

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

06.07 – КР. 1998 «С». 2023.01.11. 3 ПЗ

**ДАНЕВИЧ ВАЛЕРІЯ АНАТОЛІЇВНА**

2024

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**УДК 606:632.6**

**ПОГОДЖЕНО**

**Декан факультету**

**захисту рослин, біотехнологій та екології**

\_\_\_\_\_ **Коломієць Ю.В.**

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 р.

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**

**Завідувач кафедри**

**екобіотехнології та біорізноманіття**

\_\_\_\_\_ **Кваско О.Ю.**

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему** «Біотехнологічні методи ідентифікації збудників бактеріальних хвороб *Solanum melongena* L»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

**Гарант освітньої програми**

**д.с.-г. н., професор**

\_\_\_\_\_ **Лісовий М.М.**

**Керівник магістерської кваліфікаційної роботи**

**к.б.н., доцент**

(науковий ступінь та вчене звання)

\_\_\_\_\_ **Кваско О.Ю.**

(підпис)

(ПІБ)

**Виконав (ла)**

\_\_\_\_\_ **Даневич В.А.**

(підпис)

(ПІБ студента)

**КИЇВ-2024**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

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

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
Завідувач кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття  
**Кваско О.Ю.**  
“        ”        \_\_\_\_\_ 2024 р.

**ЗАВДАННЯ**  
**на виконання кваліфікаційної роботи студенту**

\_\_\_\_\_ Даневич Валерії Анатоліївни \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біотехнологічні методи ідентифікації збудників бактеріальних хвороб *Solanum melongena* L.»

керівник роботи к.б.н., доцент Кваско Олена Юріївна,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

2. Строк подання студентом роботи 20 травня 2024 року

3. Вихідні дані до роботи протоколи виділення та ідентифікації бактерій, поживні середовища, послідовності праймерів для полімеразно-ланцюгової реакції

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

4.1. Відібрати зразки уражених рослин *Solanum melongena*, виділити патогенів у чисту культуру та визначити патогенних властивостей виділених ізолятів бактерій.

4.2. Дослідити морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивостей виділених ізолятів бактерій.

4.3. Провести молекулярно-генетичний аналіз отриманих бактеріальних ізолятів.

### 5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Кваско О. Ю.		
2	Кваско О. Ю.		
3	Кваско О. Ю.		

6. Дата видачі завдання 1 вересня 2023 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Вибір теми і отримання завдання кваліфікаційної роботи	Вересень 2023 р.	
2	Опрацювання літературних джерел по темі роботи	Жовтень 2023 р.- грудень 2023 р.	
3	Проведення експериментальних досліджень	Січень-травень 2024 р.	
4	Аналіз отриманих результатів	Травень-серпень 2024 р.	
5	Підготовка висновків	Вересень 2024 р.	
6	Написання і оформлення бакалаврської кваліфікаційної роботи	Вересень-жовтень 2024 р.	
7	Підготовка до захисту кваліфікаційної роботи	Жовтень-листопад 2024 р.	

Завдання прийняв до виконання

\_\_\_\_\_ Даневич В.А.  
( підпис ) (прізвище та ініціали)

Керівник кваліфікаційної роботи

\_\_\_\_\_ Кваско О.Ю.  
( підпис ) (прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Бакалаврська дипломна робота виконана на тему «Біотехнологічні методи ідентифікації збудників бактеріальних хвороб *Solanum melongena* L.» в обсязі 63 сторінки комп'ютерного тексту формату А4, містить 10 рисунків, 3 таблиці, 83 використаних джерел. Складається з наступних розділів:

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

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

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

1. Відбір зразків, виділення патогенів у чисту культуру та визначення патогенних властивостей виділених ізолятів бактерій.
2. Дослідження морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей виділених ізолятів бактерій.
3. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих бактеріальних ізолятів.

**Об'єктом дослідження** є ідентифікації бактеріальних патогенів *Solanum melongena* L.

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

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

## ЗМІСТ

ВСТУП7

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ10

1.1 Традиційні методи ідентифікацій.10

1.2 Сучасні біотехнологічні методи.15

1.3 Бактеріози рослин баклажану (*Solanum melongena* L).21

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ26

1.1 Місце проведення дослідження.26

1.2 Відбір зразків для виділення бактеріальних патогенів.27

1.3 Виділення бактеріальних фітопатогенів в чисту культуру.27

1.4 Визначення патогенних ознак виділених збудників.30

1.5 Визначення пектолітичної активності.31

1.6 Реакція гіперчутливості .31

1.7 Визначення морфолого-культуральних ознак виділених ізолятів бактерій.32

1.8 Виділення ДНК та молекулярно-генетичний аналіз виділених ізолятів.37

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ40

3.1 Визначення патогенності виділених ізолятів бактерій.40

3.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічна характеристика бактеріальних ізолятів.41

3.3 Молекулярно-генетичний аналіз виділених збудників.47

ВИСНОВКИ49

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ50

ДОДАТКИ59

## ВСТУП

*Solanum melongela* L., є важливою овочевою рослиною родини Пасльонових, зазвичай культивується як фруктовий овоч у субтропічних і тропічних регіонах світу [22]. За інформацією швейцарського ботаніка Огюстена Пірама Декандолья, баклажани були відомі в Індії ще із стародавніх часів [24]. Вважається, що баклажани походять із регіону Індо-Бірма. Китай може бути вторинним центром походження. Перша згадка про баклажани в Європі була в п'ятнадцятому столітті, тоді ж і з'явилася назва eggplant, яка походить від зовнішнього вигляду баклажанів того часу (білі та яйцеподібні) [38].

Баклажани є хорошим джерелом мінералів і вітамінів, а за загальною харчовою цінністю їх можна порівняти з томатами. Баклажани мають низьку калорійність і низький вміст жирів і містять переважно воду. Він також містить білок, клітковину та вуглеводи. Плід баклажана є хорошим джерелом різних вітамінів, таких як В1, В2, В6, С, К, тіамін, ніацин і пантотенова кислота, а також мінералів, таких як магній, калій, марганець і мідь. Такий широкий спектр поживних речовин робить цю рослину важливою складовою раціону людини. [58].

Важливими країнами з вирощування баклажанів є Індія, Японія, Індонезія, Китай, Болгарія, багато країн Африки, Італія, Франція, США. Баклажани в основному вирощують у Китаї, Індії, Єгипті, Ірані та Туреччині тощо. У 2018 році у світі вирощували 1,87 млн га із загальним виробництвом 51,28 млн тонн, з яких 62% і 24% світового виробництва охоплювали Китай та Індія відповідно. На світовому ринку Україна займає 32 місце по вирощуванню баклажанів, та за даними Державної служби статистики, в Україні за 2023 рік валовий збір баклажанів став 326,8 тис. ц, що на 7,1% більше порівняно з попереднім роком (303,5 тис. ц).

Бактеріальні хвороби завдають великої шкоди овочевим рослинам, що може призвести до 20 – 50 % втрат врожаю. У літературі для родини Пасльонових описується більше 30 різних збудників захворювання, із них приблизно 15 бактеріальних. Загальний відсоток втрат врожаю становить від

80% до 90%, в деякі роки 100%. Вони виявляються скрізь, де вирощують баклажани та інші пасльонові культури. Вид фітопатогенних бактерій, стадія зараження рослин, погода та клімат, які можуть як сприяти, так і гальмувати активний розвиток збудника, а також заходи, вжиті для припинення розповсюдження збудника, впливають на економічні збитки від бактеріальних захворювань. Поява нових збудників складає основну небезпеку.

З метою запобігання поширення бактеріальних хвороб, важливо своєчасно ідентифікувати їх збудників із високою точністю для подальшого визначення ефективних методів подолання хвороб. Для цього існують ряд методик із використанням різних інструментів біотехнології та молекулярної біології.

Отже, метою роботи було дослідити ефективність різних методик ідентифікації фітопатогенних збудників захворювань *Solanum melongena* L.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Відбір зразків, виділення патогенів у чисту культуру та визначення патогенних властивостей виділених ізолятів бактерій.
2. Дослідження морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей виділених ізолятів бактерій.
3. Молекулярно-генетичний аналіз отриманих бактеріальних ізолятів.

**Об'єктом дослідження** є ідентифікації бактеріальних патогенів *Solanum melongena* L.

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

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

Практична значущість даної роботи полягає у використанні результатів для дослідження бактеріозів з мінімізацією проведених досліджень для швидкої і точної діагностики хвороби на ранніх стадіях розвитку і обмеження її поширення.

Робота виконувалась на базі ННЛ “Біотехнології та клітинної інженерії” на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин,



біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Традиційні методи ідентифікацій.

Хвороби рослин викликають значні втрати врожаю рослин, що призводить до величезних економічних збитків. Точна ідентифікація та діагностика хвороб рослин дуже важливі в епоху зміни клімату та глобалізації для продовольчої безпеки, а також для запобігання поширенню інвазійних шкідників/патогенів. Крім того, для ефективного та економного управління хворобами рослин необхідна точна, чутлива та специфічна діагностика. Наука про діагностику хвороб рослин розвинулася з візуального огляду та ідентифікації хвороб рослин для виявлення за допомогою високопродуктивних серологічних методів, таких як імуноферментний аналіз (ELISA) і молекулярних методів, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [7].

Традиційні методи ідентифікації бактерій базуються на спостереженні або за морфологією окремих клітин, або за характеристиками колонії. Відомо, що бактерії групуються відповідно до їх морфологічних характеристик (формою клітин, наявності або відсутності джгутиків і розташування джгутиків), використання субстрату та фарбування за Грамом. Інша ознака – це модель росту на твердих поживних середовищах, так як різні види бактерій можуть утворювати різні форми колоній [18]. Ці традиційні методи залишаються надійними параметрами для ідентифікації видів бактерій. Однак вони мають ряд недоліків:

1. Є трудомісткими та забирають багато часу для проведення дослідження.
2. Через різні умови середовища культивування може виникнути мінливість у культурі, що призводить до неоднозначних результатів.
3. Ідентифікація потребує чистої культури, що ускладнює, а іноді й унеможливає ідентифікацію вибагливих і непридатних для культивування бактерій.

#### **Візуальна діагностика патогенів**

До методів візуальної діагностики відносять візуалізацією у видимому світлі, візуалізацією флуоресценції хлорофілу, гіперспектральною та

тепловізійною візуалізацією [54]. Ці методи залежать від факторів навколишнього середовища та інші біологічні фактори. Проводять візуальний огляд зародкової плазми рослин. Візуальний метод діагностики значною мірою залежить від досвіду ідентифікації симптомів і їх диференціації від тісно пов'язаних симптомів, викликаних іншими факторами [65].

Одним із поширених напрямків у візуальній ідентифікації хвороб рослин є феноміка рослин. Ця методика вивчає взаємодію між патогенами рослин, завдяки їй можна виявляє просторові моделі гетерогенності та може візуалізувати локалізовані реакції. Існують різні методи фенотипування зразків рослин, наприклад хлорофілфлуоресцентне зображення, гіперспектральне зображення, теплові зображення. Цей метод повідомляють як багатообіцяючий для діагностики патогенів хвороб рослин, але недоліком є неможливість його використання для диференціювання хвороб на пізніх стадіях розвитку, також хвороби що протікають безсимптомно або мають внутрішні симптоми, так як їх важко ідентифікувати на за допомогою системи на базі зображень. Поряд з візуальним оглядом можна провести діагностику за допомогою мікроскопії для вивчення грибів і комах. Ідентифікувати вірус і фітоплазму можна за допомогою електронної мікроскопії за морфологією частинок. Але мікроскопія має низьку чутливість, і патоген у низькому титрі не може бути ідентифікований [53].

### **Морфологічна ідентифікація бактеріальних патогенів**

Як повідомлялося раніше під час ідентифікації бактерій велика увага приділяється тому, як вони ростуть на середовищах, щоб ідентифікувати їх культуральні характеристики, оскільки різні види можуть створювати дуже різні колонії. Кожна колонія має характеристики, які можуть бути унікальними для неї, і це може бути корисним для попередньої ідентифікації бактеріального виду. Колонії з помітно відмінним зовнішнім виглядом можна вважати або змішаною культурою, або результатом впливу навколишнього середовища на бактеріальну культуру, яка зазвичай створює відомі характеристики колонії або нещодавно виявлений вид. Одним із найвідоміших методів ідентифікацій бактерій є фарбування за грамом. Цей метод дозволяє класифікувати бактерії за

структурними властивостями їх клітинних стінок. На основі фарбуванні за Грамом бактерії можна диференційовано класифікувати як грампозитивні чи грамнегативні, що є зручним інструментом ідентифікації та класифікації, який залишається корисним до сьогоднішнього дня [18].

Опис особливостей колоній на твердих агаризованих середовищах включають:

- Форма ( кругла, неправильна або ризоїдна)
- Розмір(діаметр колонії: малий, середній, великий)
- висоту (вигляд колонії збоку: піднятий, опуклий, увігнутий)
- поверхня (як виглядає поверхня колонії: гладка, хвиляста, шорстка, зерниста, сосочкова або блискуча)
- край ( цілий, хвилястий, зубчастий, фімбріозний або закручений)
- колір (жовта, зелена серед інших)
- структура/непрозорість (непрозора, напівпрозора або прозора)
- ступінь росту (мізерний, помірний або рясний)
- характер (дискретний або злитий, ниткоподібний, розповсюджений або ризоїдний).

Форма клітини також використовувалася в описі та класифікації видів бактерій [13] . Найпоширенішими формами бактерій є коки (округлі за формою), бацили (паличкоподібні) і спірили (спіралеподібні) [15].

Для морфологічного опису клітин бактерій використовують світлову мікроскопію із попереднім використанням фарбників [10]. Як відомо першою людиною яка спостерігала бактерії під мікроскопом був голландський вчений Антоні ван Левенгук (1632-1723). Без фарбування бактерії безбарвні, прозорі і нечітко помітні, а фарбування служить для розрізнення клітинної структури для більш детального вивчення. Спостереження за морфологією бактерій і реакцією за Грамом зазвичай є першим етапом ідентифікації. Також повідомляється про спеціальне фарбування джгутиків, яке показує розташування їх на бактеріальній клітині та їх різноманітність. Джгутики бактерій - це придатки, які використовуються для рухливості. Їх присутність є корисним інструментом для

ідентифікації та диференціації прокариотів. Оскільки джгутики надто тонкі, щоб їх можна було побачити за допомогою комбінованої світлової мікроскопії, у методах фарбування використовується протрава (часто дубильна кислота), щоб зробити їх достатньо товстими, щоб побачити їх за допомогою імерсійного об'єктива [12]. Але у цього метода також є ряд недоліків, його вважають доволі ненадійним так як дубильна кислота яку використовують є нестабільною або прилипає до предметного скла мікроскопа. Також джгутики бактерій занадто крихкі, і при змішуванні із реагентом можуть легко відірватися від клітинної оболонки.

Метод світлової мікроскопії використовується для ідентифікації бактеріальних колоній та морфологічного опису індивідуальних бактеріальних клітин. Одним із недоліків світлової мікроскопії є обмеження його роздільної здатності для проектування зображень бактерій для чіткості ідентифікації. Альтернативним методом є скануюча електронна мікроскопія (SEM) у поєднанні із зображенням зворотно-розсіяних електронів високої роздільної здатності. Цей метод дозволяє точно виявити та ідентифікувати морфологічні особливості бактерій [23]). Суть полягає у визначенні структури поверхні бактеріальних клітин та вимірювання морфологічних змін фіксованих клітин [43].

Повідомляється про використання класифікаторів  $3\sigma$  і K-NN, як методи для ідентифікації бактеріальних клітин на основі їх морфологічних характеристик. Також було запроваджено покращений метод для характеристики бактеріальних клітин на основі їх різних характеристик шляхом сегментації цифрових зображень бактеріальних клітин і вилучення ознак геометричної форми для морфології клітин [40]. Додатково до мікроскопії існують інші методи для підвищення точності ідентифікації бактеріальних патогенів. Серед цих методів виділяють серологічні та біохімічні реакції.

### **Серодіагностика бактеріальних патогенів**

На сьогоднішній день використання серологічних методів для ідентифікації бактеріальних патогенів рослин є установленою практикою та самі методи є добре дослідженими.

Суть серологічних досліджень у детекції рослинних патогенів полягає у ідентифікації захворювання на основі антитіл, підтверджених зміною кольору в аналізі. Антитіла складаються з білків імуноглобулінів (Ig), які виробляються в організмі тварини у відповідь на присутність антигенів, якими зазвичай є чужорідні білки, складні вуглеводи, полінуклеотиди або ліпополісахариди. Кожне антитіло є специфічним для певного антигену і зв'язується з ним. Найбільш часто використовуваним серологічним методом є ELISA (імуноферментний аналіз), який був раніше розроблений для виявлення вірусів рослин [19]. Він був модифікований відповідно до конкретних потреб аналізу виявлення, а саме: прямий ELISA (кон'югований комплекс антитіло-фермент безпосередньо зв'язується з антигеном) та непрямий ELISA (антиген не зв'язується безпосередньо з антитілом – енімний кон'югат) [61]. В даний час ІФА широко використовується для виявлення рослинопатогенних грибів і бактерій з використанням моноклональних і поліклональних антисироваток.

Принципи ІФА використовуються для виявлення діагностичних ознак, за якими антигени або епітопи збудника зв'язуються з антитілами. З часом точність цього методу була покращена та використання таких комерційно доступних рекомбінантних антитіл робить діагноз практично надійнішим [47]. Повідомляється про розробку та застосування експрес тесту імунохроматографії (lateral flow-ELISA) який можна використовувати безпосередньо у відкритому полі. Цей тест був використаний для ідентифікації *Ralstonia solanacearum* у томатах [21].

Також повідомляється про розробку швидкого тесту аглютинації на предметних скельцях з використанням поліклональної антисироватки, кон'югованої з багатим на білок А цільноклітинним *Staphylococcus aureus*. Методику оцінювали на чутливість та специфічність у 18 комбінаціях антитіло-антиген, які представляли шість родів бактерій (*Erwinia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* і *Xanthomonas*). У дослідженні було збільшено специфічність методики для двох патотипів *Pseudomonas syringae* за рахунок використання антисироваток, приготовлених до соматичних екстрактів.

У переліку переваг автори зазначили швидкість, простоту та можливість ідентифікації організмів безпосередньо з інфікованих рослинних тканин. Цей метод був успішно застосований для виявлення *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* і pv. *pisi* при ураженні квасолі та гороху, відповідно, *P. gladioli* pv. *alliicola* і *Lactobacillus* sp. з гнилих цибулин і специфічних штамів *Rhizobium phaseoli* в бульбочках коренів квасолі. [48].

Отже, метод ІФА є ефективним у виявленні патогенів, таких як бактерії, але ці методи не можуть оцінити життєздатність патогенів, що є суттєвим недоліком цього методу.

## 1.2 Сучасні біотехнологічні методи.

Як повідомлялося раніше, щороку через різні патогени та хвороби відбуваються величезні втрати врожаю. Традиційний метод виявлення збудника, який все ще застосовується, шляхом візуального огляду не завжди є точним. Серологічні методи додають точності та швидкості діагностики патогенів, але мають ряд суттєвих недоліків. Одним із важливих аспектів виявлення патогенів у рослин, особливо сільськогосподарського призначення, є їх рання ідентифікація до утворення важкої інфекції є дуже важливим для порятунку урожаю, що можливо завдяки підходам молекулярної діагностики та тестам на основі нуклеїнових кислот [60].

Основні методи сучасної молекулярної біології використовують такі основні біомолекули, як ДНК [на основі зонда, кількісна полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), штрих-кодування ДНК, мікроматриця], РНК (ПЛР зі зворотною транскриптазою, секвенування наступного покоління на основі РНК-seq) і білок (Western-блот) модернізували виявлення хвороб рослин [72].

### Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Це ферментативна реакція *in vitro*, спрямована на праймер, здатна до експоненціальної ампліфікації ДНК. Методика має різноманітне застосування в різних галузях біологічних наук. Першим застосуванням ПЛР для виявлення бактеріальних патогенів у хворих рослин було для виявлення патогенів *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* у 1991 році, Нідерландах [64]. Відтоді цей підхід

широко використовується як життєздатна альтернатива для виявлення та діагностики патогенів завдяки його перевагам над звичайними методами. Тести виявлення на основі ПЛР є специфічними, чутливими, ефективними, швидкими, універсальними і відносно економічними[39]. Ці методи є ідеальними для виявлення збудника *de novo*, оскільки вони не вимагають виділення збудника в чистій культурі, що економить час і ресурси.

Повідомляється про ряд досліджень на основі ПЛР та різних збудників хвороб рослин. Одним із вагомих було виявив та підтвердив збудник бактеріального опіку граната *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* у локалізованих ураженнях, які також продемонстрував нетрансламінарий системний рух [69].

Паралельно із серологічними методами аналізу на основі ПЛР мають як вузьку, так і широку специфічність і є відносно чутливими. Діагностична специфічність визначається як міра, до якої на метод впливають нецільові компоненти, присутні у зразку, що може призвести до хибно позитивних результатів. Діагностична чутливість визначається як міра ступеня виявлення цільового патогена в зразку, що може призвести до хибно негативних результатів [49]. Специфічність ПЛР, класичної або в режимі реального часу, залежить від розробки правильних праймерів ПЛР, які є унікальними для цільового організму (патогену). Висококонсервативні генні області часто є мішенню для розробки праймерів. Близькоспоріднені мікробні види часто відрізняються одним (однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) до кількох основ у таких генах. ПЛР дозволяє виявити такі SNP [59]. З прогресом у високопродуктивному секвенуванні ДНК все більше і більше геноми збудників хвороб рослин будуть секвеновані, а дані про нуклеотидні послідовності будуть доступні, що уможливило розробку унікальних праймерів і зондів для специфічного виявлення патогенів.

На чутливість ПЛР значною мірою впливає наявність інгібіторів, які запобігають або зменшують ампліфікацію. Повідомляється про широкий спектр інгібіторів [78]. Незважаючи на те, що дія цих інгібіторів не ясна, вважається, що ці інгібітори перешкоджають активності полімерази для ампліфікації цільової



ДНК. З іншого боку, варто зазначити, що висока чутливість ПЛР також спричиняє одне з обмежень ПЛР, тобто чутливість виявлення, що перевищує порогові рівні або клінічну значущість, і хибно позитивні результати через незначне забруднення ДНК. Отже, при проведенні аналізу необхідні суворі умови, а в тест повинні бути включені відповідні негативні контролю. Також рекомендується мати окремі спеціальні зони для обробки до та після ПЛР [82].

Аналіз на основі ПЛР не може оцінити життєздатність патогена, оскільки ДНК нежиттєздатних патогенів може бути ампліфікована та створювати враження зараження. Однією з головних цілей системи виявлення патогенів, окрім визначення наявності та відсутності патогену, є життєздатність, оскільки у разі позитивного результату важливо знати, чи становить виявлений патоген загрозу для рослинництва. Неможливість відрізнити життєздатні клітини від мертвих є підводним каменем, характерним для систем виявлення на основі нуклеїнових кислот, таких як діагностична ПЛР [14]. Оскільки, теоретично, ПЛР здатна ампліфікувати одну молекулу ДНК з реакційної суміші, можливість забруднення комерційних реагентів цільовими послідовностями, що призводить до хибно позитивного результату, ніколи не виключається. Крім того, утворення неспецифічних продуктів через неправильне праймування та утворення праймерів-димерів ускладнює вірогідність правильної інтерпретації [7].

Існує ряд досліджень у яких повідомляється про використання збагачене культивування (BIO PCR) задля уникнення цієї проблеми. Ця система допомагає лише із виявленням життєздатних клітини та допомагає в усуненні можливих інгібіторів ПЛР, недоліком є те, що вона не підходить для кількісного аналізу. Таким чином, відсутність здатності розрізнити життєздатні клітини від мертвих, а також відсутність методів підготовки зразків, які не передбачають збагачувального культивування, наразі обмежують впровадження кількісної ПЛР для рутинного діагностичного використання. Молекулярні методи для визначення життєздатності патогенів зосереджені на виявленні мРНК у зразку, оскільки вважається, що різновиди мРНК є лабільними з дуже коротким періодом існування (від секунд до хвилин) після смерті клітини. Однак, хоча в

теорії це більш точний показник життєздатних мікроорганізмів, повідомляється про слабку кореляцію між цими двома змінними [71].

### **ПЛР у реальному часі (q PCR)**

ПЛР у реальному часі наразі вважається золотим стандартом для виявлення патогенів рослин. Ця техніка дозволяє контролювати реакцію під час процесу ампліфікації за допомогою флуоресцентного сигналу, який зростає пропорційно кількості генерованих ампліконів і кількості мішеней, присутніх у зразку [3]. Ще однією перевагою ПЛР у реальному часі є можливість виконувати мультиплексне виявлення двох або більше патогенів в одній реакції.

ПЛР у реальному часі є різновидом звичайної ПЛР, яка дозволяє кількісно визначити ДНК або РНК у реакційній суміші ПЛР. За допомогою визначення послідовності можна оцінити відносну кількість копій певної послідовності ДНК або РНК шляхом оцінки значення  $C_t$  (поріг циклу) для зразка. Якщо конкретна послідовність (ДНК або РНК) є у великій кількості у зразку, ампліфікація спостерігається в попередніх циклах (низьке значення  $C_t$ ); якщо послідовність мізерна, ампліфікація спостерігається в пізніших циклах (високе значення  $C_t$ ).  
Переваги над класичною ПЛР:

- дозволяє відстежувати реакцію ПЛР у реальному часі
- дозволяє вимірювати амплікон після кожного циклу
- збільшує діапазон виявлення мішені послідовність, таким чином, підвищує чутливість аналізу
- оскільки оцінка виконується в режимі реального часу, не вимагає гелелектрофору після ампліфікації, що економить час і ресурси.

Повідомляється про ефективне використання ПЛР у реальному часі для рутинного тестування насіння на патогени. ПЛР у реальному часі дозволяє кількісно визначити матричну ДНК, що може бути використано для визначення рівнів зараження насіння. Хоча витрати, пов'язані з виявленням на основі ПЛР у реальному часі, є ключовим обмеженням у його прийнятті як основної методики в лабораторіях для тестування насіння, але переваги є більшими, ніж економічні

[80].. На сьогоднішній день існує ряд успішних досліджень із використанням ПЛР у реальному часі для виявлення патогенів, *Ralstonia solanacearum* раса 3, біовар 2, у безсимптомних бульбах картоплі [51,57].

### **Метод секвенування послідовності гена 16S рРНК**

Значна частина сучасної мікробної таксономії та класифікації базується на дослідженнях бактеріального гена рибосомної РНК 16S (16S). 16S рРНК є компонентом малої субодиниці 30S прокариотичної рибосоми, яка є важливим геном у всіх бактеріях і археях. Пряме секвенування ампліфікованих ПЛР генів 16S призвело до створення великої кількості «оперативних таксономічних одиниць» (OTU), які представляють некультивовані бактерії, які здебільшого ніколи не вивчалися в лабораторії. З 2004 року відбулося різке збільшення кількості OTU, і швидкість відкриття нових OTU продовжує зростати [83]. База даних рРНК SILVA за останнім оновленням містить 9, 469, 070 бактеріальну послідовність 16S рРНК, які були згруповані на рівні 95% ідентичності в 510, 405 репрезентативну послідовність (SILVA 138,2, 11 червня 2014 р.).

Аналіз гена 16S рРНК вимагає ампліфікації цього гена за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і секвенування отриманого продукту ПЛР. Потім послідовність гена можна зіставити з попередньо отриманими послідовностями, отриманими з різних баз даних ДНК. Цей метод отримав настільки широке поширення, що бази даних послідовностей ДНК переповнені послідовностями гена 16S рРНК. Майже всі нові послідовності, депоновані для запиту, мають збіги, і будь-яка копія гена 16S рРНК, яка не відповідає жодному відомому виду бактерій, вважається новою [16].

Гени рибосомної РНК є важливою частиною механізму синтезу білка. Вони всюдиусці, тому класифікація, заснована на аналізі генів рибосомної РНК, не залишає поза увагою жодну з відомих бактерій. З цієї причини аналіз генів рибосомальних РНК є придатним інструментом для ідентифікації видів бактерій і таксономічної категоризації [81]..У прокариотів гени рибосомної РНК зустрічаються в копіях по три або чотири в одному геномі [30]. Ген 16S рРНК став надійним інструментом для ідентифікації та класифікації бактерій. З часом

ген 16S рРНК продемонстрував функціональну узгодженість, і його довжина приблизно 1500 bp, що є достатньою для біоінформаційного аналізу [42].

Повідомляється про використання послідовність гена 16S рРНК для виявлення видів бактерій у природних зразках і встановлення філогенетичних зв'язків між ними (Eren et al., 2011). Це стало можливим завдяки тому факту, що всі види бактерій містять ген 16S рРНК, який має висококонсервативні ділянки, на основі яких можна створити універсальні праймери, а також гіперваріабельні ділянки, корисні для розрізнення видів [29]. Згідно із повідомленнями, коли чисті ПЛР-продукти гена 16S отримані, секвеновані та вирівняні з базою даних бактеріальної ДНК, тоді бактерію можна ідентифікувати [8]. Ряд досліджень також підтверджують, що для ідентифікації бактерій ген 16S рРНК вважається найбільш прийнятним геном [70]. За інформацією інших експериментів, автори дають визначення 16S рРНК як «сигнатурні» гени бактерій та пояснюють, що 16S рРНК дозволяють класифікувати та ідентифікувати види бактерій, навіть якщо конкретна послідовність не відповідає в базі даних. Відмінний підхід при ідентифікації видів бактерій за допомогою цього методу полягає у виконанні високого секвенування генів 16S рРНК, які потім таксономічно класифікуються на основі їх подібності до відомих послідовностей в існуючих базах даних [52]. Прикладами успішного використання секвенування генів 16S рРНК для ідентифікації та класифікації бактеріальних патогенів є дослідження ендоефітних бактерій у внутрішніх тканинах листя та стебла цукрової тростини. Автори дослідження використовували поживне агаризоване середовище для культивування ендоефітів, після чого 107 ізолятів бактерій у внутрішніх тканинах листків і стебел цукрової тростини було відібрано для аналізу, а 23 види бактерій ідентифіковано та розділено на три групи на основі послідовностей 16S рРНК і філогенетичних аналіз. Виявленими таксонами були *Sphingobacterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium larrymoorei*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Acinetobacter* (один штам), *Enterobacter* (три штамми), *Klebsiella* (один штам), *Serratia* (один штам), *Pantoea* (три штамми) і *Pseudomonas* (два штамми)

[46]. Інші успішні дослідження ідентифікували бактеріальні ізоляти з листя *Gaultheria procumbens* (східний чайний ягоди, шашка, самшит або американська зимова зелень) як *Pseudomonas resinovorans*, *Paenibacillus polymaxa* та *Acinetobacter calcoaceticus* [11].

Варто зазначити недоліки цього методу: за допомогою наявної методики неможливо відрізнити види, які мають однакову послідовність цього гена. Ідентифікація видів бактерій на основі аналізу послідовності гена 16S рРНК ґрунтується на зіставленні отриманої послідовності з існуючою. Зіставлення з послідовністю, яка була неправильно ідентифікована, призводить до неправильної ідентифікації [56].

### **1.3 Бактеріози рослин баклажану (*Solanum melongena* L).**

Фітопатогени є збудниками хвороб рослин, переважно мікроорганізми, такі як бактерії, віруси, гриби, нематоди та найпростіші, а також деякі паразитичні рослини та водорості. Вони атакують рослини, отримують поживні речовини та викликають захворювання, виділяючи ферменти, токсини тощо. Успішність інфектування залежать від взаємодії відповідних генів, присутніх у патогенах і в рослинах. Хвороби рослин є основною причиною, що викликають великі втрати урожаю, що у свою чергу призводить до фінансових втрат, голод, харчові отруєння та зникнення видів рослин [2].

Патогени відрізняються за видами рослин, які вони можуть уражувати, за органами та тканинами, які вони можуть заразити, і за віком органу чи тканини рослини, на якій вони можуть рости. Деякі патогени обмежені одним видом, інші одним родом рослин, треті мають широкий спектр хазяїв, що належать до багатьох родин вищих рослин. Деякі збудники ростуть переважно на коренях, інші на стеблах, а деякі переважно на листках або на м'ясистих фруктах чи овочах. Деякі патогени, наприклад, судинні паразити, атакують певні типи тканин, наприклад флоему або ксилему. Інші можуть по-різному впливати на різні частини однієї рослини. Що стосується віку рослин, то одні патогени

вважають проростки або молоді ніжні частини рослин, а інші — тільки зрілі тканини [1].

Патогенні бактерії рослин (бактеріози) є важливими патогенами рослин, широко поширеними в усьому світі [9]. Повідомляється, що з 7100 класифікованих бактерій близько 150 видів є відповідальними за різні захворювання рослин (Rajesh-Kannan et al., 2016). Бактеріози класифікуються на три родини: *Xantomonadaceae*, *Pseudomonaceae* та *Enterobacteriaceae*. Ці родини бактерій містять такі роди: *Dickeya*, *Liberibacter*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Candidatus*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralsonia*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma*, *Phytoplasma*, *Brenneria*, *Lonsdale* і *Xylophilus* [1]. Вони інфікують рослини різними механізмами: за допомогою ферментів, що руйнують клітинну стінку (целюлази, ксиланази, пектинази) або шляхом введення хімічних речовин, наприклад гени *hrp* та білки *harpins* і *Avr*, пов'язаних із захворюваннями рослин [4]. Основні симптоми на культурах включають аномальні нарости на коренях, стеблах, плями на листі або плодах, опіки або омертвіння тканин на листі, стеблах або стовбурах дерев і гниль будь-якої частини рослини, зазвичай коренів або бульб [77].

У літературі для родини Пасльонових описується більше 30 різних збудників захворювання, із них приблизно 15 бактеріальних [17]. Для баклажану найпоширенішими бактеріальними захворюваннями в Україні представлені у таблиці 1

**Таблиця 1.3.1**

**Характеристика бактеріальних патогенів *Solanum melongena* L.  
розповсюджених в Україні**

<b>Патоген</b>	<b>Захворювання викликане патогеном</b>	<b>Основні симптоми</b>
<i>Rhizobium spp.</i> [32]	Кореневі пухлини (коронковий гал)	Молоді пухлини гладкі, білуваті, досить кулясті.

		<p>У міру старіння пухлини на поверхні розплавляються і поступово набувають більш-менш вираженого коричневого відтінку.</p> <p>Мають неправильну форму та різний розмір, деякі досягають кількох сантиметрів у діаметрі. Вони можуть стати губчастими і згодом руйнуватися.</p>
<i>Pectobacterium carotovorum</i> [37]	Бактеріальна м'яка гниль	Патоген уражає судинні тканини стебла, викликаючи вологі коричневого кольору плями
<i>Ralstonia solanacearum</i> [67]	Бактеріальне в'янення баклажанів	Початковим симптомом є в'янення кінчиків листків, яке через 2-3 дні стає постійним, коли в'яне вся рослина внаслідок активного розвитку хвороби. Тоді цілі рослини в'януть і раптово гинуть.

Вид фітопатогенних бактерій, стадія зараження рослин, погода та клімат, які можуть як сприяти, так і гальмувати активний розвиток збудника, а також заходи, вжиті для припинення розповсюдження збудника, впливають на економічні збитки від бактеріальних захворювань [63]. Поява нових збудників складає основну небезпеку. Для контролю поширення патогенів існують спеціальні як державні, так і міжнародні органи. Однією з великих міжнародних

організації присвячених контролю та карантину збудників хвороб рослин є Європейська та Середземноморська організація захисту рослин (ЄОКЗР). На базі ЄОКЗР існують переліки А1 [25] і А2 [26], які включають шкідливі організми, що ЄОКЗР рекомендує регулювати як карантинні шкідливі організми, в національних фітосанітарних правилах країн-членів ЄОКЗР.

Згідно Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, та Закону України «Про карантин рослин» із наданого «Перелік регульованих шкідливих організмів» та за наказом Міністерства аграрної політики України від 16.07.2019 року «Про внесення змін до Переліку регульованих шкідливих організмів» карантинними патогенами хвороб баклажану які наявні в Україні представлено у таблиці 2

Таблиця 1.3.2

**Перелік бактеріальних патогенів із списку А2 ЄОКЗР які уражують  
рослини *Solanum melongena* L.**

<b>Фітопатогени</b>	<b>Захворювання викликане патогеном</b>	<b>Поширеність фітопатогену</b>
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	чорна бактеріальна плямистість пасльонових	Найбільш поширена в Північній та Південній Америці, Східній Європі. В Україні патоген наявний, рідко уражає баклажан [44]
<i>Ralstonia solanacearum</i>	бактеріальна гниль	Поширений в Південній Америці, Африці та Європі. В Україні патоген є перехідним, є одним із найпоширеніших патогенів бактеріозів пасльонових [66]
<i>Pseudomonas syringae</i> pv.	базальний бактеріоз	Поширений в тропічних широтах, Канаді та Європі. В Україні є локально поширеним [28]



<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	бактеріальний рак	Поширений в Північній та Південній Америці, Австралії та Європі. В Україні є широко поширеним агресивним патогеном [27]
---	-------------------	---

Боротьба з хворобами рослин дуже важлива для запобігання втратам продуктивності різних культур. Згідно норм Європейського Союзу розсадники мають бути перевірені на фітосанітарний статус перед виходом на комерційний ринок. Так як поширення та інтенсивність збудників хвороб залежить від багатьох факторів зовнішнього середовища – температури, вологості, біологічних особливостей сортів, що вирощуються, агротехніки вирощування культури та багатьох інших. Є доцільним розробка ефективних методів виявлення й ідентифікації необхідні для дослідження екології, патогенезу й обмеження поширення фітопатогенних бактерій.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 1.1 Місце проведення дослідження.

Дослідження були проведені на базі навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Для проведення мікробіологічних досліджень наявні усі сектори лабораторії згідно вимог :

- приміщення для забору проб;
- приміщення для прийому, реєстрації матеріалу і видачі результатів досліджень;
- боксовані приміщення або приміщення, оснащені боксами біологічної безпеки;
- бокси для проведення санітарно-бактеріологічних досліджень;
- кімната для обробки і первинного посіву біологічного матеріалу (посівна);
- робочі кімнати (боксы) для бактеріологічних, серологічних, вірусологічних, паразитологічних досліджень.



Рис. 2.1.1. Робота над дослідженням за ламінар-боксом у асептичній кімнаті

## 1.2 Відбір зразків для виділення бактеріальних патогенів.

Зразки рослин з типовими симптомами бактеріального ураження були придбані у магазинах мас-маркету міста Київ. Загалом було обстежено 2 різних магазини на предмет бактеріального ураження рослин баклажану, було відібрано по 1 зразків з кожного магазину, упаковано в пакети для збору та передано для виділення і подальшої характеристики патогенів. Перед виділенням інфіковані зразки спочатку промивали водопровідною водою протягом 5 хвилин, стерилізували поверхню за допомогою 2% гіпохлориту натрію (NaOCl) і тричі промивали стерильною дистильованою водою.



Рис 2.2.1. Фото відібраних зразків уражених бактеріозами баклажану

## 1.3 Виділення бактеріальних фітопатогенів в чисту культуру.

Підготовка до виділення бактеріальних фітопатогенів в чисту культуру включала приготування поживного середовища бульйон Лурія-Бертані (LB) з додаванням агару. Для цього використовувалася вже готова суха суміш як містила у своєму складі : пептон ферментативний 10 г/л, триптон 10 г/л, дріжджовий екстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л, агар 12 г/л. Перед приготуванням вміст контейнеру з сухою сумішшю ретельно профільтрували для видалення контамінацій, потім відбиралась наважка у 7 грам сухої суміші LB на 250 мл

дистильованої води. Наважку ретельно розмішували при нагріванні протягом 2-3 хв до повного розплавлення агару, стерилізували під тиском у паровому стерилізаторі (автоклаві) при температурі 121 °С протягом 15 хвилин. Потім охолоджували до 45-50° С та розливали по чашкам Петрі і залишали для застигання та підсушування при  $\pm 37^{\circ}$  С. рН середовища було визначено як 7,3.

Виділення потенційних фітопатогенів проводили методом серійних розведень. У звичайну хімічну пробірку наливали 5 мл дистильованої води, потім мікробіологічною петлею (попередньо фламбованою та охолодженою) занурювали у місце ураження тканин рослини бактеріальними захворюваннями. Після цього петлю із достатньою кількістю зразком занурювали та ретельно перемішували у пробірці із дист. водою. Далі за допомогою мікропіпетки було відібрано 1 мл розчину бактерій та перенесено у іншу пробірку з 5 мл дист. водою. Розведення проводили до отримання розчину бактерій у співвідношенні 1:10. Із останньої пробірки відбирали краплю отриманої суспензії та переносили фламбованою та охолодженою петлею в чашку Петрі на поверхню твердого поживного середовища LB та засівали густими штрихами від одного краю чашки Петрі до іншого методом виснажуючого штриха. Після посіву чашки Петрі в перевернутому (дном вгору) вигляді поміщали в термостат з температурою 26 – 28°С.

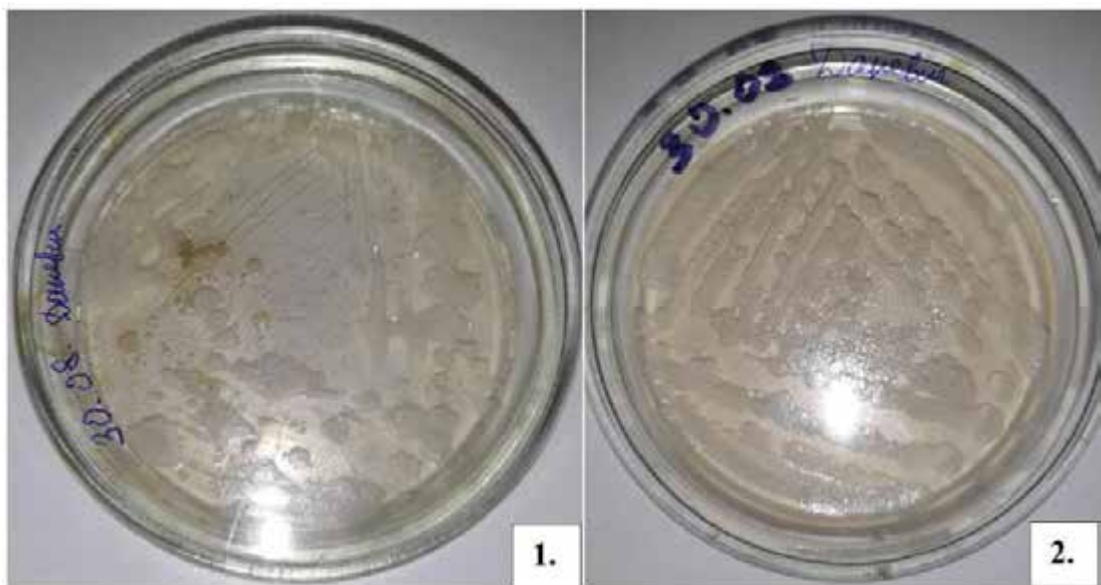


Рис.1.3.1. Отримані перші фітопатогени невідомого походження. 1. В одній чашці представлено декілька культур (жовта, світло-рожева, кремово-біла, біла); 2. Представлена монокультура білого кольору.

За появи бактеріальних колоній (здебільшого через 3 – 4 доби після посіву) діставали та повторно відсаджували колонії бактерій які візуально відрізнялись на чисте середовище для подальшої концентрації та ізоляції колоній.

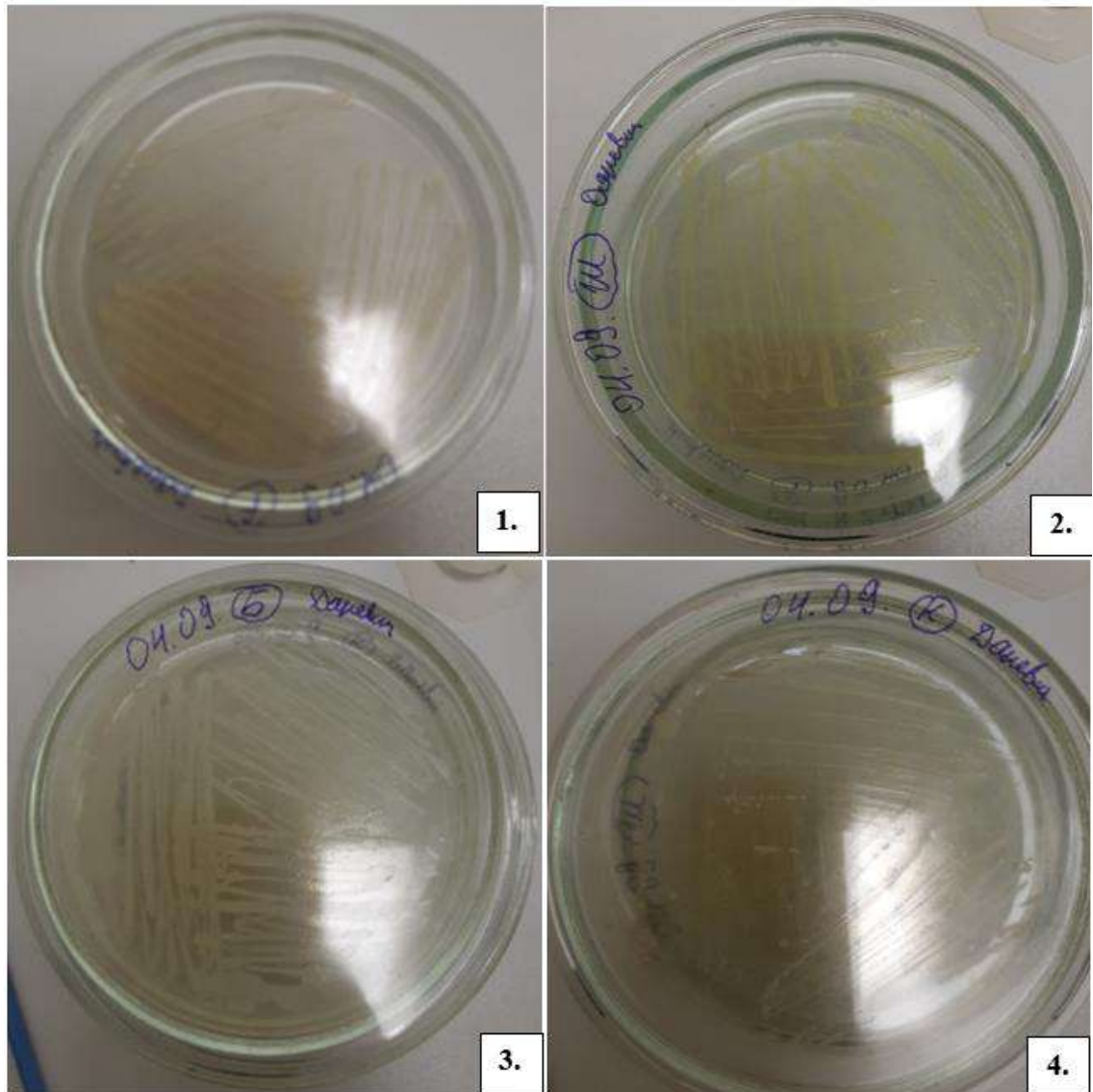


Рис.1.3.2. Отримані після повторного відсажування окремі колонії : 1. ІМА3- світло-рожева; 2. ІМА4- жовта; 3. ІМА2- біла; 4. ІМА1- кремово-біла.

#### 1.4 Визначення патогенних ознак виділених збудників.

Для тестів на патогенність зволоження ґрунту є одним із найпоширеніших методів інокуляції. Зволоження ґрунту або інокуляція коренів часто складається з пошкодження коренів і виливання 30-50 мл бактеріальної суспензії 10<sup>8</sup> КУО/мл (оптична щільність [OD] при довжині хвилі 600 нм = 0,1) близько до крони рослини. Штами зазвичай інокулюють на 3-4-тижневих рослинах (4-5 справжніх листків). Інокульовані рослини зазвичай переміщують або в кімнату для вирощування з 12-годинним циклом світла/темряви з приблизною температурою 30°C або в теплицю[41]. Ін'єкція стебла – ще один поширений метод, який використовується для інокуляції під час тестів на патогенність і зазвичай здійснюється шляхом проколу стебла голкою та введення 100 мкл бактеріальної суспензії (OD = 0,1). Для оцінки тяжкості захворювання зазвичай використовується частота захворювання, але також використовуються інші методи, такі як індекс в'янення [79].

Отже, для визначення патогенності отриманих ізолятів бактерій здорові плоди баклажану було розрізано на невеличкі частини товщиною в 3 см та промивали у проточній водопровідній воді та дезінфікували 70% етанолом протягом 5 хвилин. Протягом ночі бактеріальну культуру, вирощену в бульйоні LB, вводили в частини баклажану за допомогою стерильних шприців об'ємом 1 мл, тоді як в інші - вводили стерильну дистильовану воду в якості негативного контролю. Частини баклажану переносили в поліетиленові пакети і поміщали у вологе середовище при кімнатній температурі на 2-5 днів для розвитку симптомів.

Патогенність ізолятів для цілих здорових бульб також перевіряли шляхом натискання кінчиком піпетки на глибину 1 см, щоб утворилася невелика ранка. Потім рану негайно інокулювали окремими ізолятами і заклеювали вазеліном. Інокульовані бульби поміщали в поліетиленові пакети і зберігали у вологому середовищі при кімнатній температурі протягом 2-5 днів, щоб дати можливість розвинути симптомам [55].



### 1.5 Визначення пектолітичної активності.

Коли бактерії м'якої гнилі потрапляють у рани рослини, вони харчуються та розмножуються спочатку на рідинах, які виділяють пошкоджені клітини на поверхні рани. Там вони виробляють все більшу кількість пектолітичних ферментів, які розщеплюють пектинові речовини середньої пластинки клітини і викликають мацерацію тканин. Для визначення у бактерій такої властивості використовували плоди баклажану. Спочатку плід промивали у проточній і стерильній воді, а потім поверхню стерилізували 96 % спиртом. Після того плід очищували та стерильним скальпелем нарізали скибочки розміром  $15 \times 15 \times 10$  мм і поміщали їх у чашку Петрі. Стерильні паперові диски діаметром 30 мм, виготовлені з фільтрувального паперу, замочували в культурі бактерій з концентрацією  $1 \times 10^8$  КУО на мл на 10 хвилин протягом ночі. Потім замочені диски поміщали на скибочки баклажану та інкубували при трьох різних температурах (20, 25 і  $30^\circ\text{C}$ ) протягом 2-3 днів. В якості контролю використовували стерильну дистильовану воду. Спостереження проводили щодня. Ступінь мацерації оцінювали за дотиком до скибочки петлею. Швидкість мацерації вказувала на активність культури [20].

### 1.6 Реакція гіперчутливості .

Усі бактеріальні штами були перевірені на гіперчутливість на рослинах тютюну (*Nicotina tabacum*). Спочатку рослини тютюну (*Nicotiana tabacum*) вирощували на автоклавованому ґрунті та утримували в теплиці при температурі  $18-22^\circ\text{C}$  з регулярним поливом. Інокулят готували шляхом вирощування бактерій протягом ночі в рідкому поживному середовищі, а потім осаджували шляхом центрифугування. Концентрацію клітинної суспензії доводили до  $\text{OD}_{600} = 0,1$  ( $\sim 10^8$  КУО/мл) за допомогою спектрофотометра. Бактеріальну суспензію ( $10^8$  КУО/мл) готували в стерильній дистильованій воді та інфільтрували в міжреберну ділянку листя рослин тютюну за допомогою шприца на  $3 \text{ см}^3$ . Інокульовані рослини інкубували в повністю випадковому порядку на полиці у культуральній кімнаті 24–48 годин при  $20-28^\circ\text{C}$ . Наявність швидкого

некрозу тканин у місці інокуляції реєстрували протягом 24–48 годин після інфільтрації. Цей тест повторювався принаймні три рази для кожного штаму. Для HR-тестів стерилізовану дистильовану воду (sdH<sub>2</sub>O) використовували як негативний контроль, як позитивний – колекційний штам *Pectobacterium carotovorum*.

### **1.7 Визначення морфолого-культуральних ознак виділених ізолятів бактерій.**

**Морфологічне визначення:** Ізольовані бактерії було охарактеризовано за формою клітин, формою колонії, розміром бактріальних клітин наявністю спор за допомогою виготовлення тимчасових препаратів мікроорганізмів та методу світлової мікроскопії.

**Метод фарбування за Грамом:** Для визначення типу клітинної стінки проводили фарбування за Грамом за наступним протоколом: Фіксований препарат готували з добової культури яку наносили із краплею дист. води на предметне скло та фіксували проводивши над полум'ям пальника 2-3 рази. На фіксований мазок кладуть кусочок фільтрувального паперу, що за розміром відповідає величині предметного скла. На папір наливають розчин генціанового фіолетового (кристалічного фіолетового) на 0,5-2 хв. Забирають папірець з фарбою і, не промиваючи препарату водою, наливають на 1-2 хв. розчин Люголя до повного почорніння мазка. Потім зливають розчин Люголя і прополоскують скельце у відмиваючому розчині (0,5-1 хв.) при похитуванні (до того часу, поки не перестане відходити барвник). Промивають водою і додатково фарбують розчином сафраніну (0,5- 1 хв.). Барвник зливають, препарат промивають водою і висушують.





Рис.1.7.1. Приготування препаратів та фарбування за Грамом у стерильній кімнаті.

Після приготування фарбовані зразки розглядались на світловому мікроскопі під збільшенням  $\times 90$  з використанням імерсійної олії.

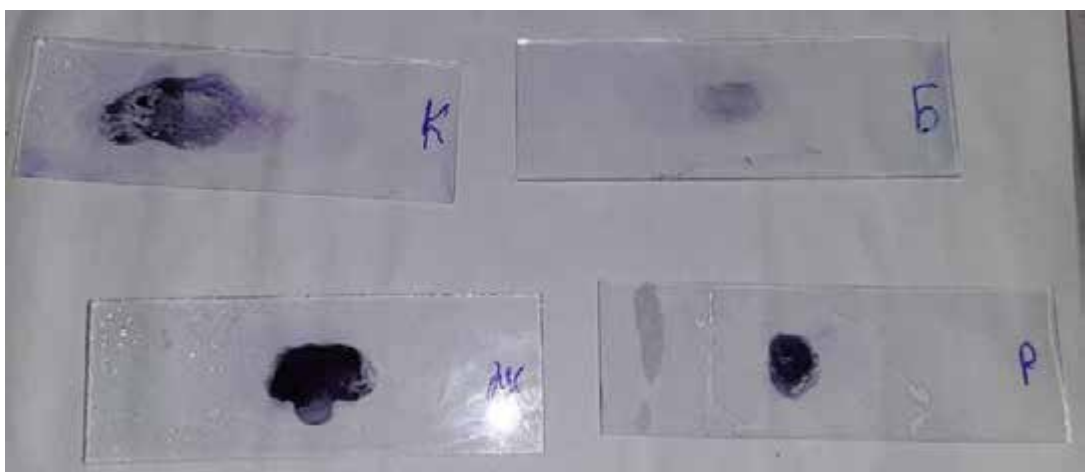


Рис.1.7.2. Отримані препарати після фарбування за Грамом.

**Каталазний тест:** Експеримент потрібно проводити у чашці Петрі. Використовуючи стерильну інокуляційну петлю, ноносили невелику кількість мікроорганізму з добре ізольованої 18–24-годинної колонії та помістили її на предметне скло. Обережно, щоб не зібрати агар. За допомогою піпетки наносили 1 краплю 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на зразок бактерії. Не перемішували. Потім негайно накривали чашку Петрі кришкою, щоб обмежити аерозолі, і спостерігали за негайним утворенням бульбашок (O<sub>2</sub> + вода = бульбашки). Спостереження за утворенням бульбашок на темному тлі покращує читабельність. Позитивні реакції виявляються миттєвим шипінням (утворенням бульбашок) [31].

**Оксидазний тест:** Тест на оксидазу використовується для визначення наявності в організмі ферменту цитохром-с-оксидази. Шматок фільтрувального паперу ватман приблизно 6 см., кладеться в чашку Петрі. Дві-три краплі 1% розчину N,N-диметил-р-фенілендіаміном капають на центр паперу. Колонію бактерій видаляють платиновим стрижнем і ретельно розмазують на фільтрувальному папері, просоченому реагентом, лінією 3-6 мм. довжиною. При позитивній реакції перенесена колонія забарвлюється в темно-фіолетовий колір через 5-10 с., якщо протягом трьох хвилин зміна кольору не відбувалась, реакція негативна [45].

**КОН тест:** Метою тесту на гідроксид калію (тест КОН) є ідентифікація грамнегативних бактерій. КОН розчиняє тонкий шар пептидоглікану клітинних стінок грамнегативних бактерій, але не впливає на стінки грампозитивних клітин. Тест КОН String Test базується на диференціальній стійкості до 3% гідроксиду калію між грампозитивними та негативними клітинами, де частина колонії змішується з невеликим об'ємом 3% КОН. Якщо клітини лізують, звільнена клітинна ДНК робить суміш в'язкою або «тягнутою». Позитивний тест вказує на грамнегативний мікроорганізм. Тому альтернативна назва тесту – «String Test». Петлю з колонією мікроорганізму емульгували на поверхні предметного скла в суспензії 3% КОН. Суспензію безперервно перемішували протягом 60 секунд, після чого петлю обережно витягували із суспензії. Тест

вважався позитивним, якщо утворення густої суспензії та мукоїдної нитки при піднятті петлі відбувалося протягом перших 30 секунд після змішування бактерій у розчині КОН [6].

**Тест на кислотоутворення (MR-тест):** Тест метилового червоного (MR) використовується для визначення того, чи може організм виробляти стабільні кислотні кінцеві продукти ферментації глюкози (1). MR-індикатор (червоний колір нижче рН 4,4; жовтий колір при рН 5,8) використовується для визначення рН після того, як ентєральна грамнегативна паличка завершила ферментацію глюкози. Використовують культури, що виростили на середовищі Кларка (пептон - 5 г/л;  $K_2HPO_4$  - 5 г/л; глюкоза – 5 г/л; вода дистильована; рН 7,0). У пробірки вносять по 2-3 краплі спиртового розчину індикатора метилового червоного. Вміст перемішували та відзначали зміну забарвлення. Якщо забарвлення червоне або яскраво рожеве, то значення рН коливається в межах 2,5-5,0; світло-рожеве або помаранчеве — рН 5,2-5,5; жовте або жовтогаряче — рН 6,0-7,0 [50].

**Тест на чутливість до еритроміцину та спектиноміцину:** Чутливість до антибіотиків розглядається як чутливість актинобактерій до антибіотиків. Ізоляти *Actinobacteria* вважаються чутливими (S), проміжними (I) або стійкими (R) до антибіотиків. Метод Кірбі-Бауєра часто використовується для визначення чутливості до антибіотиків (АСТ). Ізоляти бактерій висівали на відповідні чашки з агаром та інкубували при 28°C протягом 7–8 днів для росту. Стандартні антибіотичні диски поміщали на чашку та інкубували при  $28 \pm 2^\circ C$  протягом 24 годин. Чутливість до антибіотиків визначали шляхом вимірювання діаметрів зон інгібування навколо диска. Ефективність антибіотика залежить від розміру цієї зони і того, як вона пригнічує ріст або загибель мікроба. Більш сильний антибіотик створить більшу зону, а саме : до 15 мм – слабо чутливий; 15–24 мм – чутливий; 25 мм і більше – високочутливий. За умови відсутності зони пригнічення росту мікроорганізм вважали нечутливим до даного антибактеріального засобу [5].

**Тест на утворення гідроген сульфїду:** Деякі бактерії та археї можуть метаболічно відновлювати сірковмісні сполуки до сірководню та отримувати

енергію під час цього процесу. Ці сірковмісні сполуки можуть бути неорганічними сполуками, такими як сульфат, сульфід, тіосульфат або тетратіонати, або, можливо, органічними сірковмісними сполуками, такими як сірчані амінокислоти та білки, або навіть сама елементарна сірка. Сірка з цих сполук ферментативно відновлюється та вивільняється у вигляді сірководню ( $H_2S$ ). Тести можна проводити з використанням будь-якого середовища, доступного для цієї мети, а саме Кліглерового залізного агару (KIA), потрійного цукрового заліза (TSI), середовища SIM та свинцевого ацетатного паперу. Залізні агари придатні для виявлення продукції  $H_2S$  Enterobacter. На його наявність вказує доданий у середовище цитрат заліза. Середовище рухливості сульфідного індолу (SIM) складається з сульфату двовалентного амонію та тіосульфату натрію, які разом служать індикаторами  $H_2S$ . Утворення цього газу виявляється за допомогою чорного осаду сульфиду заліза, який утворюється в результаті реакції сульфату заліза амонію з газом  $H_2S$ . Тест на папері з ацетатом свинцю є чутливою технікою для виявлення утворення  $H_2S$ . Склад середовища SIM для 1000 мл дистильованої води: пептон (30,0 г), екстракт яловичини (3,0 г), агар (3,0 г), сульфат двовалентного амонію (0,2 г), тіосульфат натрію (0,025 г). Кінцевий РН середовища повинен підтримуватися на рівні  $7,3 \pm 0,2$  (при  $25^\circ C$ ). Подібним чином, тестове середовище з ацетату свинцю складається з дріжджових екстрактів (5,0 г), фосфату калію, фосфату амонію, сульфату магнію (0,5 г кожного), хлориду натрію (0,2 г), гідрохлориду цистеїну (0,1 г). Після засіву рідкого середовища, на пробірки підвішують смужки, просочені ацетатом свинцю. Готують смужки та просочують їх аналогічно індикаторним смужкам на індол, при цьому розчином для просочення служить 20% водний розчин ацетату свинцю з додаванням 1 г гідрокарбонату натрію або 2 мл крижаної оцтової кислоти. Просочування проводять 10-15 хв. Посіви інкубують у термостаті при  $37^\circ C$  протягом 18-48 год. Приготовлені смужки безбарвні. При утворенні у середовищі сірководню смужки починають чорніти або буріти, починаючи з нижнього краю. У такому разі реакцію на сірководень вважають позитивною [73].

**Тест на гідроліз желатину:** Тест на гідроліз желатину виявляє здатність бактерій виробляти желатинази. Цей тест допомагає ідентифікувати *Serratia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* і *Clostridium*. Він відрізняє желатиназо-позитивний, патогенний *Staphylococcus aureus* від желатиназо-негативного, непатогенного *Staphylococcus epidermidis*. Грампозитивні, спороутворюючі, паличкоподібні аеробні або анаеробні бактерії, такі як *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Clostridium perfringens* і *C. tetani*, також позитивно впливають на гідроліз желатину. Тест можна використовувати для диференціації родів бактерій, що продукують желатиназу, таких як *Serratia* та *Proteus*, від інших представників родини *Enterobacteriaceae*.

У дослідженні було використано метод живильної желатинової пластинки. У цьому методі важкий інокулят досліджуваних бактерій від 18 до 24 годин посівають на культуральні чашки, попередньо заповнені поживним желатином (23 г/літр поживного агару, 8 г/літр желатину). Планшети з інокульованим поживним желатином інкубували при 35°C протягом 24 годин. На гідроліз желатину вказують чіткі зони навколо желатиназопозитивних колоній. У деяких випадках пластини заливають насиченим сульфатом амонію для осадження негідролізованого желатину, Позитивний гідроліз желатину, про який свідчить прозора зона навколо колонії після додавання насиченого сульфату амонію. Негативний гідроліз желатину, про що свідчить відсутність чіткої зони навколо колонії [74].

### **1.8 Виділення ДНК та молекулярно-генетичний аналіз виділених ізолятів.**

Основні «стандартні» процедури ізоляції бактеріальної ДНК базуються на розщепленні клітинної стінки лізоцимом, лізисі детергентів, руйнуванні комплексів білок-нуклеїнова кислота та екстракції фенол:хлороформ для видалення білків.

Розчини які використовувалися для виділення ДНК:

- Хлороформ: ізоаміловий спирт (24:1)
- Фенол/хлороформ: ізоаміловий спирт (1:1 об./об.)

- СТАВ/NaCl: змішували 10% гексадецилтриметиламоній броміду та 5M NaCl 5M (1:1). Зберігали при кімнатній температурі.

- РНКаза (10 мг/мл): розчинили 100 мг РНКази в 10 мл стерильної дистильованої води та інкубували при 90 °C протягом 10 хвилин, щоб інактивувати ДНК. Зберігати при -20 °C до використання.

- Протеїназа К (20 мг/мл): розчинили 100 мг протеїнази К у 5 мл стерильної дистильованої води. Зберігали при -20 °C.

- TE (pH 8,0): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA. Автоклавували та зберігали при кімнатній температурі.

- 10% SDS (w/v): Розчиніть 10 г SDS у 100 мл дистильованої води. Зберігали при кімнатній температурі.

- 5M NaCl: розчинили 292,2 г NaCl в кінцевому об'ємі 1 літр. Автоклав.

- Молекулярно-біологічна вода, автоклавована

Процедура виділення бактеріальної ДНК:

1. Ресуспендуйте петлю колоній з чашки з культуральним агаром у 500 мкл TE та повністю розчиніть.

2. Додайте 30 мкл 10% SDS. Добре перемішати.

3. Додайте 3 мкл протеїнази К (20 мг/мл). Інкубуйте при 37 °C протягом 60 хвилин.

4. Додайте спочатку 100 мкл 5M NaCl, добре перемішайте, а потім 80 мкл СТАВ/NaCl. Перемішайте, перевертаючи пробірку (обережно нахиляючи) та інкубуйте при 65°C протягом 10 хв.

5. До розчину додайте рівний об'єм фенол/хлороформ:ізоаміловий спирт (25/24:1), перемішайте до емульгування та обертайте протягом 5 хвилин при 8000 об/хв. Прокачайте верхній шар у нову пробірку.

6. Повторіть крок 5

7. Додайте РНКазу до кінцевої концентрації 50 мкг/мл та інкубуйте протягом 30 хвилин при 37 °C

8. Повторіть крок 5



9. Осадить ДНК, додавши 1/10 об. 5М NaCl і 2 об'єми 100% холодного етанолу та витримуйте при -20°C о/н або при -80°C протягом 60 хвилин.
10. Віджимайте при 12 000 об/хв протягом 20 хвилин.
11. Видалить супернатант.
12. Промийте, додавши 70% етанол з наступним центрифугуванням, як у кроці 10. Повністю висушіть.
13. Повторно розчиніть у 50-200 мкл TE та зберігайте при -20 °C

Виділену ДНК було використано для проведення полімеразно ланцюгової реакції для підтвердження видової приналежності виділених ізолятів. Для ампліфікації ділянки *hrpB* ізолюваного бактеріального штаму були розроблені праймери відповідно до Poussier et al. [62], які використовували прямий праймер RShrpBf (50-TGCCATGCTGGGAAACATCT-30) і зворотний праймер RShrpBr (50GGGGGCTTCGTTGAACTGC-30) для ПЛР-ампліфікації гена *hrpB*. ПЛР проводили в пробірці для ПЛР на 0,2 мл у загальних об'ємах 25 мкл; містить 1,5 мкл геномної ДНК, 1 мкл обох праймерів, 1 мкл суміші dNTPs, 2,5 мкл MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл буфера B та 0,5 мкл 5U Taq полімерази. ПЛР-реакції проводили в термоциклері (Eppendorf AG, 22331 Гамбург, Німеччина), запрограмованому на початкову стадію денатурації 95 °C протягом 5 хвилин, потім 10 циклів при 95 °C протягом 30 секунд, 64 °C протягом 30 секунд, 68 °C протягом 2 хвилин. Останні 20 циклів були такими ж, як і перші 10, за винятком того, що додаткові 20 с додавали до етапу подовження для кожного нового циклу та останнього етапу подовження при 68 °C протягом 7 хвилин. Після цього кінцеві ампліфіковані продукти аналізували та візуалізували в 1,0% агарозних гелях, що містять 0,5 мкг/мл броміду етидію.

Отримані продукти ампліфікації було розділено за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі в буфері трис-ацетат-ЕДТА (ТАЕ), забарвленому бромідом етидію (0,5 мкг/мл).

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1 Визначення патогенності виділених ізолятів бактерій.

Після виділення бактеріальних патогенів із інфікованих рослин баклажану було отримано 4 варіанти невідомих культур, названі відповідно : ІМА1, ІМА2, ІМА3, ІМА4. Як повідомлялося раніше були проведені дослідження на патогенність, пектолітичну дію та індукцію реакції надчутливості результати яких обговорюватимуться у цьому розділі.

**Тест на патогенність:** У 2 з 4 виділених бактеріальних культур (ІМА1, ІМА3) спричинювали розвиток захворювань на розрізаних частинках, при цьому розвиток симптомів спостерігався протягом 5 днів після зараження. Було виявлено круглі плями, змочені водою, які збільшувалися у вологих умовах, що свідчило про поширення патогену, який з часом спричиняв загнивання плоду.

**Тест на пектолітичну активність:** У 2 з 4 ізолятів (ІМА1, ІМА3) спричинювали мацерацію тканини на шматочках баклажану. На більшості скибочок спостерігався набряк навколо дисків, який поєднувався з чорним забарвленням на деяких з них. У вологих умовах розм'якшення тканин поширювалося від місця посіву до краю зрізу, що супроводжувалося сильним неприємним запахом.

**Тест на гіперчутливість:** Результати інфільтрації листя тютюну різними ізолятами показали, що ізоляти ІМА1, ІМА3 викликають некроз, який з'являється через 48-72 години після інфільтрації, ізоляти індукували виразну жовту зону на краї поширення ураження. Поразка поступово ставала темнішою, а жовтий ореол, що оточував темну центральну область, ставав помітнішим через 48 годин. У той час як решта ізолятів показали колапс інфільтрованої області. Листя тютюну, інфільтровані стерильною водою, не показали реакції.

Значний відсоток збудників хвороб рослин є біотрофами, яким потрібні сполуки з живих клітин-господарів. Розпізнавання атаки патогена запускає реакцію гіперчутливості (HR) у рослині, яка включає утворення реактивних проміжних продуктів кисню (ROI) і локальну загибель клітин [36]. HR вважається одним із найважливіших факторів у перешкоджанні росту



біотрофних патогенів [33]. HR - це швидко локалізована активна смерть рослинних клітин у контакті з потенційно патогенними бактеріями, пов'язана з неспроможністю цих бактерій продовжувати розмножуватися або викликати симптоми захворювання. Цей процес регулюють гени *hrp*. Наявність генів *hrp* є характерною рисою фітопатогенних *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* і *Ralstonia spp.* Гени *hrp*, які переносяться цими бактеріями, названі так, тому що мутації в них можуть скасувати два важливі бактеріальні фенотипи, пов'язані з рослинами: виклик гіперчутливої відповіді (HR) у нехазяїв і патогенність у господарів [35]. Здатність досліджуваних ізолятів індукувати реакцію надчутливості (HR) можна пояснити наявністю в їхньому геномі генів *hrp*.

Отже, за результатами проведених досліджень на патогенність пектолітичну активність та прояв реакції надчутливості можна зробити висновки що ізоляти бактерій ІМА1, ІМА3 проявляють ознаки патогенності, зокрема, спричиняють розвиток бактеріальних хвороб на штучно інфікованих бульбах картоплі, виявляють пектолітичну активність на шматочках баклажану, а також спричиняють прояв реакції надчутливості у рослин тютюну після їх інокулювання суспензіями досліджуваних ізолятів бактерій.

### **3.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічна характеристика бактеріальних ізолятів.**

**Морфологічна характеристика:** Чотири препарати ізолятів збудника бактеріальних захворювань були фарбовані за Грамом та розглянуті під світловим мікроскопом із імерсійним збільшенням. Результат опису колоній та клітин бактерій представлено нижче.

**Ізолят ІМА1:** Спостерігаючи за клітинами ізоляту під світловим мікроскопом клітини є прямими паличкоподібними, короткими. Виділені бактерії мали рожевий колір у реакції фарбування за Грамом під світловим мікроскопом при 100-кратному збільшенні, підтверджуючи, що вони були грамнегативними. Характеристика колонії на агарозному середовищі: кругла

форма, середній розмір, опукла, глянцева поверхня, цілий край колонії, кремово-білий колір, напівпрозора, помірний ступінь росту.

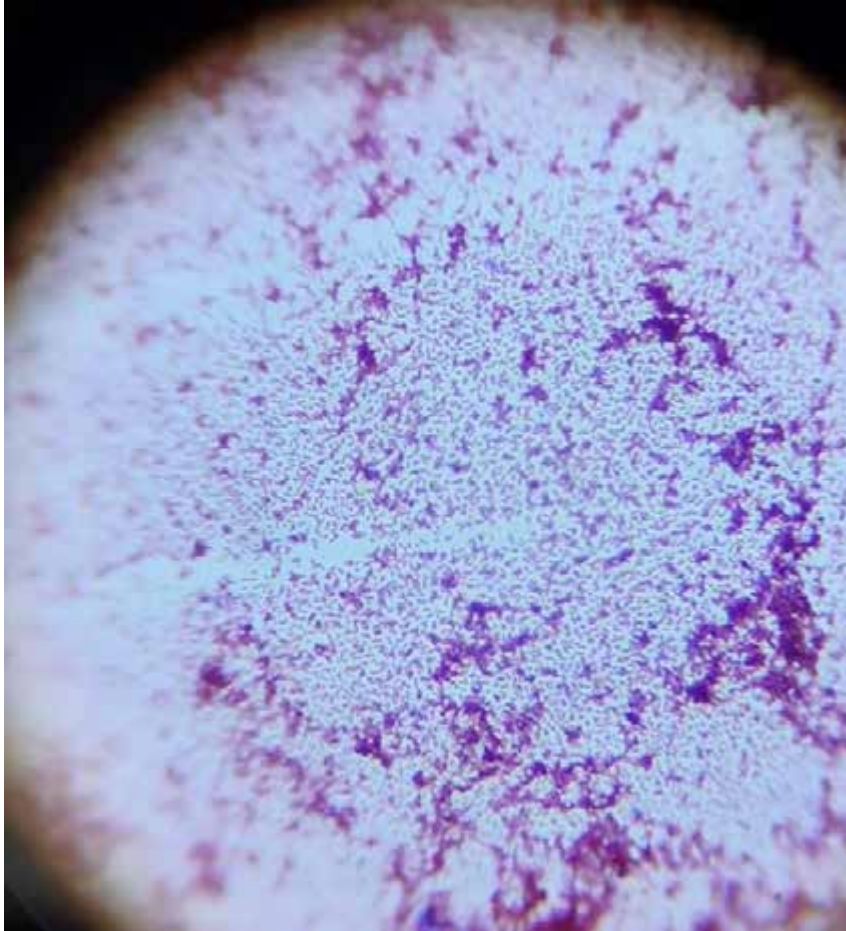


Рис.3.2.1. Фото клітин бактерій ізоляту ІМА1 у збільшенні 90х10

**Ізолят ІМА2:** Клітини бактерій під світловим мікроскопом мали сферичну форму, скупчені у згустки, мають фіолетове забарвлення у фарбуванні за Грамом, отже є грампозитивними бактеріями. Характеристика колонії на агарозному середовищі: кругла форма, середній розмір, опукла, глянцева поверхня, цілий край колонії, білий колір, напівпрозора, рясний ступінь росту.

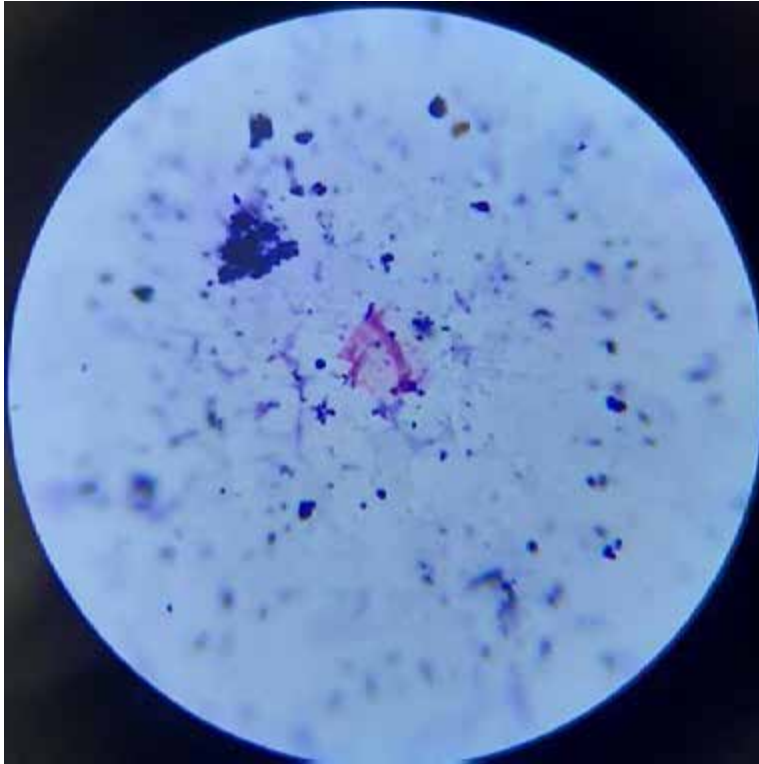


Рис.3.2.2. Фото клітин бактерій ізоляту ІМА2 у збільшенні 90х10

**Ізолят ІМА3:** Бактеріальні клітини під світловим мікроскопом є прямими паличкоподібними, короткими. Виділені бактерії мали рожевий колір у реакції фарбування за Грамом, підтверджуючи, що вони були грамнегативними. Характеристика колонії на агарозному середовищі: кругла форма, середній розмір, опукла, глянцева поверхня, цілий край колонії, світло-рожевий колір, непрозора, рясний ступінь росту.

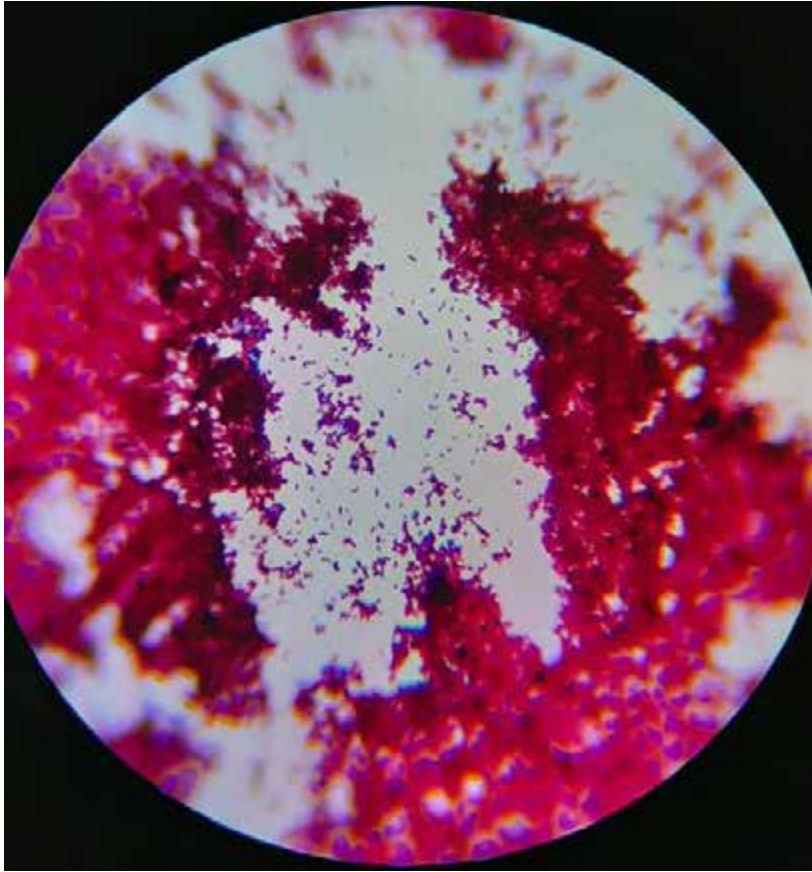


Рис.3.2.3. Фото клітин бактерій ізоляту ІМА3 у збільшенні 90x10

**Ізолят ІМА4:** Бактеріальні клітини під світловим мікроскопом є прямими паличкоподібними, короткими. Виділені бактерії мали філетовий колір у реакції фарбування за Грамом, підтверджуючи, що вони були грампозитивними. Характеристика колонії на агарозному середовищі: кругла форма, середній розмір, опукла, глянцева поверхня, цілий край колонії, жовтий, непрозора, рясний ступінь росту.



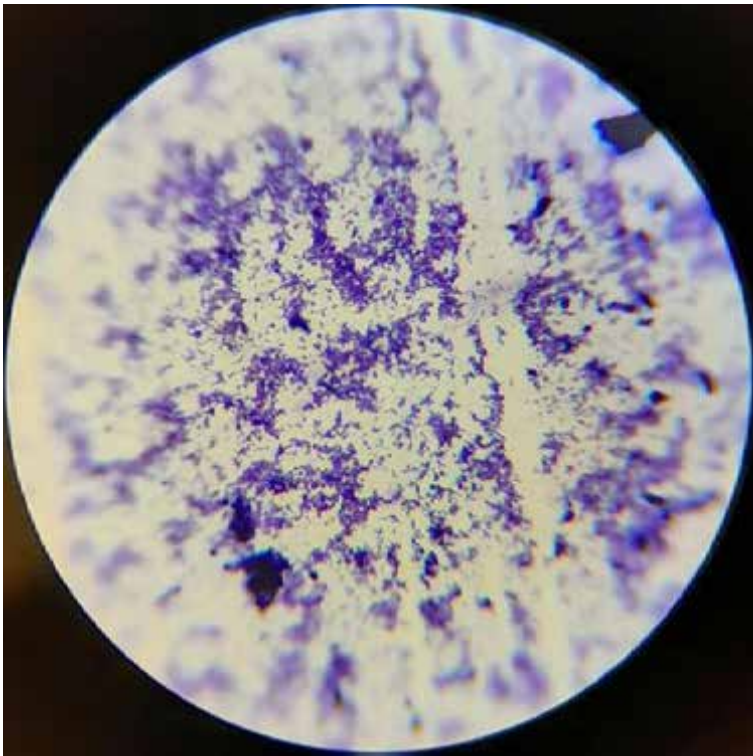


Рис.3.2.4. Фото клітин бактерій ізоляту ІМА4 у збільшенні 90х10

Виходячи із попередніх досліджень на патогенність та пектолітичну дію ізоляти ІМА1 та ІМА3 то подальші дослідження із біохімічними показниками проводилися тільки з ними. Результати досліджень описані нижче

**Біохімічна характеристика:** бактеріальні ізоляти ІМА1 та ІМА3 утворювала в'язкий матеріал, схожий на струну, на предметному склі під час тесту КОН, тож це додатково підтвердило його грамнегативність. У тесті SIM спостерігалось індольне кільце, чорне осадження рухливості H<sub>2</sub>S також ізоляти змінили колір із жовтого на червоний у тесті з метиловим червоним. Виділені ізоляти був здатні виробляти темно-синє забарвлення з реактивом Ковача, що вказувало на те, що бактерії були позитивними за тестом на оксидазу Ковача. Ізоляти показали позитивну реакцію на каталазний та тести через утворення бульбашок повітря та яскраво-рожевого забарвлення при інокуляції на середовище відповідно. Дослідження Mohamed et al. [68]. З *Ralstonia solanacearum* дають ті самі характеристики для патогену.

Тести на стійкість до антибіотиків показали, що навколо паперового диска зі стрептоміцином спостерігалась зона пригнічення, на паперовому диску з еритроміцином така зона була але менша чутливість, і виявили, що ізоляти були

більш стійкими до еритроміцину і високо чутливими до антибіотика стрептоміцину. У дослідженнях із ізолятами *R. solanacearum*. Verma et al. [76]. стрептоміцин також продемонстрував антибактеріальну ефективність і інгібував >50% КУО, в той час як еритроміцин інгібував >30% КУО.

Ґрунтуючись на наших висновках щодо морфологічних і біохімічних характеристик, ми припустили, що ізольованою бактерією є *R. solanacearum*.

Таблиця 3.2.1

**Фізіолого-біохімічні характеристики отриманих бактеріальних ізолятів**

	Фізіолого-біохімічний тест	ІМА	ІМА	ІМА	ІМА
		1	2	3	4
.	Забарвлення за Грамом	рожеве грамнегативна	фіолетово-грампозитивне	рожеве грамнегативна	фіолетово-грампозитивне
.	Утворення H <sub>2</sub> S	+	+	+	+
.	Каталазний тест	+	-	+	-
.	Оксидазний тест	+	-	+	-
.	КОН тест	+	-	+	-
.	Гідроліз желатину	-	-	+	-
.	Пектолітична активність	+	-	+	-
.	Тест на кислотоутворення (MR-тест)	+	-	+	-

.	Чутливість до еритроміцину	+	-	+	+
0.	Чутливість до стрептоміцину	+	-	+	-

Отже, 2 з 4 досліджуваних ізолятів формували рожево-білі та кремово-білі опуклі колонії, є грамнегативними та проявляють позитивні реакції на метиловий червоний, виділення газу  $H_2S$ , гідроліз желатину, тест на каталазу, тест на КОН і тест на пектолітичну активність та негативну на реакцію за Грамом, проявили меншу чутливість до еритроміцину та більшу до стрептоміцину. Такі результати дають можливість припустити, що ізоляти ІМА1 та ІМА3 належать до фітопатогенів роду *Ralstonia*.

### 3.3 Молекулярно-генетичний аналіз виділених збудників.

Попередні дослідження виділених ізолятів на патогенність, пектолітичну активність, здатність викликати реакцію надчутливості у рослин тютюну, а також вивчення їх морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних особливостей, дало можливість припустити, що 2 з 4 отриманих нами бактерії належать до роду *Ralstonia*.

Для визначення видової приналежності виділених ізолятів було проведено полімеразно ланцюгову реакцію на наявність послідовності гена *hrpB*. Повідомляється, що гени *hrp*, що кодують апарат секреції III типу, є ключовими детермінантами патогенності судинної фітопатогенної бактерії *Ralstonia solanacearum* [75].

У нашому дослідженні послідовність гена *hrpB* була ампліфікована за допомогою ПЛР-реакції з геномної ДНК *R. solanacearum*, викликаної хворобою в'янення баклажану, з використанням праймера, специфічного для гена *hrpB*. Успішна ПЛР-ампліфікація дала прозору смугу послідовності гена *hrpB* довжиною приблизно 1500 bp під час електрофорезу в агарозному гелі.

Таким чином, за результатами ампліфікації ДНК зі специфічними праймерами для послідовності гена *hrpB*. можна стверджувати, що отримані ізоляти бактерій належать до роду *Ralstonia*.



## ВИСНОВКИ

1. Показано, що досліджувані ізоляти бактерій ІМА1 та ІМА3, виділені з інфікованих зразків баклажану, проявляють ознаки патогенності, зокрема, спричинюють розвиток бактеріальних хвороб на штучно інфікованих плодах баклажану, виявляють пектолітичну активність на скибочках баклажану, досягаючи високого ступеня при інкубуванні при температурі 25 та 30°C, а також спричинюють прояв реакції надчутливості у рослин тютюну після їх інокулювання суспензіями досліджуваних ізолятів бактерій. Ізолят ІМА2 та ІМА2 не проявили ознак патогенності, отже не може належати до шуканих збудників бактеріозів *Solanum solanacearum*.

2. Визначено, що ізоляти ІМА1 та ІМА3 формували рожево-білі та кремово-білі опуклі колонії, є грамнегативними та проявляли позитивні реакції на метиловий червоний, ріст при 36-37°C, виділення газу H<sub>2</sub>S, гідроліз желатину, тест на каталазу, тест на КОН і тест на пектолітичну активність та негативну на реакцію за Грамом, проявили низьку чутливість до еритроміцину та високу чутливість до стрептоміцину. Такі результати дають можливість припустити, що дані ізоляти належать до фітопатогенів роду *Solanum*.

3. Виявлено, що за результатами ампліфікації ДНК зі специфічними праймерами для послідовності гена *hrpB* отримані ізоляти бактерій ІМА1 та ІМА3 належать до роду *Solanum*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Agrios G.N, chapter two - PARASITISM AND DISEASE DEVELOPMENT, Editor(s): GEORGE N. AGRIOS, Plant Pathology (Fifth Edition), Academic Press, 2005, Pages 77-104, ISBN 9780120445653, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50008-7>.
2. Agrios G.N., Plant Pathogens and Disease: General Introduction, Editor(s): Moselio Schaechter, Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), Academic Press, 2009, Pages 613-646, ISBN 9780123739445, <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00344-8>.)
3. Alemu K (2014). Real-time PCR and its application in plant disease diagnostics. *Advances in Life Science and Technology* 27:29-49.
4. Alfano, J.R., Collmer, A., 1997. The Type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria: Trafficking harpins, Avr Proteins, and Death. *J. Bacteriol.* 179 (18), 5655-5662
5. Amaresan N., M. Senthil Kumar, K. Annapurna, Krishna Kumar, A. Sankaranarayanan, *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, Academic Press, 2020, Pages 443-476, ISBN 9780128234143, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00021-6>.
6. Arth K , B Appalaraju, S Parvathi, VANCOMYCIN SENSITIVITY AND KOH STRING TEST AS AN ALTERNATIVE TO GRAM STAINING OF BACTERIA, *Indian Journal of Medical Microbiology*, Volume 21, Issue 2, 2003, Pages 121-123, ISSN 0255-0857, [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)03135-2](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)03135-2).
7. Balodi, Rekha & Bisht, Sunaina & Ghatak, Abhijeet & Rao, K.H.. (2017). Plant Disease Diagnosis: Technological Advancements and Challenges. *Indian Phytopathology*. 70. 275-281. [10.24838/ip.2017.v70.i3.72487](https://doi.org/10.24838/ip.2017.v70.i3.72487).
8. Barghoutti S. A. (2011). A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. *Indian J Microbiol.* 51(4): 430- 444..

9. Bar-On, Y.M., Phillips, R., Milo, R., 2018. The biomass distribution on earth. PNAS 115 (25), 6506-6511.
10. Bergmans L., Moisiadis P., Van Meerbeek B., Quiryne M., Lambrecht P. (2005). Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. Int. Endod. J. 38: 775-788.
11. Bhore S. J., Nythia R, Loh C. Y. (2010). Screening of endophytic bacteria G isolated from leaves of sambung nyawa [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokininlike compounds. Bioinformation 5(5): 191-197.)
12. Breakwell DP, Moyes RB, Reynolds J. Differential staining of bacteria: flagella stain. Curr Protoc Microbiol. 2009 Nov; Appendix 3: Appendix 3G. doi: 10.1002/9780471729259.mca03gs15. PMID: 19885934
13. Cabeen M. T., Jacobs-Wagner C. (2005). Bacterial cell shape. Nat. Rev. Microbiol. 3(8): 601-610.
14. Call D.R. Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays. Critical Rev. Microbiol 31: 91-99. | Keer, J.T. & Birc ch, L. 2003. Molecular methods for assessment of bacterial viability. J. Microbiol. Methods 53: 175-183
15. Cambray G. (2006). Basic and applied microbiology. Eds., Cloete TE, Atlas RM Van Schaik Publishers.
16. Chanama S (1999). Comparative 16S rRNA sequence analysis. Warasan Wichai Witthayasat Kanphaet 13: 107-117.
17. Chen N.C. et al. Suggested Cultural Practices for Eggplant. Last update 2002. Asian Vegetable Research and Development Center AVRDC Learning Center. Publications and Fact Sheets on Eggplant. <http://www.avrdc.org/LC/eggplant/publications.html> February 8, 2005
18. Christopher K, Bruno E (2003). Identification of bacterial species. In Tested studies for laboratory teaching. Ed., O'Donnell MA. Proceedings of the 24th Workshop / Conference of the Association for Biology Laboratory Education 24: 103-130.

19. Clark MF (1981). Immunosorbent assays in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19: 83-106.
20. Dadaşođlu, Fatih & Kotan, R.. (2017). Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum*. *Journal of Animal and Plant Sciences.* 27. 647-654.
21. Danks C and Baker I (2000). On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. *EPPO Bull.* 30: 421-426.
22. Daunay, M.-C., 2008. Eggplant. *Vegetables II Handbook of Plant Breeding.* Springer, New York, NY, pp. 163–220. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74110-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74110-9_5)
23. Davis CL, Brlansky RH (1991). Use of Immunogold Labelling with Scanning Electron Microscopy To Identify Phytopathogenic Bacteria on Leaf Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(10): 3052-3055.
24. De Candolle, A., *Origin of Cultivated Plants*, 1986.
25. EPPO Global Database. A1 list. URL: [https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A1\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A1_list)
26. EPPO Global Database. A2 list. URL: [https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A2\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list)
27. EPPO Global Database. *Clavibacter michiganensis*. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution>
28. EPPO Global Database. Distribution List for *Pseudomonas syringae* pv. URL: <https://gd.eppo.int/reporting/article-4638>
29. Eren AM, Ferris MJ, Taylor CM (2011). A framework for analysis of metagenomic sequencing data. *Pac. Symp. Biocomput.* 131-141.
30. Fogel GB, Collins CR, Li J, Brunk CF (1999). Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.* 38: 93-113.
31. Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2007) *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th Edition, Mosby Elsevier, China, 842-855.

32. Gazolla V., Camila & Lisboa, Bruno & Granada, Camille & São José, Jackson & Oliveira, Andreia & Beneduzi, Anelise & Perevalova, Yelena & Passaglia, Luciane & Vargas, Luciano. (2019). Rhizobia for Biological Control of Plant Diseases. 10.1007/978-981-13-8495-0\_14.
33. Gilchrist D.G Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide *Annu Rev Phytopathol*, 36 (1998), pp. 393-414| P Piffanelli, A Devoto, P Schulze-Lefert Defence signalling pathways in cereals *Curr Opin Plant Biol*, 2 (1999), pp. 295-300
34. Global Database. Distribution List for *Pseudomonas syringae* pv. URL: <https://gd.eppo.int/reporting/article-4638>
35. Govrin Eri M, Alex Levine, The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*, *Current Biology*, Volume 10, Issue 13, 2000, Pages 751-757, ISSN 0960-9822, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00560-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00560-1)
36. Greenberg J.T Programmed cell death in plant-pathogen interactions *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48 (1997), pp. 525-545| S.W Hutcheson Current concepts of active defense in plants *Annu Rev Phytopathol*, 36 (1998), pp. 59-90
37. He W., Luo W., Zhou J., Zhu X., Xu J. *Pectobacterium carotovorum* Subsp. *Brasilense* Causing Soft Rot in Eggplant in Xinjiang, China. *Microorganisms*. 2023; 11(11):2662. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112662>
38. Hedrick, U. P., Sturtevant's notes on edible plants, N. Y. Dept. Agric. Ann. Rep. 27, 212, pp. 685, 1919.
39. Henson JM, French R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu Rev Phytopathol*. 1993;31:81-109. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.000501. PMID: 18643762
40. Hiremath PS, Bannigidad P, Yelgond SS (2013). An Improved Automated Method for Identification of Bacterial Cell Morphological Characteristics. *International Journal of Advanced Trends in Computer Science and Engineering*, Vol. 2, No. 1: 11-16.

41. Hong, J. C., Norman, D. J., Reed, D. L., Momol, M. T., and Jones, J. B. 2012. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. *Phytopathology* 102:924-936. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0342>
42. Janda JM, Abbot SL (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.*, 45(9): 2761- 2764.
43. Kenzaka T, Tani K (2012). Scanning Electron Microscopy Imaging of Bacteria Based on Nucleic Acid Sequences, *Scanning Electron Microscopy*, Dr. Viacheslav Kazmiruk (Ed.), ISBN: 978-953-51- 0092- 8
44. Kolomiets, Y.V. & Butsenko, Liudmyla. (2021). Analysis of methods of diagnosis of bacterial diseases of tomatoes in Ukraine. *Biological Systems: Theory and Innovation*. 12. 10.31548/biologiya2021.01.002.
45. Kovacs N. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. *Nature*. 1956. Vol. 178, № 4535. P. 703.
46. Kumrapich B, Klayraung S, Wongkattiya N, Topoonyanont N (2011). Diversity of bacteria isolated from leaves and stems of sugarcane (*Saccharum* sp. Var. LK9211). 37th Congress on Science and Technology of Thailand.
47. López MM, Llop P, Cubero J, Penyalver R, Caruso P, Bertolini E, Penyalver J, Gorris MT and Cambra M (2001). Strategies for improving serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. *Plant Pathogenic Bacteria*; Springer: Berlin, Germany, pp. 83-86.
48. Lyons, N. & Taylor, J.. (2007). Serological detection of and identification of bacteria from plants using a *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *Plant Pathology*. 39. 584 - 590. 10.1111/j.1365-3059.1990.tb02537.x
49. Malorny, B., Tassios, P.T., Rådström, Cook, N., Wagner, M. & Hoorfar, J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int.J. Food Microbiol.* 83:39-48.
50. McDevitt S. Methyl red and voges-proskauer test protocols. American Society for Microbiology. 2009.

51. Mesterházy Á, Lemmens M and Reid LM (2012). Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize - a review. *Plant Breed.* 131: 1-19.
52. Mizrahi-Man O, Davenport ER, Gilad Y (2013). Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS ONE* 8(1).
53. Murillo-Williams A and Munkvold GP (2008). Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three temperature regimes. *Pl. Dis.* 92: 1695-1700
54. Mutka, Andrew & Bart, Rebecca. (2015). Image-based phenotyping of plant disease symptoms. *Frontiers in Plant Science.* 5. 734. 10.3389/fpls.2014.00734.
55. Muturi P. et al. Isolation and characterization of pectolytic bacterial pathogens infecting potatoes in Nakuru County, Kenya // *Journal of Applied Microbiology.* 2018. Vol. 124, № 6. P. 1580-1588.
56. Muzzamal H, Sarwar R, Sajid I, Hasnain S (2012). Isolation, identification and screening of endophytic bacteria antagonistic to biofilm formers. *Pakistan J. Zool.*, 44(1): 249-257.
57. Ozakman M and Schaad NW (2003). A real-time Bio-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers. *Can. J. Pl. Pathol.* 25: 232-239
58. Padmanabhan P., Cheema A., Paliyath G., Padmanabhan et al., 2016 Solanaceous fruits including tomato, eggplant, and peppers *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier (2016), pp. 24-32, 10.1016/B978-0-12-384947-2.00696-6
59. Papp, A.C., Pinsonneault, J.K., Cooke, G. & Sadee, W. 2003. Single nucleotide polymorphism genotyping using allele-specific PCR and fluorescence melting curves. *BioTechniques* 34:1068-1072
60. Paudel, Manoj & Parajuli, Kiran & Parajuli, Sovit & Regmi, Sudip. (2020). Molecular Diagnostic Approaches For Plant Pathogens Detection And Disease Management. *Science Heritage Journal.* 4. 27-30. 10.26480/gws.01.2020.27.30.
61. Paul Khurana SM (2006). Detection of plant pathogens: development and applications. *Indian Phytopath.* 59: 1-15.

62. Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C., Fegan, M., 2000. Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst. Appl. Microbiol* 23,479–486. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80021-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80021-1)
63. Prakash Jai, 9 - Mechanism of biological control of plant diseases by endophytes, Editor(s): Maulin Shah, Deepanwita Deka, In *Developments in Applied Microbiology and Biotechnology, Endophytic Association: What, Why and How*, Academic Press, 2023, Pages 181-199, ISBN 9780323912457, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91245-7.00014-6>
64. Rasmussen, O.F. & Wulff, B.S. 1991. Detection of *Pseudomonas syringae* pv *pisi* using PCR. In *Proceedings 4th International working group on Pseudomonas syringae pathovars*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. PP 369-376.
65. Riley MB, Williamson MR and Maloy O (2002). Plant disease diagnosis. *Plant Health Instr.* doi: 10.1094/PHII-2002-1021-01.
66. Rosace, Maria Chiara & Preti, Stefano & Siligato, Riccardo & Tramontini, Sara & Gogin, Andrey & Kaluski, Tomasz. (2019). *Ralstonia solanacearum* PestReport EN-1652. 10.5281/zenodo.2789712
67. Salgon S., Jourda C., Sauvage C., Daunay M.C., Reynaud B., Wicker E., Dintinger J. Eggplant Resistance to the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Involves Both Broad-Spectrum and Strain-Specific Quantitative Trait Loci. *Front Plant Sci.* 2017 May 19;8:828. doi: 10.3389/fpls.2017.00828.
68. Seleim, Mohamed & Abd-El-Moneem, Kenawy & Saeed, Farag. (2014). First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 Race 1 on Tomato in Egypt. *The plant pathology journal.* 30. 299-303. 10.5423/PPJ.NT.10.2013.0101.
69. Sharma J, Sharma KK, Kumar A, Mondal KK, Thalor S, Maity A, Gharate R, Chinchure S and Jadhav VT (2017). Pomegranate bacterial blight: symptomatology and rapid inoculation technique for *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*. *J. Plant Pathol.* 99: 109-119.)



70. Song Y, Liu C, McTeague M, Finegold SM (2003). 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J Clin Microbiol.*, 41(4): 1363-1369
71. Sung, K.D., Stern, N.J. & Hiatt, K.L. 2004. Relationship of messenger RNA Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction signal to *Campylobacter* spp. viability. *Avian Dis.* 48:254-262.
72. Swapnil Sapre, Iti Gontia-Mishra, Vishwa Vijay Thakur, Sumana Sikdar, Sharad Tiwari, Chapter 20 - Molecular techniques used in plant disease diagnosis, Editor(s): Ajay Kumar, Samir Droby, Food Security and Plant Disease Management, Woodhead Publishing, 2021, Pages 405-421, ISBN 9780128218433, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821843-3.00001-5>.
73. Thakur, Swagata & Anokhe, Archana & Kalia, Vinay. (2021). Biochemical Test for Detecting Hydrogen Sulphide (H<sub>2</sub>S) Producing Bacteria. 2. 53-56.
74. Thomas Edison E. dela Cruz, Jeremy Martin O. Torres. Gelatin Hydrolysis Test Protocol. American Society for Microbiology. 2012.
75. Vasse J, Genin S, Frey P, Boucher C, Brito B. The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Mol Plant Microbe Interact.* 2000 Mar;13(3):259-67. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.3.259. PMID: 10707351.
76. Verma, Rupa & Dutta, Abhijit & Choudhary, Ashok & Maurya, Sudarshan. (2021). Control of *Ralstonia Solanacearum* Infection in Tomato, Brinjal and Capsicum by antibiotic sensitivity test.
77. Vidaver, A.K., Lambrecht, P.A., 2004. Bacteria as plant pathogens. The Plant Health Instructor . Available from: <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2004-0809-01>
78. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Oct;63(10):3741-51. doi: 10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997. PMID: 9327537; PMCID: PMC168683..
79. Winstead, N. N., and Kelman, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42:628-634

80. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN and Elenitoba-JohnsonKS (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods*. 25:430-442.
81. Woese CR (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51(2): 221-271
82. Yang S. & Rothman R.E. 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *THE LANCET Infectious Dis.* 4: 337-348.
83. Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E. et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12, 635–645 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>

## ДОДАТКИ

### Додаток А

Матеріали опубліковані на конференції «Досягнення і перспективи в захисті та карантині рослин»

УДК 581.2:579.8:582.93

### БАКТЕРІОЗИ РОСЛИН БАКЛАЖАНУ (*SOLANUM MELONGENA* L.)

*Даневич В.А.*, магістр 1-го року,  
Науковий керівник: *Кваско О.Ю.*, кандидат біологічних наук  
Національний університет біоресурсів і природокористування України  
e-mail: [leradanevych678@gmail.com](mailto:leradanevych678@gmail.com)

Баклажани, *Solanum melongena* L. є важливою пасльоновою овочевою культурою в багатьох країнах. Походить з Індії. Баклажани є хорошим джерелом мінералів і вітамінів, а за загальною харчовою цінністю їх можна порівняти з томатами. Важливими країнами з вирощування баклажанів є Індія, Японія, Індонезія, Китай, Болгарія, багато країн Африки, Італія, Франція, США. На світовому ринку Україна займає 32 місце по вирощуванню баклажанів [3]. Баклажани мають низьку калорійність і низький вміст жирів і містять переважно воду. Він також містить білок, клітковину та вуглеводи. Плід баклажана є хорошим джерелом різних вітамінів, таких як В1, В2, В6, С, К, тіамін, ніацин і пантотенова кислота, а також мінералів, таких як магній, калій, марганець і мідь [4].

Бактеріальні хвороби завдають великої шкоди овочевим рослинам, що може призвести до 20 – 50 % втрат врожаю. У літературі для родини Пасльонових описується більше 30 різних збудників захворювання, із них приблизно 15 бактеріальних. Для баклажану найбільш поширені

## Матеріали опубліковані на конференції «Екологія- філософія існування людства»

УДК 632 (075. 8)

### КАРАНТИННІ ВИДИ БАКТЕРІЙ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІОЗІВ РОСЛИН БАКЛАЖАНУ (*SOLANUM MELONGENA* L.)

*Даневич В.А.*, магістр І р.н., факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

*Кваско О.Ю.*, к.б.н., в.о. завідувача кафедри екобіотехнологій та біорізноманіття

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

Баклажани, *Solanum melongena* L. є важливою пасльоновною овочевою культурою в багатьох країнах. Походить з Індії. Баклажани є хорошим джерелом мінералів і вітамінів, а за загальною харчовою цінністю їх можна порівняти з томатами. Важливими країнами з вирощування баклажанів є Індія, Японія, Індонезія, Китай, Болгарія, багато країн Африки, Італія, Франція, США. На світовому ринку Україна займає 32 місце по вирощуванню баклажанів [0]. Бактеріальні хвороби завдають великої шкоди овочевим рослинам, що може призвести до 20 – 50 % втрат врожаю. У літературі для родини Пасльонових описується більше 30 різних збудників захворювання, із них приблизно 15 бактеріальних. Загальний відсоток втрат врожаю становить від 80% до 90%, в деякі роки 100%. Вони виявляються скрізь, де вирощують баклажани та інші пасльонові культури. Вид фітопатогенних бактерій, стадія зараження рослин, погода та клімат, які можуть як сприяти, так і гальмувати активний розвиток збудника, а також заходи, вжиті для припинення розповсюдження збудника, впливають на економічні збитки від бактеріальних захворювань. Поява нових збудників складає основну небезпеку. Для контролю поширення патогенів було створено спеціальні державні органи. Згідно Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, та Закону України «Про карантин рослин» із наданого «Перелік регульованих шкідливих організмів» карантинними патогенами хвороб баклажану представлено у таблиці 1.

1. Перелік бактеріальних патогенів із списку А2 ЄОКЗР які уражують рослини *Solanum melongena* L.

Фітопатогени	Захворювання викликане патогеном	Поширеність фітопатогену
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	чорна бактеріальна плямистість пасльонових	Найбільш поширена в Північній та Південній Америці, Східній Європі. В Україні патоген наявний, рідко уражає баклажан [0].
<i>Ralstonia solanacearum</i>	бактеріальна гниль	Поширений в Південній Америці, Африці та Європі. В Україні патоген є перехідним, є одним із

## Матеріали опубліковані на конференції «Біотехнологія: звершення та надії»

25

УДК 63.632.3.01/08

### Даневич В.А., Кваско О.Ю. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ БАКТЕРІОЗІВ РОСЛИН БАКЛАЖАНУ (*SOLANUM MELONGENA* L.)

Національний університет біоресурсів і природокористування України вул. Героїв Оборони,  
15, м. Київ, 03041, Україна  
e-mail: leradanevych678@gmail.com

Хвороби рослин, спричинені новими, повторно виникаючими та хронічними/ендемичними патогенами, спричиняють значні економічні втрати в рослинних системах. Хвороби рослин експлуатують рослини, що призводить до низької продуктивності, яка є загрозою для продовольчої безпеки. Продовольча безпека разом з безпекою харчування викликає занепокоєння у всьому світі. Зростання чисельності населення до 2050 року потребуватиме додаткових 70% продовольства (Godfray et al., 2010), що вимагає підвищення продуктивності сільського господарства. У літературі для родини Пасльонових описується більше 30 різних збудників захворювання, із них приблизно 15 бактеріальних. Найпоширенішими для баклажану є патогени роду: *Xanthomonas*, *Ralstonia* та *Pseudomonas*.

Виявлення патогенних бактерій у насінні та інших тканинах рослин (особливо при латентних інфекціях) є складним завданням, оскільки бактерії-мішені часто розподілені нерівномірно і присутні як невеликий компонент набагато більшої бактеріальної популяції. Більше того, часто важко відрізнити та ідентифікувати патогенні бактерії від усіх ґрунтових та інших сапрофітних бактерій, які зазвичай присутні на поверхні рослин. Окрім епіфітних та випадкових поверхневих забруднювачів, на поверхні можуть також бути присутніми нешкідливі або корисні ендofітні бактерії (Punja et al., 2008).

Традиційні методи виявлення наявності патогенних бактерій включають в себе польовий огляд на наявність симптомів і ознак захворювання, а також лабораторні дослідження. Лабораторні процедури для виявлення бактерій можуть включати в себе аналіз росту, серологічні тести, такі як ІФА та імунофлуоресцентна мікроскопія. Крім того, проводиться ізоляція бактерій на селективних або напівселективних середовищах. Після виділення штами необхідно охарактеризувати за допомогою фізіологічних, біохімічних тестів і тестів на патогенність. Використання традиційних методів є надійним та ефективним для деяких бактеріальних патогенів рослин, але для багатьох інших вони не мають достатньої чутливості та специфічності. Іншим суттєвим недоліком є тривалий час, необхідний для проведення аналізів на вирощування, виділення бактерій та тестів на патогенність. Тому нові та сучасні молекулярні методи є найкращим варіантом для діагностики бактеріальних патогенів (Punja et al., 2008).

Доведено, що методи на основі нуклеїнових кислот (ДНК) загалом є більш чутливими, специфічними та надійними для виявлення, ідентифікації та кількісного визначення бактеріальних патогенів рослин, у порівнянні із іншими методами. Серед методів діагностики на основі нуклеїнових кислот ПЛР-аналіз або його різновиди дуже широко використовуються для виявлення бактеріальних патогенів у чистих культурах або при одно-чи багаторазовому інфікуванні рослин-хазяїв (Nagaapazamu, 2011). Аналізи на основі ПЛР є специфічними, чутливими, ефективними, швидкими, універсальними і відносно економічними (Henson and French, 1993). Ці методи ідеально підходять для виявлення збудника *de novo*, оскільки не вимагають виділення патогена в чистій культурі, що економить час і ресурси. До методів які використовують ДНК як основну нуклеїнову кислоту відносять: флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) та багато варіантів ПЛР [ПЛР, вкладена ПЛР (nPCR), кооперативна ПЛР (Co-PCR), мультиплексна ПЛР (M-PCR), ПЛР у реальному часі (RT-PCR) та ДНК-фінгерпрингінг] (López et al., 2009). До прикладу, за допомогою ПЛР-аналізу з використанням праймерів з послідовностей ДНК гена