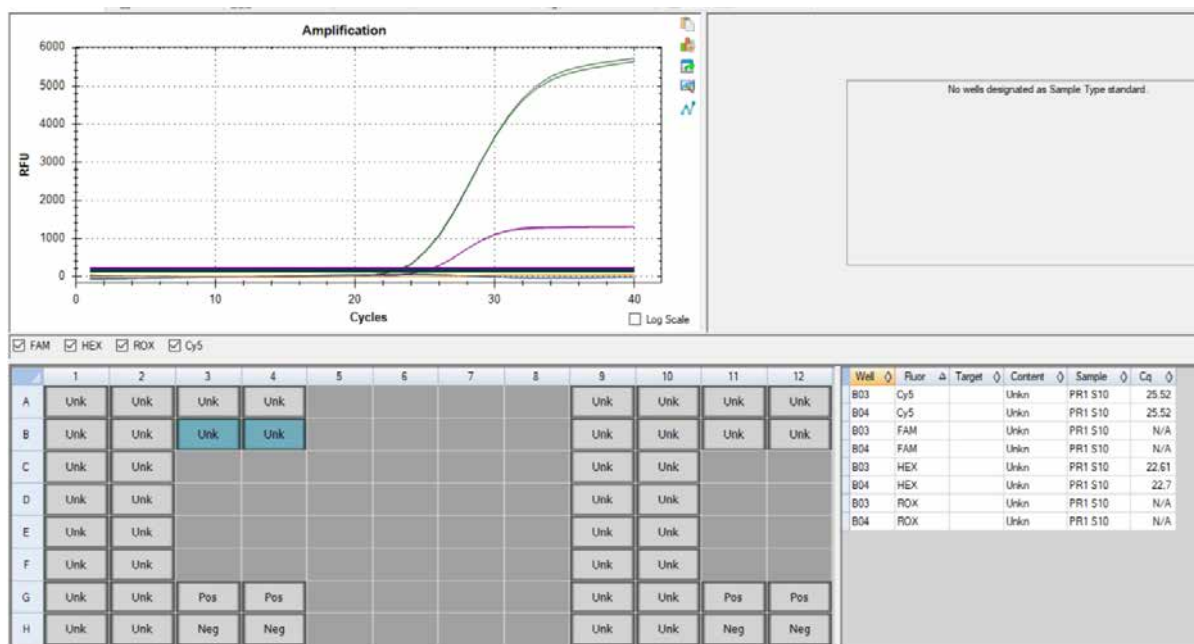


Рис. 3.10 Суміш праймерів 1 зразок 10

Позитивний контроль показує чіткий сигнал у всіх каналах (FAM, HEX, ROX), що підтверджує ефективність праймерів та правильність умов реакції (рис. 3.11).

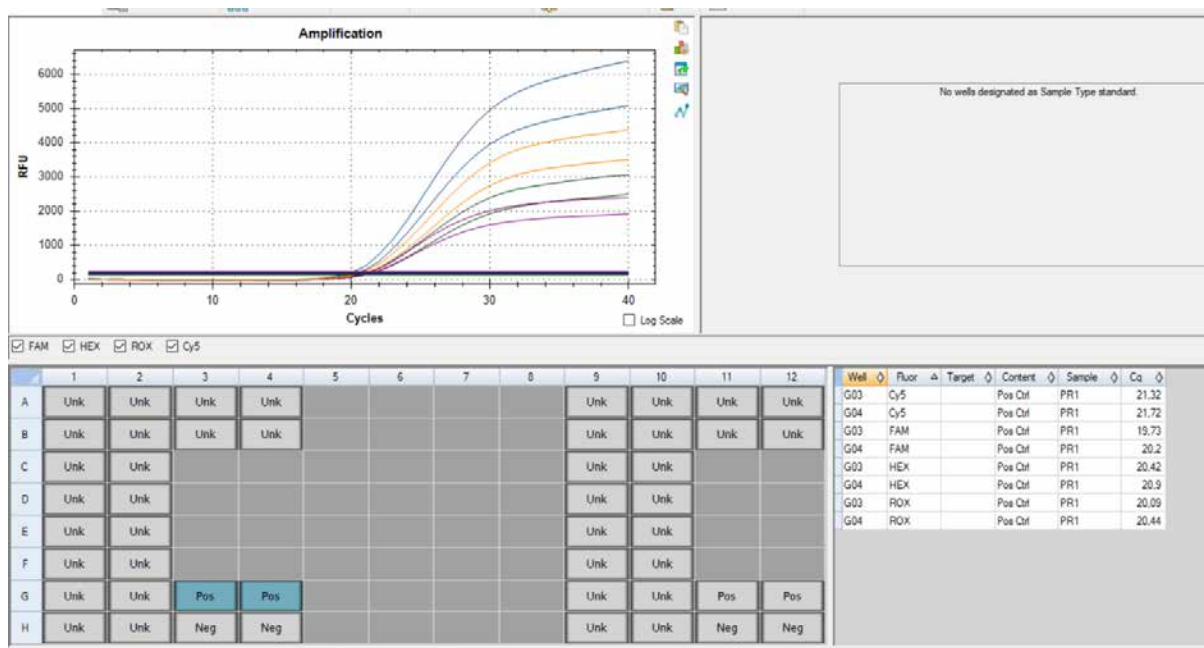


Рис. 3.11 Суміш праймерів 1 позитивний контроль

Флуоресцентний сигнал відсутній у всіх каналах, що свідчить про відсутність забруднення реагентами чи чужорідної ДНК (рис. 3.12).

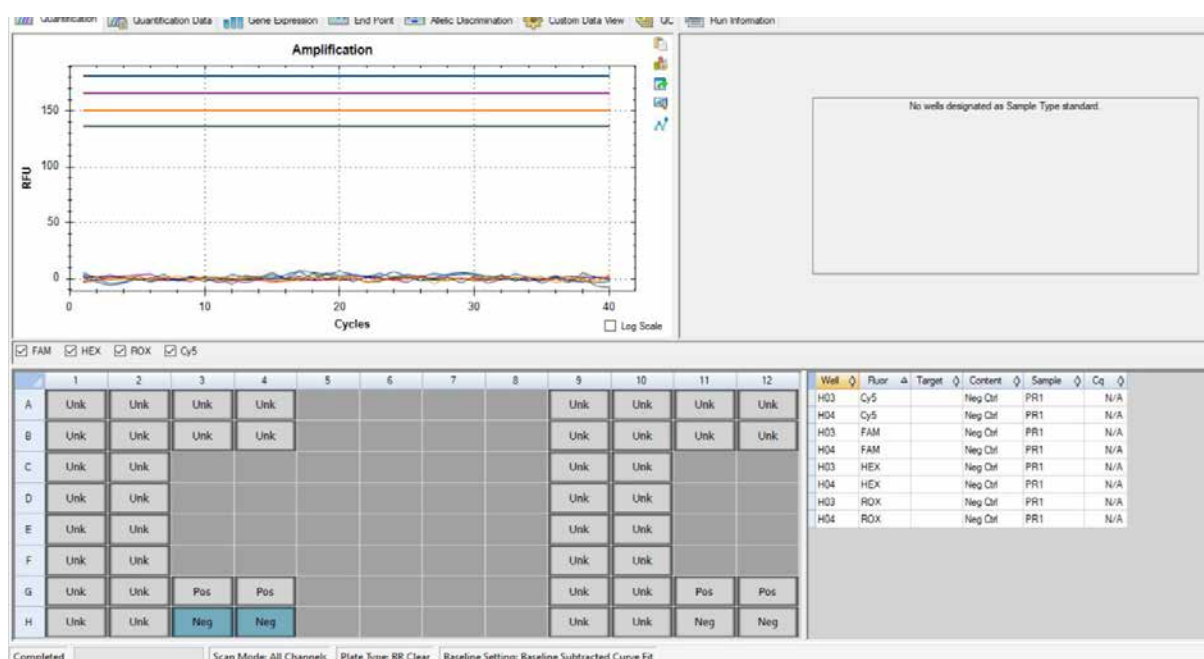


Рис. 3.12 Суміш праймерів 1 негативний контроль

3.2 Результати молекулярної діагностики грибкових патогенів у плодах дуба (*Quercus robur*)

Для виявлення грибкових патогенів, що вражають плоди дуба (жолуді), використовували суміш праймерів, специфічну для трьох типів патогенів:

- *Stromatinia pseudotuberosa* (збудник муміфікації плодів, канал FAM),
- *Phomopsis quercella* (збудник білої гнилі, канал HEX)
- *Cytospora sp.* (збудник некротичних уражень, канал ROX).

Аналіз проводиться на десяти зразках жолудів, виявлених у різних регіонах. Києва. Усі процедури супроводжуються позитивним та негативним контролем, а також внутрішнім контролем, що підтверджує якість ДНК та правильність проведення ампліфікації.

Отримані результати представлені у вигляді кривих ампліфікаційних, що відображають появу флуоресцентних сигналів у відповідних каналах.

Зразок 1 показав чіткий флуоресцентний сигнал у каналі ROX, що узгоджується з виявленням *Cytospora sp.* Криві ампліфікації були відсутні в каналах FAM та HEX, що відповідає *S. pseudotuberosa* та *P. quercella*. Внутрішній контроль (Cy5) показав стабільну ампліфікацію, що свідчить про адекватну якість зразка (рис. 3.13).

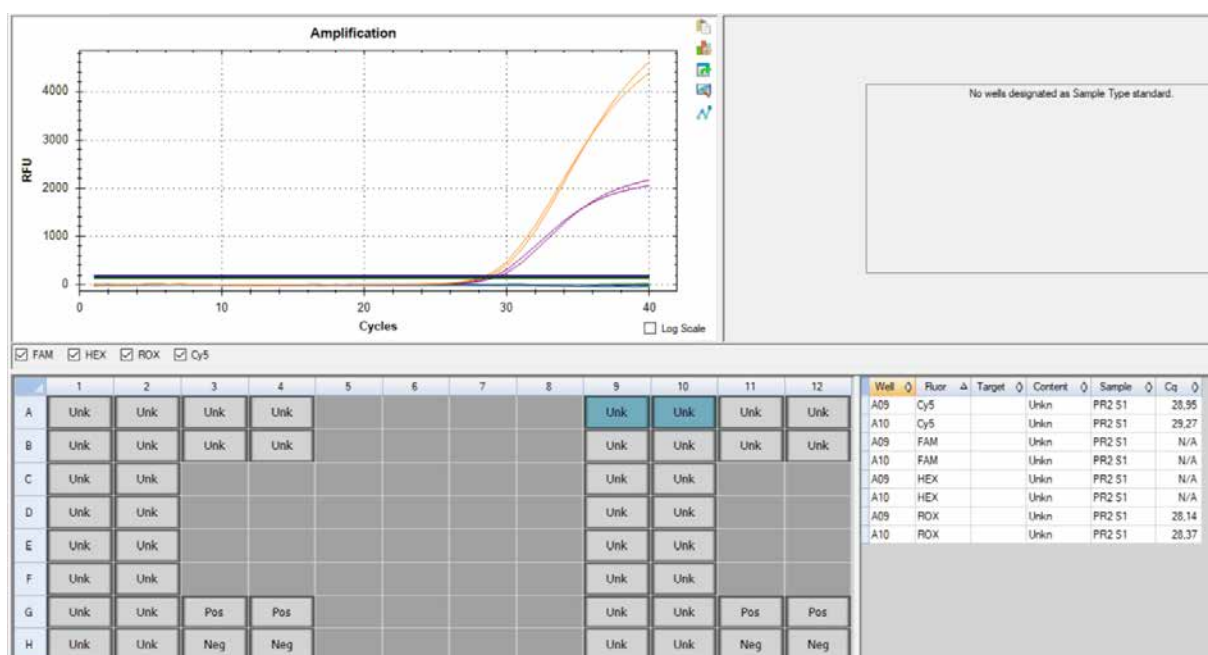


Рис. 3.12 Суміш праймерів 2 зразок 1

У другому зразку ампліфікації цільових фрагментів не виявлено — кривих у каналах FAM, HEX та ROX не було. Однак внутрішній контроль провів надійно, підтвердивши відсутність інгібіторів та правильність реакції (рис. 3.13).

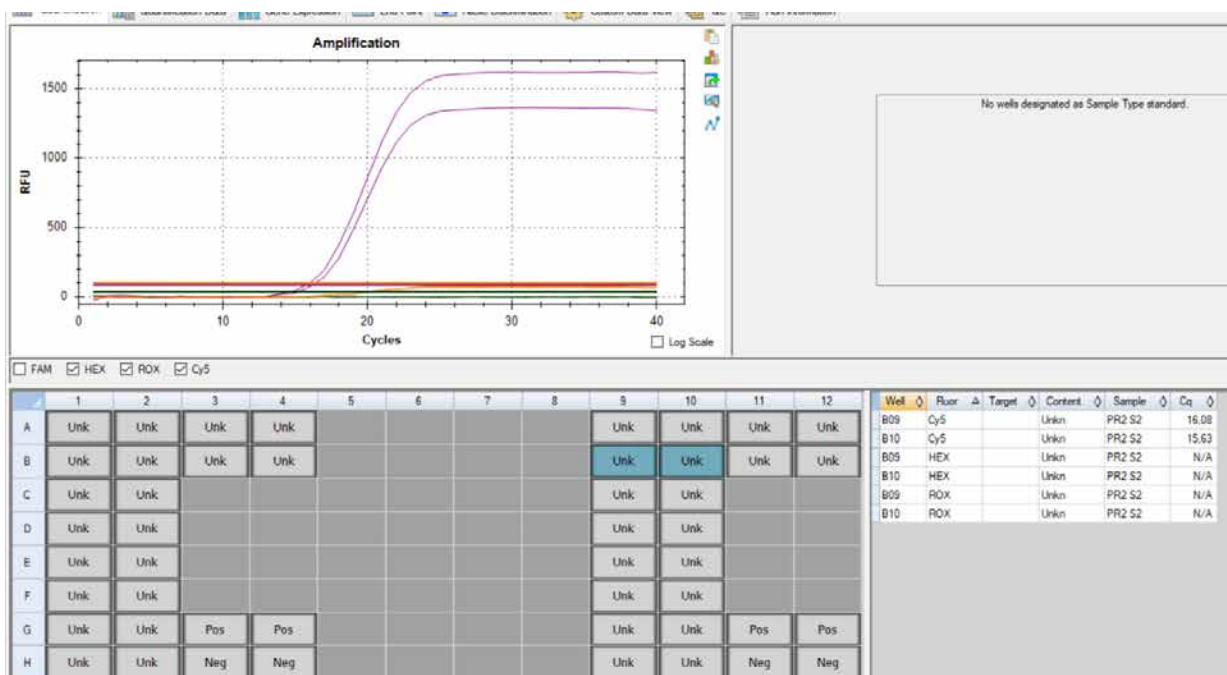


Рис. 3.13 Суміш праймерів 2 зразок 2

У зразку 3 ампліфікації цільових патогенів також не спостерігалось. Криві флуоресценції в каналах FAM, HEX та ROX залишалися на базових рівнях, тоді як внутрішній контроль показав наявність високоякісної ДНК дуба (рис. 3.14).

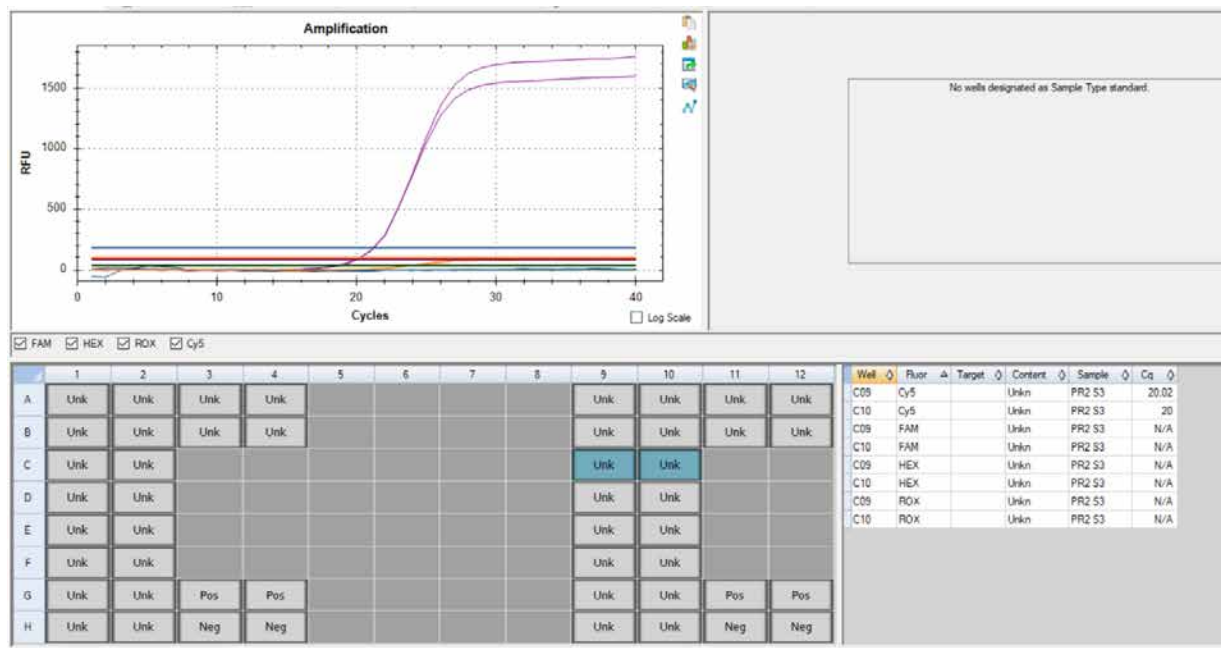


Рис. 3.14 Суміш праймерів 2 зразок 3

Зразок 4 не показав флуоресцентного сигналу в жодному з каналів, що відповідають цільовим патогенам. Внутрішній контроль ампліфікувався нормально, що свідчить про технічну правильність реакції (рис. 3.15).

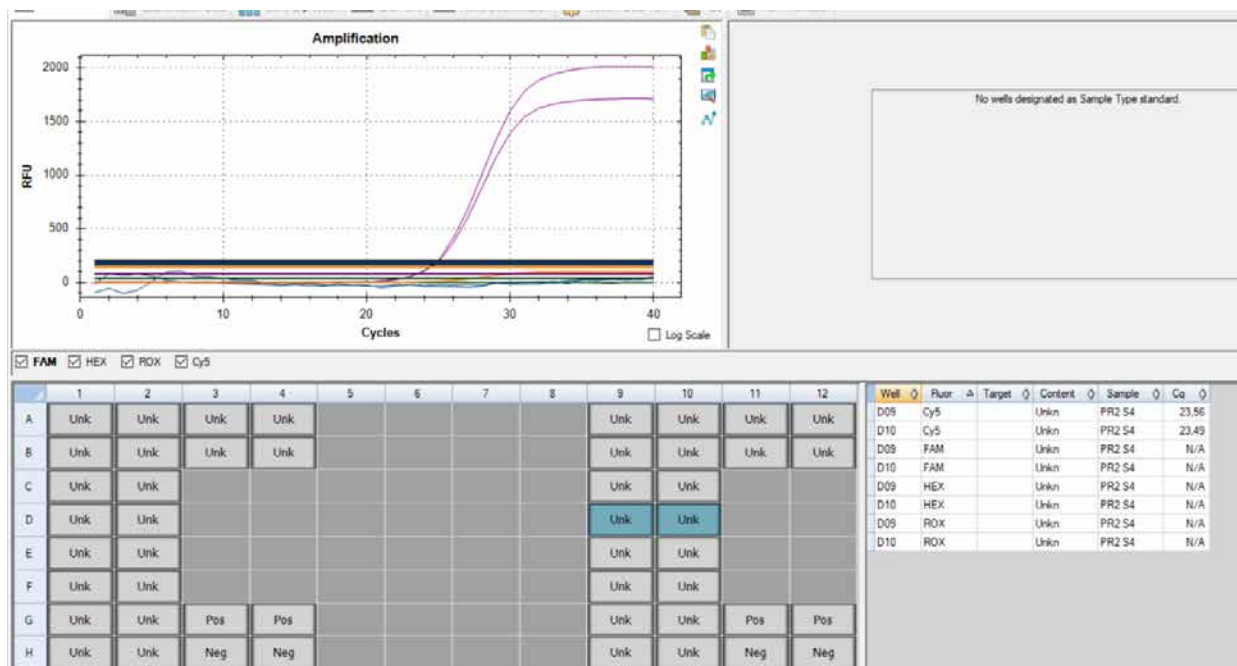


Рис. 3.15 Суміш праймерів 2 зразок 4

У п'ятому зразку флуоресцентні сигнали в каналах FAM, HEX та ROX не виявлено, що свідчить про відсутність цільових патогенів (рис. 3.16)

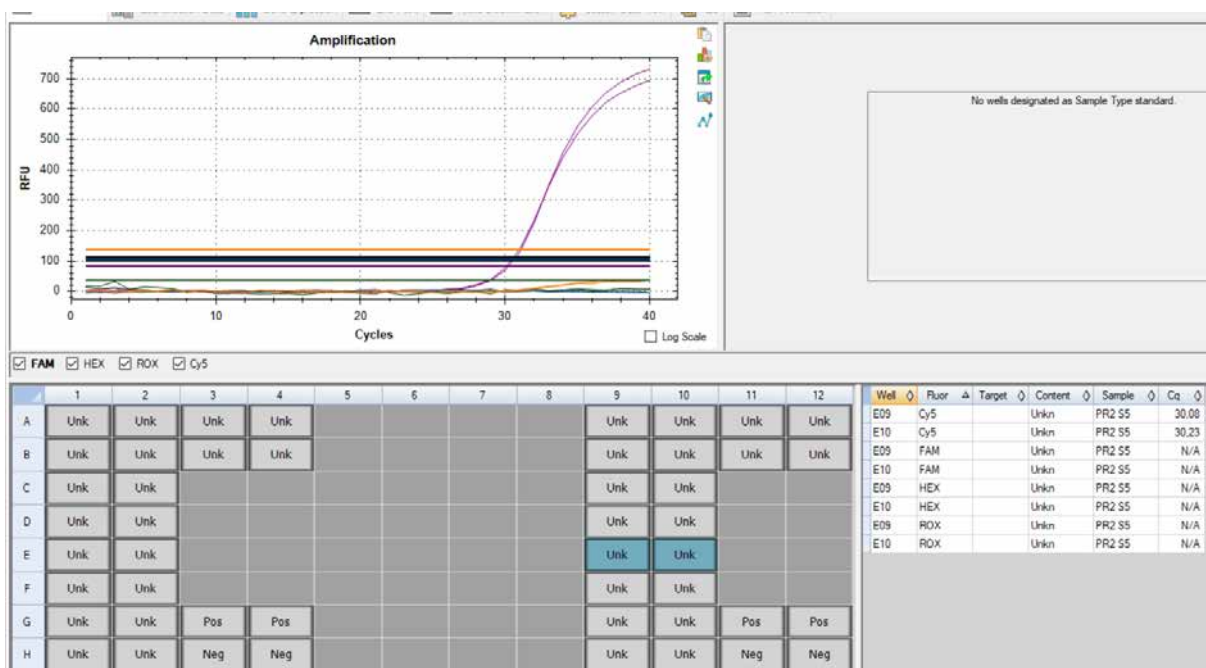


Рис. 3.16 Суміш праймерів 2 зразок 5

Реакція зразка 6 показала нормальний сигнал внутрішнього контролю, але ампліфікації в цільових каналах не виявлено. У каналах FAM, HEX та ROX сигналів немає; внутрішній контроль показує стабільну криву (рис. 3.17).

Реакція відбулася правильно, але патогени не виявлені.

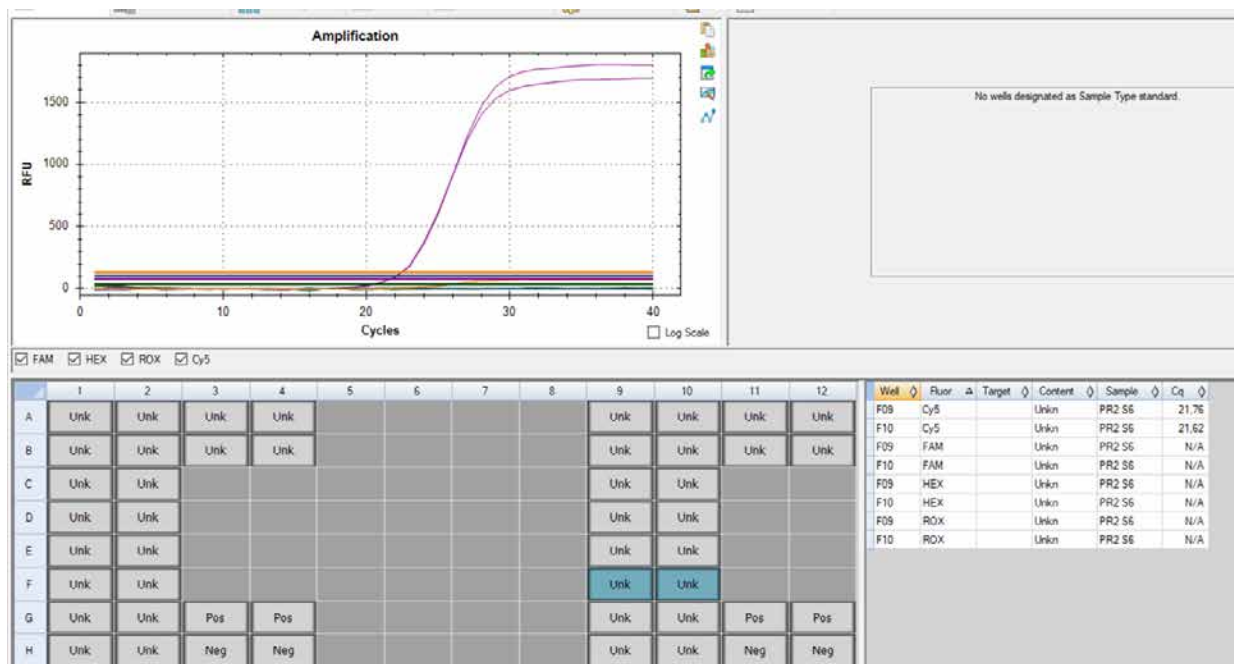


Рис. 3.17 Суміш праймерів 2 зразок 6

Сигнали у каналах FAM, HEX та ROX відсутні, а внутрішній контроль демонструє стабільну криву (рис. 3.18). Реакцію проведено коректно, але патогени не виявлені. Це свідчить про відсутність ДНК цільових грибкових патогенів у досліджуваному зразку, що може свідчити про здоровий фітосанітарний стан плодів дуба або дуже низьку концентрацію патогену, що не перевищує поріг чутливості методу.

Водночас отриманий стабільний сигнал внутрішнього контролю підтверджує, що процес екстракції та ампліфікації ДНК відбувся правильно, а відсутність флуоресцентних піків у цільових каналах є надійним показником негативного результату.

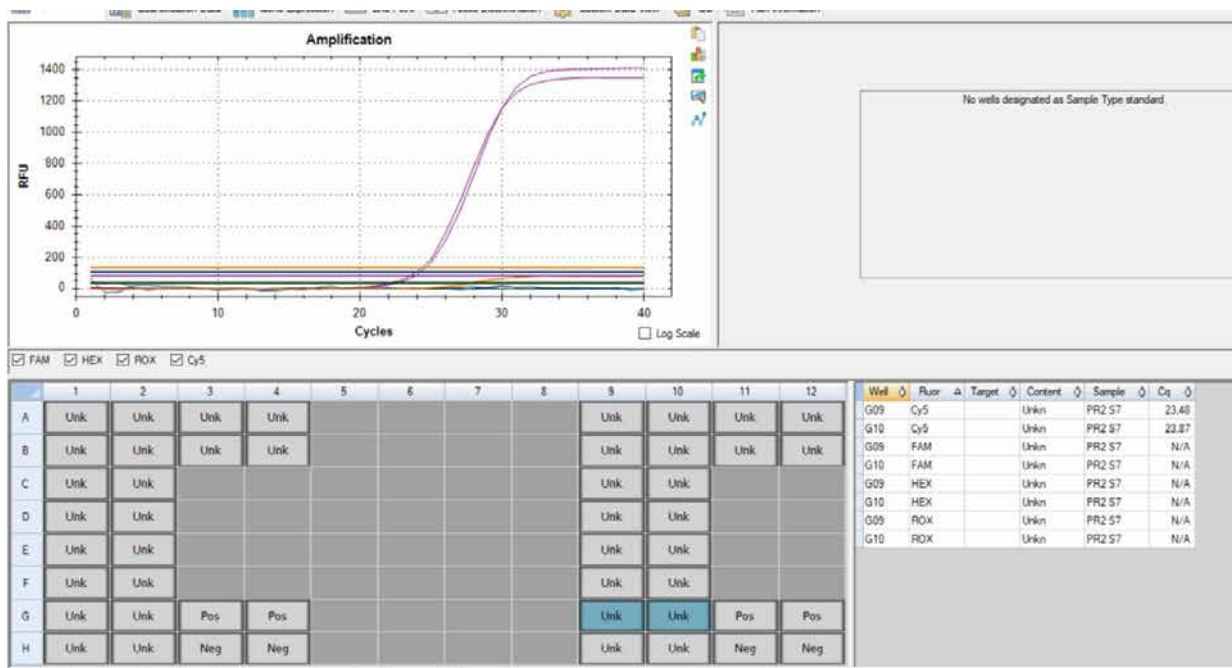


Рис. 3.18 Суміш праймерів 2 зразок 7

Зразок 8 не показав сигналу флуоресценції в жодному каналі, окрім внутрішнього контролю (рис. 3.19).

Це вказує на негативний результат та відсутність грибкової інфекції в досліджуваному матеріалі.

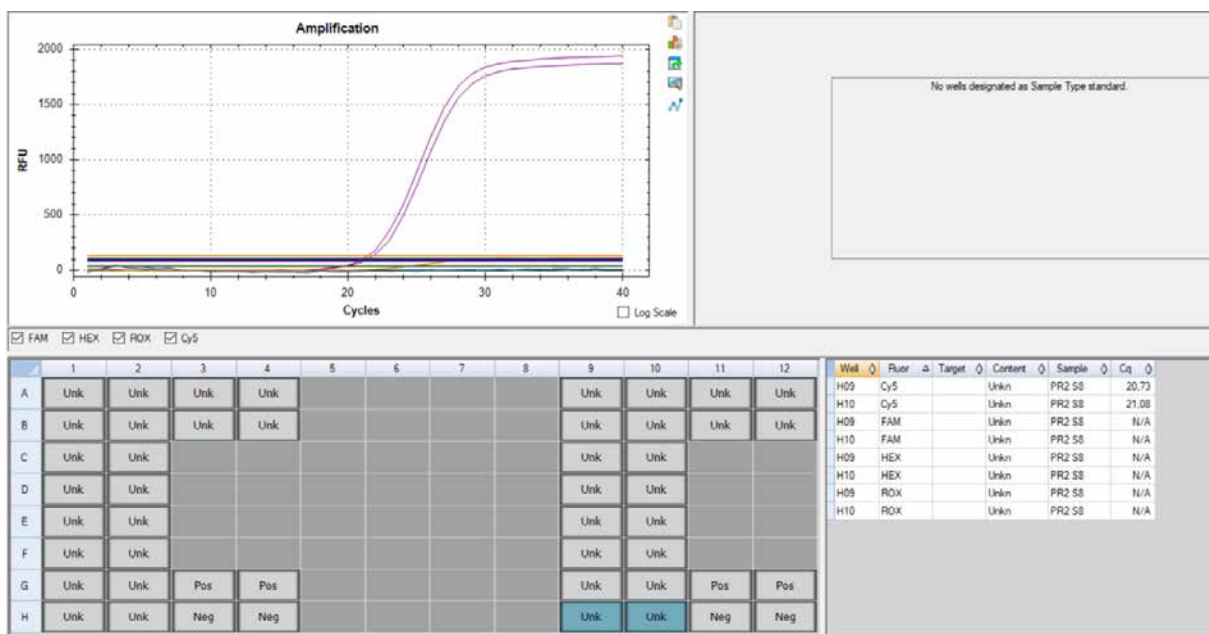


Рис. 3.19 Суміш праймерів 2 зразок 8

. Зразок 9 показав чітку ампліфікацію в каналі ROX, що відповідає патогену *Cytospora sp.* Інші канали залишалися без сигналу (рис. 3.19). Це вказує на

позитивний результат — плід дуба містить ДНК *Cytospora sp.*, ймовірно, в латентній або початковій стадії ураження.

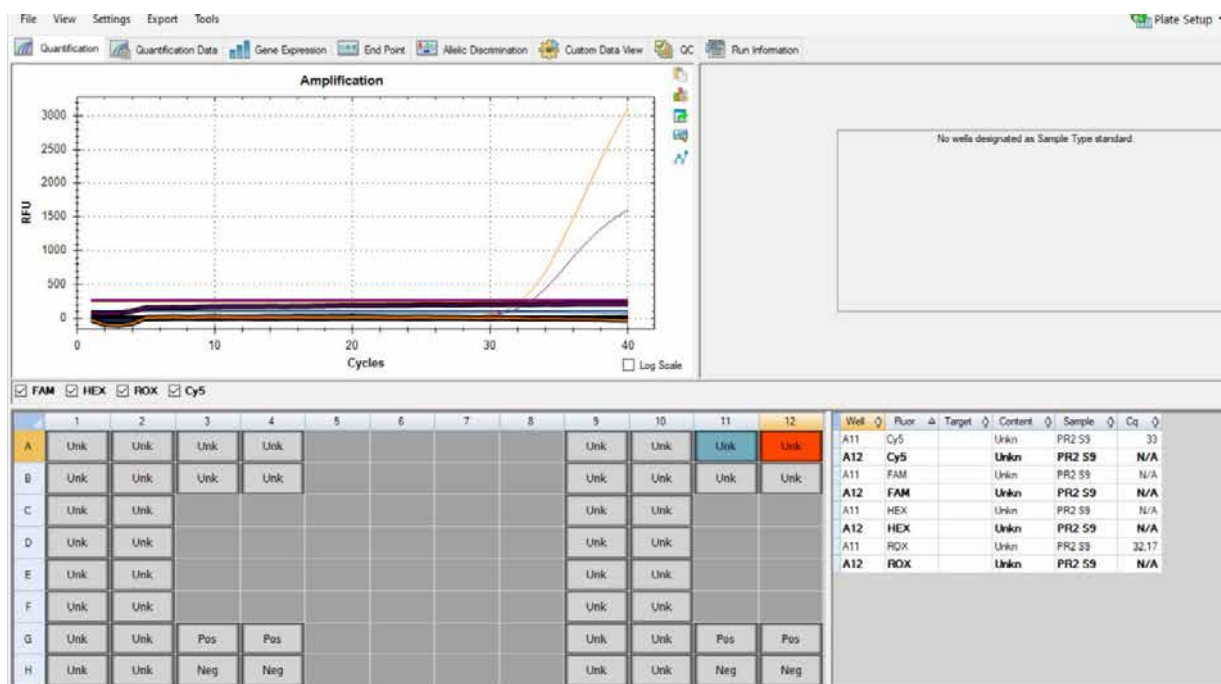


Рис. 3.20 Суміш праймерів 2 зразок 9

Зразок 10 показав аналогічну картину: позитивна крива флуоресценції в каналі ROX, що підтверджує наявність *Cytospora sp* (рис. 3.20). Решта каналів залишалися без сигналу; внутрішній контроль показав стабільні результати

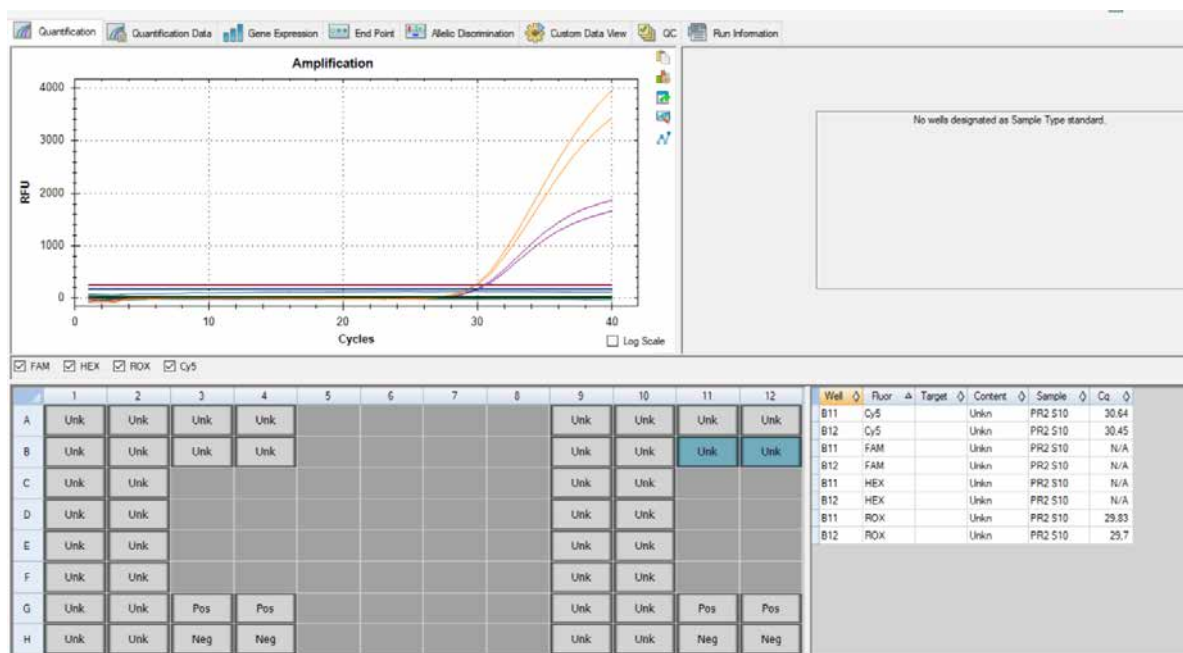


Рис. 3.21 Суміш праймерів 2 зразок 10

Позитивний контроль чітко показує ампліфікацію всіх трьох каналів (FAM, HEX, ROX), що свідчить про правильне використання праймерів та правильні умови реакції (рис. 3.22).

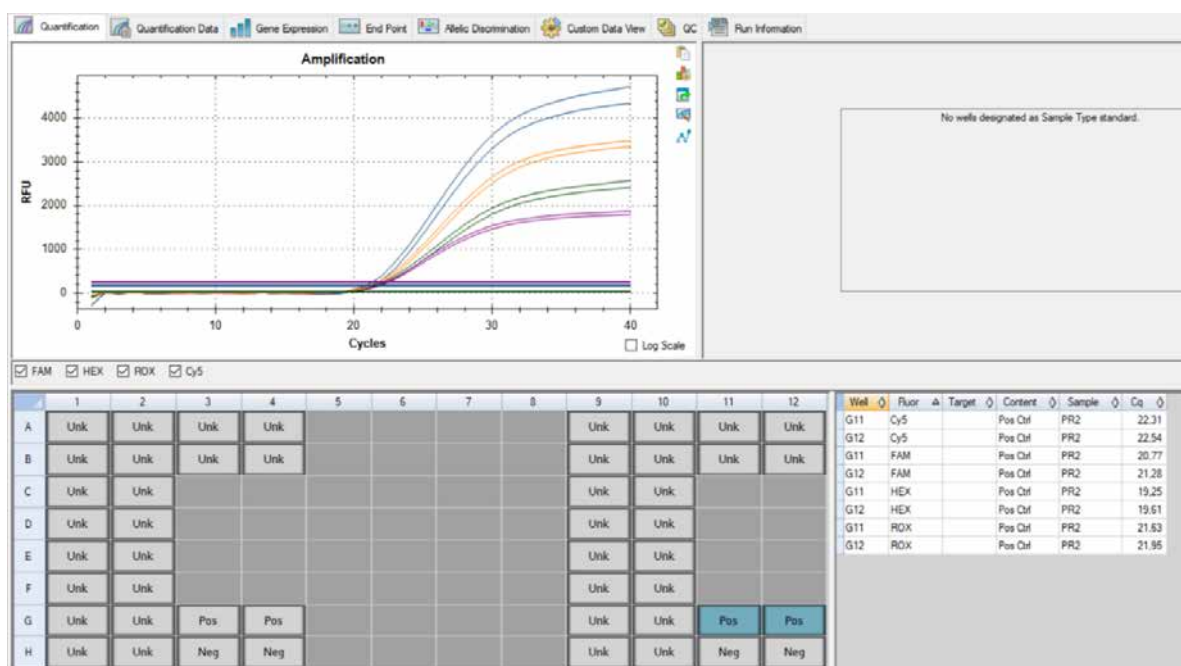


Рис. 3. 22 Суміш праймерів 2 позитивний контроль

Флуоресценція відсутня у всіх каналах, тоді як внутрішній контроль показав очікувану ампліфікацію (рис. 3. 23).

Результат підтверджує факт забруднення реакційних сумішей та правильність процедури.

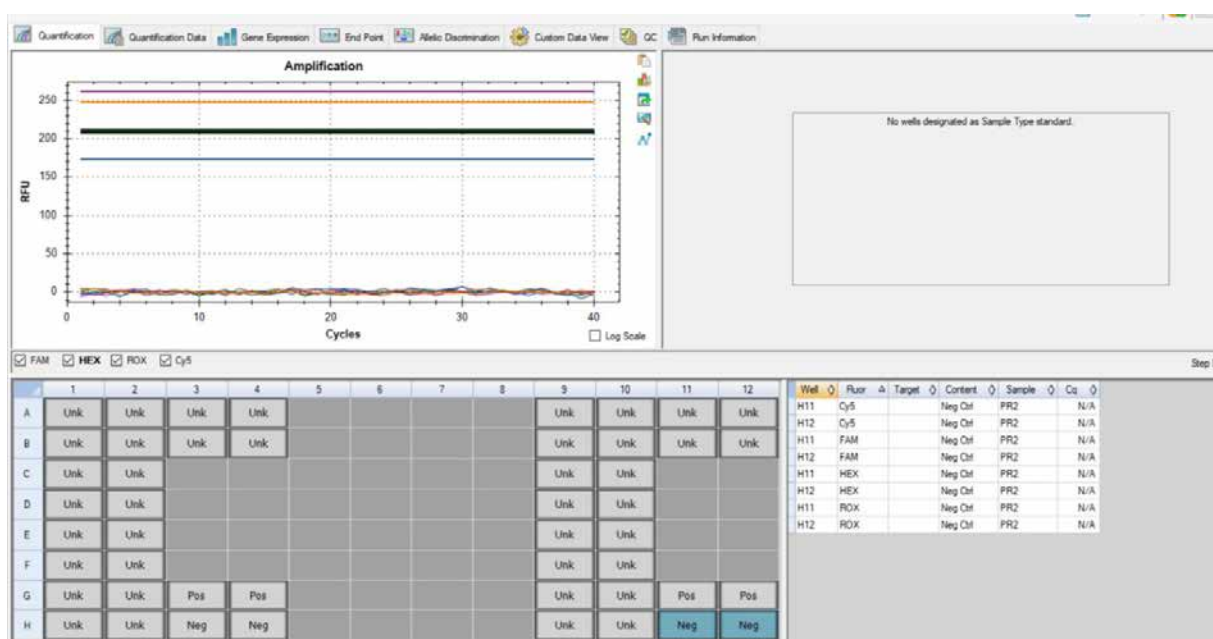


Рис. 3. 23 Суміш праймерів 2 негативний контроль

3.3 Аналіз рівня ураженості грибковими захворюваннями листя та плодів дуба звичайного у місті Києві (*Quercus robur*)

За даними молекулярного тестування з використанням суміші праймерів № 1, найбільш часто патогенами, що виявляються на листі дуба були *Microsphaera alphitoides* (борошняна роса), *Gloeosporium quercinum* (антракноз), *Ascochyta quercus* (біла плямистість) і *Cytospora sp.*

Ці результати підтверджуються візуальними спостереженнями: на ураженому листі спостерігалися ознаки хлорозу, окремі або некротичні плями, що злилися, а в деяких випадках - характерний білий міцеліальний наліт.

Борошниста роса, що викликається *Microsphaera alphitoides*, була найпоширенішим захворюванням листя у міських умовах. Вона найчастіше реєструвалася в районах з високою вологістю та густим пологом лісу (Голосіївський, Деснянський та Оболонський райони). Типові симптоми включали білий павутинний наліт на поверхні листової пластинки, за яким слідувало пожовтіння та передчасне опадіння листя.

Ідентифікація *Gloeosporium quercinum* та *Ascochyta quercus* у зразках листя свідчить про наявність некротичних плям та початкові стадії відмирання тканин, що свідчить про активну фазу розвитку цих патогенів у середині вегетаційного періоду.

У районах із високим рівнем забруднення повітря (Подільський та Дніпровський райони) спостерігалася більша кількість позитивних сигналів у каналі HEX, що відповідає *G. quercinum*, імовірно через зниження фотосинтетичної активності рослин (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Узагальнююча таблиця результатів досліджень листя дуба (*Quercus robur*) на грибокві захворювання у межах міста Київ

Зразок	Суміш праймерів 1			
	<i>Microsphaera alphitoides</i>	<i>Gloeosporium quercinum</i>	<i>Ascochyta quercus</i>	Внутрішній контроль
	FAM	HEX	ROX	Cy5
1				+
2		+		+
3		+		+
4				+
5		+		+
6		+		+
7				+
8	+			+
9				+
10		+		+

Дослідження плодів (жолудів) з використанням суміші праймерів виявило наявність кількох родів грибів: *Phomopsis quercella*, *Cytospora sp.*, *Gloeosporium* та *Stromatinia pseudotuberosa*.

Виявлення проводилося за допомогою одночасного виявлення трьох мішеней (канали FAM, HEX та ROX), що дало позитивні результати приблизно у 80% протестованих зразків плодів.

Ці патогени є дуже агресивними до репродуктивних органів дуба та здатні проникати в тканини плодів під час формування шкаралупи або через механічні пошкодження.

Інфекції *Phomopsis quercella* були особливо поширені в центральних та північних районах Києва (Шевченківському та Подільському), де спостерігалися сухі, зморщені жолуді з ознаками гниття.

Інфекції *Stromatinia pseudotuberosa* супроводжувалися розвитком темних плям на поверхні плодів та частковим пошкодженням тканини насіння. Цей грибок є патогеном, який може залишатися латентним, активізуючись під час зберігання або проростання жолудів.

Cytospora sp. було виявлено у плодах з некротичними ділянками оболонки жолудя, що може бути пов'язано з проникненням спор через мікропошкодження або природні мікротріщини під час дозрівання (табл 3.2).

Таблиця 3.2

Узагальнююча таблиця результатів досліджень плодів дуба (*Quercus robur*) на грибокві захворювання у межах міста Київ

Зразок	Суміш праймерів 2			
	<i>Stromatinia pseudotuberosa</i>	<i>Phomopsis quercella</i>	<i>Cytospora sp.</i>	Внутрішній контроль
	FAM	HEX	ROX	Cy5
1			+	+
2				+
3				+
4				+
5				+
6				+
7				+
8				+
9			+	+
10			+	+

Порівняльний аналіз показав, що зараження листя дуба було інтенсивнішим (близько 90%), ніж плодів (близько 80%).

Це тим, що листя постійно піддаються впливу повітряних потоків, пилу і крапель води, що сприяє поширенню спор гриба.

Крім того, тканини листа мають більш тонку кутикулу і більшу кількість продихів, що створює сприятливі умови для первинного зараження.

Для плодів характерно переважання збудників некрозу (*Phomopsis*, *Stromatinia*, *Cytospora*), які розвиваються переважно у глибоких шарах тканин.

У листі, навпаки, переважали біотрофні патогени, зокрема *Microsphaera alphitoides*, що паразитує на живих клітинах.

Ця відмінність свідчить про різні екологічні ніші патогенів та їх адаптаційні стратегії в межах одного виду рослин.

Аналіз результатів з урахуванням місць відбору проб показав, що ступінь пошкодження листя та плодів тісно пов'язаний з умовами навколишнього середовища.

Найвищі рівні зараження спостерігалися в районах з підвищеною антропогенною активністю та забрудненням повітря: Подільському, Дніпровському та Шевченківському.

У цих районах дуби ростуть поблизу доріг та промислових об'єктів, де рівень оксидів азоту, пилу та важких металів може перевищувати гранично допустимі концентрації. Ці фактори знижують активність ферментативних систем рослини та послаблюють її природний імунітет до інфекцій.

У більш екологічно стабільних зелених зонах, таких як Голосіївський парк та Сирецький гай, було зареєстровано менше позитивних сигналів ПЛР. Це свідчить про вищий рівень фітосанітарного здоров'я дубових насаджень та менший стрес від факторів навколишнього середовища.

3.4. Карта поширення патогенів дуба звичайного (*Quercus robur*) у місті Києві

На підставі результатів молекулярної діагностики (ПЛР у реальному часі) та візуального фітопатологічного аналізу створено мапу поширення збудників грибних хвороб дуба черешкового (*Quercus robur*) у межах міста Києва.

Дослідження проводилося у десяти адміністративних районах, що становлять різні екологічні умови – від центральних урбанізованих територій до парків та лісопаркових зон.

Метою картографування було визначення територіального розповсюдження основних збудників грибних хвороб дуба, а також виявлення закономірностей їх поширення залежно від антропогенного навантаження, мікроклімату та ступеня озеленення території.

Дещо інша картина поразки спостерігається на плодах дуба (шлунках).

Позитивні результати ПЛР-аналізу отримано у трьох районах: Голосіївському, Печерському та Святошинському.

Основним збудником був представник роду *Cytospora sp.*, що спричиняє некротичні ураження оболонки плодів. Цей гриб є факультативним паразитом, здатним переходити до патогенного стану при ослабленні рослини.

Зараження зазвичай відбувається через механічні пошкодження оболонки або мікротріщини, що утворюються при дозріванні жолудів.

Уражені плоди відрізнялися наявністю темних плям, зморщуванням та сухістю тканин.

На відміну від листя, де переважають біотрофні патогени, у плодах активніше розвиваються некротрофні гриби, зокрема *Phomopsis quercella* та *Stromatinia pseudotuberosa*. Перший викликає білу гниль плодів і найбільш поширений у центральній та північній частині Києва, а *Stromatinia pseudotuberosa* проявляється темними плямами, що гниють і може зберігати латентну інфекцію до проростання насіння.

Ці патогени потенційно небезпечні відновлення дубових насаджень, оскільки зараження плодів впливає схожість і життєздатність саджанців.

Порівняльний аналіз показав, що ступінь ураження дуба тісно корелює з місцевими умовами навколишнього середовища.

Райони з високим рівнем антропогенного навантаження (Подільський, Дніпровський та Шевченківський райони) виявилися найбільш вразливими до грибкових інфекцій.

Надмірний вміст пилу, важких металів та оксидів азоту в повітрі пригнічує фотосинтез, знижує активність антиоксидантних ферментів та послаблює природну стійкість дерев.

В результаті патогени швидше проникають у тканини, а процеси регенерації шаруватої поверхні сповільнюються.

У районах зі стабільнішими параметрами навколишнього середовища (Голосіївський парк, Сирецький гай та Оболонський район) рівень ураження дуба був значно нижчим.

Висока частка зелених насаджень, краща аерація повітря та менший рівень забруднення створюють несприятливі умови для розвитку грибкових спор.

Ця закономірність підтверджує гіпотезу про те, що фітосанітарний стан міських екосистем пов'язаний зі ступенем забруднення навколишнього середовища.

Карта розподілу збудників (рис. 3.24) чітко демонструє нерівномірність ураження дубом: південний та східний райони міста (Дарницький та Деснянський) мають найнижчі показники зараження, тоді як центральні райони Києва (Шевченківський, Подільський та Дніпровський) характеризуються найвищою концентрацією випадків.

Отримані просторові дані свідчать про тісний зв'язок між антропогенним навантаженням та станом фітосанітарного здоров'я дуба черешкового. Найбільший ризик ураження мають території з інтенсивним рухом транспорту, промисловими об'єктами та ущільненими ґрунтами, а природоохоронні зони виконують стабілізуючу функцію. Таким чином, мапа поширення патогенів може бути використана як інструмент для прогнозування динаміки грибних захворювань та планування профілактичних заходів в урбоекосистемі Києва.



Рис. 3.24 Карта розподілу збудників дуба звичайного (*Quercus robur*)

ВИСНОВКИ

1) Молекулярна діагностика листя з використанням праймерної суміші № 1 виявила ДНК збудників борошнистої роси (*Microsphaera alphitoides*) та антракнозу (*Gloeosporium quercinum*). Позитивні результати становили 60%, що свідчить про високу поширеність цих захворювань у зелених насадженнях Києва.

2) Діагностика плодів дуба (праймерна суміш №2) показала наявність *Cytospora* sp. у 30% зразків. Поразки зареєстровані у Голосіївському, Печерському та Святошинському районах.

3) Листя уражаються частіше жолудів, що пов'язано з відкритістю листової поверхні та більш сприятливими умовами для розвитку біотрофних патогенів. У плодах переважають некротрофи, що активніше розвиваються при ослабленні рослин.

4) Встановлено зв'язок між антропогенним навантаженням та рівнем зараження: найбільша кількість ПЛР-позитивних сигналів спостерігається в районах із щільною забудовою та забрудненням (Подільський, Дніпровський, Шевченківський); нижчі показники – у зелених зонах (Голосіївський, Оболонський).

5) Складено карту поширення грибних патогенів дуба у м. Києві, яка відображає просторову диференціацію вогнищ зараження та може бути використана для подальшого моніторингу та планування захисних заходів.

6) Отримані дані підтвердили ефективність методу ПЛР у реальному часі для раннього виявлення грибних патогенів у міських насадженнях та його доцільність у системі фітосанітарного контролю.

7) Для підвищення стійкості дубових насаджень рекомендується регулярний моніторинг, санітарний догляд, оцінка життєвого стану дерев та заходи щодо зниження стресових факторів міського середовища.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nature of Oaks: The Rich Ecology of Our Most Essential Native Trees. Timber Press, Incorporated, 2021. 224 p.
2. Morphology, geometric morphometrics, and taxonomy in relict deciduous oak woods in northern Italy / E. Proietti et al. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*. 2021. Vol. 32, no. 3. P. 549–564. URL: <https://doi.org/10.1007/s12210-021-01001-4>.
3. Morphological and anatomical leaf characteristics of some European and Asian pear cultivars / M. Fotirić Akšić et al. *Acta Horticulturae*. 2021. No. 1303. P. 63–70. URL: <https://doi.org/10.17660/actahortic.2021.1303.10>.
4. Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: A comparison of traditional and geometric morphometric methods / V. Viscosi et al. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 2009. Vol. 143, no. 3. P. 564–574. URL: <https://doi.org/10.1080/11263500902723129>.
5. Leaf macro- and micromorphological traits and phenotypic diversity of *Quercus petraea* subspecies in Eastern Romania / I. M. GAFENCO (PLEȘCA) et al. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2024. Vol. 52, no. 4. P. 13966. URL: <https://doi.org/10.15835/nbha52413966>.
6. Учасники проєктів Вікімедіа. Мезинський національний природний парк – Вікіпедія. Вікіпедія. URL: https://uk.wikipedia.org/wiki/Мезинський_національний_природний_парк.
7. Bezpečnostní kontrola. Taxonomic tree of plants and animals with photos | BioLib.cz. URL: <https://www.biolib.cz/cz/image/id49623>.
8. Oak tree. The Worlds of David Darling. URL: https://www.daviddarling.info/encyclopedia/O/oak_tree.html.
9. The Importance of Protecting Tree Roots - Embark Services. Embark Services. URL: <https://embarkservices.com/the-importance-of-protecting-tree-roots>.

10. Fungi as potential factors limiting natural regeneration of pedunculate oak (*Quercus robur*) in mixed-species forest stands in Poland / R. Jankowiak et al. *Plant Pathology*. 2022. Vol. 71, no. 4. P. 805–817. URL: <https://doi.org/10.1111/ppa.13529>.
11. Ectomycorrhizal Fungi Modulate Biochemical Response against Powdery Mildew Disease in *Quercus robur* L. / M. Kebert et al. *Forests*. 2022. Vol. 13, no. 9. P. 1491. URL: <https://doi.org/10.3390/f13091491>.
12. Zalkalns O., Celma L. The distribution of bacteria *Gibbsiella quercinecans* and *Brenneria goodwinii* in oak (*Quercus robur* L.) stands in Latvia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021. Vol. 875, no. 1. P. 012033. URL: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/875/1/012033>.
13. González A. J., Ciordia M. *Brenneria goodwinii* and *Gibbsiella quercinecans* isolated from weeping cankers on *Quercus robur* L. in Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 2019. Vol. 156, no. 3. P. 965–969. URL: <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01891-z>.
14. Pathogenic fungi and oomycetes causing dieback on *Fraxinus* species in the Mediterranean climate change hotspot region / A. Benigno et al. *Frontiers in Forests and Global Change*. 2023. Vol. 6. URL: <https://doi.org/10.3389/ffgc.2023.1253022>.
15. Marčiulynas A., Menkis A. Long-term Dynamics of Fungal Communities Inhabiting Decaying Stumps of *Quercus robur*. *Microbial Ecology*. 2024. Vol. 87, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02334-3>.
16. Репозитарій Білоцерківського НАУ: Головна сторінка. URL: <https://rep.btsau.edu.ua/bitstream/BNAU/654/3/Infektsiini%20khvoroby%20derevnykh%20porid.pdf>.
17. Monumental trees of Ukraine and public awareness of them / O. Tokarieva et al. *Ukrainian Journal of Forest and Wood Science*. 2024. Vol. 15, no. 2. P. 153–169. URL: <https://doi.org/10.31548/forest/2.2024.153>.

18. Szkordilis F. Mitigation of urban heat island by green spaces. *Pollack Periodica*. 2014. Vol. 9, no. 1. P. 91–100. URL: <https://doi.org/10.1556/pollack.9.2014.1.10>.
19. Вплив лінійних дубових полезахисних насаджень на біогенність чорнозему типового агрогенного використання / S. V. Sydorenko та ін. *Scientific Bulletin of UNFU*. 2019. Т. 29, № 8. С. 60–65. URL: <https://doi.org/10.36930/40290809>.
20. Hewitt C. N., Ashworth K., MacKenzie A. R. Using green infrastructure to improve urban air quality (GI4AQ). *Ambio*. 2019. Vol. 49, no. 1. P. 62–73. URL: <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01164-3>.
21. Koniakin S., Gubar L. Spontaneous flora of the local landscape Feofaniya (Kyiv, Ukraine). *Plant Introduction*. 2022. Vol. 93-94. P. 46–61. URL: <https://doi.org/10.46341/pi2021020>.
22. Головна - ДСЛП "Львівлісозахист". URL: <https://lvivlisozahyst.co.ua/wp-content/uploads/2025/07/1-900x450.jpg>.
23. Contributors to Wikimedia projects. *Apiognomonía errabunda* - Wikipedia, 2007. Wikipedia, the free encyclopedia. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Apiognomonía_errabunda.
24. Contributors to Wikimedia projects. *Ascochyta* - Wikipedia, 2013. Wikipedia. URL: <https://ceb.wikipedia.org/wiki/Ascochyta>.
25. Contributeurs aux projets Wikimedia. *Ciboria batschiana* – Wikipédia, 2021. Wikipédia, l'encyclopédie libre. URL: https://fr.wikipedia.org/wiki/Ciboria_batschiana#/media/Fichier:Ciboria_batschiana_62491027.jpg.
26. Contributors to Wikimedia projects. *Phomopsis* - Wikipedia, 2008. Wikipedia, the free encyclopedia. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phomopsis>.
27. Цитоспороз: симптоми, методи боротьби. OGOROD™ - семена поштою, СЗР і інші агротовари в Україні. URL: <https://ogorod.ua/citosporoz>.
28. Шевченко С. В. Лісова фітопатологія : Підруч. для студентів сільськогосп. ф-ів вузів. Львів : ЛДУ, 1968. 344 с.

29. Bacterioses of forest woody plants in the forests of Polissya and Forest-Steppe of Ukraine / A. F. Goychuk et al. *Ukrainian Journal of Forest and Wood Science*. 2019. Vol. 10, no. 2. P. 14–25. URL: <https://doi.org/10.31548/forest2019.02.014>.
30. Ghobadi A., Jamali S. Identification of fungal species associated with gall oak (*Quercus infectoria* Oliv.) decline in Iran. *Plant Disease*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1094/pdis-05-24-0974-re>.
31. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees / M.-L. Desprez-Loustau et al. *Annals of Forest Science*. 2006. Vol. 63, no. 6. P. 597–612. URL: <https://doi.org/10.1051/forest:2006040>.
32. Sucharzewska E. The development of *Erysiphe alphitoides* and *E. hypophylla* in the urban environment. *Acta Mycologica*. 2013. Vol. 44, no. 1. P. 109–123. URL: <https://doi.org/10.5586/am.2009.010>.
33. Endemic and Emerging Pathogens Threatening Cork Oak Trees: Management Options for Conserving a Unique Forest Ecosystem / S. Moricca et al. *Plant Disease*. 2016. Vol. 100, no. 11. P. 2184–2193. URL: <https://doi.org/10.1094/pdis-03-16-0408-fe>.
34. Climate change and forest diseases / R. N. Sturrock et al. *Plant Pathology*. 2011. Vol. 60, no. 1. P. 133–149. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02406.x>.
35. Barrès B., *Erysiphe quercicola* S. Takam. & U. Braun та *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun і S. Takam: демографічний та генетичний вплив борошнистої роси на молодий підрост дуба звичайного (*Quercus robur*). *Annals of Forest Science*. 2024. 81:24. DOI: 10.1101/2023.06.22.546164.
36. Morrison K. E. Polymerase Chain Reaction. *Practical Neurology*. 2002. Vol. 2, no. 5. P. 288–293. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1474-7766.2002.00088.x>.
37. Lorenz T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012. No. 63. URL: <https://doi.org/10.3791/3998>.

38. Raynes R., Pomatto L. C. D., Davies K. J. A. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Molecular Aspects of Medicine*. 2016. Vol. 50. P. 41–55. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.05.001>.
39. Occurrence of leaf spot caused by *Cristulariella depraedans* on *Acer ginnala* / S. E. Cho et al. *Forest Pathology*. 2016. Vol. 47, no. 1. P. e12302. URL: <https://doi.org/10.1111/efp.12302>.
40. Czachura P., Owczarek-Kościelniak M., Piątek M. *Pseudodidymella fagi* in Slovakia: First detection, morphology and culture characteristics. *Forest Pathology*. 2018. Vol. 49, no. 1. P. e12479. URL: <https://doi.org/10.1111/efp.12479>.
41. Heuser T., Zimmer W. Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 2002. Vol. 209, no. 2. P. 295–299. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11147.x>.
42. Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods / A. Mougou-Hamdane et al. *Annals of Forest Science*. 2010. Vol. 67, no. 2. P. 212. URL: <https://doi.org/10.1051/forest/2009105>.
43. Oak powdery mildew (*Erysiphe alphitoides*)-induced volatile emissions scale with the degree of infection in *Quercus robur* / L. Copolovici et al. *Tree Physiology*. 2014. Vol. 34, no. 12. P. 1399–1410. URL: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu091>.
44. Elicitor Specific Mechanisms of Defence Priming in Oak Seedlings Against Powdery Mildew / R. Sanchez-Lucas et al. *Plant, Cell & Environment*. 2025. URL: <https://doi.org/10.1111/pce.15419>.
45. Ectomycorrhizal Fungi Modulate Biochemical Response against Powdery Mildew Disease in *Quercus robur* L. / M. Kebert et al. *Forests*. 2022. Vol. 13, no. 9. P. 1491. URL: <https://doi.org/10.3390/f13091491>.

46. Fungi as potential factors limiting natural regeneration of pedunculate oak (*Quercus robur*) in mixed-species forest stands in Poland / R. Jankowiak et al. *Plant Pathology*. 2022. Vol. 71, no. 4. P. 805–817. URL: <https://doi.org/10.1111/ppa.13529>.
47. Dreyer E. An interesting analysis of the interactions between English oaks (*Quercus robur* L.) and powdery mildew (*Erysiphe* sp.) at tree population level. *Peer Community in Forest and Wood Sciences*. 2024. URL: <https://doi.org/10.24072/pci.forestwoodsci.100112>.
48. The Effect of *Quercus robur* Bark on Oral Candidiasis Caused by *Candida albicans* and *Candida glabrata* Isolated from a Pediatric Oral Infection as Comparison to Azole Antifungal / S. Naji et al. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*. 2025. Volume 17. P. 285–292. URL: <https://doi.org/10.2147/ccide.s527034>.
49. Impact of Thermotherapy and Short-Term Storage on *Quercus robur* L. Acorn Mycobiota and Germination / J. Kranjec Orlović et al. *Forests*. 2021. Vol. 12, no. 5. P. 528. URL: <https://doi.org/10.3390/f12050528>.
50. *Tubakia* spp., *Didymella macrostoma* and *Apiognomonina errabunda* causing leaf spot and anthracnose of *Quercus robur* in the Mura-Drava-Danube Biosphere Reserve / M. Zlatković et al. *Frontiers in Forests and Global Change*. 2024. Vol. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/ffgc.2024.1363141>.
51. Comparison of qPCR and Metabarcoding Methods as Tools for the Detection of Airborne Inoculum of Forest Fungal Pathogens / A. Chandelier et al. *Phytopathology*®. 2021. Vol. 111, no. 3. P. 570–581. URL: <https://doi.org/10.1094/phyto-02-20-0034-r>.
52. Testing the Pathogenic Potential of *Cryphonectria parasitica* and Related Species on Three Common European Fagaceae / F. Dennert et al. *Frontiers in Forests and Global Change*. 2020. Vol. 3. URL: <https://doi.org/10.3389/ffgc.2020.00052>.

53. Impact of Thermotherapy and Short-Term Storage on *Quercus robur* L. Acorn Mycobiota and Germination / J. Kranjec Orlović et al. *Forests*. 2021. Vol. 12, no. 5. P. 528. URL: <https://doi.org/10.3390/f12050528>.
54. Identification of an Emaravirus in a Common Oak (*Quercus robur* L.) Conservation Seed Orchard in Germany: Implications for Oak Health / M. Bandte et al. *Forests*. 2020. Vol. 11, no. 11. P. 1174. URL: <https://doi.org/10.3390/f11111174>.
55. Changes in the foliar fungal community between oak leaf flushes along a latitudinal gradient in Europe / Á. Gaytán et al. *Journal of Biogeography*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1111/jbi.14508>.
56. *Tubakia* spp., *Didymella macrostoma* and *Apiognomonina errabunda* causing leaf spot and anthracnose of *Quercus robur* in the Mura-Drava-Danube Biosphere Reserve / M. Zlatković et al. *Frontiers in Forests and Global Change*. 2024. Vol. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/ffgc.2024.1363141>.
57. Fungi as potential factors limiting natural regeneration of pedunculate oak (*Quercus robur*) in mixed-species forest stands in Poland / R. Jankowiak et al. *Plant Pathology*. 2022. Vol. 71, no. 4. P. 805–817. URL: <https://doi.org/10.1111/ppa.13529>.
58. Macrofungi on fallen oak trunks in the Białowieża Virgin Forest – ecological role of trunk parameters and surrounding vegetation. / J. Holec et al. *Czech Mycology*. 2019. Vol. 71, no. 1. P. 65–89. URL: <https://doi.org/10.33585/cmy.71105>.
59. Novotný D. Contribution to the endophytic mycobiota of aerial parts of oaks. *Czech Mycology*. 2022. Vol. 74, no. 2. P. 111–121. URL: <https://doi.org/10.33585/cmy.74201>.

- 60.Holec J., Běťák J., Dvořák D., Kříž M., Kuchaříková M., Krzyściak-Kosińska R., Kučera T. Macrofungi on fallen oak trunks in the Białowieża Virgin Forest – ecological role of trunk parameters and surrounding vegetation. *Czech Mycology*. 2019. Vol. 71, no. 1. P. 65–89. URL: <https://doi.org/10.33585/cmy.71105>
- 61.Novotný D. Contribution to the endophytic mycobiota of aerial parts of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in the Czech Republic. *Czech Mycology*. 2022. Vol. 74, no. 2. P. 121–136. URL: <https://doi.org/10.33585/cmy.74201>
- 62.Kranjec Orlović J., Drvodelić D., Vukelić M., Rukavina M., Diminić D., Oršanić M. Impact of Thermotherapy and Short-Term Storage on *Quercus robur* L. Acorn Mycobiota and Germination. *Forests*. 2021. Vol. 12, no. 5. Article 528. URL: <https://doi.org/10.3390/f12050528>
- 63.Dennert F., Hamelin R., Jung T. Testing the pathogenic potential of *Cryphonectria* species toward *Quercus robur*. *Frontiers in Forests and Global Change*. 2020. Vol. 3. Article 00052. URL: <https://doi.org/10.3389/ffgc.2020.00052>
- 64.Borowik P., Dobrzyńska E., Skrzypiec M. Preliminary studies evaluating the condition of *Quercus robur* acorns infected with *Ciboria batschiana* through electronic-nose measurements. *Acta Scientiarum Polonorum Silvarum Colendarum Ratio et Industria Lignaria*. 2022. Vol. 21(4). P. 321–329. URL: <https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-600d9a9b-015a-49c9-af7f-19c22ae93cfc>
- 65.Heuser T., Zimmer W. Quantitative analysis of phytopathogenic Ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 2002. Vol. 209, no. 2. P. 295–299. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11147.x>
- 66.Mougou-Hamdane A., Dutech C., Desprez-Loustau M.-L. Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in Europe. *Annals of Forest Science*. 2010. Vol. 67(2). Article 212. URL: <https://doi.org/10.1051/forest/2009105>

67. Ectomycorrhizal Fungi Modulate Biochemical Response against Powdery Mildew Disease in *Quercus robur* L. / Kebert M. et al. *Forests*. 2022. Vol. 13, no. 9. Article 1491. URL: <https://doi.org/10.3390/f13091491>
68. Chandelier A., Grosdidier M., Teller P. Comparison of qPCR and metabarcoding methods as tools for detection of invasive fungal pathogens. *Phytopathology*. 2021. Vol. 111(8). P. 1414–1425. URL: <https://doi.org/10.1094/PHTO-02-20-0034-R>
69. Topalidou E. T., Shaw M. W. Relationships between oak powdery mildew incidence and commensal fungi. *Forest Pathology*. 2016. Vol. 46(3). P. 230–239. URL: <https://doi.org/10.1111/efp.12239>
70. 林偉, 王斌. 殼斗科之利用與活性 [Pharmacological and biochemical use of Fagaceae species, including *Quercus robur* leaf extracts]. *林業研究學報* (Forestry Research Bulletin). 2020. Vol. 42(2). P. 57–64. URL: <https://www.forest.gov.tw/MagazineFile.aspx?fno=5572>
71. 孙静, 王强, 张波. 欧洲栎 (*Quercus robur*) 叶部真菌群落多样性研究 [Study on the diversity of fungal communities in oak leaves]. *中国林学报* (Chinese Journal of Forestry). 2021. Vol. 37(4). P. 101–112. URL: <https://doi.org/10.13240/j.cnki.cjf.2021.04.011>
72. Schröder T., Schmidt O., Langer G. Pilzkrankheiten an Eichen (*Quercus* spp.) und deren Bedeutung im Stadtgrün. *Allgemeine Forstzeitschrift*. 2019. Vol. 74(3). P. 45–53. URL: <https://doi.org/10.1007/s10342-019-01237-7>

ДОДАТКИ

Додаток А



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ
І ЕКОЛОГІЇ

ЗБІРНИК

матеріалів доповідей

**XI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ**

І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ



**«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ
ЛЮДСТВА»**

23-24 квітня 2025 р.

Київ – 2025

<i>Литвиненко С.А., Дащенко А.В.</i> МОНІТОРИНГ ГРИБКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ЛИСТЯ ТА ПЛОДІВ <i>QUERCUS ROBUR</i> МЕТОДОМ ПЛР В МЕЖАХ МІСТА КИЄВА.....	91
<i>Литвинчук А.Д., Ілзєнко В.В.</i> НОРМАТИВНО-ПРАВОВЕ РЕГУЛЮВАННЯ ВМІСТУ ПРИРОДНИХ РАДІОНУКЛІДІВ У БУДІВЕЛЬНИХ МАТЕРІАЛАХ.....	94
<i>Любчикова Р.С.</i> ВИКОРИСТАННЯ БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ БІОІНДИКАЦІЙНОЇ ОЦІНКИ ВОДНИХ ЕКОСИСТЕМ.....	96
<i>Макаренко А.А., Міняйло А.А., Дмитренко Л.А.</i> ЗБИТКИ ЗАВДАНІ ЗЕМЕЛЬНОМУ ФОНДУ УКРАЇНИ, ВНАСЛІДОК ВІЙСЬКОВОЇ АГРЕСІЇ РФ.....	98
<i>Малашева М.В., Полін Т.О., Сербешок Г.А.</i> МІКРОПЛАСТИК У ВОДНИХ ЕКОСИСТЕМАХ: ЕКОТОКСИЧНІ ЗАГРОЗИ ТА СОЦІАЛЬНА ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ.....	103
<i>Матюшко С.М.</i> ЗМІНИ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ПРОДУКТІВ ПОЛ В ТКАНИНАХ І ОРГАНАХ КОРОПА У ВІДПОВІДЬ НА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА МІКОТОКСИНОМ Т2.....	105
<i>Махлай К.О., Березник Є.М.</i> ОБЛІКИ ПОШКОДЖЕНИХ ДЕРЕВ, ЯК ЧИННИК РЕКРЕАЦІЙНОГО НАВАНТАЖЕННЯ РЕГІОНАЛЬНОГО ЛАНДШАФТНОГО ПАРКУ «ПАРК ПАРТИЗАНСЬКОЇ СЛАВИ».....	107
<i>Микосинич А.М., Міняйло А.А.</i> ЕКОЛОГІЧНІ ЗАСАДИ ОБЛАШТУВАННЯ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ ФЕРМИ З РОЗВЕДЕННЯ ОЛЕНЯ БЛАГОРОДНОГО (<i>CERVUS ELAPHUS</i>) В УКРАЇНІ.....	108
<i>Михед Ю.А., Бондарь В.І.</i> ОСОБЛИВОСТІ БІОКУМУЛЯЦІЇ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ РОСЛИНАМИ.....	110
<i>Мицик В.В., Сербешок Г.А.</i> ВПЛИВ ТУРИСТИЧНОЇ ДІЯЛЬНОСТІ НА ГЕОЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН ТЕРИТОРІЇ ПРИРОДНОГО ЗАПОВІДНИКА ГОРГАНІ.....	112
<i>Монастирецька М.С., Клименко Н.В.</i> МОНІТОРИНГ НАСЛІДКІВ ПІДРИВУ ДАМБИ НА Р. ІРПІНЬ, СПРИЧИНЕНИХ ВНАСЛІДОК ВІЙСЬКОВОЇ ДІЯЛЬНОСТІ, В МЕЖАХ ДИМЕРСЬКОЇ ТЕРИТОРІАЛЬНОЇ ГРОМАДИ.....	114
<i>Монченко М.Ю., Юрасов С.М.</i> ПРОБЛЕМИ МОНІТОРИНГУ СТАНУ АТМОСФЕРНОГО ПОВІТРЯ.....	116
<i>Нагорна А.А., Нестерова Н.Г.</i> ДЕСТРУКЦІЯ НАФТОВИХ ВУГЛЕВОДНІВ ПРЕДСТАВНИКАМИ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i>.....	119

УДК 581.1:504.5

МОНІТОРИНГ ГРИБКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ЛИСТЯ ТА ПЛОДІВ *QUERCUS ROBUR* МЕТОДОМ ПЛР В МЕЖАХ МІСТА КИЄВА

Литвиненко С.А., магістр I року навчання, факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

Дащенко А.В., кандидат с.-г. наук, доцент кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Листяні дерева, зокрема дуб звичайний (*Quercus robur*), є важливими компонентами екосистем міських парків. Вони не лише забезпечують естетичну цінність і поліпшують якість повітря, але й відіграють важливу роль у збереженні біорізноманіття та екологічній рівновазі міських територій. Проте дуби піддаються впливу різних патогенних мікроорганізмів, серед яких значну частку становлять фітопатогенні грибові захворювання. Ці патогени можуть мати серйозний вплив на здоров'я дерев, спричиняючи різноманітні захворювання, що призводять до погіршення їхнього стану та втрачених ресурсів для екосистеми.

Дослідження видового складу грибових захворювань є важливим етапом у розробці заходів контролю та збереження здоров'я дерев. Тому в даній роботі представлено

результати моніторингу грибкових патогенів, що уражають листя та плоди дуба звичайного в Києві, із застосуванням молекулярно-біологічного методу – полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Це дає змогу не лише визначити види патогенів, але й здійснити точну ідентифікацію на рівні їхньої ДНК, що значно підвищує ефективність досліджень.

Метою дослідження є визначення спектра грибкових патогенів, що уражають листя та плоди *Quercus robur* у межах Києва, використовуючи метод ПЛР. Завдяки цьому методу можна виявити не лише відомі, але й рідкісні або нові види патогенів, що допомагає створити більш точну картину екологічного стану міських зелених насаджень.

Дослідження проводились на базі лабораторно-виробничого комплексу ТОВ «ФАРМЕР.УА». Зразки листя та плодів дуба звичайного були відібрані з усіх районів Києва в період з вересня по листопад 2024 року. Вибір зразків здійснювався випадковим методом, що забезпечувало репрезентативність результатів, оскільки кожен зразок мав однакову ймовірність бути обраним для аналізу.

Для виявлення грибкових захворювань застосовували метод ПЛР, який дозволяє ідентифікувати специфічні ділянки ДНК збудників хвороб. ПЛР-аналіз є високотехнологічним методом, що дає змогу точно ідентифікувати патогени, навіть якщо їх концентрація в зразку незначна. Для кожного зразка листя та плодів використовувалися комерційні праймери, що забезпечують виявлення конкретних грибкових патогенів. У дослідженні визначалася наявність таких патогенів:

- Листя: *Microsphaera alphitoides*, *Gloeosporium quercinum*, *Ascochyta quercus*.
- Плоди: *Stromatinia pseudotuberosa*, *Phomopsis quercella*, *Cytospora sp.*

Підготовка зразків для молекулярного аналізу є складним і важливим етапом у дослідженні, оскільки правильна підготовка проб визначає успішність подальших етапів роботи, зокрема проведення ПЛР. Підготовка зразків включає кілька етапів, таких як екстракція нуклеїнових кислот, очищення зразків від домішок та перевірка якості ДНК. Тільки після цього можна провести аналіз, який дозволяє виявити наявність певних патогенів.

Результати дослідження показали, що в міських парках Києва дуби звичайні піддаються впливу досліджуваних грибкових патогенів. Серед виявлених грибів найбільш поширеними були *Cytospora sp.* та *Gloeosporium quercinum*, що є типовими для листяних дерев і можуть викликати значні ушкодження. Утім, виявлення інших патогенів, таких як *Microsphaera alphitoides*, що також підтвердило важливість своєчасного моніторингу для збереження здоров'я дерев у міському середовищі.

Результати дослідження підкреслюють важливість регулярного моніторингу стану міських насаджень для своєчасного виявлення та запобігання поширенню фітопатогенів.

Вони також показують необхідність розробки нових або удосконалених методів боротьби з патогенами, оскільки забруднення довкілля та зміна клімату можуть сприяти їхньому поширенню та розвитку. Крім того, ці дані мають практичне значення для розробки програм захисту зелених насаджень Києва, які можуть включати як біологічні, так і хімічні методи контролю.

Використання методу ПЛР виявило широкий спектр грибкових патогенів, що уражають дуби звичайні в міських умовах. Ці результати є значущими для розвитку стратегії боротьби з грибковими захворюваннями дубів у Києві, оскільки ПЛР дозволяє не лише виявляти поширені патогени, а й виявляти нові види, що ще не були зафіксовані в Україні.

Моніторинг патогенів є важливою частиною охорони здоров'я дерев в умовах міського середовища, де дуби, як і інші дерева, піддаються численним стресам: забрудненню повітря, змінам клімату та іншим антропогенним впливам. Своєчасне виявлення захворювань і розробка відповідних заходів дозволяє зберегти не лише здоров'я окремих дерев, а й забезпечити стійкість всіх міських екосистем.

Список використаних джерел

1. A description of the symptoms of Acute Oak Decline in Britain and a comparative review on causes of similar disorders on oak in Europe / S. Denman et al. *Forestry*. 2014. Vol. 87, no. 4. P. 535–551. URL: <https://doi.org/10.1093/forestry/cpu010> (date of access: 06.04.2025).
2. Identification of an Emaravirus in a Common Oak (*Quercus robur* L.) Conservation Seed Orchard in Germany: Implications for Oak Health / M. Bandte et al. *Forests*. 2020. Vol. 11, no. 11. P. 1174. URL: <https://doi.org/10.3390/f11111174> (date of access: 06.04.2025).
3. Development of a PCR-RFLP Based Detection Method for the Oak Pathogens *Diplodia corticola* and *D. quercivora* / T.J. Dreaden et al. *Plant Health Progress*. 2014. Vol. 15, no. 2. P. 63–66. URL: <https://doi.org/10.1094/php-rs-13-0122> (date of access: 06.04.2025).
4. Preliminary Comparative Analysis of Phenological Varieties of *Quercus robur* by ISSR-Markers / V. Chokheli et al. *Journal of Botany*. 2016. Vol. 2016. P. 1–7. URL: <https://doi.org/10.1155/2016/7910451> (date of access: 06.04.2025).
5. Early identification of fungal leaf blight disease (*Alternaria alternate*) on *Platycladus orientalis* plants by using gas chromatography-ion mobility spectrometry / C. Zheng et al. *Microchemical Journal*. 2022. P. 107505. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107505> (date of access: 06.04.2025).

Додаток Б

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ



ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ

ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ В ЗАХИСТІ ТА КАРАНТИНІ РОСЛИН

*Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції
здобувачів вищої освіти, присвяченій 127-річчю НУБіП України*

(13 травня 2025 р.)



Київ-2025

Зміст

СЕКЦІЯ: I. ЕНТОМОЛОГІЯ

<i>Герасименко М.С., Кава Л.П.</i> ВИДОВИЙ СКЛАД ШКІДНИКІВ ПЛОДІВ СЛИВИ ТА ЇХ БІОЛОГІЯ.....	12
<i>Дороднов А.Р., Кава Л.П.</i> ВНУТРІШНЬСТЕБЛОВІ ШКІДНИКИ СМОРОДИНИ.....	13
<i>Кукса С.О., Доля М.М.</i> РОЗМНОЖЕННЯ ЛУЧНОГО МЕТЕЛИКА У КОРОТКОРОТАЦІЙНИХ СІВОЗМІНАХ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ.....	15
<i>Кучер Т.Р., Кава Л.П.</i> МУРАХИ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЇХ БІОЛОГІ.....	17
<i>Леоптьєва К.С., Кава Л.П.</i> ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПРЕДСТАВНИКІВ РЯДУ БОГОМОЛИ – MANTOPTERA.....	19
<i>Ломача П., Кава Л.П.</i> ВИДОВИЙ СКЛАД ҐРУНТОВИХ ШКІДНИКІВ НА ПОСІВАХ КУКУРУДЗИ В УМОВАХ КИЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ.....	21
<i>Поліба В.О., Кукса С.О., Доля М.М.</i> ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ ЕНТОМОКОМПЛЕКСІВ ПОЛЬОВИХ КУЛЬТУР ЗА РЕСУРСООЦІДНИХ ТЕХНОЛОГІЙ У ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ.....	23
<i>Сазан Д.О., Статкевич О.І.</i> МОНИТОРИНГ ВИДОВОЇ РІЗНОМАНІТНОСТІ ЕНТОМОФАГІВ НА НЕКТАРОНОСНИХ РОСЛИНАХ.....	25
<i>Сокирко Н.О., Кава Л.П.</i> ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ДОМІНАНТНИХ ШКІДНИКІВ СУНИЦІ.....	28
<i>Трош С.Р., Кава Л.П.</i> ПІДГРИЗАЮЧІ СОВКИ НА ПОСІВАХ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ, ЇХ БІОЛОГІЯ ТА ШКІДЛИВІСТЬ.....	29
<i>Фрідріх В.А. Кава Л.П.</i> ВИВЧЕННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ КОКЦІНЕЛІДІ.....	31
<i>Цап Б.В., Кава Л.П.</i> ФІТОФАГИ У ПОСІВАХ ГОРОХУ ОЗИМОГО ТА ЇХ ШКІДЛИВІСТЬ.....	32
<i>Ковальчук Я.А., Статкевич О.І.</i> ДОМІНУЮЧІ ВИДИ КОМАХ-ФІТОФАГІВ У ПОСІВАХ ЧАСНИКУ.....	34

СЕКЦІЯ: II. ФІТОПАТОЛОГІЯ

<i>Басок О. Л., Гентош Д. Т.</i> МОНИТОРИНГ ІРЖІ ГРУШІ.....	37
<i>Бельскіте Я.Е., Піковський М.Й.</i> ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ БОРОШНИСТОЇ РОСИ ТРОЯНД У ВІДКРИТОМУ ҐРУНТІ.....	38
<i>Болушевська Л.В., Баїшта О.В.</i> ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ПУХИРЧАТОЇ САЖКИ КУКУРУДЗИ.....	40
<i>Буґира В. В., Ключевич М. М.</i> МІКОФЛОРА ЗЕРНА СПЕЛЕТІ В АГРОПІДПРИЄМСТВАХ ЖИТОМИРСЬКОЇ ОБЛАСТІ.....	42
<i>Голубов С.С., Патица М.В.</i> ФУЗАРІОЗ ТОМАТІВ: ПАТОЛОГІЧНІ ПРОЯВИ, ДІАГНОСТИКА ТА МЕТОДИ КОНТРОЛЮ.....	44
<i>Гольцбергер Й. І., Піковський М. Й.</i> ХВОРОБИ НАСІННЯ РІПАКУ ОЗИМОГО.....	46
<i>Єрко В.В., Гентош Д. Т.</i> МОНИТОРИНГ ІРЖІ ЯЧМЕНЮ.....	48
<i>Карась А. О., Гентош Д.Т.</i> ПОШИРЕННЯ ХВОРОБ ЧАСНИКУ ГОРОДНЬОГО (<i>ALLIUM SATIVUM</i> L.) В МЕЖАХ КИЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ.....	50
<i>Климчук А.І., Дащенко А.В.</i> ВІРУСНІ ТА ГРИБНІ ХВОРОБИ ПШЕНИЦІ В УКРАЇНІ ТА МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ІМУНІТЕТУ НА ЗДОРОВ'Я РОСЛИН.....	52
<i>Коваленко В. О., Баїшта О. В.</i> ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ НАЙБІЛЬШ ПОШИРЕНИХ ХВОРОБ ФУНДУКА.....	54
<i>Литвиненко С. А., Дащенко А. В.</i> МОНИТОРИНГ ГРИБКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ЛИСТЯ ТА ПЛОДІВ <i>QUERCUS ROBUR</i> МЕТОДОМ ПІЛР В МЕЖАХ МІСТА КІЄВА.....	56
<i>Никитенко Є.М., Гентош Д.Т.</i> ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ КОРЕНЕВОЇ ГНИЛІ ВИКИ ЯРОЇ.....	58
<i>Оврамець А. В., Гентош Д.Т.</i> ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ БОРОШНИСТОЇ РОСИ ЧОРНОЇ СМОРОДИНИ.....	60
<i>Павленко К. О., Баїшта О. В.</i> ФУЗАРІОЗ СОЇ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЇХ ЗБУДНИКІВ.....	61
<i>Павлюк В. Р., Гентош Д. Т.</i> ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ КОРЕНЕВИХ ГНИЛЕЙ ЯЧМЕНЮ ОЗИМОГО.....	63
<i>Пастух Т.П., Піковський М.Й.</i> МІКОФЛОРА НАСІННЯ СОЇ.....	65
<i>Спирidonова С.В., Баїшта О.В.</i> ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ГРИБНИХ ХВОРОБ МОРКВИ ТА ЗАХОДИ ЩОДО ОБМЕЖЕННЯ ЇХ ЧИСЕЛЬНОСТІ.....	67
<i>Чепчак М. О., Піковський М. Й.</i> ДИНАМІКА РОЗВИТКУ БІЛОЇ ГНИЛІ СОНЯШНИКУ.....	68

УДК 581.143:579.61:504.53(477.41)

**МОНІТОРИНГ ГРИБКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ЛИСТЯ ТА ПЛОДІВ
QUERCUS ROBUR МЕТОДОМ ПЛР В МЕЖАХ МІСТА КИЄВА**

Литвиненко С. А., студентка МІ,

Науковий керівник: **Дашенко А. В.**, к.с.-г.н., доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Дуб звичайний (*Quercus robur*) є одним із ключових видів листяних дерев у міських парках, відіграючи важливу роль у збереженні екологічної рівноваги, біорізноманіття та якості міського середовища. Водночас, ці дерева часто уражаються фітопатогенними грибами, що призводить до ослаблення їх життєздатності та порушення екосистемних функцій.

Метою цієї роботи є виявлення та ідентифікація фітопатогенних грибів, що уражають листя та плоди дуба звичайного (*Quercus robur*) у межах міської території м. Київ, із застосуванням молекулярно-біологічного методу — полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Дослідження також спрямоване на аналіз поширеності виявлених патогенів і оцінку доцільності використання ПЛР як інструменту фітосанітарного моніторингу в урбанізованих умовах.

Польові дослідження проводились у вересні–листопаді 2024 року. Зразки листя та плодів дуба були відібрані випадковим чином у всіх районах Києва. Підготовка матеріалу включала екстракцію та очищення нуклеїнових кислот, перевірку якості ДНК і подальший ПЛР-аналіз із використанням комерційних праймерів для ідентифікації грибових патогенів.

У результаті виявлено наступні патогени:

- Листя — *Microsphaera alphitoides*, *Gloeosporium quercinum*, *Ascochyta quercus*.
- Плоди — *Stromatinia pseudotuberosa*, *Phomopsis quercella*, *Cytospora sp.*

Найбільш поширеними були *Cytospora sp.* та *Gloeosporium quercinum*, які можуть спричинити значні ушкодження. Виявлення *Microsphaera alphitoides* та інших патогенів свідчить про необхідність постійного фітопатологічного моніторингу.

Отримані результати підкреслюють доцільність використання ПЛР для фітосанітарного моніторингу у міському середовищі. Також вони мають практичне значення для розробки ефективних стратегій захисту зелених насаджень, що включають як профілактичні, так і інтервенційні заходи в умовах змін клімату та антропогенного навантаження.

Список використаної літератури:

1. A description of the symptoms of Acute Oak Decline in Britain and a comparative review on causes of similar disorders on oak in Europe / S. Denman et al. *Forestry*. 2014. Vol. 87, no. 4. P. 535–551. URL: <https://doi.org/10.1093/forestry/cpu010> (date of access: 06.04.2025).
2. Identification of an Emaravirus in a Common Oak (*Quercus robur* L.) Conservation Seed Orchard in Germany: Implications for Oak Health / M. Bandte et al. *Forests*. 2020. Vol. 11, no. 11. P. 1174. URL: <https://doi.org/10.3390/f11111174> (date of access: 06.04.2025).
3. Development of a PCR-RFLP Based Detection Method for the Oak Pathogens *Diplodia corticola* and *D. quercivora* / T. J. Dreaden et al. *Plant Health Progress*. 2014. Vol. 15, no. 2. P. 63–66. URL: <https://doi.org/10.1094/php-rs-13-0122> (date of access: 06.04.2025).
4. Preliminary Comparative Analysis of Phenological Varieties of *Quercus robur* by ISSR-Markers / V. Chokheli et al. *Journal of Botany*. 2016.

Vol. 2016. P. 1–7. URL: <https://doi.org/10.1155/2016/7910451> (date of access: 06.04.2025).

5. Early identification of fungal leaf blight disease (*Alternaria alternate*) on *Platycladus orientalis* plants by using gas chromatography-ion mobility spectrometry / C. Zheng et al. *Microchemical Journal*. 2022. P. 107505. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107505> (date of access: 06.04.2025).