

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГРИЦЕВА НАТАЛІЯ ГЕННАДІЇВНА

УДК: 579.2; 579.6; 581.2; 632; 635.1; 633.491

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЕТИОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІАЛЬНИХ ГНИЛЕЙ
КАРТОПЛІ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) В УКРАЇНІ ТА РОЗРОБКА
МЕТОДІВ ЇХ ДІАГНОСТИКИ**

Спеціальність – 091 - біологія

Галузь знань – 09 -біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біології

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Н. Г. Грицева

Науковий керівник: Сківка Лариса Михайлівна, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Грицева Н.Г. Етіологічна характеристика бактеріальних гнилей картоплі (*Solanum Tuberosum L.*) в Україні та розробка методів їх діагностики. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія) – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2024.

Картопля займає одну з провідних позицій серед основних сільськогосподарських культур в Україні через її важливе стратегічне значення, а валовий урожай культури дозволяє утримувати лідуєче місце серед світових виробників. За даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН, Україна в останні роки зміцнила свої позиції серед світових виробників картоплі та входить до трійки лідерів з часткою більше 5% її виробництва. Однак, незважаючи на наявність родючих ґрунтів та сприятливих агрокліматичних умов, урожайність картоплі в Україні більше ніж у 3 рази поступається аналогічним показникам розвинутих країн Європи та США. Серед багатьох чинників, що впливають на кількісні та якісні показники урожаю картоплі, фітопатогенні бактерії займають одне з провідних місць, через спричинені втрати, що можуть досягати до 50% у сприятливі роки. Серед основних збудників бактеріальних інфекцій картоплі виокремлюють комплекс видів *Ralstonia solanacearum*, представників пектолітичних бактерій родів *Pectobacterium* і *Dickeya* та представника коринеформних бактерій *Clavibacter sepedonicus*. Комплекс видів *R. solanacearum* згрупував у собі нещодавно виокремлені види, що викликають гнилі широкого спектру рослин-господарів та віднесені Європейською Організацією Захисту і Карантину Рослин до переліку карантинних організмів, що наносять значних економічних збитків як через прямі втрати врожаю, так і через жорсткі карантинні заходи, що унеможливають виробництво картоплі. Пектолітичні бактерії родів *Pectobacterium* і *Dickeya*, володіючи обширним пулом факторів патогенності, поширені у всьому світі та призводять до

загнивання широкого спектру цінних сільськогосподарських культур. Серед пектолітичних бактерій, основним, але не єдиним, етіологічним збудником м'якої гнилі бульб та чорної ніжки у полі і досі залишається *Pectobacterium atrosepticum*, що на відміну від інших представників даної групи, уражує значно менше коло рослин-господарів, серед яких чільне місце посідає картопля. Коринформна бактерія *Clavibacter sepedonicus*, що викликає кільцеву гниль, як і представник пектолітичних бактерій-збудників інфекцій картоплі, поширений у світі, однак в основному призводить до непрямих втрат, що спричинені вибраковуванням ураженого врожаю та впровадженням карантинних заходів, що засновані на забороні вирощування картоплі. Дослідження поширеності бактеріальних збудників та володіння інформацією стосовно етіологічної структури інфекцій відіграє важливу роль у розумінні епідеміологічної ситуації та виборі необхідних фітосанітарних та карантинних заходів для мінімізації їх розвитку та поширення посівними площами.

Саме тому метою роботи була детекція латентного поширення фітопатогенних бактерій - збудників м'якої *Pectobacterium atrosepticum* та кільцевої *Clavibacter sepedonicus* гнилей у різних кліматичних умовах взаємодії господар : паразит та удосконалення методів їх діагностики. Для виконання поставленої мети були використані мікробіологічні (культивування колекційних штамів фітопатогенних мікроорганізмів), фітопатологічні (штучне ураження бульб картоплі для оцінки стійкості сортів картоплі до збудників бактеріальних гнилей картоплі), фізико-хімічні (виділення ДНК, електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації), молекулярно-генетичні (проведення ПЛР та ПЛР у реальному часі), імунохімічні (проведення сендвіч-варіанту ELISA) та статистичні методи досліджень.

На першому етапі нашої роботи проводили дослідження поширеності збудників м'якої та кільцевої гнилей в урожаї картоплі на території України, використовуючи сертифіковані тест-системи ІФА. Для цього були відібрані бульби картоплі урожаїв 2020 та 2021 років з 8-ми областей України, включаючи: Одеську, Київську, Донецьку, Херсонську, Черкаську,

Миколаївську, Дніпропетровську та Житомирську області. Збудники м'якої та кільцевої гнилей були виявлені у врожаї практично всіх областей, окрім Одеської, де збудник м'якої гнилі не був виявлений, та Херсонської і Житомирської областей, де збудник кільцевої гнилі не детектувався у врожаї 2020 року. Найвищий показник ураження м'якою гниллю *P.atrosepticum* було виявлено у Миколаївській області, у той час як збудник кільцевої гнилі *S. sepedonicus* домінував у Київській та Дніпропетровській областях. Змішана інфекція була поширена серед половини досліджуваних областей, однак не перевищувала 5%.

У 2021 році розподіл збудників бактеріальних інфекцій в усіх областях характеризувався збільшенням ураження пектолітичними бактеріями вдвічі у порівнянні з 2020 роком, окрім Дніпропетровської області, де показники поширення були подібними. Найвищі показники виявлення збудників як кільцевої, так і м'якої гнилі було зареєстровано у Донецькій області, де також спостерігався найвищий показник змішаної інфекції серед інших досліджуваних областей. Таким чином, у ході нашого дослідження збудники бактеріальних гнилей виявлялись у досліджуваних областях з різною інтенсивністю. Однак, слід відмітити, що на обстежених виробничих ділянках спектр вирощуваних сортів картоплі протягом 2-х років практично не змінювався. Відтак, маючи подібні сорти картоплі на тих же територіях, значний перерозподіл поширення м'якої гнилі картоплі у 2021 році міг бути спричинений змінами кліматичних умов, які відбувались протягом року та стали більш сприятливими для оптимального розвитку патогенів.

З огляду на вище зазначене, на другому етапі дослідження для перевірки даного припущення було зібрано помісячні базові кліматичні показники, такі як температура повітря та кількість опадів у період виробництва картоплі. На основі вже наявних показників були розраховані додаткові кліматичні індекси а саме: середні значення температури та вологості для окремих періодів виробництва картоплі, середньорічну температуру та кількість опадів, амплітуди температурних показників та опадів, а також гідротермічний

коефіцієнт Селянінова, що об'єднує в собі як температурні показники так і кількість опадів.

Для виявлення взаємозв'язку між описаними вище кліматичними показниками та поширенням гнилей картоплі використовували кореляційний аналіз Спірмена. Результати кореляційного аналізу вказали на сильний позитивний зв'язок між латентним інфікуванням бульб збудником м'якої гнилі *P. atrosepticum* та показником суми опадів і гідротермічним коефіцієнтом Селянінова, у вегетаційний період культури. Також була виявлена сильна негативна кореляція між середньодобовою температурою у період збирання врожаю та поширеністю *P. atrosepticum*. У випадку збудника кільцевої гнилі *S. sepedonicus* була виявлена лише помірна кореляція між поширенням та середньодобовою температурою протягом періоду садіння. Отримані результати вказують на те, що умови навколишнього середовища, а саме температура та вологість відіграють істотну роль у поширенні збудника м'якої гнилі *P. atrosepticum*, у порівнянні зі збудником кільцевої гнилі *S. sepedonicus*.

Як зазначено в описі трикутника хвороб у фітопатології, лише наявність вірулентного патогену, оптимальних умов зовнішнього середовища та сприйнятливої рослини-господаря можуть гарантувати розвиток інфекційного процесу. Збільшення поширеності збудника м'якої гнилі *P. atrosepticum* серед досліджуваних областей, де культивувались подібні сорти картоплі, для більшості з яких виробником була зазначена висока стійкість до чорної ніжки, актуалізувала необхідність дослідити чутливість поширених на території України сортів картоплі до музейного штаму типового збудника м'якої гнилі *P. atrosepticum* В-1084^Т. У ході експерименту поверхнево стерилізовані бульби поширених сортів картоплі інфікували стандартизованою суспензією бактеріальних клітин та інкубували протягом відведеного часу. Для оцінки ураження аналізували площу мацерації та масу мацерованих тканин бульб картоплі. У результаті нами було виявлено, що найбільш чутливим до використаного штаму *P. atrosepticum* В-1084^Т виявився сорт Riviera, для якого виробником зазначено середньо-високу стійкість до чорної ніжки. Сорт

Picasso, який, згідно даних селекціонера, має низьку стійкість до чорної ніжки, проявив вищий ступінь стійкості у порівнянні з сортами Bellarosa і Queen Anne, які, згідно даних виробника, мають високу стійкість до чорної ніжки. Також було відмічено, різницю у ступені ураження одних і тих самих сортів, культивованих у різних агрокліматичних регіонах, з вищими показниками площі мацерації та маси мацерованих тканин для бульб, вирощених на півдні України. Виявлений взаємозв'язок між поширенням пектолітичних бактерій і кліматичними умовами та наукові публікації щодо питань впливу змін клімату на циркуляцію та патогенність збудників інфекційних процесів у сільськогосподарських культурах спонукали до проведення додаткового експерименту щодо впливу підвищеної температури (30°C) на стійкість обраних сортів картоплі до *P. atrosepticum*. У даному випадку, для всіх аналізованих сортів було виявлено збільшення ступеню ураження в середньому у 1,5 рази, за виключенням сорту Queen Anne, який не продемонстрував змін в ураженні бульб. Отримані нами дані вказують на те, що генетичний потенціал стійкості сорту картоплі до чорної ніжки не є визначальним фактором, що впливає на розвиток хвороби. Літературні дані вказують, що кліматичні умови та кількісні і якісні характеристики складових ґрунту сільськогосподарських угідь, у т.ч. ґрунтової мікробіоти, також можуть відігравати важливу роль у протіканні інфекцій.

Літературні дані щодо поширення на території України, здатність викликати м'яку гниль картоплі та широке коло додаткових рослин-господарів у сукупності спричинили необхідність розробки методу детекції *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. На початковому етапі підібрали та розробили специфічні праймери до внутрішнього транскрибованого спейсеру 16S-23S рРНК, які при тестуванні з тотальною ДНК фітопатогенних бактерій утворювали амплікони лише з цільовою матрицею штамів *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Іншим відкритим питанням у виявленні бактеріальних гнилей картоплі залишався протокол ПЛР детекції комплексу видів *R. solanacearum*, що викликають

буру гниль картоплі. У нашому дослідженні рекомендована пара праймерів для детекції комплексу видів *R. solanacearum* запропонована Seal et al. давала значно менший продукт ампліфікації, ніж описаний у наданому протоколі, що спонукало до розробки власних праймерів до консенсусної послідовності 16S рРНК. Розроблені праймери при перехресному дослідженні синтезували амплікони з теоретично розрахованою кількістю пар нуклеотидів лише з генетичним матеріалом цільових бактерій. Розробка високоспецифічних пар праймерів для детекції *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* та комплексу видів *R. solanacearum* дозволила надалі розробити ДНК-зонди для кількісного визначення бактеріальних патогенів методом ПЛР у реальному часі, використовуючи калібрувальні криві з серій десятикратних розведень тотальної ДНК цільового патогену. Розроблений протокол детекції ПЛР у реальному часі для *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* був використаний у лабораторному дослідженні бульб урожаю 2021 року на наявність латентної інфекції. Аналіз поширеності аналізованого збудника у досліджуваних бульбах з Київської та Одеської областей, вказує на переважання патогену більше ніж у 3,5 рази для Одеської області у порівнянні з даним показником у Київській області. Така відмінність у поширенні *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* у різних областях України може бути спричинена погоднокліматичними умовами на даних територіях, що нами було виявлено для іншого представника пектолітичних бактерій *P. atrosepticum*.

Таким чином, у ході дисертаційного дослідження було оновлено дані поширеності збудників бактеріальних гнилей на території України. Вперше в Україні, встановлено зв'язок між поширенням *Pectobacterium atrosepticum* та *Clavibacter sepedonicus* і кліматичними умовами, що реєструвались у період посадки, вегетації та збору урожаю. У лабораторних експериментах досліджено стійкість поширених на українських територіях сортів картоплі до типового збудника чорної ніжки та м'якої гнилі картоплі і показано підвищену чутливість бульб картоплі до *Pectobacterium atrosepticum* за підвищеної температури інкубації. Оптимізовано та розроблено протоколи детекції

методами класичної ПЛР та ПЛР у реальному часі для комплексу видів *Ralstonia solanacearum* та *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Ключові слова: бактеріальні хвороби, картопля, бактерії, погодні умови, кільцева гниль, стрес, *Clavibacter sepedonicus*, клімат, мікст-інфекція, ідентифікація, м'яка гниль, комплекс видів *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Solanum tuberosum*.

ABSTRACT

***Hrytseva N.H.* Etiological characteristics of infectious diseases of potato (*Solanum tuberosum* L.) in Ukraine and development of methods of their diagnostics.** – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for PhD (Doctor of Philosophy) degree in biological sciences in speciality 091-Biology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2024.

Potatoes are one of the leading crops in Ukraine due to their strategic importance, and the gross harvest of the crop allows Ukraine to maintain a leading position among global producers. According to the Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Ukraine has strengthened its position among global potato producers in recent years and is among the top three with a share of more than 5% of its production. However, despite having fertile soils and favorable agro-climatic conditions, potato yields in Ukraine are more than 3 times lower than in developed countries in Europe and the US. Among the many factors affecting the quantitative and qualitative performance of the potato crop, phytopathogenic bacteria are one of the leading causes of losses, which can reach up to 50% in favorable years.

Ralstonia solanacearum species complex, pectolytic bacteria of the genera *Pectobacterium* and *Dickeya*, and the pleomorphic bacteria of *Clavibacter sepedonicus* are the main causative agents of bacterial infections in potatoes. *R. solanacearum* species complex includes recently identified species that cause rotting in a wide range of host plants, and the complex has been assigned by the European and Mediterranean Plant Protection Organization as quarantine organisms resulting in significant economic losses, both through direct and indirect crop damage that hinder potato production. Pectolytic bacteria of the genera *Pectobacterium* and *Dickeya*, possessing a wide pool of pathogenicity factors, are widespread throughout the world and cause decay of a wide range of valuable crops. Among the pectolytic bacteria, *Pectobacterium atrosepticum* remains the main, but not the only,

etiologi­cal agent of soft rot of tubers and blackleg in the field, which, unlike other members of this group, affects a much smaller range of host plants, among which potatoes are the most important. The coryneform bacterium *Clavibacter sepedonicus*, which causes ring rot, as well as a representative of pectolytic bacteria causing potato infections, is widespread in the world, but mainly leads to indirect losses caused by the rejection of the affected crop and the introduction of quarantine measures based on the ban on potato cultivation. The study of the prevalence of bacterial pathogens and the knowledge of the etiologi­cal structure of infections plays an important role in understanding the epidemiological situation and selecting the necessary phytosanitary and quarantine measures to minimize their development and spread through the crop area.

Therefore, the work was aimed to study the prevalence of the main causative agents of bacterial potato rots in Ukraine and to develop the methods of their molecular detection. To conduct the study, we applied microbiological (cultivation of phytopathogenic microorganisms), phytopathological (artificial infection of potato tubers to assess the resistance of potato varieties to causative agents of bacterial rot), physicochemical (DNA isolation, electrophoretic separation of amplification products), molecular (PCR and real-time PCR), immunochemical (conducting ELISA in a sandwich format), and statistical methods.

In the first stage of the research, the prevalence of the causative agents of soft and ring rot in potato harvests in Ukraine was explored using certified serological test systems. For this purpose, potato tubers from the 2020 and 2021 harvests from 8 regions of Ukraine, including Odesa, Kyiv, Donetsk, Kherson, Cherkasy, Mykolaiv, Dnipropetrovsk, and Zhytomyr regions, were sampled. The causative agents of soft and ring rots were detected in the tubers from all regions, except the Odesa region, where the causative agent of soft rot was not detected, and the Kherson and Zhytomyr regions, where the causative agent of ring rot was not detected in the 2020 potato harvest. The highest incidence of soft rot caused by *P. atrosepticum* was detected in the Mykolaiv region, while the ring rot pathogen *C. sepedonicus* dominated in the Kyiv and Dnipropetrovsk regions. Mixed infection was prevalent

in half of the analyzed regions, but didn't exceed 5%. In 2021, the distribution of bacterial infection agents was characterized by a double increase of pectolytic bacteria compared to 2020, except for the Dnipropetrovsk region, where the distribution of bacteria was similar to previous year. The highest rates of detection of both ring and soft rot pathogens were recorded in Donetsk region, which also had the highest rate of mixed infection among the other regions studied.

Thus, in the course of our study, bacterial rot pathogens were detected in the surveyed regions with varying intensity. However, it should be noted that the range of potato varieties grown in the surveyed production plots has not changed over the past 2 years. Therefore, having similar potato varieties in the same areas, a significant redistribution of the spread of soft rot in 2021 could be caused by changes in climatic conditions that occurred during the year and became more favorable for the optimal development of pathogens.

In view of the above, at the second stage of the study, monthly climatic indicators, such as air temperature and precipitation during the potato production period, were collected to test this assumption. Additional climatic indices were calculated using these basal indicators, such as mean temperature and humidity for specific periods of potato production, annual average temperature and rainfall, temperature, and rainfall amplitudes, and the Selyaninov hydrothermal coefficient, which combines temperature and rainfall indicators.

A Spearman correlation was conducted to examine the relationship between the aforementioned climatic indicators and the spread of causative agents of potato rots. The results of the analysis revealed a strong positive correlation between latent infection of potato tubers with the soft rot pathogen *P. atrosepticum* and the sum of rainfall and the Selyaninov hydrothermal coefficient during the potato growing season. A strong negative correlation was detected between the average daily temperature during the harvest season and the prevalence of *P. atrosepticum*. A moderate correlation was also found between the ring rot pathogen *C. sepedonicus* prevalence and the average daily temperature during the potato planting season. These results indicate that environmental conditions, particularly temperature and

humidity, play more significant role in the spread of the soft rot pathogen *P. atrosepticum* as compared to the ring rot pathogen *C. sepedonicus*.

According to the disease triangle - a commonly accepted paradigm in plant pathology - only the presence of a virulent pathogen, optimal environmental conditions and a susceptible host plant can guarantee the development of the infection process. The increase in the prevalence of the soft rot pathogen *P. atrosepticum* among the studied regions where similar potato varieties were cultivated, most of which were reported by the manufacturer to be highly resistant to blackleg, necessitated investigating the sensitivity of potato varieties common in Ukraine to the museum strain of the typical soft rot pathogen *P. atrosepticum* B-1084^T. During the experiment, surface-sterilized tubers of common potato varieties were infected with a standardized suspension of bacterial cells and incubated for the allotted time.

To assess the damage, the area of maceration and the weight of macerated tissues of potato tubers were analyzed. As a result, we found that the variety Riviera, which is reported by the manufacturer to have medium-high resistance to blackleg, was the most sensitive to the *P. atrosepticum* B-1084^T strain. The Picasso variety, which according to the breeder has low resistance to blackleg, showed a higher degree of resistance compared to the Bellarosa and Queen Anne varieties, which according to the manufacturers have high resistance to blackleg. There was also a difference in the degree of damage of the same varieties cultivated in different agroclimatic regions, with higher maceration area and macerated tissue weight for tubers grown in southern Ukraine. The identified relationship between the spread of pectinolytic bacteria and climatic conditions along with literature data concerning the impact of climate change on the circulation and pathogenicity of infectious agents in crops prompted an additional experiment to investigate the effect of elevated temperature (30°C) on the resistance of selected potato varieties to *P. atrosepticum*. In this case, for all the analyzed varieties, an increase in the degree of damage was found by an average of 1.5 times, with the exception of the Queen Anne variety, which did not show any changes in tuber damage under elevated

temperature. Our data indicate that the genetic potential for resistance of a potato variety to blackleg is not a determining factor in the development of the disease. Literature data indicate that climatic conditions as well as quantitative and qualitative characteristics of soil components, including soil microbiota, can also play an important role in the course of infections.

The literature data on the prevalence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Ukraine, its ability to cause soft rot of potatoes, and a wide range of additional host plants necessitated developing methodology for the detection of this pathogen. At the initial stage, specific primers were selected and developed for the internal transcribed spacer of 16S-23S rRNA, which, when tested with total DNA of phytopathogenic bacteria, formed amplicons only with the target matrix of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Another unresolved issue in the detection of bacterial potato rots was the PCR protocol for the detection of the *Ralstonia solanacearum* species complex, which causes brown rot in potato. In our study, the recommended pair of primers for detection of the *R. solanacearum* species complex proposed by Seal et al. gave a significantly lower amplification product than that described in the provided protocol, which prompted us to develop our own primers for the consensus 16S rRNA sequence. The developed primers synthesized amplicons with the theoretically calculated number of base pairs only with the genetic material of the target bacteria during the cross-validation. The development of highly specific primer pairs for the detection of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and *R. solanacearum* species complex allowed further development of DNA probes for the quantitative detection of bacterial pathogens by real-time PCR using calibration curves from a series of tenfold dilutions of total DNA of the target pathogens.

The developed real-time PCR detection protocol for *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* was used in the laboratory testing of tubers from the 2021 harvest for the presence of latent infection. The analysis of the prevalence of the pathogen in the tested tubers from Kyiv and Odesa regions indicates that the occurrence of the pathogen is more than 3.5 times higher in Odesa region compared to the same

indicator in Kyiv region. Such a difference in the distribution of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* in different regions of Ukraine may be caused by different weather conditions in these areas, which we found for another representative of pectolytic bacteria *P. atrosepticum*.

Thus, in the course of the dissertation research, the data on the prevalence of bacterial rot pathogens in Ukraine were updated. For the first time in Ukraine, a link was established between the spread of *Pectobacterium atrosepticum* and *Clavibacter sepedonicus* and climatic conditions recorded during planting, vegetation and harvesting seasons. In laboratory experiments, the resistance of potato varieties common in the Ukrainian territories to the typical pathogen of blackleg and soft rot of potatoes was investigated and the increased sensitivity of potato tubers to *Pectobacterium atrosepticum* at elevated incubation temperature was shown. The detection protocols by classical and real-time PCR were optimized and developed for the *Ralstonia solanacearum* species complex and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Key words: bacterial diseases, potato, bacteria, weather conditions, ring rot, stress, *Clavibacter sepedonicus*, climate, mix-infection, identification, soft rot, *Ralstonia solanacearum* species complex, *Pectobacterium atrosepticum*, *Solanum tuberosum*.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. N. Hrytseva, "Development of specific primers for 16s rRNA gene analysis in the detection of *Ralstonia solanacearum* SPECIES COMPLEX", *Biotechnol. Acta* 15(3), 5–12 (2022).
<https://doi.org/10.15407/biotech15.03.005> (*Особистий внесок здобувача – пошук інформації, дизайн дослідження, проведення експерименту, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
 2. N. G. Hrytseva та L. M. Skivka, "Prevalence of causative agents of ring rot *clavibacter sepedonicus*, blackleg and wet rot *pectobacterium atrocepticum* in the 2021 year potato harvest in the territory of ukraine", *Microbiology&Biotechnology* 2023(1(57)), 6–17.
[https://doi.org/10.18524/2307-4663.2023.1\(57\).274279](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2023.1(57).274279) (*Особистий внесок здобувача – розробка концепції, проведення дослідження, обробка даних, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
 3. N. G. Hrytseva та L. M. Skivka, "Latent infestation of potato tubers with soft rot and ring rot pathogens under changing weather conditions in ukraine", *Мікробіологічний журнал* 85(6), 26–40 (2023).
<https://doi.org/10.15407/microbiolj85.06.026> (*Особистий внесок здобувача – розробка концепції та проведення дослідження, аналіз даних, статистична обробка даних, написання рукопису, підготовка статті до друку*)
- N. Hrytseva, T. Babych, A. Andriienko, K. Rubanik та Y. Yumyna, "Assessment of resistance to the pathogen of soft rot and blackleg common in ukraine potato varieties", *Bull. Taras Shevchenko National Univ. Kyiv. Ser.* 95(4), 39–44 (2023). <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.95.39-44> (*Особистий внесок здобувача – дизайн дослідження, інокуляція збудником, написання рукопису, підготовка статті до друку*)

Статті у інших виданнях:

4. Воробйова Н. Чистий насінневий матеріал як запорука гарного врожаю, Майстерня аграрія, №3, 98-103 (2020).

Опубліковані праці апробаційного характеру:

5. Грицева Н.Г., Сківка Л.М. Нові підходи в детекції комплексу видів *Ralstonia solanacearum* на основі 16s РНК». Біологічні процеси оптимізації продукційного процесу культурних рослин: матеріали Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції, присвяченої 60-річчю ІСМАВ НААН, 2021, 176 с.
6. N. Hrytseva. Development of real-time pcr to detect *Ralstonia solanacearum* species complex based on 16s RNA. IV International Scientific Conference «Microbiology and Immunology– the development outlook in the XXI Century», 2022. 106 p.
7. Грицева Н.Г., Сківка Л.М. Поширення *Pectobacterium atrosepticum* та *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* в урожаї картоплі на півдні України у 2021 році. Біологічні дослідження – 2022: за матеріалами XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції, 2022, 300 с.
8. Грицева Н.Г., Сківка Л.М. Аналіз поширення кільцевої гнилі та м'якої гнилі в урожаї бульб картоплі на території Львівської області у 2022 році, Молодь і поступ біології: за матеріалами XIX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «МОЛОДЬ І ПОСТУП БІОЛОГІЇ», присвячена 90-річчю від дня народження академіка НАН України, професора Шеляга-Сосонка Юрія, 2023, 238 с.
9. Грицева Н.Г., Сківка Л.М. Порівняльний аналіз поширення збудників чорної ніжки та м'якої гнилі картоплі *Pectobacterium atrosepticum* та *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* в урожаї картоплі 2021 року, Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: матеріали XVI наукової конференції молодих учених, 2023. 162 с.
10. Hrytseva N., Babych T., Andriienko A., Rubanik K., Skivka L., Yumyna J. Susceptibility of Bellarosa and Riviera potato varieties from different

regions to the *Pectobacterium atrosepticum* B-1084T, The International Scientific and Practical Conference Kyiv, Ukraine "MODERN ASPECTS OF MICROBIOLOGY, VIROLOGY, AND BIOTECHNOLOGY IN WARTIME AND POST-WAR PERIOD", 2023. 299 p.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	29
1.1.Виробництво картоплі та її економічне значення для України	29
1.2.Основні хвороби картоплі	37
1.2.1. Бура бактеріальна гниль картоплі	40
1.2.2. Кільцева гниль картоплі.....	44
1.2.3. Чорна ніжка та м'яка гниль картоплі.....	47
1.3.Методи діагностики фітопатогенних мікроорганізмів.....	51
1.3.1. Молекулярні методи досліджень	51
1.3.2. Імунохімічні методи досліджень.....	55
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	59
2.1. Реактиви та матеріали, що були використані у роботі	59
2.2. Обладнання, яке було використано у роботі	60
2.3. Розчини та буферні системи, використані у роботі	62
2.3.1. Розчини та буферні системи які були використанні для виділення тотальної ДНК за Boom at all. з модифікаціями	62
2.3.2. Буферні системи, які були використані для проведення ELISA.....	63
2.3.3. Буферні системи використані для проведення горизонтального електрофорезу	64
2.4. Мікроорганізми, використані у дослідженнях	64
2.5. Середовища культивування	65
2.6. Відбір зразків урожаю картоплі	66
2.7. Визначення стійкості сортів картоплі до бактеріальних гнилей картоплі за різних температурних режимах	70
2.8. Імуноферментний аналіз (DAS ELISA)	72
2.9. Виділення та характеристика ДНК	73
2.10. Характеристика праймерів використаних у дослідженні.....	74

2.11. Проведення ПЛР для виявлення комплексу видів <i>Ralstonia solanacearum</i> та <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	74
2.12. Проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР розділення в агарозному гелі.....	75
2.13. Агрокліматичні умови на території України	76
2.14. Статистична обробка даних	77
3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	79
3.1. Поширеність збудників м'якої та кільцевої гнилі на території України	79
3.1.1. Поширення <i>Pectobacterium atrosepticum</i> та <i>Clavibacter sepedonicus</i> у моно- та мікст інфекції в урожаї картоплі 2020 та 2021 років	80
3.1.2. Зв'язок між поширенням збудників кільцевої та м'якої гнилі в урожаї картоплі та кліматичними умовами на території її вирощування	88
3.2. Оцінка стійкості сортів картоплі, поширених на території України, до збудника м'якої гнилі та чорної ніжки в умовах різних температур інокуляції	100
3.3. Оптимізація методів діагностики бактеріальних інфекцій	114
3.3.1. Розробка протоколу виявлення комплексу видів <i>Ralstonia solanacearum</i> та <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	116
3.3.2. Кількісне визначення комплексу видів <i>Ralstonia solanacearum</i> та <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> з використанням оптимізованого протоколу ПЛР	127
3.3.3. Оцінка поширення <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> у досліджуваних партіях картоплі з використанням розробленого протоколу ПЛР у реальному часі	133
УЗАГАЛЬНЕННЯ	135
ВИСНОВКИ	143
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	145
ДОДАТКИ	181

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (етилендіамінтетраоцтова кислота)

egl – endoglucanase (ендоглюканаза)

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (імуноферментний аналіз)

EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization (Європейська та Середземноморська організація карантину і захисту рослин (ЄОКЗР))

FAO – Food and Agriculture Organization (Продовольча та сільськогосподарська організація ООН)

ITS - Internal transcribed spacer (внутрішній транскрибований спейсер)

PBS - phosphate buffer solution (фосфатний буфер)

RSSC- *Ralstonia solanacearum* species complex (комплекс видів *Ralstonia solanacearum*)

SDS - Sodium dodecyl sulfate (додецилсульфат натрію)

ГТК - гідротермічний коефіцієнт Селянінова

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота

ІФ - імунофлуоресценція

ІФА - імуноферментний аналіз

ЛПС - ліпополісахарид

НК – нуклеїнова кислота

ПЛР - полімеразно ланцюгова реакція

РНК - рибонуклеїнова кислота

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Актуальність теми

Картопля є однією з основних культур, що відіграє важливу роль у світовому сільському господарстві і за обсягами валового виробництва та споживання займає провідні позиції, поступаючись лише кукурудзі, пшениці та рису [1]. Стале виробництво картоплі, яка належить до стратегічних сільськогосподарських культур та має широкий спектр застосування, від виробництва продуктів харчування до кормів та сировини для харчової галузі економіки, має вирішальне значення для агропромислового комплексу України, а картоплярство залишається однією з пріоритетних його галузей, яка забезпечує продовольчу безпеку населення та має великий, нереалізований експортний потенціал. [2-3].

Згідно аналітичних даних FAOSTAT та Tridge, за останні декілька років Україна зміцнила свої позиції серед країн - найбільших виробників картоплі в світі та входить до трійки лідерів з часткою 5,68% світового виробництва картоплі, поступаючись лише Китаю (25,8%) та Індії (14,4%), випереджаючи за вказаним показником США (4,94%) та росію (4,87%) [4]. Попри таку високу частку у світовому виробництві картоплі, за експортом своєї продукції Україна займає лише 38 місце, що приблизно становить 0,11% серед всіх експортерів. Крім цього, показано, що незважаючи на наявність родючих ґрунтів та сприятливих агрокліматичних умов, урожайність картоплі в Україні схильна до коливань: від 120 ц/га у південних областях до більш ніж 180 ц/га у північних та західних областях [5], що у 3 рази менше у порівнянні з аналогічним показником розвинутих країн Європи та США [1]. Серед низки дестабілізуючих факторів, що негативно впливають на якісні і кількісні показники отриманого врожаю картоплі, окрім абіотичних чинників, що виражаються у вигляді дефіциту або надлишку у фізичному чи хімічному середовищі, включаючи температуру, вологість, світло та поживні речовини, визначальними є хвороби, спричинені фітопатогенними мікроорганізмами,

такими як віруси, гриби та бактерії. [6]. Серед збудників інфекційних хвороб, істотну роль у виробництві картоплі відіграють бактеріальні інфекції, які можуть спричинити втрати урожаю від 25 % до 50% у сприятливі роки [7].

Останні роки, науковці приділяють особливу увагу регульованому збуднику кільцевої гнилі картоплі *Clavibacter sepedonicus* відповідно ЕРРО, через масштабні території заселення та виявлення нових рослин-господарів, що призводить до катастрофічних фінансових втрат внаслідок накладання суворих фітосанітарних обмежень із заборонаю виробництва та експорту продукції [8-10]. Іншим шкодочиним мікроорганізмом, що відіграє провідну роль у всіх кліматичних зонах виробництва картоплі залишається *Pectobacterium atrosepticum*, основний етіологічний чинник чорної ніжки та м'якої гнилі картоплі, що призводить до зниження кількісних та якісних показників урожаю [10]. Вегетативне розмноження картоплі, зумовлене біологією рослини, та глобальне поширення через невибагливість до агрокліматичних умов [11] дозволяє фітопатогенним бактеріям латентно циркулювати у бульбах, а оптимальні умови зовнішнього середовища призводять до їх накопичення, що у кінцевому випадку веде до значних втрат урожаю. Широке розповсюдження виробництва картоплі та можливість бактеріальних інфекцій тривалий час латентно інфікувати бульби актуалізують моніторинг описаних вище збудників бактеріальних інфекцій в урожаї картоплі, а отримані дані дають можливість спланувати фітосанітарні заходи для зниження втрат та мінімізації поширення інфекцій.

Навколишнє середовище, рослини та інфекційні агенти тісно пов'язані між собою, а їх глибока взаємодія утворює трикутник хвороб та вказує на необхідність всіх компонентів для розвитку інфекційного процесу [12]. Глобальні зміни клімату, що характеризуються перерозподілом вологості та високою амплітудою коливання температур, впливають на біологічні властивості патогенів і рівень їх виживання, а також змінюють сприйнятливості рослини-господаря, що призводить до змін у впливі хвороб

на сільськогосподарські культури [13]. Мізерність та суперечливість наявних нині наукових досліджень щодо зв'язку між поширенням бактеріальних хвороб та агрокліматичних умов, вказує на важливість дослідження даного питання.

Також, варто зазначити, що згідно наказу Міністерства розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України №750 від 13.04.2021 «Про затвердження інструкцій з виявлення, локалізації та ліквідації деяких регульованих шкідливих організмів картоплі», відповідно до затверджених інструкцій, фітосанітарна експертиза (аналіз) з метою виявлення та діагностики збудників бурої бактеріальної та кільцевої гнилі картоплі проводиться відповідно до методів, зазначених у ДСТУ 4709:2006, стандартах Європейської і Середземноморської організації захисту і карантину рослин (ЄОЗКР), інших міжнародних, регіональних, галузевих або національних стандартах, з використанням рекомендованих виробниками обладнання або тест-систем, описаних у відповідних наукових чи науково-практичних фахових публікаціях, з урахуванням положень законодавства України про карантин рослин [14]. Такий широкий спектр дозволених до використання стандартів та методів, лише констатує той факт, що для України постає гостра потреба у розробці та впровадженні нових, оптимізації вже існуючих тест-систем з виявлення та діагностики вищезазначених збудників. Використання власних, уніфікованих методів фітосанітарної експертизи дозволить коректно дослідити наявність та поширення в агрофітоценозі України збудників бактеріальних гнилей картоплі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана у рамках науково-дослідної теми «Вирішення проблемних питань різноманітності та стрес-толерантності представників флори та мікобіоти України за глобальних змін клімату» (№ 16КФ036-07) на базі кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса

Шевченка. Молекулярно-біологічну та імунохімічну частину досліджень було виконано на базі відділу технічного розвитку та підтримки діагностичного центру ЗЗР ТОВ «Сингента». Автор висловлює вдячність керівництву та колективу ТОВ «Сингента» за неоціненну допомогу у проведенні експериментальних досліджень.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи була детекція латентного поширення фітопатогенних бактерій - збудників м'якої *Pectobacterium atrosepticum* та кільцевої *Clavibacter sepedonicus* гнилей у різних кліматичних умовах взаємодії господар : паразит та удосконалення методів їх діагностики.

Завдання дослідження:

1. Провести дослідження поширеності збудників м'якої гнилі і чорної ніжки *Pectobacterium atrosepticum* та кільцевої гнилі картоплі *Clavibacter sepedonicus* в урожаї картоплі на території України.
2. Проаналізувати взаємозв'язок між кліматичними умовами на території вирощування картоплі та поширенням збудників кільцевої та м'якої гнилі в урожаї картоплі.
3. Провести оцінку стійкості сортів картоплі, поширених на території України, до збудника м'якої гнилі та чорної ніжки.
4. Удосконалити методологію виявлення збудників бактеріальних гнилей картоплі.

Об'єкт дослідження: збудники бактеріальних гнилей картоплі *Pectobacterium atrosepticum* та *Clavibacter sepedonicus*.

Предмет дослідження: латентне поширення фітопатогенних бактерій - збудників м'якої *Pectobacterium atrosepticum* та кільцевої *Clavibacter sepedonicus* гнилей у різних кліматичних умовах взаємодії господар : паразит та методи їхньої детекції.

Методи дослідження: поставлені завдання у роботі були виконані з використанням мікробіологічних (культивування колекційних штамів

фітопатогенних мікроорганізмів), фітопатологічних (штучне ураження бульб картоплі для оцінки стійкості сортів картоплі до збудників бактеріальних гнилей картоплі), фізико-хімічних (виділення ДНК, електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації), молекулярно-генетичних (проведення ПЛР та ПЛР у реальному часі), імунохімічних (проведення сендвіч-варіанту ELISA), статистичних методів досліджень.

Наукова новизна отриманих результатів. Отримано нові дані щодо латентного поширення збудників бактеріальних гнилей в урожаї картоплі з 8 областей України, що відносяться до різних кліматичних зон, впродовж дворічного періоду 2020-2021 рр.

Уперше в Україні, виявлено статистично достовірні кореляційні зв'язки між рівнем латентного інфікування врожаю картоплі збудниками бактеріальних гнилей та кліматичними умовами на території їх вирощування. Встановлено сильну позитивну кореляційну залежність між показником гідротермічного коефіцієнта Селянінова у період вегетації картоплі та ступенем ураженості бульб збудником м'якої гнилі та чорної ніжки. Показано, що рівень латентного інфікування бульб збудником кільцевої гнилі позитивно корелює з температурою повітря у період посадки картоплі.

Розширено існуючі уявлення щодо чутливості бульб картоплі сортів, які найбільш поширені на території України, до збудника м'якої гнилі та чорної ніжки. Показано ступінь ураження пектолітичними бактеріями, що викликають м'яку гниль, лише частково узгоджується з генетичними характеристиками, заявленими виробником, і варіює залежно від умов вирощування.

Уперше встановлено посилення симптоматичних проявів м'якої гнилі за умов інкубації інокульованих бульб в лабораторних умовах за температури, вищої за оптимальну для даного збудника, що може вказувати на імовірне посилення патогенності *P. atrosepticum* в умовах глобальних змін клімату.

Розроблено пару праймерів, яка може бути використана для якісної та кількісної детекції збудника м'якої гнилі картоплі *P. carotovorum subsp. carotovorum*.

Практичне значення одержаних результатів. Результати моніторингу латентного інфікування врожаю картоплі збудниками бактеріальних гнилей можуть бути використані для прогнозування поширення інфекцій на території України.

Оптимізовано протокол детекції та кількісного визначення представників комплексу видів *Ralstonia solanacearum* методом ПЛР у реальному часі, який може бути використаний для діагностики і моніторингу бактеріального в'янення та бурої гнилі картоплі.

Сконструйовано праймери, що можуть бути використані для розробки ПЛР-системи щодо якісної та кількісної детекції збудника м'якої гнилі картоплі *P. carotovorum subsp. carotovorum*.

Результати дисертаційної роботи застосовуються в навчальному процесі кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка при викладанні дисципліни «Фітопатогенні бактерії» для студентів ОР Бакалавр ОПП «Біологія».

Особистий внесок здобувача.

Дисертаційна робота є самостійним та оригінальним науковим дослідженням, а викладені в ній результати, матеріали, узагальнення та висновки виконано особисто автором. Дисертанткою самостійно проведено аналіз наукової літератури, інформаційний пошук, планування дослідів та експериментів, розробка схем дослідження, отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки. Формування ідеї роботи, формулювання мети та завдань дослідження, обговорення отриманих

результатів та їх інтерпретацію, формулювання висновків проведено за участі наукового керівника д.б.н., професора Л.М. Сківки.

Автор висловлює глибоку вдячність провідному науковому співробітнику відділу фітопатогенних мікроорганізмів, Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, д.б.н., проф., академіку НААН України В.П. Патиці за надання колекційних культур фітопатогенних бактерій; доценту кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини», к.б.н. Ю. М. Юміні на допомогу в організації фітопатологічних досліджень. Окрему вдячність висловлює керівникам діагностичних центрів відділу технічного розвитку та підтримки ЗЗР ТОВ «Сингента», к.б.н. Шевченко Ю. та Кучер А. за допомогу та підтримку у проведенні лабораторних досліджень. Співучасть колег у виконанні роботи відображена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації.

Результати дисертаційної роботи були представлені на Всеукраїнській науково-практичній онлайн-конференції, присвяченій 60-річчю ІСМАВ НААН (26-27 жовтня 2021, Чернігів); IV International Scientific Conference «Microbiology and Immunology– the development outlook in the XXI Century» (September 22-23 2022, Kyiv); XIII Всеукраїнській науково-практичній конференції (10-11 жовтня 2022, Житомир); XIX Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «МОЛОДЬ І ПОСТУП БІОЛОГІЇ», присвячена 90-річчю від дня народження академіка НАН України, професора Шеляга-Сосонка Юрія (26-28 квітня 2023, Львів); XVI Всеукраїнській науково-практичній онлайн-конференції молодих вчених "Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві" (25 жовтня, Чернігів); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти мікробіології, вірусології та біотехнології у воєнний та післявоєнний час» (15-16 листопада 2023, Київ).

Публікації.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 10 праць: 4 статті, з яких 3 - у вітчизняних наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України категорії Б та 1 стаття у фаховому періодичному виданні, рекомендованому МОН України категорії А, індексованому у наукометричній базі SCOPUS, а також 6 тез наукових доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків, списку використаних літературних джерел (265 посилань) та додатків. Загальний обсяг дисертації складає 186 сторінок, з яких 124 сторінки основної частини. Робота ілюстрована 10 таблицями та 32 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Виробництво картоплі та її економічне значення для України

Картопля (*Solanum tuberosum* L.) відноситься до стратегічно важливих сільськогосподарських культур світового виробництва, що забезпечує продовольчу безпеку і добробут населення [3, 15]. Вона займає лідуєче місце за різноманітністю використання та є неоціненною продовольчою, кормовою і технічною культурою у народному господарстві [4].

Картопля належить до родини Пасльонових (*Solanaceae*) та налічує близько 90 родів і 2800 видів [16-17]. Культивована картопля відноситься до виду *Solanum tuberosum* та поділяється на два підвиди. До першого підвиду належать культивовані сорти *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, життєвий цикл яких пристосований до довгих днів і, ймовірно, походить від першої інтродукції в Європу. Другий підвид, *S. tuberosum* subsp. *andigena*, що пристосований до умов короткого дня, включає південноамериканські місцеві сорти, які зазвичай вирощується в Андах [18]. Сучасна комплексна таксономічна класифікація картоплі налічує вісім культурних та 228 диких видів, розділених на 21 таксономічну серію, включаючи 19 серій (секцій) для бульбоносних видів і дві серії (секції) для небульбоносних видів [17,19].

Картопля вважається важливою культурою в розвинутих країнах і країнах, що розвиваються, через її універсальне використання. Близько 85% біомаси картоплі є їстівною, що є вищим показником, а ніж 50% їстівної біомаси зернових [20 - 21]. Високі смакові якості та сприятливий для здоров'я людини хімічний склад і визначають продовольчу цінність бульб картоплі [22]. Дослідження показали, що картопля є важливим джерелом вуглеводів, стійкого крохмалю, білків, вітамінів С і В₆, а також калію [23]. Картопля також є джерелом антиоксидантів, які можуть сприяти запобіганню як

дегенеративним, так і віковим захворюванням, причому лютеїн і зеаксантин присутні у великих кількостях у картоплі з жовтою м'якоттю [22-24], а антоціани присутні у фіолетовій і червоній м'якоті. Вона також містить глікоалкалоїди, які у високих концентраціях є токсичними для людини, однак в низьких концентраціях можуть мати корисні ефекти, такі як пригнічення росту ракових клітин [25 - 26]. Концентрація стійкого крохмалю, білка, ліпідів, калію, фосфору, магнію, заліза, цинку, вітамінів С і В₆, хлорогенової кислоти та глікоалкалоїдів має діапазон варіацій незалежно від кольору м'якоті [25, 27]. Наприклад, картопля з жовтою м'якоттю має більшу концентрацію каротиноїдів, ніж картопля з білою м'якоттю, а фіолетова картопля має вищу концентрацію антоціанів, ніж картопля з червоною або білою м'якоттю [27-28].

Бульби картоплі широко використовують і у тваринництві в сирому та запареному вигляді. На корм використовуються також силос із зеленого бадилля картоплі та продукти валоризації відходів промислової переробки бульб [29]. За даними FAO, у 2021 році у всьому світі було вироблено 376 мільйонів тон картоплі. Очікується, що у 2030 році може утворитися близько 8000 кілотон відходів картопляної шкірки, з відповідними викидами парникових газів 5 мільйонів тон CO₂ еквівалента. Крім кормів для тварин, технічні процеси в картоплепереробній промисловості утворюють відходи органічних залишків з великою кількістю біологічно активних сполук і вуглеводів, і, таким чином, процеси екстракції та біоконверсії цих відходів можуть дозволити виробляти високоцінні продукти з виділенням функціональних інгредієнтів для створення харчових добавок і фармацевтичних продуктів, продуктів, пов'язаних з біоенергетикою, ферментів, добрив тощо [30]. При вирощуванні картоплі на корм, вихід кормових одиниць з 1 га може перевищувати 5,5-6 тис. [31]. Картопля, як технічна культура, цінна сировина для виробництва спирту, крохмалю,

глюкози, декстрину, сивушного масла, вуглекислоти та інших похідних [32 - 33].

Відповідно до відкритих даних FAO картопля як сільськогосподарська культура утримує 3 позицію (рис.1.1.) серед вироблених сільськогосподарських культур у світі після кукурудзи (*Zea mays* L.), рису (*Oryza sativa* L.) та пшениці (*Triticum aestivum* L.) [1, 34].

Виробництво картоплі у світі з 1961 року зросло з 270 млн т до більше ніж 370 млн т у 2021 році. Збільшення виробництва пов'язане насамперед із постійним підвищенням потенціалу врожайності сортів картоплі, оскільки площа, яка відведена під картоплю, зменшилася з 22,14 млн га до 18,1 млн га за той же період [1, 20].

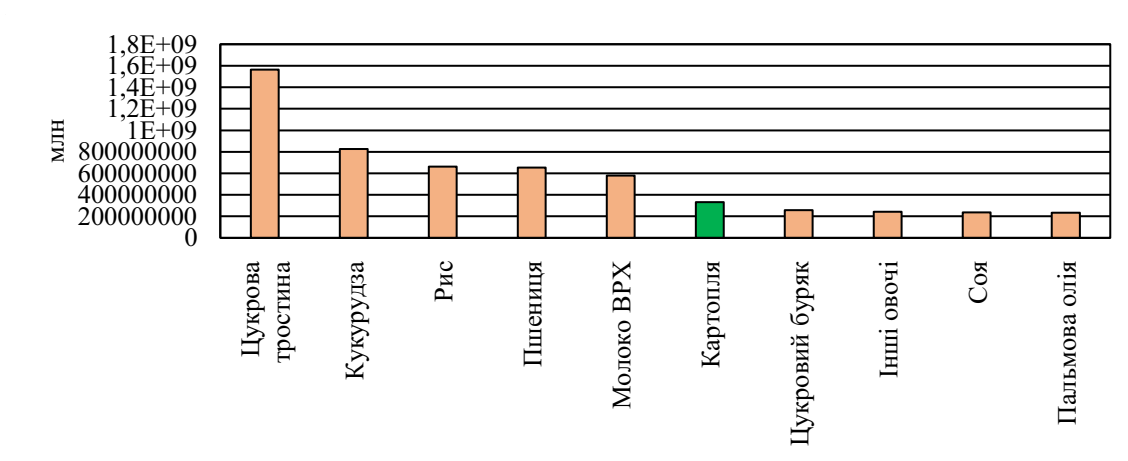


Рис.1.1. Середній показник з 1994-2021 рр. виробництва 10 основних сільськогосподарських культур у світі. Джерело: побудовано автором за даними FAOSTAT [1]

У світовому сільському господарстві у 2021 році, 18,1 млн га земельних угідь було задіяно для виробництва картоплі, урожайність котрої склала 376,1 млн т. Азія була і залишається найбільшим у світі виробником картоплі, із зібраним урожаєм у 195,5 млн т, що складає 53,2% світового виробництва (рис.1.2.). Європа виробила більше чверті – 27,3% загальносвітового врожаю

(102,5 млн т), а більше 77% виробництва картоплі у 2021 році у Європі припало на Україну, рф, Німеччину, Францію, Польщу, Королівство Нідерланди та Велику Британію з сумарним валовим збором у 79,01 млн т.

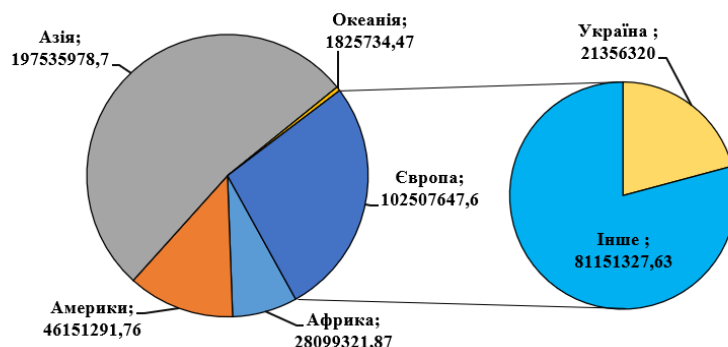


Рис.1.2. Частка виробництва картоплі по регіонах світу у 2021 році
Джерело: побудовано автором за даними FAOSTAT [1]

В Північній та Південній Америці виробництво картоплі сягало 46,15 млн т, що у 1,6 рази більше у порівнянні з показниками виробництва у Африці – 28,1 млн т [1].

Україна входить до п'ятірки найбільших країн-виробників картоплі, з валовим урожаєм у 20,82 млн т, поступаючись Китаю (92,2 млн т) та Індії (50,994 млн т) за котрими йдуть рф, США, Німеччина, Бангладеш, Франція, Польща та Нідерланди з сумарним виробництвом у 82,65 млн т (рис.1.3.).

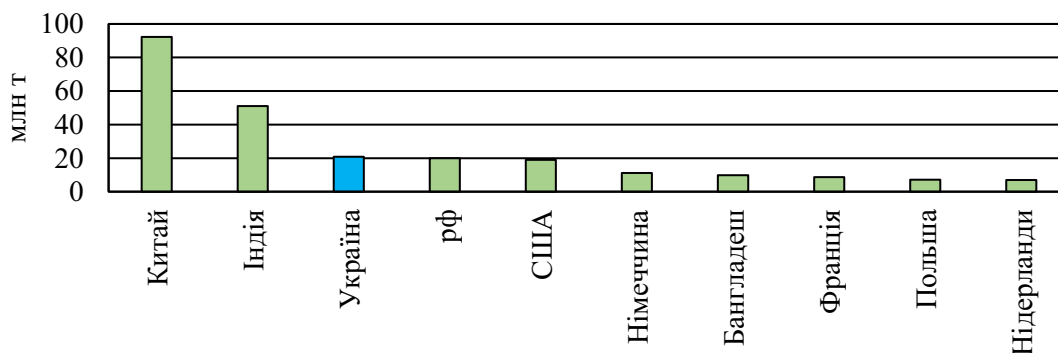


Рис.1.3. Світові лідери виробництва картоплі у 2021 році
Джерело: побудовано автором за даними FAOSTAT [1]

Картоплярство було і залишається пріоритетною сферою сільського господарства в Україні [3].

Відповідно, до офіційних даних Державної служби статистики України було зареєстровано близько 22556 тис. га земельних угідь у 2022 році під посів основних сільськогосподарських культур (рис.1.4.). Більше 6,0% від загальної площі угідь було використано для вирощування коренеплодів та бульбоплодів, овочевих та баштанних продовольчих культур. З них, 1207,7 тис. га були виділені для виробництва картоплі, що у перерахунку складає більше 70% сільськогосподарських земель на яких вирощуються коренеплоди, бульбоплоди, овочеві та баштанні культури для продовольства [5].

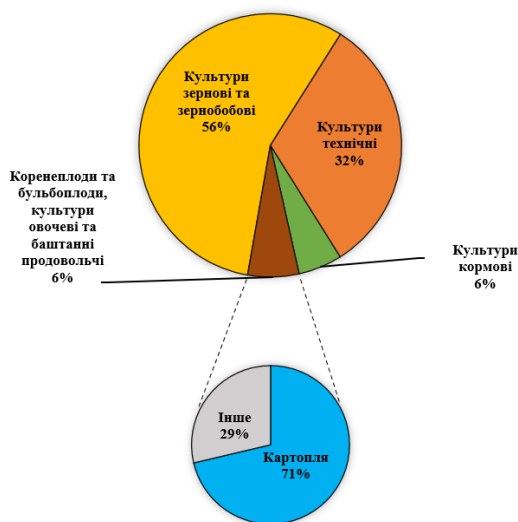


Рис.1.4. Прощі посіву в Україні під сільськогосподарські культури у 2022 році [5]

Як відомо, основне виробництво картоплі в Україні зосереджено в господарствах населення, частка якого склала 97,9% (1581,2 тис. га) у 2022 році від загальної зареєстрованої площі під картоплю (рис.1.5.) [22]. Дана тенденція щодо площ під виробництво картоплі прослідковується доволі довгий період часу та вказує на те, що виробництво картоплі відбувається у

примітивних умовах сільськими домогосподарствами на присадибних ділянках [5, 35].



Рис.1.5. Посівна площа під урожай картоплі в розрізі господарств різних категорій [5]

Протягом останніх 10 років спостерігалось коливання посівних площ картоплі у господарствах всіх категорій (рис.1.6.). У державній статистиці на 2013 рік було зареєстровано 1394,1 тис. га під виробництво картоплі, однак починаючи з 2014 року посівні площі почали зменшуватись до 1291,0 тис. га у 2015 році. Часткове зростання площ під картоплю спостерігалось протягом наступних кількох років до 1323,2 тис. га у 2017 році, однак у 2018-2019 роках площі зменшились до 1308,9 тис. га. Істотне збільшення площ під картоплю на 1,3% було зареєстровано у 2020 році, у порівнянні з посівними площами 2019 року. Зменшення посівних площ у 2014 та 2022 роках, у першу чергу, пов'язано з військовою агресією російської федерації у 2014 році та повномасштабною війною російської федерації проти України у 2022 році. У той же час, показники урожайності картоплі у період з 2013 по 2022 роки характеризувались циклічністю: найвищі показники були зареєстровані у 2014 (23693 тис. т), 2018 (22504 тис. т) та у 2021 роках (21356 тис. т), тоді як мінімальні показники виробництва були зареєстровані у 2015 (20839 тис. т) та 2019 (20269 тис. т) роках, що вказує на те, що зменшення посівних площ під

картоплю опосередковано вплинуло на валовий збір даної сільськогосподарської культури [5].

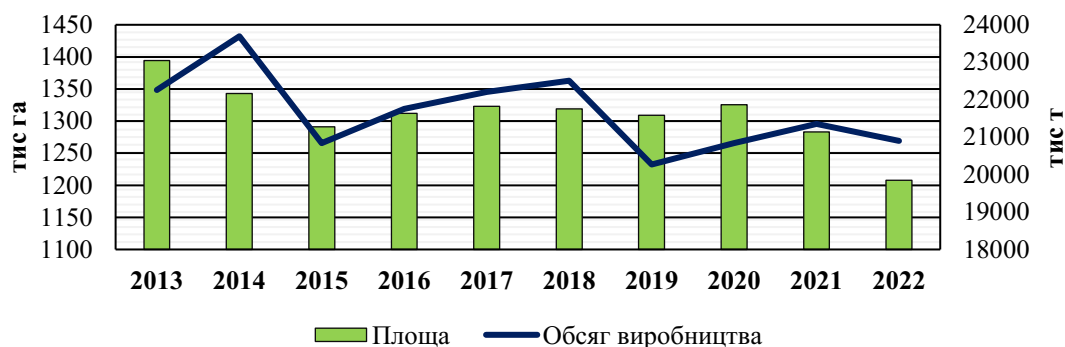


Рис. 1.6. Площі та обсяг виробництва картоплі в Україні у період 2013- 2022 років. *Дані наведено без урахування тимчасово окупованої території Автономної Республіки Крим, м. Севастополя та частини тимчасово окупованих територій у Донецькій та Луганській областях та тимчасово окупованих російською федерацією територій та частини територій, на яких ведуться (велися) бойові дії.

Оптимальні природно-кліматичні умови в Україні дозволяють реалізовувати виробництво картоплі майже на всіх її територіях. На Поліссі наявні оптимальні агрокліматичні умови для вирощування картоплі, де наявність чорноземів дозволяє отримувати найвищі показники врожайності. У низовинах Полісся, а саме на півночі та заході країни, можна отримати найбільший урожай картоплі [3, 36]. Найбільша кількість площ під виробництво картоплі у 2022 році в Україні зосереджена у Вінницькій (105,7 тис. га), Львівській (98,9 тис. га) та Житомирській областях (90,5 тис. га). Відтак, найбільші посівні площі у даних областях майже у 2 рази перевищували середній показник посівних площ картоплі в Україні, що становить 52,5 тис. га. (рис.1.7.) Хоч у Вінницькій області зосереджена найбільша кількість площ, однак урожайність у 17472,3 тис. ц поступається у середньому майже на 1200 тис. ц Житомирській та Львівській областям з

урожайністю у 18969,2 тис. ц та 18309,5 тис. ц відповідно. У той самий час, середня урожайність картоплі по областях України становила 164,8 ц/га та коливалась від 113,9 ц/га у Миколаївській області до 232,7 ц/га у Полтавській області [5].

Висока врожайність та валовий збір картоплі в Україні не забезпечили збільшення експорту даної культури. На ринку експорту Україна ніколи не займала провідних позицій. На січень 2022 року було експортовано свіжої картоплі у 19 країн світу, а найбільше до Азербайджану 2609,7 т, Білорусі 2637,48 т та Молдови 328,050 т. Низький рівень експорту картоплі зумовлений, у першу чергу, не конкурентоспроможністю картоплі, високим рівнем витрат під час вирощування, збору та зберігання, застарілими сільськогосподарськими технологіями та не повною мірою використаним потенціалом сортів картоплі [3, 37].

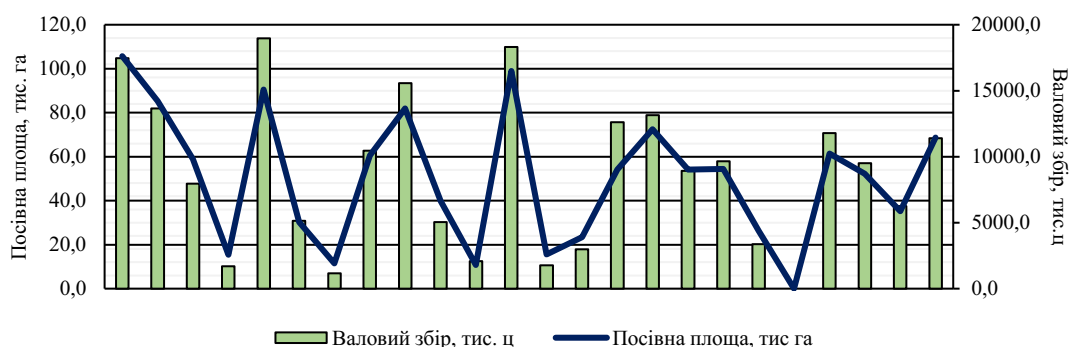


Рис. 1.7. Посівна площа та валовий збір урожаю картоплі у 2022 році у розрізі областей України. *Дані наведено без урахування тимчасово окупованих російською федерацією територій та частини територій, на яких ведуться (велися) бойові дії. Інформація сформована на основі фактично поданих підприємствами звітів Державній службі статистики України (рівень звітування становив 82%) та проведених дооцінок показників.

Загально відомо, що урожайність картоплі в Україні, більше ніж у 3 рази, менша за аналогічний показник у США, Канаді, країнах ЄС та Австралії [1,

38]. У першу чергу, зниження даного показника пов'язано з впливом на виробництво як абіотичних факторів (родючість ґрунту, водопостачання, заморозки та посухи), так і біотичних факторів (вірусних, бактеріальних, грибних, паразитарних інфекцій), які можуть спричинити до 20% втрат світового виробництва картоплі [39].

1.2. Основні хвороби картоплі

Картопля належить до сільськогосподарських культур, що схильні до значного ураження фітопатогенними мікроорганізмами [7]. Основною особливістю картоплі є наявність легкодоступних для збудників хвороб, соковитих стебел та бульб, що і лімітує отримання високих врожаїв [40 - 42]. В основному виробництво картоплі відбувається вегетативно за допомогою материнських (насіньових) бульб, хоча можливе також статеве розмноження за допомогою ботанічного насіння, яке називається справжнім насінням картоплі [43].

Саме вегетативне розмноження картоплі, через насінньові бульби, дає можливість збудникам більшості хвороб циркулювати в популяції з року в рік за схемою бульба-рослина-бульба [7,42]. Підвищена сприйнятливість картоплі до шкідників і хвороб, ймовірно, пов'язана з втратою генетичного різноманіття в результаті традиційних методів селекції [44]. Наприклад, відбір бульб зі зниженою гіркотою призвів до зниження рівня метаболітів глікоалкалоїдів, що відлякують комах, у листі, тим самим потенційно посилюючи пошкодження комахами [18].

Шкідники та хвороби є основними перешкодами, з якими стикаються фермери, які вирощують картоплю. Хвороби спричинені патогенними організмами, можуть виникнути на різних етапах виробництва від посадки до збирання врожаю та зберігання [45]. Картопля (*Solanum tuberosum*) може

уражуватись понад сотнею видів шкідників і хвороб, спричинених комахами, нематодами, вірусами, бактеріями та грибами [46 - 47].

Грибкові хвороби картоплі

Останніми роками грибкові захворювання сільськогосподарських культур стають все більш критичними, оскільки вони серйозно впливають на врожайність і якість культур та стали виключно важливою перешкодою для розвитку сталого сільського господарства [48].

До найпоширеніших збудників хвороб грибної етіології відносять: ооміцетний збудник *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 1876 збудник фітофторозу [49]; некротрофний збудник *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn 1858 (телеоморфа *Thanatephorus cucumeris*) який викликає чорну паршу (ризоктоніоз), кореневі гнилі та в'янення рослин у полі [50 -51]; ґрунтовий облігатний біотрофний хітридієвий гриб *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Percival 1909, що призводить до раку картоплі, карантинної хвороби культивованої картоплі [52 - 53]; аскоміцетний гриб *Helminthosporium solani* Durieu & Mont 1849 збудник сріблястої парші [54-55]; ураження *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes 1958 призводить до чорної крапковості картоплі або антракнозу [56-57]; аскомікотовий гриб *Phoma exigua* викликає фомозну гниль або ж гангрену картоплі [58] і на додаток понад 17 видів грибів роду *Fusarium*, можуть викликати суху фузаріозну гниль картоплі [59] серед яких домінують (*Fusarium sambucinum* Brondeau 1855 (анаморфа *Gibberella pulicaris*), *Fusarium graminearum* Schwabe 1839 (анаморфа *Gibberella zeae*), *Fusarium oxysporum* Schltdl. 1824 (анаморфа *Hypocreales*), *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. 1881 (анаморфа *Nectria haematococca*))[60-61]. Вирішальну роль у взаємодії між господарем і патогеном та вважаються другорядною детермінантою патогенності та основною зброєю видів *Fusarium* у розвитку сухих гнилей у картоплі відіграють мікотоксини [62-63]. Мікотоксини, спричиняють цито-, гено-, нейро- та гепатотоксичну дію на тварин та людину і можуть призводити до імуносупресивного ефекту через їх численні

інгібіторні впливи на функції еукаріотичних клітин, у тому числі клітин імунної системи [64].

Втрати картоплі під час вегетації та урожаю бульб може сягати 100% для збудників фітофторозу та раку картоплі [65-66]; до 30% втрат призводить ризоктоніоз картоплі, впливаючи на якісний і кількісний урожай бульб картоплі[67]; від 6,25 до 25 % втрат спостерігається при розвитку сухої фузаріозної гнилі щорічно, а при пошкодженні бульб картоплі — до 60 % [68]; до 12% втрат врожайності призводить розвиток антракнозу на картопляних полях [69], а ураження сріблястою паршею, призводить до близько 17% втрат якісних показників бульб картоплі через втрату води та усадку [70].

Вірусні хвороби картоплі

На даний час відомо понад 50 різних вірусів і один віроїд, що інфікують картоплю в усьому світі, однак лише кілька з них спричиняють значні збитки в глобальному масштабі [71]. В Україні та світі серед вірусних інфекцій домінують: Y вірус картоплі (PVY, рід *Potyvirus*) [72-74], вірус скручування листя картоплі (PLRV, *Polerovirus*) [75-77], X вірус картоплі (PVX, *Potexvirus*), S вірус картоплі (PVS, *Carlavirus*) [78], A вірус картоплі (PVA, *Potyvirus*) [79-80], M вірус картоплі (PVM, *Carlavirus*) [81] та віроїд веретеноподібності бульб картоплі (PSTVd) [82].

До прикладу, важкі штами PVY і PLRV можуть знизити врожайність до 80%, тоді як легкі віруси, такі як PVX, PVS і M вірус картоплі (PVM), можуть спричинити втрату до 30% врожаю [77].

А продуктивність рослин, заражених одночасно PVX і PVM, знижується до 60%, а при зараженні комплексом PVX + PVM + PVY - на 83,7%, тобто рослини практично не дають врожаю [83].

Разом з тим, збудники бактеріальних хвороб уражають картоплю у всьому світі та завдають серйозної шкоди, особливо бульбам, економічно найважливішій частині рослини. Бактеріальне в'янення та бура гниль картоплі

збудником яких є комплекс видів *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. та представники родів *Pectobacterium* та *Dickeya*, що викликають чорну ніжку і м'яку гниль, вважаються найважливішими хворобами. Тоді як кільцева гниль картоплі – збудник *Clavibacter sepedonicus* та звичайна парша, що викликається комплексом видів роду *Streptomyces* є другорядними. А надзвичайно рідкісним явищем, оскільки зустрічається в дуже ізольованій місцевості, вважається хвороба зебрової штрихуватості, яку викликає «*Candidatus Liberibacter solanacearum*» [84-86]. «*Candidatus Liberibacter solanacearum*» це грамнегативна бактерія, облигатний паразит, що розмножується у флоемі рослин, що призводить до економічно важливої інфекції, яка вже задокументована у комерційних сферах Північної та Центральної Америки та Нової Зеландії. У США втрати врожаю картоплі, від даного збудника, за оцінками, сягали до 100% [87-88].

1.2.1. Бура бактеріальна гниль картоплі

Серед економічно важливих фітопатогенних видів бактерій β -протеобактерія *Ralstonia solanacearum*, родини *Burkholderiaceae*, становить особливий інтерес для наукової спільноти через: глобальне поширення збудника; широкий діапазон господарів, що складає понад 450 видів рослин у 54 родинях; агресивність у різноманітних умовах навколишнього середовища та чудову здатність зберігати гени патогенності за відсутності рослини-господаря [89]. Хвороба, викликана цим бактеріальним патогеном, широко відома як бактеріальне в'янення, однак має кілька інших назв, таких як бура гниль картоплі, в'янення тютюну за Гранвілем, хвороба мокко бананів та інші назви відповідно до рослини-господаря [90-91]. *R. solanacearum* була зазначена як друга за шкодочиністю серед фітопатогенних мікроорганізмів та занесена до переліку карантинних мікроорганізмів Європейською

організацією захисту та карантину рослин [92-94]. Втрати врожаю через цей патоген у всьому світі надзвичайно важко оцінити через нерегулярність збору даних, але незважаючи на це, J. Elphinstone у 2015 році повідомив про щорічні збитки, що досягають одного мільярда доларів США [9].

У 1895 році E. F. Smith виділив збудника бактеріального в'янення помідорів та картоплі, а дослідження біології, патогенності та характеру симптомів, виражених у багатьох господарів, змусили назвати новий вид бактерій — *Bacillus solanacearum*, який згодом був рекласифікований до роду *Pseudomonas* [95]. У 1962 році Buddenhagen, Sequeira та Kelman виділили п'ять рас *Pseudomonas solanacearum*, спираючись на відмінності патотипу, типу колонії, серотипу, біохімічного типу, лізотипу, і діапазону господарів та шість біоварів за здатністю штамів окиснювати три дисахариди (сахарозу, мальтозу, лактозу) і три гексозні спирти (маніт, сорбіт, дульцитол) [96].

У 2005 році класифікація раса/біовар була замінена Fegan та Prior на систему філотип - секвевар. Суть якої полягала у поділі штамів на філотипи на основі аналізу послідовності регіону внутрішньо транскрибованого спейсеру з додатковим поділом на секвевари на основі часткових послідовностей гена ендоглюканази (*egl*) [97]. Вважається, що філотипи корелюють із географічним походженням штамів: філотип I (Азія), філотип II (Америка), філотип III (Африка) та філотип IV (Індонезія) [98].

В останній класифікації 2014 року фенотипова характеристика, включаючи аналіз складу жирних кислот цілої клітини, базовий склад ДНК, гібридизацію ДНК-ДНК, аналіз генів внутрішнього транскрибованого спейсеру (ITS) та ендоглюканази (*egl*), призвела до опису трьох видів у межах комплексу видів *R. solanacearum*: *R. solanacearum*, що включає всі штамів філотипу II; *Ralstonia pseudosolanacearum*, яка містить філотипи I і III та *Ralstonia syzygii*, що корелює зі штамів філотипу IV [99-100].

Через нещодавню рекласифікацію комплексу видів *R. solanacearum*, більшість біологічних та епідеміологічних знань було отримано саме для комплексу видів, а не на рівні філотипу/виду [98]. Як зазначено вище, комплекс видів *R. solanacearum* поширений у всьому світі, частково завдяки широкому спектру господарів (рис.1.8.), а також завдяки розвитку масової зовнішньої торгівлі між країнами [101]. Описані представники роду *Ralstonia* спричиняють бактеріальне в'янення широкого спектру сільськогосподарських культур, у першу чергу, представників родини Пасльонових, таких як картопля, помідори та баклажани, а також інших важливих культур, таких як соняшник, гарбуз, кабачки, тютюн, фруктовий банан [102].

Комплекс видів *R. solanacearum* є ґрунтовими грамнегативними рухливими бактеріями, однак основним джерелом бактеріального збудника також виступають уражені бульби картоплі та насіння сільськогосподарських культур зібраних з уражених збудником рослин [103-104]. Було показано, що бактерії виживають у життєздатній, але некультивованій формі в умовах стресу в ґрунті та воді, але епідеміологічне значення цього явища не до кінця вивчено [9].

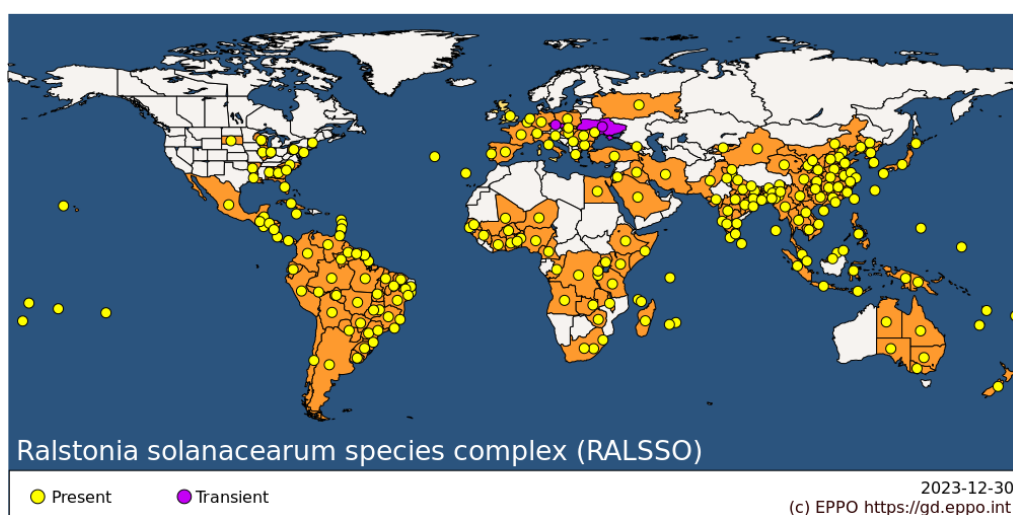


Рис.1.8. Поширення комплексу видів *Ralstonia solanacearum* у світі відповідно до даних Європейської організації захисту і карантину рослин. Примітка: жовте коло – збудник присутній у країні, фіолетове коло – збудник тимчасово присутній[105]

Розвиток та протікання захворювання відбувається при температурі 24–35°C. Висока інтенсивність поширення хвороби спостерігається при високій вологості ґрунту або у періоди вологої погоди/сезону дощів. [86, 106]. Розвиток та інтенсивність бактеріального в'янення залежить від патогенності та вірулентності штамів. Вірулентність штамів є кумулятивною і складною та зазвичай включає кілька факторів вірулентності [107]. На різних стадіях інфекції штами *Ralstonia* використовують різноманітні фактори вірулентності, щоб сприяти розвитку захворювання [108-109], застосовуючи ліпополісахарид (ЛПС), ферменти, що руйнують клітинну стінку, таких як пектинази, полігалактуронази, ендоглюканаза, пектинметилестераза, целобіогідролаза і ДНКазы та ферменти, які детоксикують активні форми кисню, як захисний фактор рослини [102, 110].

Наприклад, ЛПС є основним фактором вірулентності, який підвищує швидкість і ступінь поширення інфекції від кореня до стебла, пригнічує потік води в них, викликаючи в'янення та загибель рослин [111]. Диференційно-діагностичною ознакою ураження вегетативної маси рослин даним бактеріальним збудником є білі тонкі тяжі (нитки) бактеріального слизу, що виділяються з судинних пучків зрізаних стебел уражених рослин, поміщених у воду [86]. Бульби уражені штамми *Ralstonia* залежно від стану хвороби можуть бути без візуальних ознак хвороби або ж мати побуріння та некроз судинного кільця і прилеглих тканин м'якуша з подальшим виділенням бактеріального ексудату при розрізі. При сильному ураженні виділення ексудату може спостерігатись з вічок та місць прикріплення стolonів, що призводить до налипання ґрунту [112-113].

Боротьба зі збудником захворювання залишається обмеженою та ускладнюється здатністю патогенів виживати у рослинних рештках та безсимптомно у бур'янах, які діють як резервуари інокуляту. Профілактика бактеріального в'янення значною мірою залежить від наявності вільного від

патогену садивного матеріалу, ефективного спостереження та моніторингу бактеріального збудника у насіннєвому матеріалі та врожаї картоплі [114]. Дезінфекція агротехнічного обладнання, що використовується на всіх етапах виробництва картоплі, вважається ефективним профілактичним заходом щодо поширення збудника на ділянках виробництва картоплі [115]. А в районах, де збудник може поширюватися в забрудненій зрошувальній воді, заборона зрошення поверхневими водами є ефективним заходом боротьби [116]. Сурові карантинні вимоги країн-експортерів, глобальні фітосанітарні дослідження насіннєвого матеріалу, полів вирощування та урожаю дозволили призупинити масштабне поширення карантинного збудника бактеріального в'янення та бурої гнилі картоплі, комплексу видів *Ralstonia solanacearum*. Однак, моніторинг збудника у насіннєвому матеріалі висуває жорсткі умови щодо інформативності і точності проведення діагностичних досліджень. Зважаючи на велику різноманітність представників комплексу видів *Ralstonia solanacearum*, доцільною є розробка діагностичних систем для виявлення представників, які циркулюють на даній території.

1.2.2. Кільцева гниль картоплі

Іншою небезпечною карантинною хворобою, яка присутня в основних регіонах виробництва картоплі, є кільцева гниль картоплі, яку викликає *Clavibacter sepedonicus* [117]. Збудник кільцевої гнилі, як і збудник бурої гнилі картоплі внесений до списку А2 карантинних об'єктів ЕРРО (рис.1.9.) [8].

О. Appel у 1905 році описав раніше незареєстроване бактеріальне захворювання під назвою «кільцева гниль картоплі» з описом збудника *Bacterium sepedonicum*, який пізніше був змінений на *Aplanobacter sepedonicus* та описував нерухому паличкоподібну бактерію. У 1942 році W. J. Dowson перевів описані раніше грампозитивні коринєформні фітопатогенні бактерії в

рід *Corynebacterium*, а збудника кільцевої гнилі картоплі назвали *Corynebacterium sepedonicum* [118].

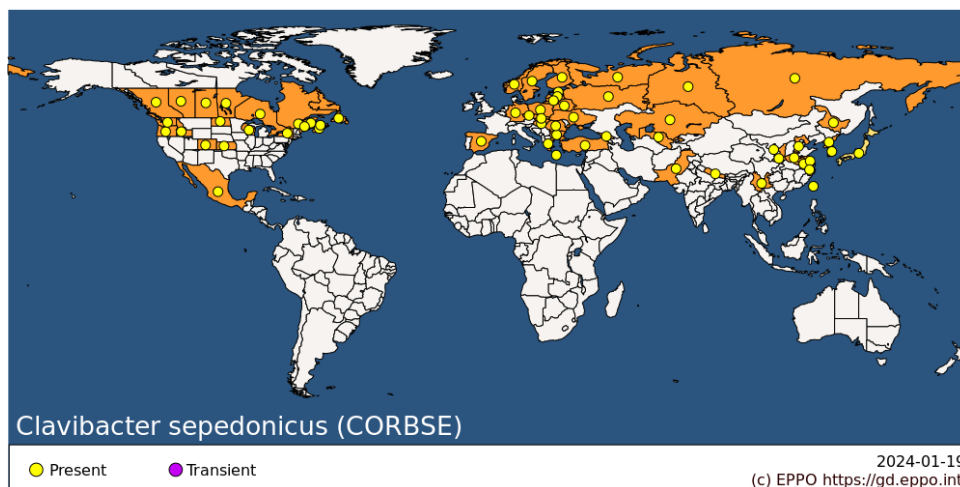


Рис.1.9. Поширення *Clavibacter sepedonicus* у світі відповідно до даних Європейської організації захисту і карантину рослин [119]. Жовте коло – збудник присутній у країні, фіолетове коло – збудник тимчасово присутній

Назва *Corynebacterium sepedonicum* використовувалася більше 40 років, поки Davis et al. не запропонували рід *Clavibacter* для грамозитивних коринеформних бактерій, що містять 2,4-діаміномасляну кислоту як компонент пептидоглікану клітинної стінки. Збудник кільцевої гнилі був перекласифікований як підвид типового виду *C. michiganense* та до кінця 1980-х років називався *C. michiganense* subsp. *sepedonicum*. Однак, згідно з правилами номенклатури таксономії бактерій, у наступні роки назва була змінена на *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* [120].

Повторна класифікація представників роду *Clavibacter* на шість нових видів була запропонована Li et al у 2018 році, на основі порівнянь геномних послідовностей [121]. Порівняльний геномний і філогенетичний аналізи з використанням загальнодоступних послідовностей геномів роду підтверджують класифікацію, запропоновану Li et al, що *C. sepedonicus* є монофілетичним таксоном та включає лише штами, виділені із картоплі [122].

Основним та головним господарем для збудника *Clavibacter sepedonicus* залишається картопля, однак нові повідомлення вказують на те, що уражуються й інші представники родини Пасльонові, такі як томат, баклажан [120, 123]. *Clavibacter sepedonicus* - грампозитивна плеоморфна бактерія [86], що може виживати на контамінованих збудником поверхнях сільськогосподарського обладнання, протягом багатьох років, однак основним джерелом інфекції залишаються інфіковані бульби картоплі [124]. Збудник кільцевої гнилі має доволі низьку оптимальну температуру росту 21–23 °С і приурочений переважно до прохолодніших регіонів вирощування картоплі [9].

Оскільки інфекція найчастіше починається з бульб, інфікована судинна тканина стає жовтуватого кольору та сирнистої текстури, унаслідок вироблення збудником целюлаз та інших позаклітинних ферментів, у тому числі полігалактуронази, пектинліази, ксиланази, що призводить до розвитку симптомів [86]. У міру розвитку гнилі, тріщини на поверхні бульб можуть стати видимими безпосередньо під перидермою. Через подібність симптомів ураження бульб *Clavibacter sepedonicus* можна сплутати з ураженнями викликаними комплексом видів *Ralstonia solanacearum* [123]. Прояв ураження у полі може варіювати від легкого в'янення вегетативної маси з інтенсивним розвитком бульбової форми хвороби до в'янення, що призводить до загибелі вегетативної маси у ранні строки та незначним розвитком бульбової форми в залежності від температури та вологості у вегетаційний період. Хоч прямі втрати через в'янення та загнивання бульб у полі та при зберіганні зазвичай помірні, тим не менш, кільцева гниль є обмеженням для виробництва насінневої картоплі, що має значний непрямий вплив на торгівлю[9].

Контроль даного збудника за відсутності ефективних хімічних або біологічних заходів боротьби, досягається, в першу чергу, застосуванням суворих правил карантину та сертифікації насіння, що дозволяє на ранніх етапах виявити латентну інфекцію та виключити уражені партії з програм посіву до того, як почнеться подальше поширення патогену. Фітосанітарні

заходи повинні бути спрямовані на всю систему виробництва картоплі, а здійснення сівозміни, використання цілого, а не нарізного садивного матеріалу, проведення дезінфекції сільськогосподарського обладнання та інших санітарних заходів відіграє фундаментальну роль у запобіганні захворюванню [125-128].

За оцінками, прямі втрати врожаю становлять понад 50%. з польових випробувань у Норвегії та США, а у Європі економічний вплив спричинений збудником кільцевої гнилі оцінюється в 15 мільйонів євро на рік [129].

1.2.3. Чорна ніжка та м'яка гниль картоплі

Серед найшкідливіших і найруйнівніших бактеріальних хвороб, які впливають на світове виробництво картоплі поруч з бурою та кільцевою гнилями картоплі розглядається чорна ніжка під час вегетації у полі та м'яка гниль бульб під час зберігання та транспортування [130].

Збудники захворювань чорної ніжки та м'якої гнилі бульб картоплі належать до родів *Pectobacterium* та *Dickeya* родини *Pectobacteriaceae* [131]. У всьому світі пектолітичні бактерії викликають захворювання широкого спектру культурних рослин, таких як картопля, хрін, жовтий ківі, помідори, капуста, огірок, артишок, соняшник, болгарський перець, гарбуз і салат [132]. Рід *Pectobacterium* був уперше запропонований і описаний Waldee at al. в 1945 році та на сьогодні охоплює 19 видів відповідно до сучасної класифікації [133].

Pectobacterium atrosepticum, грамнегативна неспороутворююча, факультативно анаеробна із перитрихальними джгутіками, паличка, вважається основним, але не єдиним етіологічним агентом, який спричиняє захворювання на чорну ніжку та м'яку гниль (бульб) у посівах картоплі. У всьому світі *P. atrosepticum* в основному обмежується картоплею, на відміну від інших збудників чорної ніжки, таких як *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*,

P. carotovorum subsp. *brasiliense*, *P. parmentieri* та види роду *Dickeya* [10, 134]. Впливаючи на врожайність картоплі, якість бульб, а також продовольчу біобезпеку, *P. atrosepticum* є одним із найнебезпечніших патогенів картоплі і може призвести до значних економічних втрат від 20 до більше 100 мільйонів доларів у всьому світі щороку [135]. Зазначено, що бульби картоплі вважаються основним резервуаром бактеріального збудника, тим не менш, навіть після багатьох років досліджень знання про джерело початкової інфекції все ще обмежені. Ураження може спричинити ґрунтовий інокулят, що йде від уражених мацерованих бульб картоплі, однак кілька досліджень показали, що збудник виживає в ґрунті лише протягом обмеженого періоду, навіть при наявності рослинних решток [136-138].

Температура вважається одним із найважливіших факторів, що впливають на розвиток захворювання, викликаного пектолітичними бактеріями. Наприклад, було продемонстровано, що *P. atrosepticum* швидше росте при більш низькій температурі повітря менше 25°C, хоча оптимальні температури росту коливаються від 25 до 30°C [130]. Домінуючим фактором у розвитку патогенності є і залишається продукція ферментів, що руйнують клітинну стінку, включаючи пектинази, целюлази, протеази та ксиланази, що регулюється щільністю клітин популяції [139]. Так, згідно даних Natalia Kaczynska et al., активність пектатліази у *P. atrosepticum* була максимальною при 15–17°C і знижена при 30,5°C, що свідчить про те, що температура контролює експресію факторів вірулентності в патогенах рослин під час інфекцій [130]. А декілька форм (ізоферментів) більшості пектолітичних ферментів, які виробляються бактеріями, забезпечують пластичність метаболізму і тим самим підвищують здатність бактерій виживати та колонізувати різні середовища [86].

Прояв хвороби на вегетативній масі у полі проявляється як загнивання столонів та побуріння судинної системи з подальшим в'яненням та загниванням усієї рослини. Уражені рослини дають мало або взагалі не

утворюють бульб [138]. При ураженні бульб картоплі, візуальні ознаки ураження можуть стати помітними лише через певний період часу, що пов'язано із накопиченням інфекційного агенту. Розвиваючись у бульбі, пектолітичні бактерії призводять до мацерації та розкрадання тканин бульб, що може бути помітним як при візуальному огляді цілої бульби так і при її розрізі [9, 135].

Мінімізація впливу та боротьба з пектобактеріями в основному опирається на культурні практики: використання для посадки лише якісного сертифікованого матеріалу вільного від пектолітичних бактерій, проведення фітосанітарних оглядів та чисток полів від уражених рослин, з подальшим їх знищенням для запобігання розповсюдження інфікованого матеріалу, мінімізація використання різаного садивного матеріалу при посадці [140], дезінфекція сільськогосподарського обладнання та сховищ перед використанням, а також дотримання оптимальних умов температури, вологості та потоку повітря у період зберігання бульб картоплі [141].

Підсумовуючи вище сказане слід зазначити, що інфекції бактеріальної етіології є одним з найважливіших біотичних факторів обмеження виробництва картоплі у всіх кліматичних регіонах світу. Однак, розвиток бактеріальних інфекцій потребує не лише рослину-господаря, а й оптимальні умови середовища. Саме поняття «трикутник хвороб» у фітопатології вказує на важливість взаємодії патогенів, рослин із середовищем (рис. 1.10.)

Для розвитку хвороби необхідна сприйнятлива рослина-господар, вірулентний патоген і відповідні умови навколишнього середовища, оскільки відсутність сприятливих умов для будь-якого з цих факторів не призводить до розвитку хвороби. [142].

До прикладу, Werra et al. знайшли кореляцію між водонасиченістю ґрунту та ураженістю збудниками чорної ніжки та м'якої гнилі бульб картоплі [143]. Haverkort & Verhagen припустили, що більш високі температури та

нерегулярні опади збільшують ризики бактеріальних інфекцій картоплі, викликані *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* та *Ralstonia solanacearum* [144].



Рис.1.10. Трикутник хвороб рослин. Адаптований Moore et al. [142]

У кінцевому висновку можна сказати, що розвиток інфекційних хвороб рівноцінно залежить як від рослини-господаря та збудника так і від абіотичних факторів, що наявні у невеликий проміжок вегетації культури. З огляду на це мінімізація втрат врожаю такої промислово важливої сільськогосподарської культури, як картопля потребує регулярного скринінгу садивного матеріалу валідованими методами, а також додаткове вивчення особливостей патологічного процесу, викликаного бактеріальними збудниками, за умов варіювання абіотичних факторів. Особливої актуальності врахування впливу абіотичних факторів на чутливість промислово важливих сільськогосподарських культур, у т.ч. картоплі, до збудників бактеріальних хвороб набуває в умовах глобальних змін клімату, які, згідно прогнозів фахівців, можуть викликати як послаблення патогенності і вірулентності збудників, так і посилення.

1.3. Методи діагностики фітопатогенних мікроорганізмів

Патогени рослин завдають серйозних збитків з точки зору економіки та виробництва в сільському господарстві [145]. Саме тому виявлення та ідентифікація збудників хвороб рослин є однією з найважливіших стратегій стійкого управління хворобами рослин та важливою передумовою для їх розуміння та контролю [146-147]. Належний догляд за сільськогосподарськими культурами та раннє виявлення хвороб має вирішальне значення для підтримки стійкості сільського господарства [148]. У даному випадку, доступність швидких, чутливих і точних методів виявлення та ідентифікації патогенів рослин стає все більш необхідною для покращення процесу прийняття рішень щодо боротьби з хворобами [149-150]. За останні два десятиліття з технологічним прогресом удосконалилися методи швидкої діагностики захворювань. Різні фітопатогени, включаючи гриби, бактерії та віруси, можна ідентифікувати за допомогою молекулярних та імунологічних методів. Ці методи є високоефективними для точної ідентифікації збудника на видовому рівні. Вони забезпечують діагностику в режимі реального часу, а їх чутливість набагато вища, ніж у звичайних методів, що дозволяє швидко й точно виявляти патогени навіть у безсимптомних рослинах, які можуть утримувати відносно низькі популяції патогенів [151].

1.3.1. Молекулярні методи досліджень

Молекулярні методи досліджень добре зарекомендували себе для діагностики і виявлення хвороб рослин із застосуванням визначень на основі нуклеїнових кислот [152]

Наявність генетичної послідовності ДНК та/або РНК, яка є унікальною для цільового патогена є чудовими молекулярними мішенями для виявлення та ідентифікації (патогенних) мікроорганізмів [153].

Теоретично, згідно зі статистикою Пуассона, даний метод здатний ампліфікувати мінімальні кількості цільових нуклеїнових кислот, однак на практиці межа виявлення дуже залежить від типу зразка, ефективності екстракції ДНК та ампліфікації, на яку, у свою чергу, впливають налаштування ПЛР та дизайн праймерів [154]. Специфічність ПЛР значною мірою залежить від правильного дизайну високоселективних праймерів, які базуються на генетичній інформації цільового мікроорганізму, а висока чутливість дозволяє виявити мінімальні їх кількості [155]. На додаток до високої чутливості та специфічності, ПЛР також є значно швидшим, а результати можна отримати за лічені години [156].

Однак, як і будь які інші методи, ПЛР має ряд недоліків: чутливість до інгібіторів ПЛР, які присутні у зразку та можуть призвести до хибнонегативних результатів [157]; висока чутливість може призвести до підвищеного ризику отримання хибнопозитивних результатів через неспецифічну ампліфікацію або забруднення, а кількісне визначення цільового патогена неможливе в звичайній ПЛР [158-159]. Крім того, у разі виявлення кількох збудників в одному зразку слід використовувати окремі процедури ПЛР, використання яких призводить до удорожчання аналізу [160]. Саме тому, для вирішення основних наявних недоліків були розроблені різноманітні модифікації класичної ПЛР. До прикладу, ПЛР зі зворотною транскрипцією (RT-PCR), включає етап зворотної транскрипції, під час якого шаблон РНК транскрибується в комплементарний ланцюг ДНК (кДНК), що і використовується як матриця у звичайній реакції ПЛР [161]. Сьогодні RT-PCR є найбільш використовуваним методом діагностики вірусів рослин завдяки його здатності виявляти віруси в низьких концентраціях у рослинах [162]. При мультиплексній ПЛР використовується дві або більше пар праймерів, які

високоспецифічні до різних генетичних послідовностей в одній реакції, що дозволяє одночасно виявляти кілька цільових патогенів [163]. Так за допомогою мультиплексною ПЛР Bangratz at al. виявили та оцінили наявність п'яти основних видів бактерій, що викликають важливі захворювання рису в Африці [164]. Вкладена ПЛР заснована на використанні двох пар праймерів: продукт ампліфікації першої (зовнішньої) пари праймерів слугує матрицею для другої (внутрішньої) пари праймерів, що зменшує неспецифічне зв'язування та збільшує вихідну кількість амплікону [165]. Safaiefarahani at al. повідомили, що через високу схожість послідовностей *P. erythrosetptica* з його близькоспорідними видами, саме вкладена ПЛР допомогла збільшити чутливість праймерів принаймні в 100 разів [166]. ПЛР з гарячим стартом спрямована на зменшення неспецифічної ампліфікації, яка спостерігається під час неспецифічного відпалу праймерів, утримуючи полімеразу за допомогою фізичних бар'єрів, доки не буде досягнуто температури відпаду. А тривала ПЛР дозволяє при використанні суміші термостабільних ДНК-полімераз отримувати фрагменти довжиною понад 5 кб [167].

Найсуттєвішою віхою у використанні ПЛР була розробка TaqMan компанією Applied Biosystems на початку 1990-х років, що ознаменувала запровадження концепції моніторингу ампліфікації ДНК у реальному часі за допомогою моніторингу флуоресценції [154]. ПЛР у реальному часі, працює за тим самим принципом, що й звичайна ПЛР, з основною відмінністю, що ампліфікований фрагмент ДНК вимірюється під час ПЛР в режимі реального часу замість визначення його кількості у кінцевій точці [168]. Інша суттєва перевага ПЛР у реальному часі перед звичайною ПЛР, полягає не лише у виявленні наявності цільового патогену, але й визначенні його точної кількості, відповідно до калібрувальної кривої побудованої на основі стандартних розчинів з відомою концентрацією ДНК [169]. Крім того, кПЛР також може надавати напівкількісні результати без стандартів, але з контролем, що використовується як еталонний матеріал. У цьому випадку

спостережувані результати можуть бути виражені як більші, менші або кратні відносно контролю [154]. ПЛР в режимі реального часу заснована на принципі, що флуоресцентний сигнал пропорційний кількості амплікону, виробленого у кожному циклі, і може бути задокументований через інтенсивність інтеркалюючого барвника або розпад міченого барвником репортерного зонда під час ампліфікації [170].

Серед існуючих підходів, найбільш поширеними для візуалізації продуктів ампліфікації і досі залишаються 5'-нуклеазний метод, також відомий як TaqMan та SYBR® Green I.

Неспецифічний флуоресцентний барвник SYBR® Green I, взаємодіє з малою борозною дволанцюгової ДНК, що утворюється під час циклів ПЛР. Неспецифічна взаємодія SYBR® Green I з дволанцюговою ДНК є як основною перевагою так і недоліком, зв'язуючи всю дволанцюгову ДНК у розчині, включаючи димери праймерів і неспецифічні продукти ПЛР, що може призвести до помилкових сигналів [171]

Інший відомий метод, 5'-нуклеазний метод або ж TaqMan, заснований на взаємодії олігонуклеотидного зонду з флуоресцентною репортерною молекулою на 5'-кінці та молекулою-гасником на 3'-кінці з певною послідовністю цільової ДНК для виявлення продуктів ПЛР [172]. Зонд виконує роль перешкоди і перебуває на шляху ДНК-полімерази. Тому при синтезі комплементарного ланцюга ДНК-полімераза розщеплює зонд від 5'- до 3'-кінця завдяки своїй 5'-екзонуклеазній активності під час подовження праймера, який відокремлює репортерну молекулу від гасника, що призводить до випромінення флуоресценції. Таким чином, флуоресценція виявляється лише тоді, коли ділянка ДНК-мішені ампліфікована [171]. Метод TaqMan більш чутливий та дає більш реалістичну картину щодо наявності цільового фрагмента ДНК у порівнянні з SYBR® Green I, що неспецифічно зв'язується з будь якою дДНК [173].

Кількісна ПЛР має помітні переваги перед описаною вище класичною ПЛР, що включають підвищену чутливість і точність, кількісне визначення патогену, великий динамічний діапазон, високу пропускну здатність, здатність виконувати мультиплексні реакції, швидша та надійніша ампліфікація, а основне - відсутність маніпуляцій після ПЛР [154].

1.3.2. Імунохімічні методи досліджень

Серологічні методи виявлення патогенів, зокрема вірусів рослин, були доступні фітопатологам протягом багатьох років [174]. Однак впровадження у фітопатологію більш досконалих імунодіагностичних методів розширило сферу їх застосування для діагностики захворювань, викликаних різними вірусами, бактеріями, спіроплазмами, мікоплазмовими організмами і грибами [175].

Імунологічні або серологічні методи виявлення збудників хвороб рослин засновані на принципі специфічної взаємодії антиген-антитіло [176]. Загалом існує два типи антитіл, які можна використовувати з цією метою: поліклональні антитіла, які складаються із суміші антитіл різних ізотипів (класів), що мають спорідненість до різних епітопів антигену/антигенів цільового збудника та моноклональні антитіла, препарат яких містить антитіла одного ізотипу (класу) зі специфічністю до одного конкретного епітопу [177]. Оскільки поліклональна антисироватка містить антитіла, які націлені на різні епітопи, існує вищий ризик перехресної реакції з іншими антигенами, що призводить до отримання хибнопозитивних результатів [178]. Використання моноклональних антитіл значно підвищує специфічність і відтворюваність, діагностичної процедури, оскільки немає мінливості між партіями, як у випадку з поліклональними антитілами. Однак, недоліком використання

моноклональних антитіл є те, що вони, як правило, дорожчі та менш чутливі, ніж їхні поліклональні аналоги [179].

На даний час найбільш доступні та часто застосовувані імунологічні аналізи, які використовуються для виявлення патогенів рослин у повсякденній практиці, включають: імуноферментний аналіз і його модифікації та імунофлуоресцентний аналіз [180-181].

Вперше розроблений у 1970-х роках, ІФА добре зарекомендував себе як метод, що широко використовується для виявлення фітопатогенів у всьому світі [182].

Наприклад, Європейська Організація Захистку і Карантину Рослин рекомендує проводити ІФА для перевірки присутності більшості фітопатогенних мікроорганізмів у культурних рослинах [8,53].

Основний принцип ІФА полягає у тому, що цільові епітопи (антигени) вірусів і бактерій специфічно зв'язуються з антитілами, які можуть бути кон'югованими з ферментом або флуорофором для візуалізації утворених імунних комплексів на основі змін кольору/появи флуоресценції в результаті взаємодії між субстратом та ферментом-міткою (лужна фосфатаза, пероксидаза хрому та β -галактозидаза), флуорофором (флюоресцеїну ізотіоціонат) ковалентно кон'югованих з антитілами або наночастинкою (золото) [183-185].

За останні два десятиліття відбувся ряд різноманітних важливих технологічних інновацій методології ІФА [181]. Було розроблено кілька форматів ІФА, включаючи прямий, непрямий, сендвіч-тест і конкурентний ІФА, кожний з яких має свої переваги і недоліки. Це дозволяє обрати оптимальну модифікацію для кожного конкретного збудника або комплексу збудників з метою досягнення максимальної діагностичної інформативності [185].

Чутливість і специфічність ІФА можуть значно відрізнятись в різних модифікаціях аналізу і значною мірою залежать від використовуваних антитіл і кон'югованого ферменту. Це може призвести до збільшення кількості хибнопозитивних (через знижену специфічність), а також хибнонегативних результатів (через знижену чутливість) [186].

Наприклад, непрямий ІФА зазвичай більш чутливий, оскільки численні вторинні антитіла, мічені ферментом, з високою специфічністю зв'язуються з первинним антитілом, зв'язаним з антигеном, що призводить до посилення сигналу [180].

ІФА є відносно простим у виконанні, а час, необхідний для виконання аналізу, становить від однієї до кількох годин. Використання багатолункових планшетів різних форматів полегшує одночасне тестування багатьох зразків та може бути автоматизованим [187]. Однак, використання ІФА пов'язане з деякими недоліками. Через низьку хімічну та фізичну стабільність антитіла потребують охолодження для зберігання та спеціальних буферів [188-189].

Інший поширений метод детекції збудників хвороб рослин є імунофлуоресцентний метод (ІФ), що ґрунтуються на використанні антитіл мічених флуоресцентним барвником, таким як флуоресцеїн ізотіоціанат або ціаніновий барвник [190]. У виявленні та діагностиці патогенів рослин імунофлуоресценцію можна використовувати для ідентифікації наявності специфічних молекулярних структур, пов'язаних із патогенами або ефекторних білків, які секретуються патогенами та сприяють розвитку захворювання. Виявлення патернів патогенності методом імунофлуоресценції можна проводити з використанням як прямої так і непрямой модифікації. Флуоресценція, як метод виявлення та діагностики патогенів рослин, вважається більш високочутливим та може виявляти низькі рівні специфічних молекул у зразку, специфічною для цільової молекули та здатна диференціювати тісно споріднені молекули, може виявляти кілька цільових молекул в одному зразку, дозволяючи аналізувати кілька аспектів процесу

захворювання одночасно та є відносно простим і зрозумілим методом, який можна виконувати в більшості дослідницьких лабораторій [191]. Однак, існують також певні обмеження щодо використання імунофлуоресценції для виявлення та діагностики патогенів рослин: наявність специфічних антитіл, які розпізнають цільову молекулу, хибнопозитивні результати через перехресну взаємодію антитіл, хибнонегативні результати через неможливість взаємодії антитіл з патернами, що знаходяться всередині клітин, наявність спеціального обладнання, такого як флуоресцентні мікроскопи або рідери для вимірювання флуоресценції [180].

Розробляються також більш сучасні модифікації імунохімічного аналізу фітопатогенів, у число яких входить використання імунобіосенсорів. Імунобіосенсори засновані на трансдукції сигналу, створеного взаємодією між антитілами і антигенами, і вважаються перспективним підходом для розробки високоефективних біосенсорів на основі афінності для виявлення патогенів. Сигнал імуносенсора може генеруватися безпосередньо або опосередковано. Прямі імунологічні аналізи дозволяють безпосередньо виявити подію спорідненості шляхом оцінки фізичних змін, викликаних утворенням комплексу антитіло-антиген, а мічені імуносенсори використовують мітки, що генерують сигнали, які дозволяють використовувати більш чутливі та універсальні режими виявлення, щоб визначити, чи сталася подія зв'язування [192].

Підводячи підсумки описаних вище методів діагностики та ідентифікації збудників інфекційних хвороб рослин, слід зауважити, що для агропромислового комплексу основними критеріями проведення досліджень були і залишаються інформативність, специфічність та швидкість. Наявність та ідентифікація збудників з подальшим аналізом епідеміологічної ситуації вимагає простих у виконанні, однак високоспецифічних та стандартизованих методів діагностики сільськогосподарської продукції.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Реактиви та матеріали, що були використані у роботі

У ході дослідження були використані наступні матеріали та реактиви:

- для виділення ДНК використовували реактиви: гуанідин гідрохлорид ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{-HCl}$) (Scharlau, Іспанія); динатрієва сіль, ЕДТА ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (VWR Chemicals, LLC, США); тріс гідрохлорид ($(\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl})$) (Shenzhen Nexconn Pharmatechs Ltd., Китай); тріс основний ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) (Shenzhen Nexconn Pharmatechs Ltd., Китай); тритон X-100 (Triton® X-100) (LLC CWR Chemicals, США); діоксид кремнію з гранулометричним складом від 0,5 до 10 мкм (80% частинок від 1 до 5 мкм) (Honeywell International Inc., США); натрій гідроксид (NaOH) (Німеччина); натрій хлористий (NaCl) (EMD Millipore Corporation, США); калій хлористий (KCl) (Франція); натрій фосфат двоосновний (Na_2HPO_4) (Prayon S.A., Марокко); дигідрофосфат калію (KH_2PO_4) (EMD Millipore Corporation, США); хлоридна кислота (HCl, 2,0 М) (Honeywell International Inc., США); етанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (96%) (ПрАТ ВВП Укрзооветпромстач, Україна); набір реактивів «АГРОСОРБ НК» (Агроген Ново, Україна).
- для калібрування портативного рН-метру проводили за використанням набору стандартних розчинів (рН 10,01, рН 7,00 та рН 4,01). В якості електроліту для рН-електроду використовували 3,0 М розчин KCl (Lab Logistics Group International GmbH, Німеччина).
- для проведення ПЛР використовували 2×PCR SuperMix (Bio-Helix, Тайвань). Для проведення кількісної ПЛР в реальному часі використовували набір реактивів Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England BioLabs, Inc., США).

- для проведення електрофоретичного розділення використовували: агарозу для електрофорезу CSL-AG500 (Clever Scientific, Велика Британія), етидіум бромід ($C_{21}H_{20}BrN_3$) (Sigma, США), борну кислоту (H_3BO_3) (Sigma, США), тетраборат натрію ($Na_2B_4O_7$) (Merck, Німеччина); маркер молекулярних мас 25 п.о. «GeneRuler Low Range DNA Ladder» (Thermo Scientific, Литва), маркер молекулярних мас 50 п.о. «GenPak® DNA Markers M 50» (Ізоген, росія).
- для проведення подвійного антитільного сендвічу для ідентифікації збудників бактеріальної етіології використовували тест системи LOEWE® Standard CompleteKit (Biochemica GmbH, Німеччина) відповідно рекомендацій виробника.
- для культивування мікроорганізмів використовували поживні середовища: поживний агар (ТОВ «Фармактив», Україна), nutrient agar (Merck, Німеччина).

2.2. Обладнання, яке було використано у роботі

- Для якісного поділу речовин застосовували: мікроцентрифугу-вортекс "Micro-spin" FV-2400 (Biosan, Латвія), мікроцентрифугу «Pico 17» (Thermo Scientific, США), мікроцентрифугу «MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина).
- Для проведення вимірювань використовували: спектрофотометр «NanoDrop 1000» (Thermo Fisher Scientific, США), портативний рН-метр «Orion™ 2-Star Benchtop» (Thermo Fisher Scientific, США), ваги лабораторні електронні ТВЕ – 0,15-0,001 (Техноваги, Україна), прилад для визначення мутності бактеріальної суспензії Densi-La-Meter (Denso, Чехія), аналітичні ваги ABJ 80-4NM (KERN&SOHN, Німеччина), аналітичні ваги ABJ 80-4NM (KERN&SOHN, Німеччина), аналітичні ваги (Mettler Toledo, Швейцарія).

- Для підтримання сталої температури було використано: термостат для мікропробірок «Драй-блок» TDB-120 (Biosan, Латвія), шафа сухо жарова SLW 115 SIMPLE (POL-EKO, Польща), термостат
- ПЛР проводили з використанням: УФ-боксу для чистої роботи з ДНК-пробами UVC/T-M-AR (Biosan, Латвія), термоциклеру (ампліфікатор) «T-100 TOUCH» (Bio-Rad Laboratories Ltd., США), системи ПЛР в реальному часі «CFX 96 TOUCH» (Bio-Rad Laboratories Ltd., США).
- Для проведення горизонтального електрофорезу було використано: магнітну мішалку з підігрівом «HSC» (VELP, Італія), камери для горизонтального електрофорезу «Mini Sub-Cell GT» (Bio-Rad Laboratories Ltd., США), джерело постійного струму «PowerPac HV» (Bio-Rad Laboratories Ltd., США), систему гельдокументування Bio-Rad Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories Ltd., США).
- Пробопідготовка зразків виконувалась з використанням: автоматичного гомогенізатора «SpeedMill PLUS» (Analytic Jena AG, Німеччина), пробірок для гомогенізації «NucleoSpin® Bead Tubes Type C» (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG, Німеччина), напівавтоматичного гомогенізатора «Homex 6» (BIOREBA AG, Швейцарія), універсальних пакетів для гомогенізації «Extraction bags Universal 12 x 15 cm» (BIOREBA AG, Швейцарія).
- Імуноферментний аналіз проводили використовуючи: термошейкер для імунопланшет PST-60HL-4 (BioSan, Латвія), промивач для мікропланшетів PW 40 (Bio-Rad Laboratories Ltd., США), мікропланшетний фотометр SUNRISE (TECAN Austria GmbH, Австрія).
- Для дослідження стійкості сортів картоплі було використано: Санідез (ТОВ «МДМ», Україна); ламінарний бокс 2 класу біологічної безпеки NU-437-400E (NuAire, США); деіонізатор електричний «Crystal В Віо» (ADRONA, Литва); дозатори автоматичні змінного об'єму (від 10 до 1000 мкл); стакан скляний об'ємом 50, 100, 250, 500 мл; пробірки мікроцентрифужні 1,5, 2,0, 15, 50 мл; одноразові наконечники для дозаторів (від 10 мкл до 10 мл); контейнери з кришкою 1,7, 3,5 л (ТОВ «ПАК ХАУС»,

Україна); сталевий стрижень; парафільм (Vemis, США, Німеччина); циліндр мірний об'ємом 100-1000 мл; циліндр мірний об'ємом 100 – 500 мл;

2.3. Розчини та буферні системи, використані у роботі

2.3.1 Розчини та буферні системи які були використанні для виділення тотальної ДНК за Boom at all. з модифікаціями

Для виділення тотальної ДНК з бактеріальної суспензії, рослинного та насінневого матеріалу картоплі готували наступні буфери та розчини:

- лізуючий буфер (6М $\text{CH}_5\text{N}_3\text{-HCl}$, 0,1 М TrisHCl , 0,2 М EDTA , Triton x-100). 57,32 г гуанідин гідрохлориду (GuHCl) розчиняли у 54,32 мл 0,1 М TrisHCl (рН – 6,4), додавали 1,1 мл 0,2 М EDTA (рН – 8,0) та 1,3 мл Triton x-100. Проводили розчинення компонентів перемішуванням при нагріванні 60-65 °С, переносили до 100 мл мірної колби та доводили 0,1 М TrisHCl (рН – 6,4) до поділки. Зберігали буфер для лізису при температурі 4–8°C;
- для приготування суспензії діоксиду кремнію (SiO_2) спочатку готували 10X фосфатний буфер (PBS) (1.37 М NaCl , 26,8 мМ KCl , 42,9 мМ Na_2HPO_4 , 14,7 мМ KH_2PO_4 , рН – 6,8) з якого в подальшому готували 1X PBS та доводили рН до 7,4 10 М NaOH . В мікроцентрифужну пробірку, об'ємом 1,5 мл переносили наважку 300 мг SiO_2 та додавали 1 мл 1X PBS, перемішували на вортексі та залишали на 2 години при кімнатній температурі. Через 2 години відбирали надосадову рідину, додавали 1 мл 1X PBS, перемішували на вортексі та залишали ще на 2 години. Після чого, пробірки центрифугували 2 хв при 2000 g, зливали супернатант та додавали 1 мл 6 М GuHCl (рН – 2,0). Готову суспензію зберігали 4–8°C;
- промивний буфер (70 % етанол, 1 М TrisHCl , 2М NaCl , рН – 7,5). До мірного циліндру об'ємом 500 мл вносили 350 мл 96% етанолу, 5 мл 1 М

TrisHCl, 25 мл 2М NaCl та доводили до позначки деіонізованою водою. Зберігали при температурі 4–8°C.;

- буфер для елюції ДНК (1 М TrisHCl, 0,5М EDTA, pH – 8,0). До мірної колби вносили 0,5 мл 1 М TrisHCl (pH – 8,0), 0,1 мл 0,5М EDTA (pH – 8,0) та доводили об'єм до 50 мл деіонізованою водою. Зберігали при температурі 4–8°C.

-

2.3.2. Буферні системи які були використанні для проведення ELISA

Для проведення ELISA використовували тест системи LOEWE® Standard CompleteKit (Biochemica GmbH, Німеччина):

- для розведення концентрованих специфічних антитіл готували покривний буфер: у 900 мл дистильованої води розчиняли 1,59 г карбонату натрію (Na_2CO_3) та 2,93 г гідрокарбонату натрію (NaHCO_3), коригували pH до 9,6 та доводили об'єм до 1 літру;
- промивання мікропланшетів проводили промивним буфером: 40,0 г хлористого натрію (NaCl), 14,5 г додекагідрату гідроортофосфату натрію ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), 1,0 г дигідрофосфату калію (KH_2PO_4), 1,0 г калію хлористого (KCl) та 2,5 мл Tween 20 розчиняли у 5 літрах дистильованої води, pH розчину доводили до 7,4;
- наважки дослідних бульб гомогенізували у пробо-кон'югатний буфері: на 1 літр води використовували 20 г полівінілпіролідону (в'язкість K10-K40) ($(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$) та 2 г бичачого альбуміну сироватки, доводили pH до 7,4;
- для приготування субстратного буферу 1X: у 100 мл дистильованої води розчиняли 97 г диетаноламіну ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$) та 0,2 г дигідрат хлорид магнію ($\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pH розчину до 9.8 доводили хлоридною кислотою (HCl);
- для проведення ферментативної реакції з лужною фосфатазою готували субстратний розчин: 1 мг/мл 4-нітрофенілфосфатдинатрієвої солі гексагідрату ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{NNa}_2\text{O}_{12}\text{P}$) розчиняли у субстратному буфері.

2.3.3. Буферні системи використані для проведення горизонтального електрофорезу

- Для приготування вихідного 10% Na-боратного буферу: 12 г борної кислоти (H_3BO_3) та 19 г натрію тетраборнокислового, 10-водневого ($Na_2B_4 \times 10H_2O$) переносили у мірний стакан та додавали 900 мл води, розчиняли на магнітному змішувачі. Переносили у мірну колбу на 1000 мл та доводили об'єм до позначки дистильованою водою. Зберігали при 4–8°C до закінчення використання;
- Для приготування робочого 1% Na-боратного буферу: за допомогою мірного циліндру відміряли 100 мл 10× Na-боратного буферу та переносили їх в мірну колбу місткістю 1000 мл. Доводили об'єм розчину дистильованою водою до позначки. Зберігали буфер при 4–8°C до закінчення використання.

2.4. Мікроорганізми, використані у дослідженнях

Як тест-культури у роботі були використані штами фітопатогенних бактерій із колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології (ІМВ) імені Д.К. Заболотного НАН України (табл. 2.1.).

Таблиця 2.1.

Штами видів фітопатогенних бактерій використанні у дослідженні

№	Вид фітопатогенних бактерій	Код штаму
1	2	3
1.	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1992	B-1109T = ATCC 11696, CFPB 2047, ICMP 5712, ICPB PS256, LMG 2299, NCPPB 325 ← Мурас В.А., 9049 ← ICMP 5712 ← NCPPB 325.

1	2	3
2.	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1992	B-1110 = ICMP 7859 ← Мурас В.А., 9081 ← ICMP 7859.
3.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Ac-1996
4.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Ac-1995
5.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Ac-1997
6.	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	B-1075
7.	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	B-1084T
8.	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	B-1103
9.	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	B-1097
10.	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	B-1079
11.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B-1022
12.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B-1028
13.	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	B-1070
14.	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	B-1060

2.5. Середовища культивування

Для культивування вищезазначених штамів фітопатогенних бактерій використовували щільне живильне середовище: картопляно-глюкозний агар (КГА г/л: гомогенізована варена картопля – 200 г, глюкоза – 20 г, агар – 20 г, NaCl – 5 г), картопляний агар (КА г/л: гомогенізована варена картопля – 500, агар – 20, NaCl – 5), поживний агар (НА г/л: пептон – 5, екстракт дріжджів – 3, агар - 12) та поживний агар (ПА г/л: пептон -10, агар – 10, NaCl – 5, екстракт дріжджів - 3) [193]. Культури бактерій культивували в термостаті за

температури 26°C протягом 24-48 год. Зберігали бактеріальні культури у холодильнику при температурі 4°C. Для підтримання бактеріальних культур, проводили пересів на нові поживні середовища кожні 2 місяці. Для проведення молекулярно біологічних досліджень використовували усі наявні штами бактеріальних культур. Для штучного ураження бульб картоплі використовували штам *Pectobacterium atrosepticum* В-1084^Г.

2.6. Відбір зразків урожаю картоплі

Біологічним матеріалом для скринінгу бактеріальних гнилей були бульби картоплі врожаїв 2020 та 2021 років. Для імунно-хімічних досліджень було відібрано 2821 бульбу. Відбір зразків та формування середньої проби картоплі проводився уповноваженими особами з господарств під час збору урожаю відповідно до ДСТУ 4014:2001 [194].

Кожного року (2020 та 2021) для дослідження були використані середні проби бульб картоплі зі щойно зібраного врожаю без візуальних ознак захворювань. У 2020 році було досліджено 1661 бульба картоплі з 8 областей України, серед яких Одеська (148 бульб), Київська (763), Донецька (30), Херсонська (90), Черкаська (90), Миколаївська (60), Дніпропетровська (390) та Житомирська (90) області. У 2021 році було проаналізовано 1160 бульб картоплі з тих же 8 областей України: Одеської (40 бульб), Київської (430), Донецької (90), Херсонської (120), Черкаської (120), Миколаївської (120), Дніпропетровської (150) та Житомирської (90) областей (рис.2.1.). Характеристики сортів картоплі, що були надані уповноваженими особами внесені у таблицю 2.2.

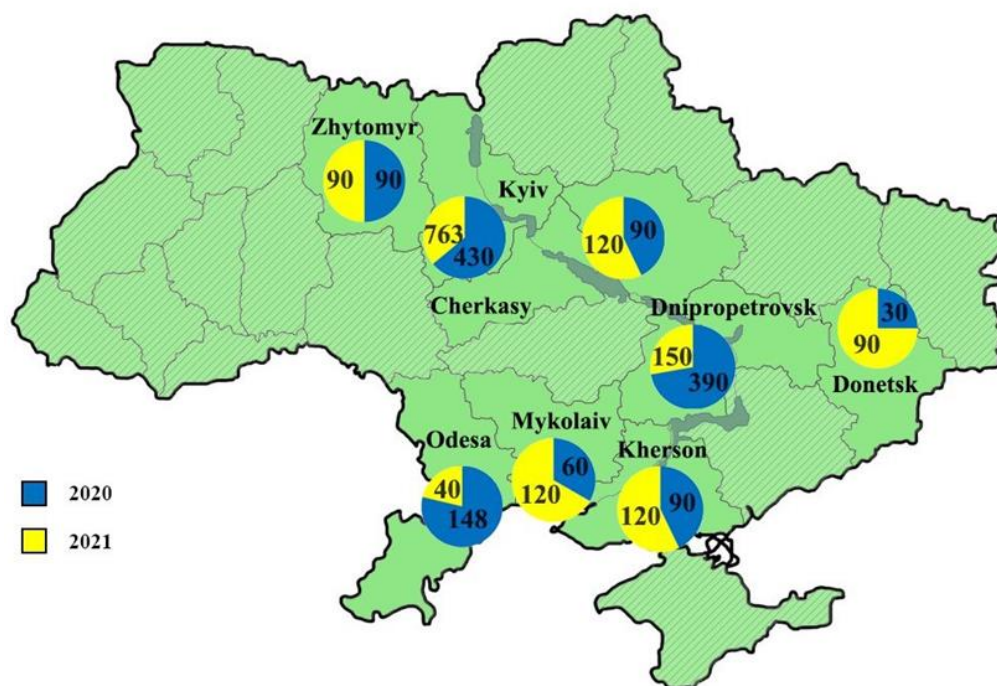


Рис.2.1. Карта відбору проб картоплі у 2020 та 2021 роках

Таблиця 2.2.

Характеристика сортів картоплі, що були проаналізовані у дослідженнях

Область	Сорт, виробник (країна виробника)	Група стиглості	Стійкість до чорної ніжки
2020			
Одеса	Miranda, SOLANA GmbH (Німеччина)	Рання	Низька - середня
	Laperla, SOLANA GmbH (Німеччина)	Ультрарання	*
	Riviera, Mts. Voerhave (Netherlands)	Ультрарання	Середня – Висока
Миколаїв	Riviera, Mts. Voerhave (Нідерланди)	Ультрарання	Середня – Висока
	Prada, SOLANA GmbH (Німеччина)	Ультрарання	Середня
Херсон	Riviera, Mts. Voerhave (Нідерланди)	Ультрарання	Середня – Висока
	Arizona, AGRICO RESEARCH BV (Нідерланди)	Середньорання	Середня
Дніпропетровськ	**		

Донецьк	Monte Carlo, TPC (Нідерланди)	Середньорання	*
Черкаси	**		
Київ	Bellarosa, EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH (Німеччина)	Ультра рання - рання	*
	Colomba, HZPC (Нідерланди)	Рання	*
	Mozart, HZPC (Нідерланди)	Середньопізня	*
	Granada, SOLANA GmbH (Німеччина)	Середньорання	Висока
	Toscana, SOLANA GmbH (Німеччина)	Середньорання	Висока
	Queen Anne, SOLANA GmbH (Німеччина)	Рання	Висока
	Labella, SOLANA GmbH (Німеччина)	Середньорання	Середня - Висока
	Lilly, SOLANA GmbH (Німеччина)	Середньорання	Висока
	Soraya, Greenvale Seed (Велика Британія)	Рання	Висока
	Sunshine, SOLANA GmbH (Німеччина)	Ультра рання - рання	Висока
	Opal, SOLANA GmbH (Німеччина)	Середньорання	Висока
	Red Lady, SOLANA GmbH (Німеччина)	Середньорання	Середня - Висока
	Prada, SOLANA GmbH (Німеччина)	Ультрарання	Середня
		Arizona, AGRICO RESEARCH BV (Нідерланди)	Середньорання
Rudolph, AGRICO UK (Велика Британія)		Рання	Низька
Arsenal, AGRICO UK (Велика Британія)		Середньорання	*
Riviera, Mts. Voerhave (Netherlands)		Ультрарання	Середня – Висока

Житомир	Colomba, HZPC (Нідерланди)	Рання	*
	Riviera, Mts. Voerhave (Нідерланди)	Ультрарання	Середня – Висока
	Soraya Сарая, Greenvale Seed (Велика Британія)	Рання	Високий
2021			
Одеса	**		
Миколаїв	Natalia, SOLANA GmbH (Німеччина)	Рання	Висока
	Prada, SOLANA GmbH (Німеччина)	Ультрарання	Середня
	Rodriga, SOLANA GmbH (Німеччина)	Рання	Висока
	Sunshine, SOLANA GmbH (Німеччина)	Ультрарання - рання	Висока
Херсон	Bellarosa, EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH (Німеччина)	Ультрарання - рання	*
	Vineta, EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH (Німеччина)	Рання	*
	Arizona, AGRICO RESEARCH BV (Нідерланди)	Середньорання	Середня
Дніпропетровськ	**		
Донецьк	Arizona Арізона, AGRICO RESEARCH BV (Нідерланди)	Середньорання	Середня
	Picasso, GEBR. HOLSTEIN (Нідерланди)	Середньопізня	Низька- Середня
	Monte Carlo, TPC (Нідерланди)	Середньорання	*
Черкаси	Labella Лабелла, SOLANA GmbH (Німеччина)	Середньорання	Середня – Висока
	Belmonda, SOLANA GmbH (Німеччина)	Середньорання	Середня – Висока
Київ	Picasso, GEBR. HOLSTEIN (Нідерланди)	Середньопізня	Низька

	Arizona, AGRICO RESEARCH BV (Нідерланди)	Середньорання	Середня
Житомир	**		

Примітки: * - інформація про чутливість/стійкість до чорної ніжки у сортових характеристиках не надана виробниками; ** - дані щодо сортів картоплі не надані уповноваженими особами.

2.7. Визначення стійкості сортів картоплі до бактеріальних гнилей картоплі за різних температурних режимів

Для визначення стійкості до збудників бактеріальних гнилей картоплі, відібрані сорти картоплі зберігали щонайменше 1 місяць після збору урожаю.

Бульби картоплі попередньо мили у водогінній воді для видалення зовнішніх забруднень. Після чого поміщали у 0,1% розчин активного хлору на 15 хвилин для поверхневої стерилізації з подальшим промиванням у дистильованій стерильній воді та підсушували бульби при кімнатній температурі. У дослідженні був використаний штам *Pectobacterium atrosepticum* B-1084^T = ATCC 33260, CFBR 1526, ICMP 1526, LMG 2386, NCPPB 549, люб'язно наданий з Національної колекції мікроорганізмів України. Суспензію бактеріальних клітин, 24-годинної культури, *P. atrosepticum* B-1084^T для інокуляції готували у стерильному фізіологічному розчині та стандартизували до концентрації 3,3 за МакФарландом ($1,0 \cdot 10^9$ клітин/мл) з Densi-La-Meter («Лахема», Чеська Республіка).

У бульбах за допомогою металевого стрижня довжиною 10 мм та діаметром 2 мм робили отвір, вносили 10 мкл суспензії дозатором змінного об'єму та закривали отвір парафільмом. Як негативний контроль у отвір бульб вносився стерильний фізіологічний розчин.

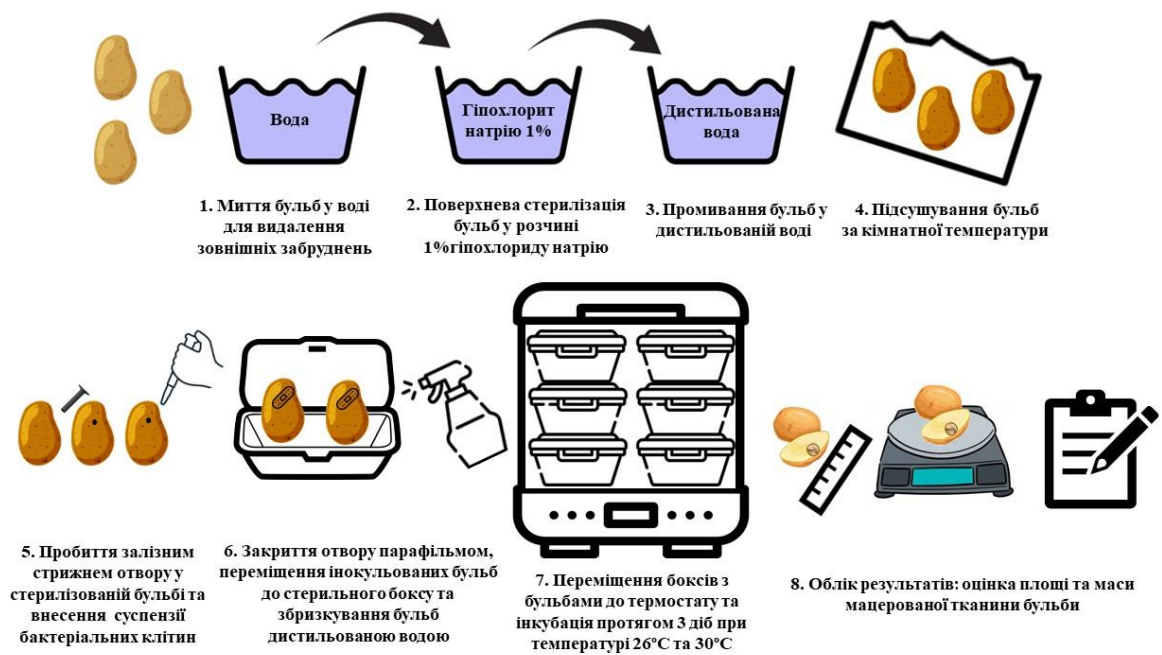


Рис.2.2. Схема проведення експерименту штучного зараження бульб картоплі

Інокульовані бульби поміщали у стерильні бокси та бризкали дистильованою водою, після чого бокси з бульбами закривали кришками та поміщали у термостати при відповідних температурних режимах на 3 доби (рис.2.2.). Після інкубації бульби розрізали вертикально через місце інокуляції та оцінювали симптоми хвороби, згідно Lebecka et al., з деякими модифікаціями [195, 196]. А саме, оцінювали дві ознаки захворювання: захворюваність (DI) – частка бульб із симптомами гнилі та тяжкість захворювання (DS), яку оцінювали за середньою площею мацерації та середньою масою гнилої тканини. Площу мацерації бульб картоплі після інокуляції збудником та інкубації протягом 3-х діб, розраховували за формулою:

$$S = r1 * r2 * \pi$$

де, r1 - менший радіус еліпсу, r2 – більший радіус еліпсу, π – 3,14.

2.8. Імуноферментний аналіз (DAS ELISA)

Первинні специфічні концентровані антитіла IgG розчиняли у співвідношенні 1:200 у покривному буфері та вносили по 200 мкл у лунки мікропланшета. Інкубували протягом 4 год при температурі 37°C у термошейкері для мікропланшетів. Після інкубації проводили відмивання промивним буфером за допомогою промивача для мікропланшетів із дворазовим замочуванням на 3 хв. Наважку 0,2 г кожної окремої бульби картоплі відбирали та вносили в універсальні пакети для гомогенізації, додавали 4 мл пробо-кон'югатного буферу та проводили гомогенізацію за допомогою напівавтоматичного гомогенізатора.

Після інкубації антитіл та промивання мікропланшета, у лунки вносили позитивні, негативні контролю та гомогенат досліджуваних бульб картоплі у об'ємі 200 мкл. Після внесення проб проводили інкубацію мікропланшета протягом ночі при 4°C. Надалі проводили відмивання лунок мікропланшета промивним буфером із дворазовим замочуванням протягом 3 хв. Вносили у лунки мікропланшета підготовані вторинні специфічні антитіла, мічені лужною фосфатазою, розчинені у пробо-кон'югатному буфері у співвідношенні 1:200 у об'ємі 200 мкл, з подальшою інкубацією протягом 4 год при температурі 37°C у термошейкері. Відмивали лунки мікропланшета промивним буфером з дворазовим замочуванням на 3 хв за допомогою промивача і вносили субстратний буфер у об'ємі 200 мкл у лунки та залишали у темному місці протягом години.

Результати інтенсивності ферментативної реакції зчитували за допомогою мікропланшетного фотометра на довжині хвилі 405 нм. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програмного забезпечення Magellan V.7.1.

2.9. Виділення та характеристика ДНК

Виділення тотальної ДНК за допомогою комерційного тест-набору «АГРОСОРБ НК» проводили відповідно до рекомендацій виробника.

Виділення ДНК за Boom at all. з модифікаціями проводили за описаною нижче методикою.

Наважки проб бульб картоплі у 50 мг вносили у мікроцентрифужні пробірки та додавали 400 мкл лізуючого розчину з подальшою інкубацією протягом 35-40 хв у термостаті при температурі 65°C.

Після інкубації, пробірки з пробами центрифугували протягом 30 с при 2400 g. У нові пробірки переносили 200 мкл супернатанту та вносили 20 мкл сорбенту. Суміш супернатанту та сорбенту перемішували на вортексі протягом 10 хв та центрифугували 30 с при 2400 g з подальшим видаленням супернатанту з пробірок. До утвореного осаду у пробірках вносили 200 мкл лізуючого розчину, ретельно перемішували на вортексі до повного розчинення осаду та додавали 1 мл сольового буферу. Перемішували суспендуванням з подальшим центрифугуванням протягом 30 с при 2400 g та подальшим обережним видаленням супернатанту з пробірок. Надалі проводили 2-кратне відмивання з використання сольового розчину, перемішування на вортексі до повного розчинення осаду, центрифугування протягом 30 с при 2400 g та бережним видаленням супернатанту з пробірок. У термостаті протягом 4-5 хв при температурі 65 °C підсушували пробірки з сорбентом, кришки при цьому залишали відкритими. До пробірок після підсушування додавали 100 мкл розчинника НК та перемішували на вортексі до одержання гомогенної суспензії. Пробірки поміщали у термостат на 4-5 хв при температурі 65 °C та перемішували вміст пробірок на вортексі з подальшим центрифугуванням протягом 1 хв при 17000 g. Отриманий супернатант з ДНК переносили у нові чисті пробірки та зберігали при -20 °C у холодильній камері.

Чистоту та кількість виділеної ДНК визначали спектрофотометрично шляхом вимірювання абсорбції A260/A280 за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000, концентрацію ДНК оцінювали шляхом вимірювання поглинання при 260 нм.

2.10. Характеристика праймерів використаних у дослідженнях

Праймери та зонди із подвійними флуоресцентними мітками синтезували на замовлення (Metabion International AG, Німеччина). Для проведення ПЛР реакції готували робочі концентрації праймерів та зондів. У пробірку з леофілізованим праймером додавали необхідну кількість деіонізованої води, що вказана у паспорті праймера для отримання концентрації 100 пмоль/мкл. Суміш перемішували піпетуванням та залишали на 30 хв. для розчинення праймерів. У нові пробірки вносили аліквоти по 5 мкл розчинених праймерів та доводили до об'єму у 100 мкл деіонізованою водою для концентрації 5 пмоль/мкл. Приготовані розчини праймерів надалі використовували для проведення класичної ПЛР. Тривале зберігання розчинів проводилось у морозильній камері при -20°C. Послідовність праймерів використаних у дослідженнях наведено у таблиці Б.1.

2.11. Проведення ПЛР для виявлення комплексу видів *Ralstonia solanacearum* та *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Постановку класичної ПЛР ампліфікації проводили на приладі T 1000 Touch. Загальний об'єм реакційної суміші становив 10 мкл. До складу реакційної суміші входили: 3,4 мкл деіонізованої води, 3,1 мкл 2×PCR SuperMix (Bio-Helix, Тайвань), 1 мкл 5 пмоль суміші праймерів та 2,5 мкл зразків ДНК. Програму ампліфікації фрагментів ДНК комплексу видів *Ralstonia solanacearum* проводили згідно наступних температурних умов:

денатурація 120 с при 96°C; 40 циклів – денатурація ДНК 20 с при 94°C, відпал (гібридизація праймерів) 20 с при 66°C, синтез комплементарних ланцюгів ДНК 30 с при 72°C; елонгація 600 с при 72°C, зберігання при 4 °C [92].

Для ампліфікації фрагментів ДНК *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* проводили відповідно до наступної методики: денатурація 180 с при 94°C; 40 циклів – денатурація ДНК 20с при 94°C, відпал (гібридизація праймерів) 20 с при 64°C, синтез комплементарних ланцюгів ДНК 20 с при 72°C; елонгація 300 с при 72°C, зберігання при 10 °C.

2.12. Проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР в агарозному гелі.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі, що готували на 1×Na-боратному буфері. На кожні 100 мл розплавленої агарози додавали по 10 мкл етидію бромистого у концентрації 10 мг/мл. Агарозний гель заливали шаром товщиною не більше 0,5 см на пластинку для заливання розплавленої агарози та залишали на 20 хв для застигання. Надалі у камеру переносили пластинку з гелем та заповнювали 1× Na-боратним буфером, до повного покриття агарозного гелю. Електрофоретичне розділення проводили у градієнті напруги 10 В/см. Після завершення електрофорезу агарозний гель переносили до системи гелюдокументування, фотографували під ультрафіолетовим світлом, довжиною хвилі 260 нм.

За допомогою програмного забезпечення Image Lab v. 5.0 (Bio-Rad Laboratories Ltd., США) аналізували отримані електрофореграми продуктів ампліфікації.

2.13. Агрокліматичні умови на території України

Для кожної області були зібрані метеорологічні дані: сума опадів (мм/місяць) та середня температура повітря (°С/місяць), отримані з місцевих метеорологічних станцій компанії ТОВ Сингента.

Крім абсолютних показників суми місячної опадів та середньомісячної температури вираховували їх амплітуду та річну суму опадів. Амплітуда температур розраховувалася як різниця між максимальною та мінімальною середньою температурою повітря (°С), що спостерігалася протягом періоду вирощування картоплі (з квітня по вересень). Амплітуда опадів розраховувалася як різниця між максимальною та мінімальною сумою опадів (мм/місяць), що випали за період вирощування картоплі (з квітня по вересень). Сума опадів розраховувалася шляхом підсумовування місячних сум опадів за період вирощування картоплі (з квітня по вересень).

Додатково розраховували гідротермічний коефіцієнт (коефіцієнт Селянінова) [197]. Гідротермічний коефіцієнт (ГТК) розраховували на основі місячної суми опадів (R) та місячної суми середньодобових температур (Σt) за наступною формулою:

$$\text{ГТК} = \frac{\Sigma R}{0,1 \times \Sigma t_{\text{акт}>10}} \quad \text{або} \quad \frac{\Sigma R \times 10}{\Sigma t_{\text{акт}>10}}$$

Критерії інтенсивності вологозабезпеченості території:

<0.40 – дуже сильна посуха,

0.41–0.70 – сильна посуха,

0.71–1.0 – посуха,

1.01–1.3 – доволі сухо,

1.31–1.6 – достатньо вологи,

1.61–2.0 – доволі волого

2.01–2.50 - волого

2.51–3 – дуже волого

>3 – занадто волого [198].

2.14. Статистична обробка даних

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010 (Microsoft, США), для розрахунків амплітуди температур та опадів, суми опадів та коефіцієнту Селянінова.

Дані про суму опадів за період вегетації картоплі представлені як середнє значення \pm SD. Ці дані були перевірені за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова на нормальний розподіл перед іншими статистичними тестами. Статистичні відмінності розраховували за допомогою двостороннього t-критерію. Відмінності вважалися значущими при $p < 0,05$.

Для кожної вимірної метеорологічної змінної: місячна сума опадів, місячна сума середньодобових температур та коефіцієнт Селянінова, було проведено окремий кореляційний аналіз з поширеністю збудника м'якої та кільцевої гнилі картоплі в бульбах нового врожаю в різних областях. Для розрахунку використовували коефіцієнт кореляції Спірмена [143]. Статистичну значущість отриманих значень коефіцієнта кореляції Спірмена перевіряли шляхом розрахунку t-статистики за формулою:

$$t = \frac{r\sqrt{N-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

де, t - розподіл Стюдента, r - кореляція Спірмена, N - розмір вибірки, N - 2 - ступені свободи [199].

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень чутливості бульб до збудників чорної ніжки і м'якої гнилі (маса мацерованої тканини та площа мацерації бульб картоплі) проводили в Microsoft Excel з використанням методів варіаційної статистики з розрахунком М (25 %; 75 %), де М – медіана, (25 %; 75 %) – інтерквартильний інтервал між 25-м і 75-м центилями.

Статистичні відмінності між варіантами дослідження були розраховані за допомогою тесту Краскела-Уолліса. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Поширеність збудників м'якої та кільцевої гнилей картоплі на території України

Дослідження поширеності бактеріальних збудників відіграє важливу роль у розумінні епідеміологічної ситуації, що склалась, та виборі необхідних фітосанітарних та карантинних заходів для мінімізації їх подальшого розповсюдження. Як відомо, розвиток бактеріальної інфекції потребує трьох компонентів: вірулентний патоген, рослина-господар, що сприйнятлива до патогену, та сприйнятливі умови для розвитку патогену. З точки зору сільського господарства, кліматичні зміни мають серйозні наслідки для географічного розподілу сільськогосподарських культур і пов'язаних з ними патогенів [200]. Відтак, за останні 30 років річна температура у Східній Європі, включаючи Україну, зросла на 1,5°C, що особливо помітно у високих показниках міжрічної мінливості температур взимку. Однак, мінливість опадів на території України є значно більш виразною порівняно з температурними змінами, що проявляється у значних відмінностях місячних сум опадів протягом року [201]. Кліматичні умови, агротехнічні заходи, що впроваджені у виробництво картоплі та сорти, що реалізуються на сільськогосподарських угіддях, відіграють важливу роль в епідемічній ситуації бактеріальних інфекцій. Саме тому, нашим першим завданням було провести дослідження поширеності збудників бактеріальних гнилей картоплі на території України.

3.1.1. Поширення *Pectobacterium atrosepticum* та *Clavibacter sepedonicus* у моно- та мікст інфекції в урожаї картоплі 2020 та 2021 років

Картопля є важливою культурою світового сільського господарства маючи високий потенціал урожайності, гарну поживну цінність та універсальність у приготуванні [43]. Традиційно у сільськогосподарському виробництві картоплю вирощують як однорічну культуру з вегетативним розмноженням бульбами як садивним матеріалом, а статеве (насіннєве) розмноження обмежується селекційними програмами [18, 202]. Вегетативне розмноження картоплі, як наслідок біології самої рослини, створює можливість збудникам інфекційних захворювань зберігатись у латентній формі як у період вегетації, так і у період зберігання [7, 203]. А використання бульб попереднього урожаю, як насіннєвого матеріалу, призводить до накопичення інфекційних агентів у популяції, що, у свою чергу, веде до зниження урожайності та товарної якості продукту виробництва [20]. Бактеріальні інфекції є одним з важливих біотичних чинників, що обмежують виробництво картоплі, особливо у регіонах з теплим помірним кліматом [9].

Було підраховано, що 60% втрат урожаю картоплі пов'язані з гнилями, що виникають під час вирощування, транспортування та зберігання бульб [140]. Збудник кільцевої гнилі *Clavibacter sepedonicus* в Україні відноситься до некарантинних, але регульованих шкідливих організмів. У країнах-членах ЕРРО він віднесений до карантинних об'єктів списку А2 [8]. Збудник м'якої гнилі та чорної ніжки картоплі *Pectobacterium atrosepticum* був віднесений журналом *Molecular Plant Pathology* до десятки фітопатогенних мікроорганізмів, що наносять значні економічні збитки світовому сільському господарству [204].

Відомо, що саме материнські бульби, що використовуються для посадки, є основним джерелом бактеріальних інфекцій та відіграють основну роль у поширенні збудників бактеріальних інфекцій на сільськогосподарських

угіддях [118, 136, 200]. При загниванні материнської бульби, бактерії вивільняються у ґрунт та мігрують через ґрунтову воду, уражуючи молоді бульби. Czajkowski et al. показали, що бактерії, які перебувають у ґрунті, також можуть колонізувати корені картоплі, а згодом мігрувати через судинну систему у молоді бульби. Однак, за відсутності сприятливих умов, фітопатогенні бактерії зберігаються у бульбах у мінімальній кількості, не спричиняючи видимого розвитку захворювання [7]. Крім уражених насінневих бульб джерелом фітопатогенних бактерій *Clavibacter sepedonicus* та *Pectobacterium atrosepticum* у сільському господарстві також можуть слугувати уражене сільськогосподарське обладнання, призначене для посадки та збору урожаю картоплі, склади для зберігання картоплі, рослинні рештки, бур'яни та, у деяких випадках, вода для іригації [8, 136].

Діагностика насінневого матеріалу та урожаю картоплі на наявність збудників гнилей має важливе значення для оцінки і контролю його посівних якостей. Гетерогенний імуноферментний аналіз (Enzyme Linked Immunosorbent Assay,—ELISA) залишається лідуючим методичним підходом, оскільки має високу чутливість і зазвичай використовується для виявлення збудників у рослинному матеріалі без видимих ознак захворювання [205].

Найбільші обсяги картоплі вирощуються в українському Поліссі (яке охоплює Рівненську, Волинську, Житомирську та північні частини Київської і Чернігівської областей) та у Лісостеповій зоні України (яка включає Київську, Житомирську, Черкаську, Вінницьку, Кіровоградську, Хмельницьку та Одеську області). У 2020 році було проаналізовано 1661 бульба картоплі, а у 2021 році – 1160 бульб картоплі з 8 областей України включаючи Одеську, Миколаївську, Херсонську, Дніпропетровську, Донецьку, Черкаську, Київську та Житомирську області. Таким чином дослідження охоплювало обидві стратегічні для вирощування картоплі природні зони України. Однак, варто зазначити, що обмеженням проведеного дослідження була відсутність зразків бульб із західних областей України.

Досліджувані мікроорганізми були розповсюджені у бульбах всіх обстежених областей протягом двох дослідних років, однак, з різною частотою виявлення.

Було встановлено, що досліджувані фітопатогенні мікроорганізми разом у формі змішаної інфекції зустрічались у бульбах з усіх досліджуваних областей у 2020 році, окрім Одеської області, де був виявлений лише збудник кільцевої гнилі *C. sepedonicus* у 6,1% бульб, а також Житомирської і Херсонської областей, де була виявлена лише наявність збудника м'якої гнилі *P. atrocepticum* у 7,8% та 2,2% досліджуваних бульб відповідно (рис.3.1.).

Найвищі частки ураження дослідних бульб картоплі в урожаї 2020 року збудником кільцевої гнилі *C. sepedonicus* спостерігалися у Київській та Дніпропетровській областях і становили 16,1% та 11,0% відповідно. Для Миколаївської та Донецької областей поширення збудника кільцевої гнилі у проаналізованих бульбах не перевищувало 5,0% і становило 3,3%, а для Черкаської області цей показник становив 1,1%.

У свою чергу, найвищий відсоток присутності збудника м'якої гнилі *P. atrocepticum* у бульбах картоплі врожаю 2020 року - 18,3% було зареєстровано для Миколаївської області. У Черкаській та Київській областях поширення збудника м'якої гнилі сягало 7,7%, а для бульб з Донецької та Дніпропетровської областей України показник ураження не перевищував 5,0% та становив для Донецької області – 3,3%, а Дніпропетровської – 2,3%.

Таким чином, поширення збудника м'якої гнилі в урожаї картоплі 2020 року в середньому реєструвалося більшою мірою на території північних областей. Збудник кільцевої гнилі більшою мірою виявлявся в урожаї 2020 року з Північно-Східного географічного регіону. Що стосується характеристики поширення збудників гнилей за природними зонами, то більшу частку уражених бульб ми реєстрували в урожаї, вирощеному у лісостеповій зоні.

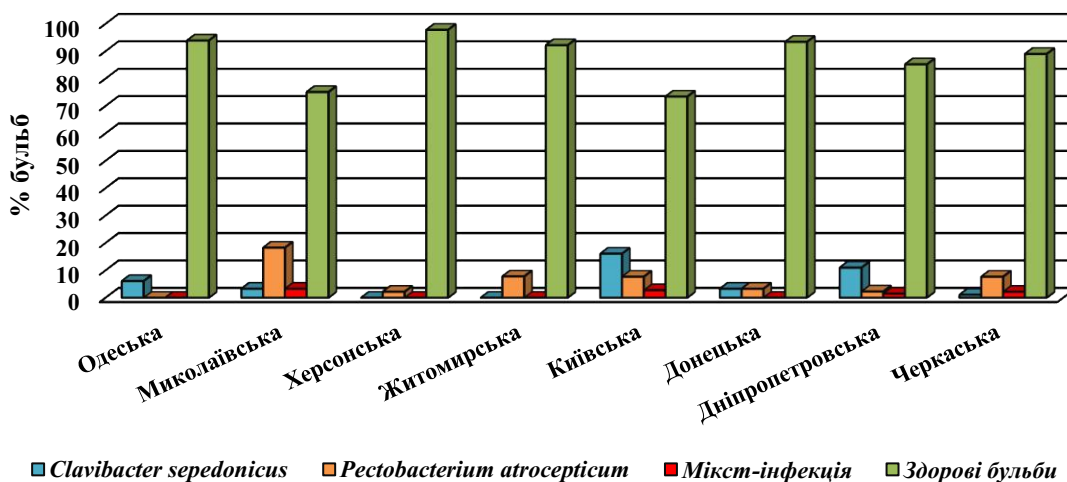


Рис.3.1. Поширеність збудників м'якої та кільцевої гнилей у формі моно- та змішаної інфекції (%) в урожаї картоплі 2020 року

Ситуація з латентним інфікуванням врожаю картоплі у наступному році дещо змінилася. У бульбах урожаю 2021 року, найвищий відсоток ураженості бульб збудниками кільцевої і м'якої гнилі як у формі змішаної інфекції, так і у формі моноінфекцій було зареєстровано у Донецькій області: *C. sepedonicus* – 11,1%, *P. atrosepticum* – 31%, змішана інфекція – 8,9% (рис.3.2.).

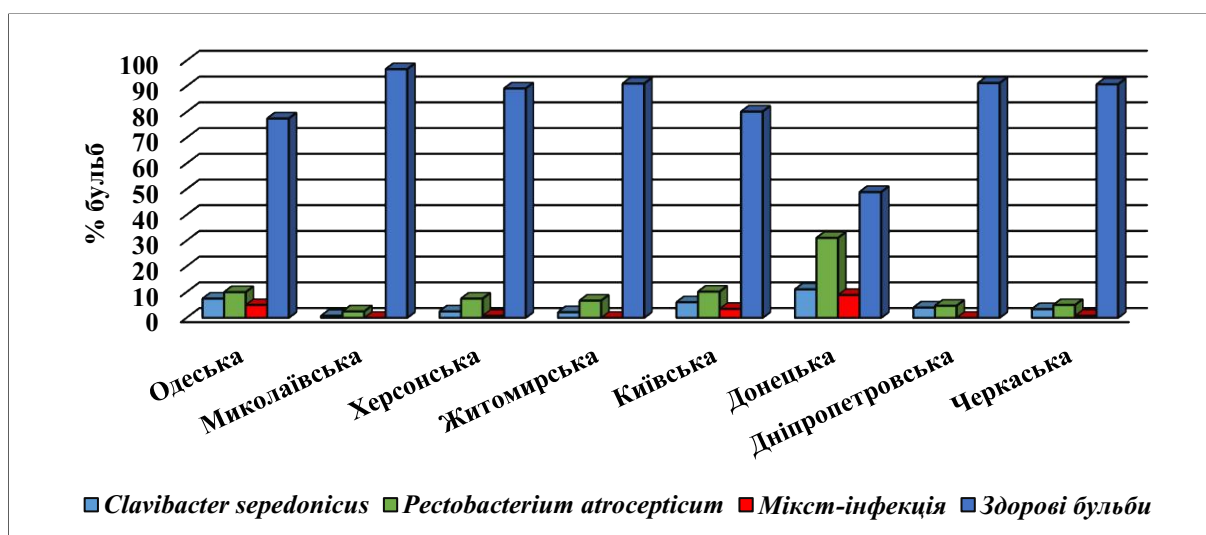


Рис.3.2. Поширеність збудників м'якої та кільцевої гнилей у формі моно- та змішаної інфекції (%) в урожаї картоплі у 2021 році

Найвищі показники ураження бульб картоплі збудником м'якої гнилі *P. atrocepticum* було зареєстровано, окрім Донецької, у Київській та Одеській областях з показниками у 10,2% та 10,0% відповідно.

Позитивний результат 7,5% та 6,7% досліджуваних бульб був отриманий для представника пектолітичних бактерій *P. atrocepticum* у Херсонській та Житомирській областях. Відсоток ураження м'якою гниллю у Черкаській, Дніпропетровській та Миколаївській областях сягав не більше 5,0% і становив 5,0%, 4,7% та 2,5% відповідно.

Висока інтенсивність поширення збудника кільцевої гнилі *C. sepedonicus* серед досліджуваних областей, окрім Донецької області, також була виявлена у Одеській області з показником у 7,5%. За результатами дослідження, 6,1% бульб були уражені коринформною бактерією збудником кільцевої гнилі картоплі *C. sepedonicus* у Київській області. У Дніпропетровській, Черкаській, Херсонській, Житомирській та Миколаївській областях ступінь ураження кільцевою гниллю не перевищував 5,0% та становив 4,0%, 3,4%, 2,5%, 2,2% та 0,8%, відповідно.

Хвороби рослин, за яких у процес ураження залучено більше, ніж один патоген, зазвичай називають «комплексними», оскільки їх діагностика та подальша боротьба з ними є більш складними. Naumann et al. у своєму дослідженні повідомляють про синергетичну взаємодію *C. sepedonicus* та *P. atrocepticum* при комбінованій інокуляції обома збудниками бульб картоплі у 3-х річних польових та тепличних випробуваннях [206].

Так, перехресне ураження збудником кільцевої гнилі *C. sepedonicus* та м'якої гнилі *P. atrocepticum* у 2020 році спостерігалось у дослідних бульбах з Миколаївської, Дніпропетровської, Черкаської та Київської областей, а частота трапляння змішаної інфекції не перевищувала 5,0%. Найвищі показники змішаної інфекції *C. sepedonicus* та *P. atrocepticum* спостерігали у Миколаївській – 3,3%, Київській – 2,75% та Черкаській – 2,2% областях.

Найменша кількість бульб з перехресним ураженням була виявлена у Дніпропетровській області і сягала 1,5% від загальної кількості проаналізованих бульб. Відповідно до отриманих нами даних, було виявлено, що у досліджуваних бульбах картоплі урожаю 2020 року збудник м'якої гнилі *P. atrocepticum* виявлявся приблизно у 4 рази частіше в пробах з аналізованих областей, окрім Дніпропетровської та Київської областей, де спостерігалось значне переважання кількості бульб уражених збудником кільцевої гнилі картоплі *C. sepedonicus*. Кількість бульб вільних від збудника кільцевої гнилі *C. sepedonicus* та збудника м'якої гнилі та чорної ніжки картоплі *P. atrocepticum* коливалась від 73,45% для Київської області до 97,8% для Херсонської області.

Щодо ситуації зі змішаною інфекцією у 2021 році то найвища частка уражених бульб була виявлена у Донецькій області і становила 8,9%. В Одеській області змішана інфекція була підтверджена у 5,0% досліджуваних бульб. Одночасне виявлення збудників кільцевої та м'якої гнилі у Київській області було встановлено у 3,5% бульб. У Херсонській та Черкаській областях ступінь поширення змішаної інфекції не перевищував 1,0% і сягав 0,8%. Відсоток бульб вільних від збудника кільцевої гнилі *C. sepedonicus* та збудника м'якої гнилі та чорної ніжки картоплі *P. atrocepticum* коливався від 48,9% для Донецької області до 96,7% для Дніпропетровської області. Відтак, збудник *P. atrocepticum* зустрічався у 2 рази частіше у досліджуваних бульбах картоплі урожаю 2021 року у більшості областей, окрім Дніпропетровської області, де кількість уражених бульб збудником кільцевої гнилі та м'якої гнилі мінімально відрізнялась.

Таким чином, результати нашого дослідження урожаю картоплі у 2020 році з 8-ми областей України показали переважання збудника м'якої гнилі *P. atrocepticum*, представника пектолітичних бактерій, у Миколаївській та Черкаській областях, окрім Одеської області, де даний збудник не був детектований. У Дніпропетровській та Київській областях переважало

поширення *C. sepedonicus* збудника кільцевої гнилі, за винятком Херсонської та Житомирської областей, де даного збудника не було виявлено. Змішана бактеріальна інфекція була виявлена у бульбах з 50,0% обстежених областей, але відсоток поширення не перевищував 5,0%.

У порівнянні з показниками поширення дослідних збудників бактеріальних інфекцій попереднього року, у 2021 році збудник м'якої гнилі *P. atrocepticum* виявлявся, в середньому, вдвічі частіше порівняно зі збудником кільцевої гнилі *C. sepedonicus* у зразках урожаю картоплі з усіх обстежених областей, окрім Дніпропетровської області, де поширення збудників було подібним. Мікст інфекція у 2021 році була виявлена у 62,5% бульб з обстежених областей, з найвищим проявом у Донецькій області - 8,9%.

Отримані нами дані, щодо поширення збудників кільцевої та м'якої гнилей картоплі в урожаї картоплі протягом 2 досліджуваних років, свідчать про істотні зміни у поширенні даних збудників на територіях вирощування картоплі (рис.3.3.). У порівнянні з 2020 роком поява *C. sepedonicus* була зареєстрована у Херсонській та Житомирській областях, а збудник *P. atrocepticum* був виявлений у 2021 році у Одеській області.

Значне збільшення кількості уражених бульб картоплі збудником кільцевої гнилі в урожаї 2021 у порівнянні з 2020 роком було зафіксовано в Одеській, Донецькій та Черкаській областях. У той самий час, зменшення показника трапляння *C. sepedonicus* реєстрували у Миколаївській, Київській та Дніпропетровській областях. Істотне збільшення трапляння збудника м'якої гнилі було виявлено у Херсонській, Київській, Донецькій та Дніпропетровській областях. Однак, у Миколаївській, Житомирській та Черкаській областях було встановлено зменшення кількості позитивних бульб на збудника м'якої гнилі картоплі у 2021 році. Отже, поширення збудника м'якої гнилі виявлялось значною мірою в урожаї картоплі 2021 року на території північних, південних та східних областей. В урожаї 2021 року збудник кільцевої гнилі більшою мірою виявлявся з Південно-Східного

географічного регіону. За природними зонами, найбільшу частку уражених бульб ми детектували в урожаї, вирощеному у степовій зоні.

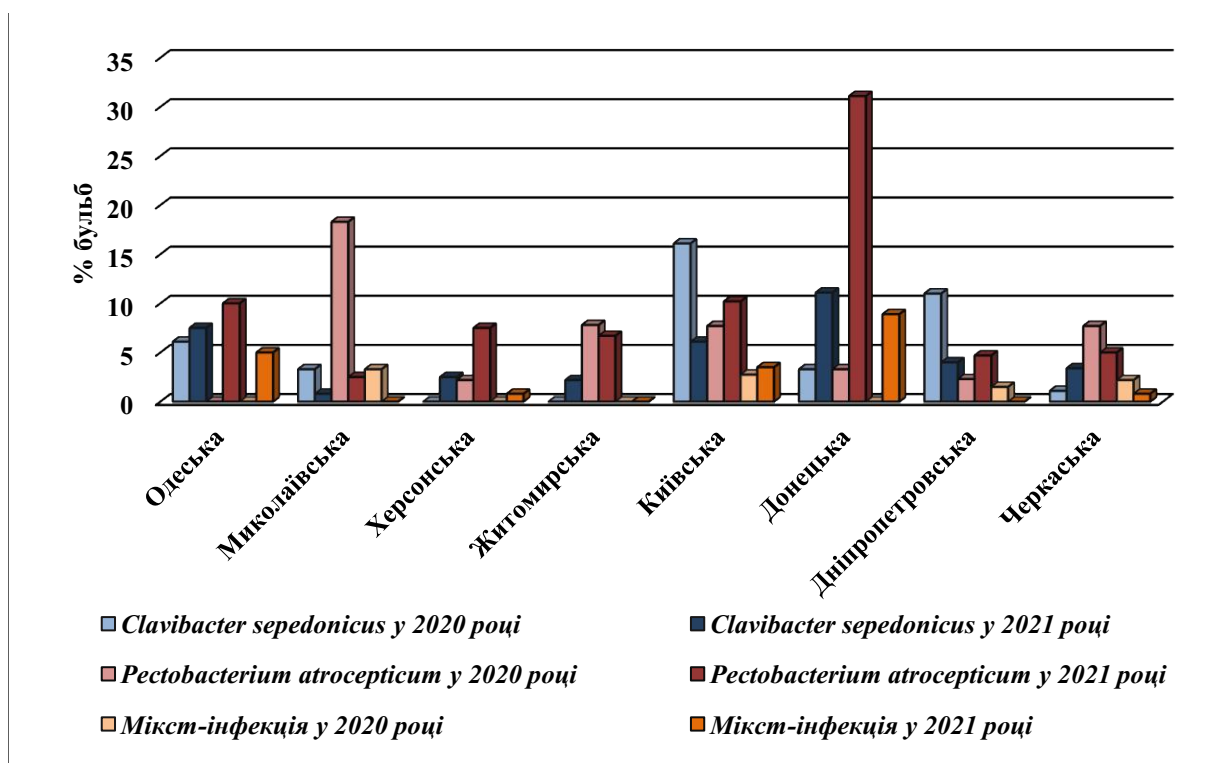


Рис.3.3. Поширеність збудників м'якої та кільцевої гнилей у формі моно- та змішаної інфекції (%) в урожаї картоплі протягом 2-х років дослідження

Відтак, отримані нами дані за досліджувані роки вказують на значну динамічну зміну поширення збудників кільцевої *C. sepedonicus* та м'якої *P. atrosepticum* гнилей на обстежених територіях вирощування картоплі в Україні, що може бути пов'язане з використанням сортів різної стійкості до чорної ніжки, кліматичних умов на українських територіях та інших біотичних і абіотичних чинників.

3.1.2. Зв'язок між поширенням збудників кільцевої та м'якої гнилі в урожаї картоплі та кліматичними умовами на території її вирощування

На якість та кількість врожаю картоплі значною мірою впливають кліматичні умови під час посадки, вирощування та збирання врожаю, оскільки абіотичні та біотичні стреси, що діють у тандемі (хвороби розвиваються лише за сприятливих умов навколишнього середовища), призводять до величезних втрат врожаю [207]. Як відомо, фітопатогенні організми та рослини не взаємодіють ізольовано. Реалізація біологічних властивостей збудників гнилей, як і у випадку будь-якого іншого фітопатогенного мікроорганізму, залежить не лише від генетичних особливостей сорту картоплі, а також від багатьох факторів навколишнього середовища, включаючи температуру повітря та ґрунту, вологість повітря та особливостей ґрунту. Погодні зміни, які є дуже непередбачуваними за своїми характеристиками, можуть по-різному впливати на трикутник хвороб рослин. Літературні дані щодо впливу погодних умов, зокрема температури повітря та рівня опадів, на латентне ураження бульб картоплі м'якою гниллю, чорною ніжкою та кільцевою гниллю є досить нечисленними та суперечливими.

P. atrosepticum, чутливий до температури вид, зустрічається переважно в помірному кліматі і здатен рости лише при температурі до 33°C, а викликати захворювання переважно при 18-22°C. Температура відіграє вирішальну роль для гниття материнських бульб, і *P. atrosepticum* є більш патогенним за нижчих температур (<25°C) [208]. Крім того, температурні коливання можуть зумовлювати експресію факторів патогенності і таким чином впливати на селекцію видів [209-210]. Natalia Kaczynska et al. повідомили про досліджений пул з 29 терморегуляторних генів *P. atrosepticum* (у тому числі пов'язаних з патогенністю), 14 з яких посилювали регуляцію при 18°C, а 15 - при 28°C. Вони припустили, що ці гени можуть бути задіяні в селекції. Автори

припускають участь цих генів в екологічній адаптації патогена [130]. На думку Pe'rombelonn et al. [211], іншим не менш важливим фактором навколишнього середовища для гниття бульб є вологість ґрунту, оскільки водна плівка на поверхні бульб створює анаеробні умови в тканинах бульб, що сприяє розмноженню бактерій. На основі лабораторних експериментів Moh et al. [212] вважають, що температура є найвпливовішим фактором навколишнього середовища для ураження бульб збудником м'якої гнилі за яким слідують бактеріальне навантаження та вологість.

C. sepedonicus має низьку оптимальну температуру росту (20-23°C) і обмежується переважно прохолодними регіонами вирощування картоплі. Високі температури стимулюють розвиток хвороби, а низькі температури сприяють виживанню патогена. Концентрація інокуляту, сорт, географічне розташування та взаємодія цих факторів впливають на прояв симптомів у польових умовах. Прояв симптомів у тепличних експериментах відбувався швидше при температурі 22-25°C, ніж при 16-18°C або 4°C. Крім того, відносно висока температура ґрунту сприяє розвитку хвороби [213]. Метеорологічні фактори, такі як відносна вологість, температура і профіль ґрунту, також мають значний вплив на розвиток кільцевої гнилі на рослинах картоплі. За даними Pietraszko et al., рівень зараження збудником кільцевої гнилі знижується з підвищенням температури повітря (вище оптимальної) та рівня опадів, а висока вологість ґрунту також може перешкоджати інфікуванню [214]. Gryn et al. [198] стверджують, що температура повітря і ґрунту в початковий період вегетації картоплі не має суттєвого впливу на кількість бульб, уражених збудником кільцевої гнилі.

З огляду на відмінності ураження бульб врожаю 2021 року порівняно з показниками 2020 року на одних і тих же територіях, незважаючи на вирощування практично однакового спектру сортів картоплі, ми припустили, що однією з причин цих відмінностей можуть бути зміни кліматичних умов, які відбулися у 2021 році порівняно з 2020 роком. Перевірка цього

припущення і стала наступним завданням роботи. Для цього ми провели порівняльний аналіз основних кліматичних показників на обстежених територіях впродовж періоду посадки, вегетації та збору врожаю за 2020-2021 рр, а також дослідження взаємозв'язку між цими кліматичними показниками та ураженістю бульб картоплі збудниками кільцевої та м'якої гнилі.

Початок картопляного сезону в Україні у 2020 році, виявився посушливим для більшості областей України, (табл. В.1.). За період квітня місяця у досліджуваних областях випало від 8,0 мм у Одеській та Миколаївській областях до 27,1 мм опадів у Київській області, а середня температура повітря коливалась від 8,7°C у Донецькій області до 11,2°C у Одеській області. Температурний режим травня коливався від 12,4°C для Київської області до більш ніж 15°C у південних та східних областях. У травні спостерігались рясні опади: найбільша кількість опадів була зафіксована у Київській та Житомирській областях з показниками 124,5 мм та 116,7 мм відповідно. У інших досліджуваних областях коливання опадів сягало від 36,6 мм у Херсонській області до 61,3 мм у Дніпропетровській області.

Протягом червня 2020 року на територіях досліджуваних областей середня температура повітря коливалась від 20,1°C у Житомирській області до 22,9°C у Херсонській області, а кількість опадів варіювала від 30,5 мм у Херсонській області до майже 80 мм у Житомирській області. Коливання температур у липні становило від майже 26°C у Херсонській області до 20,3°C у Житомирській області.

Серпень відзначився найменшою кількістю опадів протягом вегетаційного періоду картоплі, а показники опадів коливались від 3,4 мм для Одеської області до 25,2 мм для Житомирської області, а температура у більшості областей сягала більше ніж 23°C, окрім Черкаської – 22,3°C, Київської – 21,2°C та Житомирської 20,5°C.

Найменша кількість опадів у вересні місяці випала у Донецькій області – 0,8 мм, а найбільша кількість опадів 35,9 мм спостерігалась на територіях Херсонської області. Температурні показники на початку осені, у вересні місяці 2020 року, на територіях південних областей сягали більше 20,5°C, у той час як у північних та східних областях показники температури становили від 17,5°C у Житомирській області до 19,8°C у Донецькій області.

На відміну від 2020 року у квітні 2021, погодні умови відзначились низькими температурами, що коливались від 7,6°C для Житомирської області до 9,9°C для Херсонської області та опадами більше ніж 40 мм для досліджуваних областей, окрім Донецької, де кількість опадів сягала 31,6 мм, (табл. Г.1). У травні найвищі показники температури були виявлені у Херсонській та Донецькій областях та становили 17,1°C, найнижчі показники спостерігались у Київській та Житомирській областях та сягали 14,3°C та 13,6°C відповідно.

Найбільша кількість опадів у червні 2021 року була зафіксована у Дніпропетровській – 129,3 мм та Донецькій 130,9 мм областях, найменша кількість опадів випала у Київській та Житомирській областях та становила 50,7 мм та 47,6 мм відповідно. У липні на територіях усіх досліджуваних областей випало від 36,5 мм для Миколаївської області до 59,9 мм опадів у Херсонській області. Коливання температурного режиму становило від 27,1°C для південних, східних та центральних областей до 20,1°C для північних областей. У серпні найбільша кількість опадів спостерігались у Житомирській – 60,5 мм та Черкаській – 46,9 мм областях, у решти досліджуваних областей показник опадів не перевищував 22 мм. Температурний режим у серпні 2021 року коливався від 20,8-22,0°C для північних областей до 23,4-26,5 °C для центральних, східних та південних областей.

Вересень відзначився невеликою кількістю опадів у межах від 10,9 мм у Одеській області до 28,4 мм у Житомирській області, а коливання температур

у даний період були у межах від 13,6°C для Житомирської області до 17°C у Херсонській області.

Одним з важливих показників, який використовують для моніторингу вологозабезпеченості території у вегетаційний період є комплексна величина - гідротермічний коефіцієнт Селянінова (ГТК).

Гідротермічний коефіцієнт Селянінова (ГТК), у квітні 2020 року, розраховувався лише для областей, де середня температура повітря перевищувала 10°C, дані наведено у таблиці В.1. Було отримано досить низькі показники ГТК, що свідчили про досить сухий квітень, тоді як у травні значення ГТК коливалися від 2,42 для Херсонської до 10,04 для Київської області та вказували про достатнє, а подекуди й надмірне зволоження. Вегетаційний період 2020 року характеризувався достатнім та надмірним зволоженням усіх областей у червні. Однак, у липні показник ГТК вказував на посуху різної інтенсивності в більшості областей, окрім Київської та Житомирської, де спостерігалось достатнє зволоження. Період збирання картоплі у 2020 році відзначився досить посушливою погодою з високими температурами у серпні в усіх областях, тоді як у вересні посушлива погода зберігалася в Одеській, Миколаївській, Донецькій та Дніпропетровській областях.

У 2021 році посівний період, характеризувався дещо нижчими температурами повітря та значно більшою кількістю опадів, порівняно з 2020 роком, у всіх областях (табл. Г.1.) Значення ГТК у травні були досить близькими до показників 2020 року та коливались у межах від 1,51 для Херсонської області до 8,60 для Житомирської області, що вказувало на достатнє, а у деяких областях на надмірне зволоження.

Вегетаційний період у червні 2021 року характеризувався значно більшою кількістю опадів порівняно з 2020 роком практично в усіх областях з показниками ГТК від 2,36 для Житомирської області до 6,18 для Донецької області. Гідротермічний коефіцієнт у липні місяці для досліджуваних областей

коливався у межах від 1,38 для Миколаївської області до 2,21 для Херсонської області, що вказувало на достатність вологи на даних територіях. Збиральна кампанія 2021 року характеризувалася нижчими температурами повітря, порівняно з 2020 роком, у всіх регіонах, а кількість опадів значно варіювала від дуже низької в Одеській області до досить високої в Житомирській області. ГТК серпня у більшості областей вказував на посуху різної інтенсивності від 0,45 для Донецької області до 0,82 для Херсонської області, за винятком Київської – 1,71, Черкаської – 2,0 та Житомирської – 2,91 областей. У той час у вересні показники ГТК були у межах від 0,65 для Одеської області до 2,09 для Житомирської області, що вказувало на посуху у південних областях та достатню кількість вологи у північних, східних та центральних областях.

Окрім базових погодних характеристик таких як середньомісячна температура та сума опадів, також були розраховані амплітуди температури та опадів за період вегетації картоплі (з квітня по вересень) та суми опадів (рис.3.4.). Варіації кількості опадів були значно вищими у 2021 році порівняно з 2020 роком у більшості областей, окрім Київської, Черкаської та Житомирської (рис. 3.4.A). Максимальна амплітуда опадів у 2021 році була зафіксована в Донецькій області: у 2,7 рази більша, ніж у 2020 році. У Житомирській області практично не спостерігалось відмінностей в амплітуді опадів у 2020 та 2021 роках. Незначне зростання амплітуди температури у 2021 році спостерігалось в усіх регіонах, однак найбільш виражено у Київській та Житомирській областях (рис.3.4.B). Сума опадів за період вегетації картоплі у 2021 році була суттєво більшою порівняно з 2020 роком у більшості областей, окрім Черкаської, Київської та Житомирської (рис. 3.4.C).

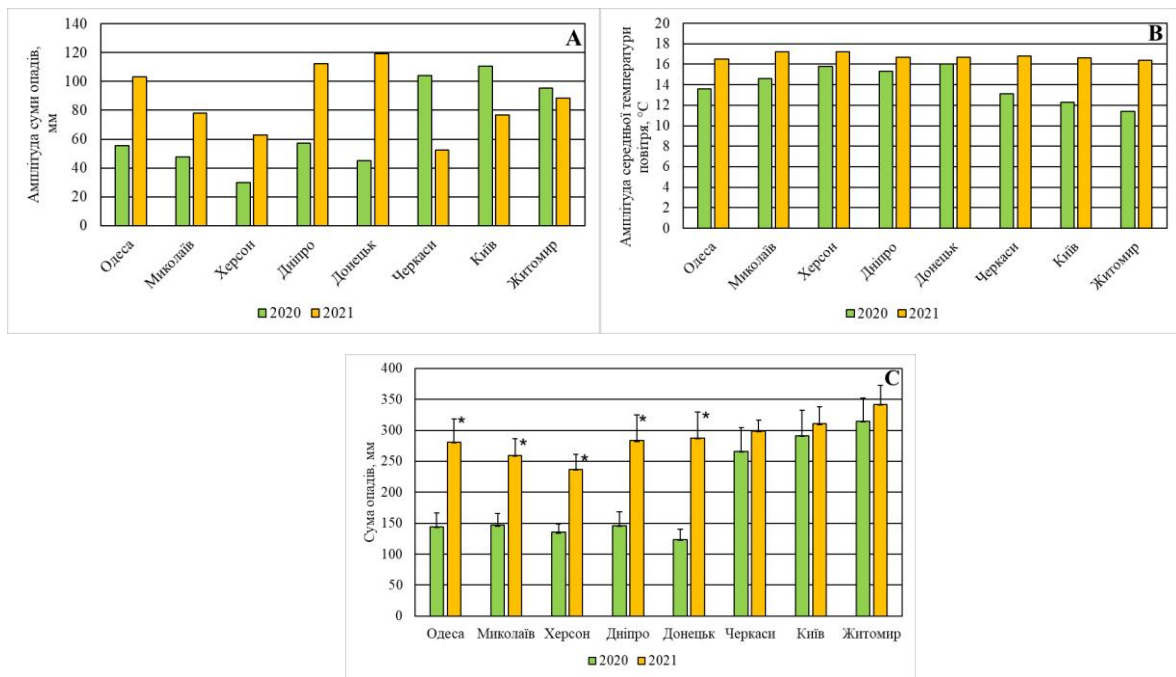


Рис.3.4. Амплітуда суми опадів (А), амплітуда середньої температури повітря (В) та сума опадів за період посіву, вегетації та збирання врожаю (С) у 2020 та 2021 роках у досліджуваних регіонах України. Дані на діаграмі С представлені як середнє значення \pm SD. * - $p < 0,05$ порівняно з 2020 роком

Як було зазначено раніше, збудник кільцевої гнилі *C. sepedonicus*, та збудник м'якої гнилі та чорної ніжки *P. atrosepticum* були виявлені в усіх досліджуваних регіонах, але поширеність латентної інвазії змінювалася між 2020 та 2021 роками практично в усіх областях (рис.3.5.).

У 2020 році *C. sepedonicus* виявлено у зразках бульб з усіх областей, крім Херсонської та Житомирської (рис.3.5.А). У 2020 році Херсонська область вирізнялася з-поміж інших регіонів найнижчими значеннями ГТК за період вирощування картоплі через низьку кількість опадів, а Житомирська область відзначалась найнижчими місячними температурами порівняно з іншими обстеженими областями у період вирощування картоплі (табл. В.1.). Найвищий відсоток поширення *C. sepedonicus* цього року спостерігався у Київській та Дніпропетровській областях: 18,9% та 12,6% відповідно. У Київській області спостерігалася найбільша кількість опадів під час посадки та початку вегетації картоплі.

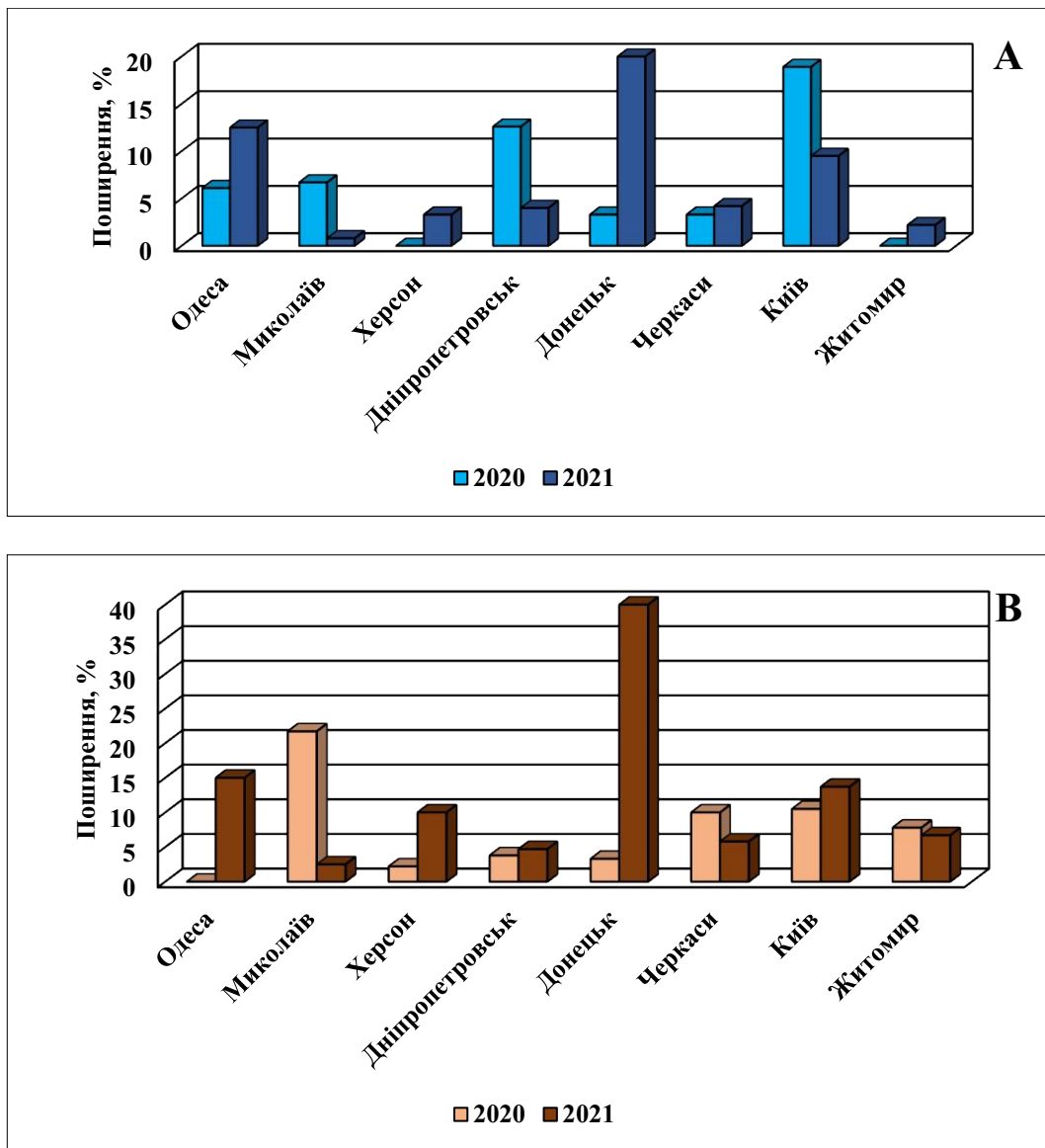


Рис.3.5. Поширеність *C. sepedonicus* (А) та *P. atrosepticum* (В) у досліджуваних бульбах картоплі нового врожаю у різних областях України у 2020-2021 рр.

У наступному 2021 році ситуація з латентним ураженням бульб картоплі збудником кільцевої гнилі змінилася. Бульби з латентною інфекцією виявлено в пробах з Херсонської - 3,3% та Житомирської - 2,2% областей. Крім того, виріс показник виявлення *C. sepedonicus* в Одеській, Донецькій та Черкаській областях. Найбільшу частку уражених бульб було виявлено у пробах Донецької області – 20%, що в шість разів перевищував показник 2020 року 3,3%. Для цього регіону характерні найбільш значні коливання кількості

опадів за період вирощування картоплі у 2021 році. Поширеність збудника у Київській, де була виявлена найменша амплітуда рівня опадів, Дніпропетровській, де спостерігалась найменша кількість опадів під час посадки картоплі та періоду початку вегетації, а також у Миколаївській, де була найнижча сума опадів за час вирощування картоплі, областях – навпаки, зменшилась відповідно в 2, 3 і 8 разів.

P. atrosepticum було виявлено в більшості обстежених областей у 2020 році, окрім Одеської області (рис. 3.5.В). Середнє значення поширеності збудника м'якої гnilі та чорної ніжки у бульбах нового врожаю на території України було близьким до такого, що і для *C. sepedonicus*: 7,4 % проти 6,4 % відповідно. Цього року найвищі показники поширеності були зафіксовані у пробах бульб з Миколаївської, Київської та Черкаської областей: 21,7%, 10,5% та 10% відповідно. Слід зазначити, що сорти картоплі, вирощені в Миколаївській області, селекціонери характеризували як середньо-стійкі до чорної ніжки, а більшість сортів Київської області – як високо- та середньо-стійкі (табл. 2.2.).

У 2021 році середня частота виявлення збудника чорної ніжки по країні зросла порівняно з 2020 роком у 1,7 рази: 12,3% проти 7,4% відповідно, що було асоційовано зі збільшенням середньої суми опадів за час вирощування картоплі в цілому в 1,5 рази у всіх обстежених областях.

P. atrosepticum було виявлено у 15% бульб середніх проб картоплі з Одеської області, причому показники поширеності збудника зросли в більшості регіонів, за винятком Миколаївської та Черкаської областей, де показники поширеності знизились у 8,7 та 1,7 рази відповідно, а також Житомирської області, де ситуація з *P. atrosepticum* суттєво не змінилася. Найвищі показники захворюваності збудником м'якої гnilі та чорної ніжки були зареєстровані у Донецькій області – 40%, що у 12,1 рази вище показника захворюваності у 2020 році. Слід зазначити, що стійкість сортів картоплі,

вироснути у регіонах з підвищеною поширеністю збудника, суттєво коливалася від низької до високої (за паспортними даними заводчиків).

Проведений нами кореляційний аналіз Спірмена підтвердив зв'язок між поширеністю *P. atrosepticum* та значеннями коефіцієнта ГТК у вегетаційний період картоплі (червень-липень) ($r = 0,721$, $p < 0,05$) (рис. 3.6.A). Сильна позитивна кореляція також була виявлена між поширеністю *P. atrosepticum* та місячною сумою опадів протягом вегетаційного періоду картоплі ($r = 0,721$, $p < 0,05$) (рис. 3.6.B). Крім того, була виявлена сильна негативна кореляція між поширеністю *P. atrosepticum* та місячною сумою середньодобових температур протягом сезону збирання картоплі (серпень-вересень) ($r = -0,736$, $p < 0,05$) (рис. 3.6.C). Щодо *C. sepedonicus* виявлено лише помірну кореляцію між поширеністю збудника та місячною сумою середньодобових температур протягом сезону садіння картоплі (травень) ($r = 0,591$, $p \geq 0,05$) (рис. 3.6.D).

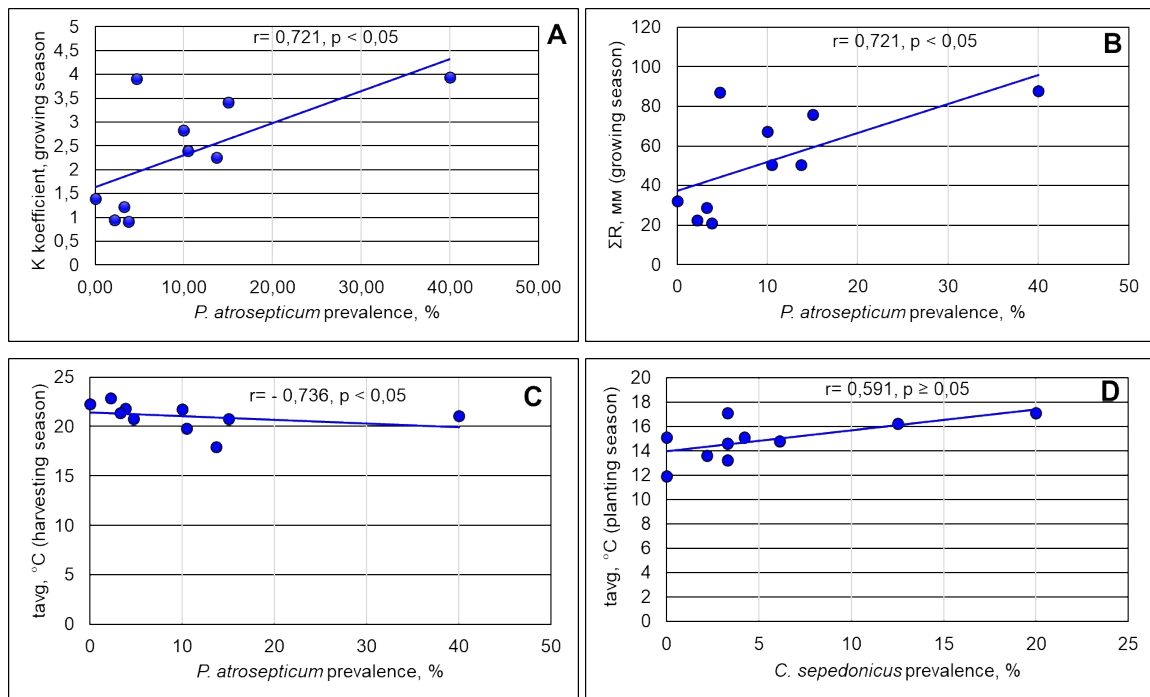


Рис. 3.6. Кореляції між поширеністю *P. atrosepticum* і *C. sepedonicus* та параметрами погодних умов.

Наші власні результати показують, що як температура повітря, так і кількість опадів відіграють однаково важливу роль у зараженні дочірніх бульб *P. atrosepticum*. Регіони з різко підвищеною поширеністю збудника м'якої гнилі та чорної ніжки у 2021 році характеризувалися найвищими значеннями температури повітря на початку вегетації 17,2°C, що є найближчим до оптимуму для активації терморегуляторних генів, пов'язаних з патогенністю пектобактерій. Донецька область з найвищим значенням поширеності також відзначалася найвищим рівнем опадів у ранній період вегетації та найбільшою сумою приросту опадів порівняно з 2020 роком. Крім того, ми виявили сильну позитивну кореляцію між поширеністю *P. atrosepticum* та значенням коефіцієнта ГТК протягом вегетаційного періоду. За даними Aung et al. [215], висока атмосферна вологість пригнічує опосередковану геном R гіперчутливу реакцію рослин. Це може бути одним із механізмів зниження стійкості до ураження збудником м'якої гнилі [216]. Не можна також виключати вплив генетичних особливостей сортів картоплі, оскільки в Херсонській області, де в 2021 році спостерігався сплеск поширення *P. atrosepticum*, використовувалися сорти картоплі, які мають загалом нижчу стійкість до чорної ніжки, порівняно з сортами, що використовувалися у 2020 році. У той же час, у Донецькій області один і той самий сорт вирощувався у 2020 та 2021 роках, що, тим не менш, не вплинуло на сплеск зараження у 2021 році. Це зайвий раз підкреслює той факт, що чутливість сортів картоплі до ураження бактеріальними патогенами залежить не лише від генетичних характеристик заданих виробником. Наші результати узгоджуються з даними Liaquat et al. [217], які виявили значну кореляцію між кількома погодними параметрами та розвитком м'якої гнилі та чорної ніжки у різних сортів картоплі, незалежно від їх генетичних характеристик.

Щодо збудника кільцевої гнилі, то наші власні спостереження дещо суперечать твердженню Green et al. [198], оскільки ми виявили помірну позитивну кореляцію між поширеністю *C. sepedonicus* та температурою

повітря в початковий період вегетації картоплі. Наші висновки узгоджуються з даними щодо кореляції між температурою повітря під час початкового росту рослин та експресією генів вірулентності видів *Clavibacter*, що уражують томати [218]. Екстремально підвищений рівень опадів у 2021 році суттєво не змінив середню поширеність збудника кільцевої гнилі в досліджуваних регіонах порівняно з 2020 роком. Це може свідчити про більшу важливість температури повітря, ніж рівня опадів, для зараження. Чутливість до кільцевої гнилі не зафіксована в сертифікатах сортів картоплі, що вирощуються на території України, і потребує подальшого дослідження.

Таким чином, поширеність збудника м'якої гнилі та чорної ніжки *P. atrosepticum* у бульбах картоплі тісно корелює з рівнем опадів. Це може бути пов'язано з негативним впливом високої атмосферної вологості на функцію та активність R-генів, що опосередковують швидко локалізовану загибель клітин у місці проникнення патогена і, як наслідок, стійкість до хвороби. Висока поширеність *P. atrosepticum* в окремих регіонах пов'язана з температурою повітря під час посадки та напочатку вегетації, яка близька до оптимальної для активації деяких терморегуляторних генів, пов'язаних з патогенністю бактерій. Поширеність збудника кільцевої гнилі *C. sepedonicus* у бульбах картоплі помірно корелює з температурою повітря під час садіння та на початку вегетації. Найбільш вірогідною причиною може бути активація експресії генів вірулентності, яка притаманна фітопатогенним представникам роду *Clavibacter* наприкінці весняного періоду.

У сукупності наші результати вказують на те, що погодні фактори, такі як температура і вологість повітря під час садіння та напочатку вегетації картоплі, можуть впливати на зараження дочірніх бульб збудниками м'якої та кільцевої гнилей. Розуміння реакції сортів картоплі з різною генетично обумовленою сприйнятливістю до м'якої та кільцевої гнилей на зміну погодних умов є надзвичайно важливим для виробників картоплі з метою

розробки заходів контролю цих хвороб, у т.ч. шляхом вибору оптимальних сортів для кожної конкретної території і потребує подальших досліджень.

3.2. Оцінка стійкості сортів картоплі, поширених на території України, до збудника м'якої гнилі та чорної ніжки в умовах різних температур інокуляції

Як зазначалось раніше, чорна ніжка та м'яка гниль бульб відносяться до повсюдно поширених бактеріальних інфекцій [219], до етіологічних збудників яких відносять представників родини *Enterobacteriaceae*, родів *Dickeya* та *Pectobacterium* [136]. Однак, левову частку в ураженні картоплі у світі чорною ніжкою та м'якою гниллю і досі займає *P. atrosepticum*, який на відміну від деяких інших представників, обмежений вузьким колом господарів [134].

Важливою причиною швидкого та масштабного поширення збудника бактеріальної гнилі картоплі, є те, що комерційних сортів картоплі, які мають природний імунітет до чорної ніжки та м'якої гнилі, спричинених видами *Dickeya* та *Pectobacterium*, не існує, однак деякі сорти демонструють часткову стійкість [220]. А вірулентність представників роду *Pectobacterium* заснована на ферментах, що руйнують клітинну стінку рослин чим порушують цілісність клітини-господаря. Однак, активація синтезу цих екзоферментів відбувається при досягненні високої щільності популяції, що координується чутливістю до кворуму через складний набір факторів транскрипції та посттранскрипційних регуляторів [140]. До інших факторів вірулентності відносять білки ворсинок, протеази, ЛПС, регулятори утворення біоплівки та рухливості, що поширені серед штамів *Pectobacterium*, оскільки вони є незамінними для забезпечення розвитку захворювання [131]. Наразі не існує ефективного методу боротьби із захворюванням, спричиненим *P. atrosepticum*, і жодні хімічні агенти не

ефективні проти патогену, а культурні практики та умови зберігання не можуть запобігти поширенню хвороби [221].

Тому наступним завданням нашої роботи було оцінити стійкість до збудника м'якої гнилі та чорної ніжки. Для виконання поставленого завдання були відібрані найпоширеніші сорти, що вирощуються на території України. Bellarosa - це ранній сорт німецької селекції (EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH) з періодом вегетації до 65 днів. У паспорті сорту зазначено високу стійкість до чорної ніжки. Зразки цього сорту були отримані з Чернігівської та Одеської областей. Queen Anne ранній сорт німецької селекції (SOLANA GmbH) періодом дозрівання до 70 днів, отриманий з Одеської області. Згідно характеристики виробника, сорт має високу стійкість до чорної ніжки. Сорт картоплі нідерландського походження (GEBR. HOLSTEIN) Picasso – середньопізній, з періодом вирощування до 140 днів. У паспорті сорту вказана низька стійкість до чорної ніжки. Зразки отримано з Київської області. Виведений в Нідерландах (Mts. Voerhave) сорт Riviera – один з найпоширеніших у нашій країні, період вегетації становить від 40 до 60 днів у полі. Зразки цього сорту отримані з Одеської та Чернігівської областей. У паспорті виробника зазначено, що сорт характеризується середньо-високою стійкістю до чорної ніжки.

На першому етапі нашого дослідження нами було оцінено рівень пошкодження бульб картоплі, інокульованих штамом *P. atrosepticum* В 1084^T, при температурі 26°C (рис.3.7.).

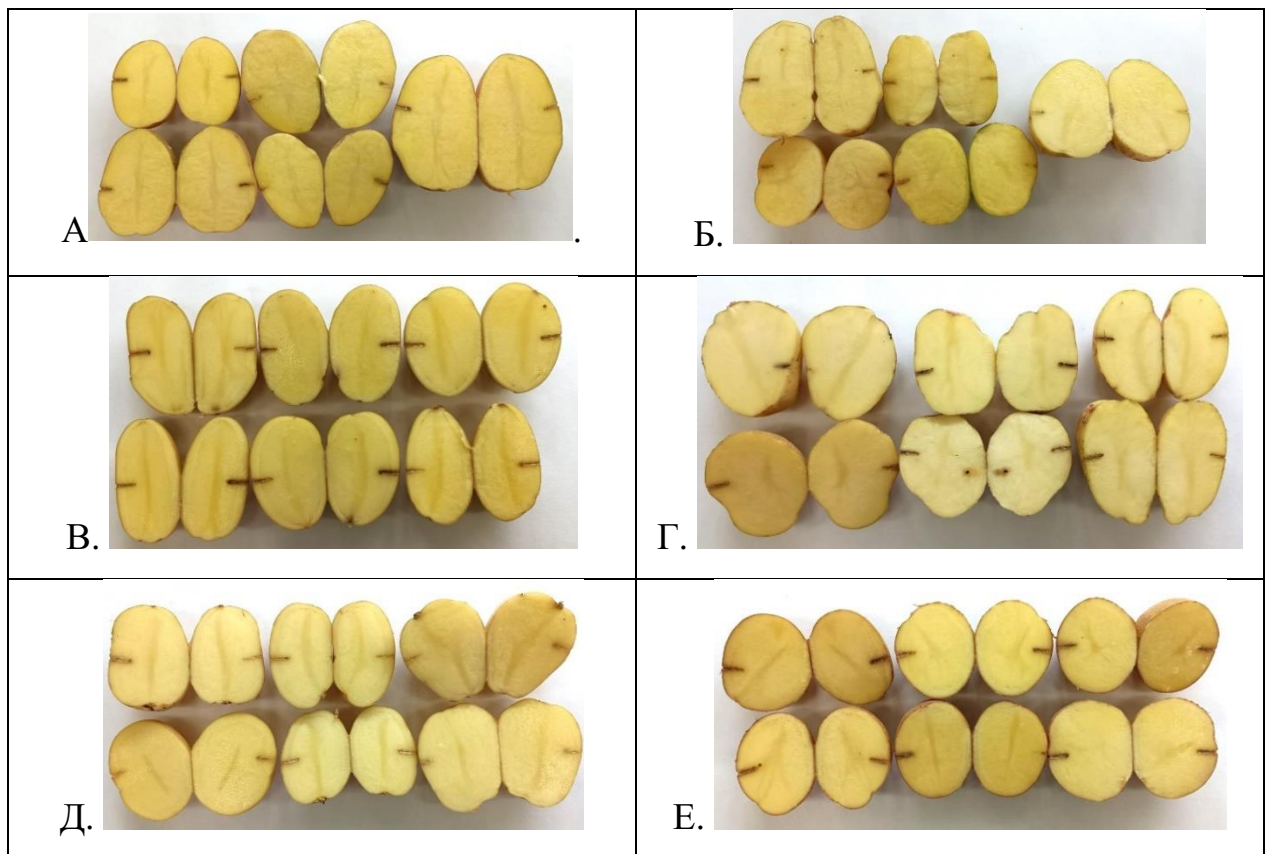


Рис.3.7. Контрольні бульби інокульовані фізіологічним розчином та інкубовані протягом 3 діб при температурі 26°C. А. Сорт Bellarosa Чернігів; Б. Сорт Riviera Чернігів; В. Сорт Queen Anne; Г. Сорт Picasso; Д. Сорт Riviera Одеса; Е. Сорт Bellarosa Одеса.

Як показали результати досліджень бульби картоплі різних сортів і навіть одних і тих же сортів, але вирощених на різних територіях України, виявили різну чутливість до ураження музейним штамом збудника м'якої гнилі та чорної ніжки (рис.3.8.). Захворюваність - частка бульб з симптомами ураження гниллю для усіх досліджуваних сортів картоплі сягала 100%.

Бульби сорту Riviera, отримані з Одеської області, зазнали значно більшого впливу пектолітичних ферментів *P. atrosepticum* В-1084^Т порівняно з бульбами інших сортів: значення площі мацерації становило 131,9 мм². Друге місце за площею ураження (98,9 мм²) посідав у той час сорт Riviera. Близькі за значеннями до сорту Riviera, вирощеного у Чернігівській області, показники

площі мацерації зареєстровано також для сортів Queen Anne (медіана = 93,8 мм²).

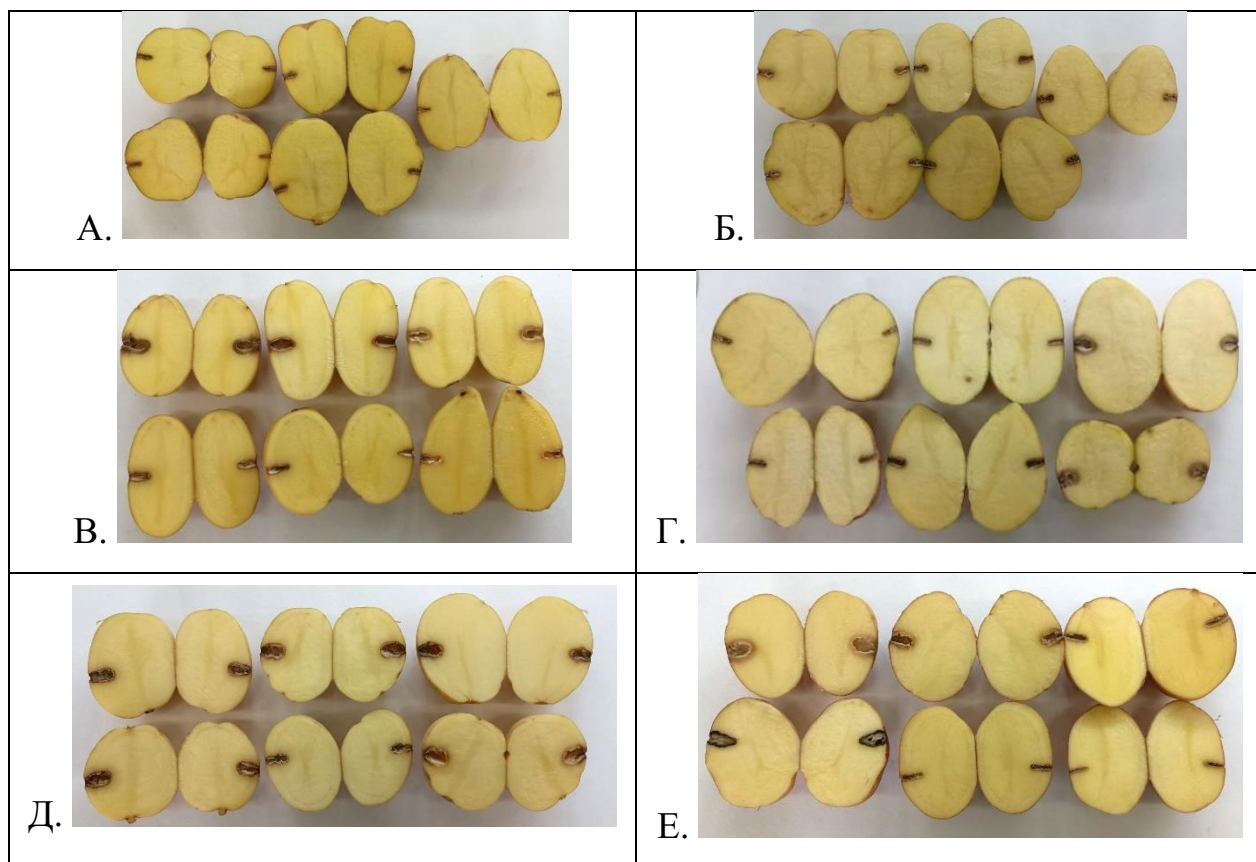


Рис.3.8. Дослідні бульби інокульовані штамом *P.atrosepeticum* В 1084^T після інкубації протягом 3 діб при температурі 26°C. А. Сорт Bellarosa Чернігів; Б. Сорт Riviera Чернігів; В. Сорт Queen Anne; Г. Сорт Picasso; Д. Сорт Riviera Одеса; Е. Сорт Bellarosa Одеса.

Деяко нижчий показник площі мацерації виявлено у бульбах сорту Bellarosa, вирощеного в Одеській області - (85,96 мм²). Медіани площі мацерації бульб сортів Picasso (49,5 мм²) та Bellarosa (Чернігів) (65,9 мм²) були, в середньому, у 2,5 разів меншими за показник для сорту Riviera з Одещини, $p \leq 0,05$ у всіх випадках (рис. 3.9.). Найнижчий ступінь ураження виявився у бульб сорту Picasso.

Отримані нами дані свідчать про те, що, за умов інкубації інокульованих бульб за температури, оптимальної для даного збудника, сорт Riviera (Одеса) був найбільш сприйнятливим до ураження музейним штамом пектолітичної

бактерії *P. atrosepticum* В 1084^T, а сорт Picasso – найменш чутливим. Слід зазначити, що показник площі мацерації для бульб сортів Picasso та Bellarosa (Одеса) характеризувався значною варіабельністю, що може вказувати на генетичну неоднорідність бульб у зразку, яка, у свою чергу, може бути пов'язана з тривалим використанням сорту без оновлення. Отримані нами дані узгоджуються з характеристиками сортів, наданими виробником, щодо стійкості до чорної ніжки.

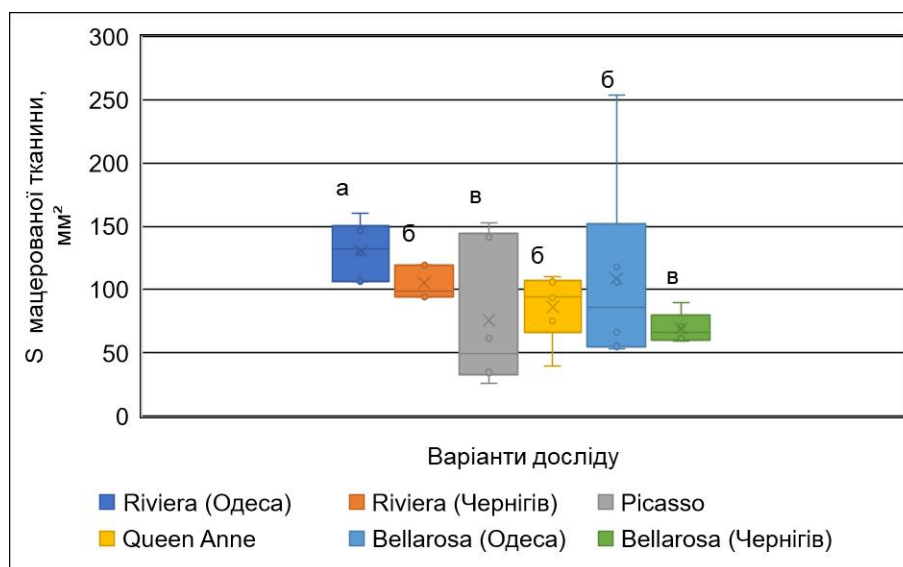


Рис.3.9. Площа мацерації бульб картоплі різних сортів, інокульованих *P.atrosepticum* В 1084^T *in vitro* за температури 26° С. Примітка: різні літери позначають статистичну вірогідність відмінності між варіантами дослідю, $p < 0,05$.

Окремо слід звернути увагу на відмінності у чутливості бульб одного й того сорту, але вирощеного на різних територіях. Так, площа мацерації бульб сорту Riviera з Одещини була в середньому в 1,4 рази вищою за аналогічний показник бульб цього ж сорту з Чернігівщини ($p \leq 0,05$). Показник площі мацерації для бульб сорту Bellarosa з Одещини був в 1,5 рази вищим ($p \leq 0,05$) за показник бульб того ж сорту з Чернігівщини. Отже, бульби зі зразків картоплі обох сортів в Одеській області, які формувалися в умовах підвищеної температури і зниженої вологості у порівнянні з картоплею з Чернігівської

області, виявилися більш чутливими до ураження пектолітичними бактеріями в лабораторних умовах.

Що стосується маси мацерованої тканини бульб картоплі (рис. 3.10.), то результати порівняльної оцінки цього показника для різних сортів частково були порівняними з результатами оцінки площі мацерації.

Найвищу масу мацерованої тканини (медіана 0,411 г) зареєстровано для бульб сорту Riviera (Одеса), для яких спостерігалась найбільша площа мацерації. Показник для решти сортів був статистично вірогідно нижчим. При цьому для того самого сорту, але вирощеного у Чернігівській області, а також для бульб зі зразка Bellarosa з Одещини показники були нижчими майже вдвічі, а для решти сортів – майже в 2,5 рази. Найменшу масу мацерованої тканини спостерігали у бульбах сорту Picasso, для якого зареєстровано найменшу площу мацерації. Однак, слід відмітити, що маса мацерованої тканини бульб зі зразка Bellarosa (Одеса) була статистично вірогідно більшою за аналогічний показник для бульб зі зразка Queen Anne, але при цьому площа мацерації у бульбах сорту Queen Anne була більшою порівняно з аналогічним показником для бульб сорту Bellarosa (Одеса). Це свідчить про те, що маса мацерованої тканини залежить не лише від площі мацерації, а й від хімічного складу тканини бульб картоплі. Достатньо високим рівнем варіабельності характеризувалися показники маси мацерованої тканини для бульб сортів Picasso, Queen Anne та Bellarosa (Одеса).

Проаналізувавши отримані дані, на даному етапі дослідження, можна говорити, що найбільш сприйнятливим до використаного штаму фітопатогенної пектолітичної бактерії *P.atrosepticum* В 1084^Г *in vitro* за температури 26°C був сорт Riviera (Одеса), як за показником площі мацерованої тканини, так і за масою мацерованої тканини бульби картоплі, а найменшу чутливість серед аналізованих сортів проявив сорт Picasso, що вказує на високу стійкість даного сорту до збудника чорної ніжки та м'якої гнилі картоплі.

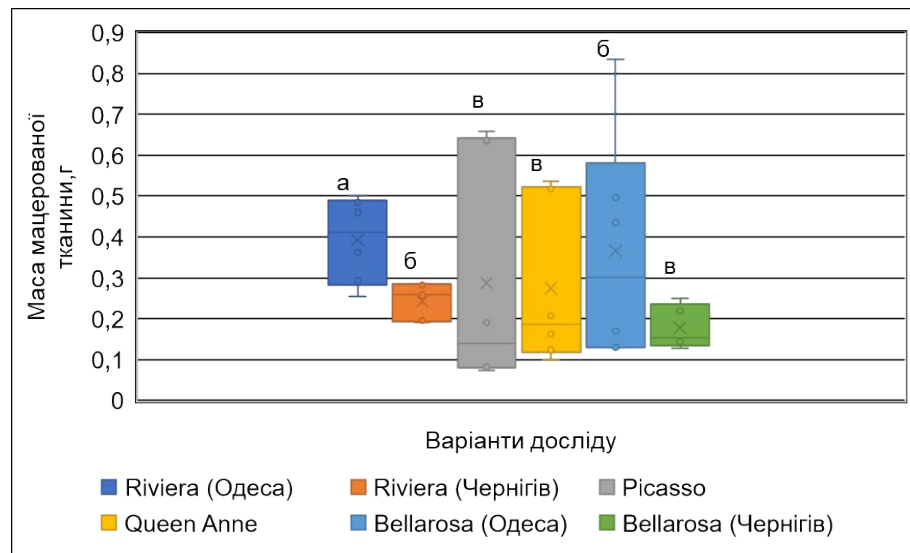


Рис.3.10. Маса мацерованої тканини бульб картоплі різних сортів, інокульованих *P.atrosepticum* В 1084^Т *in vitro* за температури 26°C. Примітка: різні літери позначають статистичну вірогідність відмінності між варіантами дослідження, $p < 0,05$.

З огляду на отримані результати, можна припустити, що різну сприйнятливість використаних сортів картоплі до гниття, при оптимальній температурі, викликаного інокуляцією *P. atrosepticum*, не можна пояснити лише різними генетичними детермінантами стійкості до хвороб у цих сортів, розроблених виробниками. З чотирьох використаних у дослідженні сортів високу стійкість, згідно даних виробників, мають сорти Bellarosa і Queen Anne. Натомість, за нашими даними стійкість цих сортів була дещо нижчою порівняно з сортом Picasso, який, згідно паспорту, характеризується низькою стійкістю до чорної ніжки. Це підкреслює важливість факторів оточуючого середовища у реалізації генетичних характеристик сорту щодо стійкості до збудників бактеріальних хвороб.

Розуміючи важливість глобальних змін клімату на розвиток та поширення інфекційних агентів на сільськогосподарських угіддях, стає критичним розуміння та аналіз впливу змін атмосферної температури на біологічні властивості збудників хвороб. Очікується, що в наступні десятиліття середня глобальна температура підвищиться на 2–5°C. У

результаті на Землі відбудуться помітні кліматичні зміни, що характеризуються екстремальними погодними явищами в найближчі десятиліття, такими як підвищення температури, зміни у кількості опадів, посухи, більш часті та сильніші торнадо та урагани [13]. Докази вказують на те, що з майбутніми змінами клімату буде посилений репродуктивний потенціал і посилене географічне поширення патогенів, що потенційно може призвести до змін у динаміці захворювання та діапазоні носіїв патогенів, викликаючи занепокоєння збільшенням спалахів захворювання. Комбіновані біотичні та абіотичні стреси також можуть призвести до змін у сигнальних шляхах захисту в рослинах, призводячи до підвищеної чутливості до ендемічних патогенів, а також до потенційно нових патогенів. Таким чином, розуміння впливу зміни клімату на поширеність і вірулентність різних біотичних стресів також має важливе значення для розробки кліматичної стійкості рослин [222].

Температура відіграє вирішальну роль у процесі гниття картоплі і було продемонстровано, що *Pectobacterium spp.* добре ростуть і є патогенними в широкому діапазоні температур. Встановлено, що температура визначає присутність виду та експресію факторів патогенності [208].

Саме тому, наступним етапом нашого дослідження було проведення аналізу стійкості обраних сортів картоплі до штаму *P. atrosepticum* В 1084^T при підвищеній температурі інкубації (рис.3.11.).

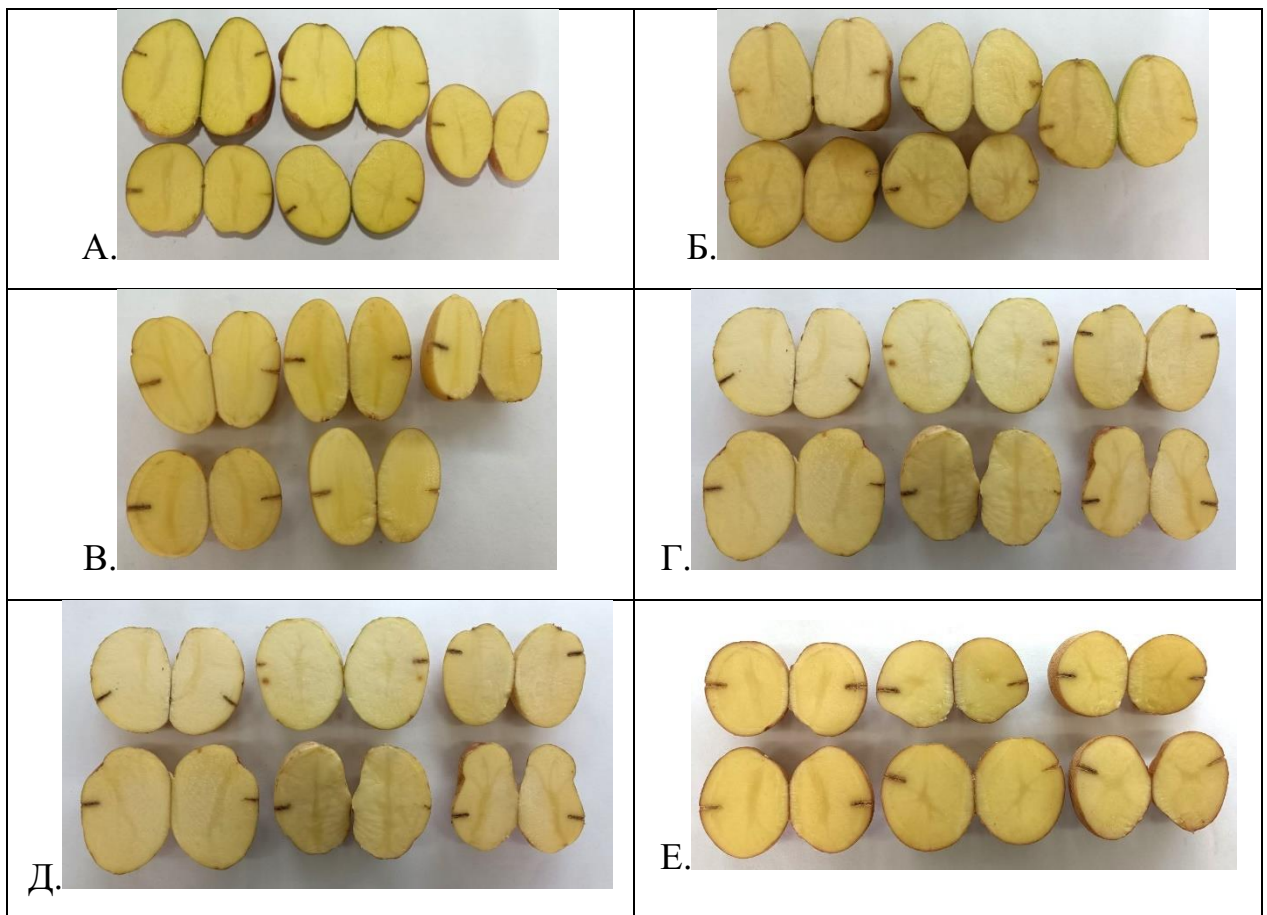


Рис.3.11. Контрольні бульби інокульовані фізіологічним розчином та інкубовані протягом 3 діб при температурі 30°C. А. Сорт Bellarosa Чернігів; Б. Сорт Riviera Чернігів; В. Сорт Queen Anne; Г. Сорт Picasso; Д. Сорт Riviera Одеса; Е. Сорт Bellarosa Одеса.

Отримані нами результати досліджень показали, що бульби картоплі різних сортів, а також одних і тих самих сортів, однак вирощених у різних регіонах України, проявляли різну чутливість до обраного музейного штаму збудника м'якої гнилі та чорної ніжки при підвищеній температурі інкубації інокульованих бульб (рис.3.12.). слід зазначити, що підвищення температури інкубації інокульованих бульб спричинило підвищення їх вразливості до пектолітичних бактерій. Площа мацерації збільшилася, в середньому, у півтора рази для сортів Bellarosa і Riviera, більше, ніж вдвічі – для сорту Picasso і майже не змінилася для сорту Queen Anne, що вказує на його стійкість,

незалежну від зміни температур і, ймовірно, повністю детерміновану генетичними характеристиками.



Рис. 3.12. Дослідні бульби інюльовані штамом *P.atrosepticum* В 1084^Т та інкубовані протягом 3 діб при температурі 30°C. А. Сорт Bellarosa Чернігів; Б. Сорт Riviera Чернігів; В. Сорт Queen Anne; Г. Сорт Picasso; Д. Сорт Riviera Одеса; Е. Сорт Bellarosa Одеса

Розподіл чотирьох досліджених сортів за площею мацерації після інкубації інюльованих бульб за температури 30°C децю змінився, порівняно з результатами після інкубації за оптимальної для збудника температури 26°C (рис.3.13). Найвища чутливість, як і за температури 26°C, спостерігалася у бульб сорту Riviera, вирощених в Одеській області. Значення медіани площі мацерації для сорту Riviera (Одеса) сягало 211,95 мм² та було в середньому у 1,7 рази вищим у порівнянні з даним показником для сорту Picasso (122,46 мм²), який проявляв найменшу вразливість до пектолітичної бактерії за

температури 26°C. Однак, за температури 30°C найменш вразливим виявився не сорт Picasso, а сорт Bellarosa (Чернігів), площа мацерації бульб якого (87,92 мм²) була у 2,4 рази меншою за даний показник для сорту Riviera (Одеса). Отримані дані вказують на стійкість сорту Bellarosa до пектолітичних бактерій в умовах підвищення температури.

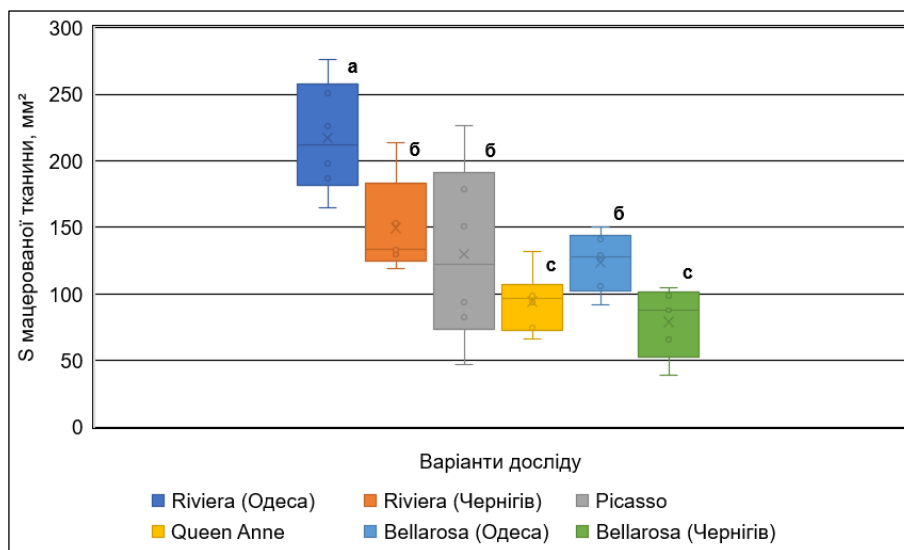


Рис.3.13. Площа мацерації бульб картоплі різних сортів, інокульованих *P.atrosepticum* В 1084^T *in vitro* за температури 30 °С. Примітка: різні літери позначають статистичну вірогідність відмінності між варіантами досліджу, $p < 0,05$.

Висока варіабельність площі мацерованої тканин бульб картоплі при 30°C була виявлена для сорту Picasso, як і на попередньому етапі дослідження.

Подібно до результатів спостереження щодо різної вразливості до пектобактерій одного й того ж сорту, вирощеного на різних територіях, після інкубації інокульованих бульб за температури, оптимальної для збудника, аналогічне явище зареєстровано і після інкубації інокульованих бульб за підвищеної температури. Бульби сорту Riviera, отримані з Одеської області, за температури інкубації у 30°C протягом 3-х діб, як і за температури інкубації, оптимальної для даного збудника, значно більшою мірою уражувались

штамом *P. atrosepticum* В 1084^T у порівнянні з бульбами цього сорту, вирощеного у Чернігівській області. Така сама закономірність спостерігалася і для сорту Bellarosa: бульби, вирощені на Одещині, були більш вразливими до пектолітичних бактерій після інкубації в умовах підвищеної температури, порівняно з бульбами з Чернігівщини. Це ще раз засвідчує, що генетичні детермінанти стійкості зазначених сортів по-різному реалізуються в різних умовах вирощування культури.

Результати порівняння маси мацерованої тканини бульб в аналізованих сортах картоплі у значній мірі були співставними з отриманими даними щодо площі мацерації при підвищеній температурі (рис.3.14.).

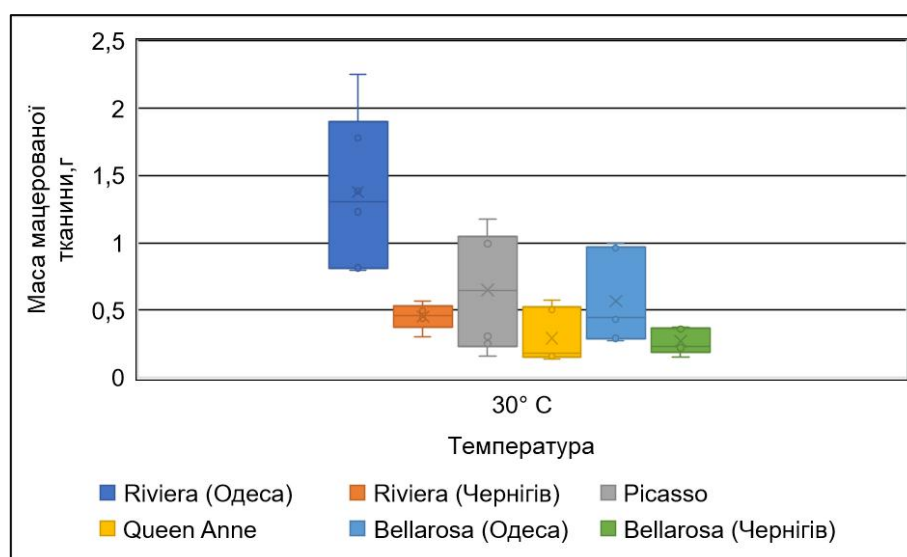


Рис.3.14. Маса мацерованої тканини бульб картоплі різних сортів, інокульованих *P.atrosepticum* В 1084^T *in vitro* за температури 30° С. Примітка: різні літери позначають статистичну вірогідність відмінності між варіантами дослідження, $p < 0,05$.

Найбільша маса мацерованої тканини (1,03 г) спостерігалась для сорту Riviera (Одеса), який мав найбільшу площу мацерації (211,95 мм²). Показник маси мацерованої тканини бульб картоплі сортів Bellarosa вирощеного на Одещині та Riviera вирощеного на Чернігівщині був статистично меншим у 2

рази у порівнянні з даним показником для сорту Riviera (Одеса). Статистично вірогідно меншою більш ніж у 3 рази була маса мацерованої тканини у досліджуваних сортах картоплі Bellarosa вирощеного на Одещині (0,44 г) і Riviera (Чернігів) (0,46 г) та у 5,5-7 разів меншою для сортів Bellarosa з Чернігівщини (0,23 г) та Queen Anne (0,18 г) у порівнянні з сортом Riviera (Одеса), $p \leq 0,05$ у всіх випадках. Найменшу масу мацерованої тканини було виявлено для сорту Bellarosa (Чернігів), що мав найменшу площу мацерації.

Слід відмітити, що у бульбах сорту Riviera з Чернігівщини, у яких виявлено більшу площу мацерації тканин у порівнянні з сортом Picasso, маса мацерованої тканини була меншою, ніж у бульбах сорту Picasso.

Отримані нами результати на даному етапі роботи вказують, що підвищення температури інкубації призвело до збільшення площі та маси мацерації тканин бульб у дослідних сортах картоплі. Збільшення показника маси мацерованої тканини на даному етапі дослідження у порівнянні з аналогічним показником при оптимальній температурі було зафіксовано для сортів Picasso та Riviera (Одеса) у 4,7 та 3,25 рази відповідно. Мінімальне збільшення маси було виявлено для сорту Queen Anne. Значно вищі показники ураження аналізованих сортів картоплі при підвищеній температурі можуть свідчити про зміну рівнів експресії генів, що відповідальні за фактори патогенності у пектолітичної бактерії *P. atrosepticum* [223].

Як було зазначено раніше, на прояв та інтенсивність бактеріальної інфекції впливають ряд факторів від сорту картоплі до кліматичних умов на територіях виробництва культури. Однак зараз, все частіше повідомляється про роль мікробіому в пом'якшенні захворювань рослин. Відомо, що ґрунтовий, ризосферний та ендofітний мікробіом містить таксони з потенційно позитивним впливом на стійкість рослин до патогенів [224]. Наприклад, Padilla-Gálvez at al. повідомили про штам *Streptomyces* з картоплі з активністю інгібування кворуму, ефективною проти пектолітичних бактерій [225]. А Morales-Cedeño at al. виявили, що мікробіом, пов'язаний з рослинами,

залежить від мікробної спільноти ґрунту як основного джерела бактерій пов'язаних з рослинами [224]. Buchholz et al довели, що бактеріальні спільноти бульб картоплі змінювалися протягом поколінь і ставали більш схожими на ґрунтову бактеріальну спільноту, тоді як вплив генетичних характеристик сорту картоплі на бактеріальну сукупність з часом втрачався [225]. Описану вище тезу підтверджують результати дослідження бактеріального співтовариства в ризосфері різних сортів картоплі, вирощених у двох різних місцях і в різні роки, показуючи, що ефект поля переважає вплив генотипу [226]. Як наслідок, ґрунт може впливати на стійкість до патогенів, бо ендоефітне мікробне співтовариство материнської бульби картоплі залежить від ґрунту, де вона була вирощена [227]. Також важливим фактором, що впливає на інтенсивність розвитку хвороби, вважають поживні речовини у бульбах картоплі. Так, Graham та Harper, досліджуючи вплив рівня азоту на чорну ніжку показали, що захворюваність, спричинена *P. atrosepticum*, була нижчою на польових ділянках із відносно високим вмістом азоту [228]. A Dubois Gill et al. вказали, що внесення азоту у ґрунт сприяє більшому прояву симптомів чорної ніжки в полі [223]. Високий рівень азоту у ґрунті також збільшує вміст нітратів у дочірніх бульбах, що теоретично може призвести до розвитку м'якої гнилі в дочірніх бульбах після збору врожаю через проліферацію пектолітичних бактерій, використовуючи нітрати одночасно як джерело азоту та акцептор електронів. [229]. Ще одним важливим компонентом, що позитивно корелює зі стійкістю до пектолітичних бактерій є вміст кальцію в тканинах рослин, механізм якого, очевидно, зумовлений взаємодією іонів з пектином клітинної стінки [230-231].

Отже, проаналізувавши отримані дані на даному етапі роботи можна зробити висновок, що сорти картоплі, які на даний період час домінують у сільськогосподарському виробництві на території України, проявляють різну стійкість до пектолітичної бактерії, збудника м'якої гнилі та чорної ніжки картоплі, не завжди напряму залежить від наданих селекціонерами паспортів сертифікації. Температура відіграє важливу роль та є одним з важливих

факторів, що впливають на інтенсивність ураження та гниття бульб картоплі, яке може бути пов'язане з генетичною складовою факторів патогенності пектолітичних бактерій [223]. А різна варіабельність прояву ураження (маси та площі мацерації) всередині сорту може вказувати на варіабельність якісних та кількісних показників поживних компонентів у бульбах, що можуть як і позитивно так і негативно впливати на інтенсивність гниття бульб картоплі. Також було виявлено, що культивування аналогічних сортів у різних кліматичних та агрогрунтових регіонах на пряму впливає на тяжкість протікання процесів мацерації тканин та вказує на те, що ефект поля переважає вплив генотипу [226]. А ґрунт може впливати на стійкість патогенів за двома основними механізмами: фізико-хімічними характеристиками, які впливають на ріст і формування механізмів стійкості до біотичних чинників, а також шляхом формування різного ендofітного угруповання мікроорганізмів у тканині бульби, оскільки склад ендofітного мікробного співтовариства материнської бульби картоплі залежить від ґрунту, де вона була вирощена [225; 227]. Зважаючи на суперечливість та нечисленність даних щодо реалізації генетичних характеристик сорту в умовах змінних умов середовища вирощування картоплі, це питання потребує поглибленого вивчення з метою оптимізації культивування такої промислово важливої культури не лише на території України, а й на території інших країн світу.

3.3. Оптимізація методів діагностики бактеріальних інфекцій

Швидке виявлення та коректна діагностика бактеріальних патогенів сільськогосподарських культур, у т.ч. картоплі, стають все більш важливими для захисту глобальної продовольчої безпеки. Виявлення фітопатогенів на ранніх стадіях створює можливість у короткий час сформувавши план заходів фітосанітарного контролю та перелік рекомендованих сільськогосподарських

методів для зменшення впливу цих хвороб на виробництво сільськогосподарських культур [232]. Виявлення збудників класичними методами мікробіології і досі залишається золотим стандартом діагностики інфекційних хвороб, включаючи виділення чистої культури, біохімічні методи ідентифікації та тестування збудника на наявність факторів патогенності. До недоліків використання мікробіологічних методів діагностики слід віднести доволі високу праце- і часозатратність, негативний вплив на стандартизацію дослідження використання доволі широкого спектру поживних середовищ. Імунохімічні методи детекції знайшли широке застосування завдяки доволі високій діагностичній інформативності, експресності та можливості стандартизації діагностичного дослідження шляхом застосування комерційних тест-систем. Одним з недоліків цієї групи методів діагностики фітопатогенів є обмеження у кількісному аналізі антигенного навантаження. Запровадження методу ПЛР, як зазначено вище, привело до розробки безлічі діагностичних інструментів, які допомогли підвищити ефективність діагностики та забезпечити визначення характеристик збудників інфекційних захворювань шляхом виявлення та ідентифікації їх ДНК [233]. На відміну від фенотипових характеристик, оцінка яких лежить в основі мікробіологічних методів детекції і які можуть бути змінними, методи молекулярної ампліфікації використовують переваги використання стабільних генотипових характеристик. Ще однією важливою діагностичною перевагою ПЛР є те, що виявлення нуклеїнової кислоти не потребує трудомісткого культивування мікробної біомаси. Бактеріальний геном забезпечує варіабельні області для ідентифікації видів, а фактори вірулентності або локуси токсинів можуть бути корисними для визначення патогенності організму [234]. Крім того, чутливість методів ПЛР переважає таку для більшості існуючих на ринку тест-систем для виявлення фітопатогенів на основі імунохімічного аналізу. Особливої уваги заслуговує факт циркуляції різних представників фітопатогенних бактерій, у т.ч. збудників гнилей картоплі, на різних територіях. Оптимізація протоколів діагностики бактеріальних хвороб з урахуванням цього факту є шляхом до

підвищення діагностичної інформативності процедури їх виявлення. Саме тому наступним завданням нашого дослідження було оптимізувати протоколи виявлення основних бактеріальних збудників гнилей картоплі.

3.3.1. Розробка протоколу виявлення комплексу видів *Ralstonia solanacearum* та *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

У процесі моніторингу латентного ураження бульб картоплі пектолітичними бактеріями роду *Pectobacterium* – збудниками чорної ніжки та м'якої гнилі (бульб) у посівах картоплі – перед нами постала проблема відсутності комерційних ІФА тест систем для виявлення одного з представників цього роду з відмінними від *P. atrosepticum* біологічними властивостями, які зумовлюють високий рівень його шкодочинності – *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* вважається не менш економічно важливим фітопатогенним мікроорганізмом, ніж *P. atrosepticum*. Він є повсюдним некротрофним фітопатогеном, важливою біологічною особливістю якого є широке коло господарів таких як морква, капуста, огірок, баклажан, часник, цибуля, перець, гарбуз та помідори, на відміну від *P. atrosepticum*, основною вразливою рослиною-хазяїном для якого є картопля [140, 235, 326]. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* належить до трійки етіологічних агентів, які спричиняють захворювання на чорну ніжку та м'яку гниль (бульб) у посівах картоплі [237]. Це грамнегативний, факультативно анаеробний мікроорганізм, що здатний виживати не лише в уражених бульбах, а й у рослинних рештках наявних у ґрунті, в кореневій системі бур'янів і польових культур, а також у поверхневих водах [131].

У дисертаційній роботі Ірини Вернигори наведено результати дослідження поширеності цього збудника м'якої гнилі в урожаї картоплі на території Полісся у господарствах різної форми власності протягом 2007-2009

pp. За результатами проведеного дослідження автори характеризують виділені ізоляти *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* як такі, що мали найвищі показники патогенності серед досліджених пектобактерій. Виявлення мікроорганізмів проводилося мікробіологічними методами, які, як зазначено вище, мають низку обмежень і не завжди є релевантними для проведення скринінгового дослідження [238].

Ю.В. Коломієць та колеги повідомили про поширення *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* у тепличних господарствах Київщини при фітосанітарних оглядах фермерських господарств у 2019-2020 роках [205], що вказує на триваючу персистенцію цього збудника в агрофітоценозах України з потенційно високим потенціалом поширення. Обширне коло господарів, широке розповсюдження м'якої гнилі, та відсутність комерційних ІФА тест систем для виявлення *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* актуалізували необхідність створення швидкого простого та якісного методу діагностики для подальшого дослідження поширеності цього збудника не лише у сільськогосподарських угіддях, а й у продуктах харчування. Зазначеним вимогам відповідає метод ПЛР, який характеризується високою діагностичною точністю та інформативністю, а також є одним з методів у фітопатології, релевантним для скринінгових і моніторингових досліджень поряд з ІФА.

З огляду на вище зазначене, перший етап досліджень даного завдання роботи був присвячений створенню специфічних праймерів для виявлення *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

При конструюванні праймерів ми дотримувались загальноприйнятих рекомендацій та вимог щодо структури та фізико-хімічних властивостей праймерів для ПЛР. Розмір праймера має бути у межах 15 – 25 п.н.; температура плавлення праймерів (T_m), тобто температура при якій 50% дволанцюгової ДНК розходиться, була в діапазоні між 52-58°C також рекомендовано щоб T_m праймерів у парі була в межах 1-5°C один від одного,

для забезпечення основних стадій ПЛР; відсоткове співвідношення GC від загальної кількості основ, орієнтація на переважний вміст пар GC між 45-60% для кожного праймера; наявність GC затискачів на 3'-кінці для специфічного зв'язування праймера, однак не більше 3 гуанідину або 3 цитозину з 5 кінцевих нуклеотидів та відсутність здатності до димеризації та значного утворення шпильок [239].

Для розробки специфічних праймерів було обрано ділянку внутрішньо транскрибованого спейсеру *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (AF232677.1), що розташований між 59-378 нуклеотидом 16S-23S рРНК. Специфічність та гомологію запропонованих послідовностей праймерів аналізували за допомогою інструменту пошуку базового локального вирівнювання (BLAST) та бази даних GenBank. Аналіз та множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили з використанням програмного забезпечення T-Coffee, щоб уникнути невідповідностей праймерів та підвищити їх специфічність до широкого діапазону ізолятів (табл.3.1.).

Таблиця 3.1.

Характеристика сконструйованих прямих та зворотних праймерів використаних у дослідженні *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Назва праймера	Вид праймера	Вміст GC, %	Кількість основ	T _m , °C	Кількість нуклеотидів			
					A	C	G	T
PCCs	Прямий	42,3	26	65	8	2	9	7
PCCa	Зворотній	60	20	63	4	6	6	4

Специфічність сконструйованої пари праймерів була перевірена на генетичному матеріалі наданих музейних штамів фітопатогенних бактерій із колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології (ІМВ) імені Д.К. Заболотного НАН України.

Пара праймерів PCCs/PCCa давала продукт ампліфікації розміром 320 пар нуклеотидів лише з генетичним матеріалом специфічних штамів та не давала жодних продуктів ампліфікації з іншими штамми фітопатогенних бактерій (рис.3.15.).

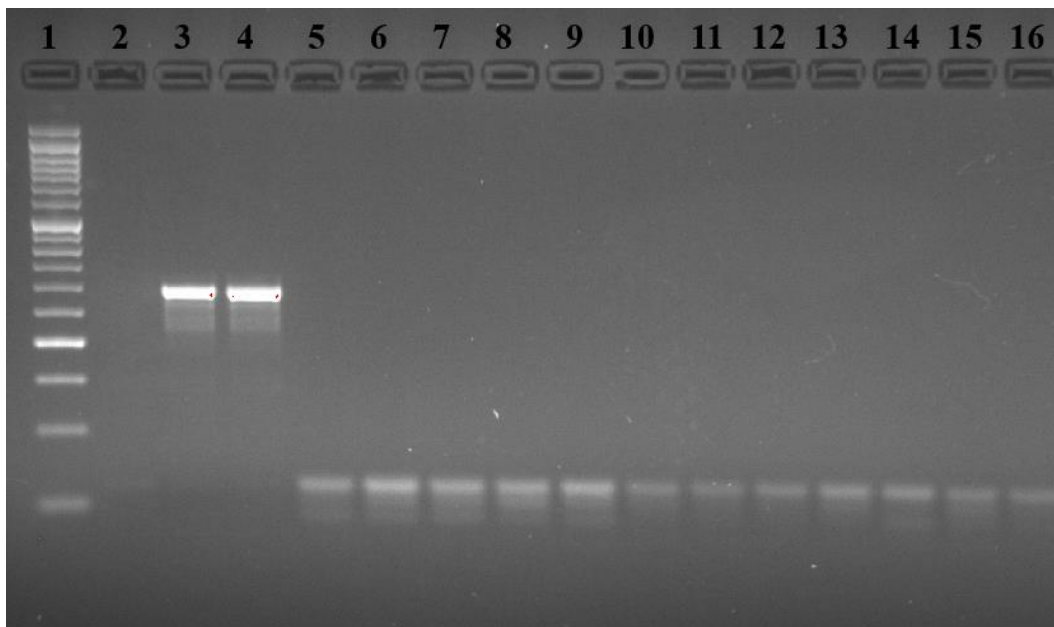


Рис.3.15. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з використанням сконструйованої пари праймерів PCCs/PCCa. 1 — Маркер молекулярної маси, крок 50 п.н.; 2 - негативний контроль; 3 - *P. carotovorum subsp. carotovorum* (1097); 4 - *P. carotovorum subsp. carotovorum* (B-1079); 5 - *P. carotovorum* (B-1075); 6 - *P. atrosepticum* (B-1084); 7 - *P. atrosepticum* (B-1103); 8 - *R. solanacearum* (Smith 1896)Yabuuchi et al. 1992 ICMP 5712; 9 - *R. solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1992 ICMP 7859; 10 - *C. michiganensis subsp. michiganensis* (Ac-1996), 11 - *C. michiganensis subsp. sepedonicus* (Ac-1995); 12 - *C. michiganensis subsp. sepedonicus* (Ac-1997); 13 - *P.syringae pv. syringae* (B-1022); 14 - *P. syringae pv. syringae* (B-1028); 15 - *X. campestris pv.campestris* (B-1070); 16 - *X. vesicatoria* (B-1060).

Варто зазначити, що *P. carotovorum subsp. carotovorum* фітопатогенна бактерія з широким спектром рослин-господарів, що викликає м'яку гниль, в'янення та чорну ніжку картоплі, а також спричиняє гнилі у овочевих, бобових та інших культур. А також, враховуючи той факт, що запропонована

нами тест-система, може бути використана для діагностики на культурах, де зустрічається даний збудник, тому для перевірки специфічності праймерів, були обрані фітопатогени, що широко розповсюджені в агрофітоценозах України та уражають як пасльонові, так і непасльонові рослини. Для прикладу, *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, томат вважається основним господарем [240], однак представники родини Пасльонові, включаючи картоплю та баклажан, та інші види культурних рослин таких як: огірок, соняшник, кавун чутливі до природного зараження та/або штучної інокуляції [207, 241, 242] *S. sepedonicus* - патоген який в основному має тенденцію існувати безсимптомно як латентна інфекція картоплі [8, 243]. Комплекс видів *R. solanacearum* широко поширений сільськогосподарськими угіддями у світі та викликає бактеріальне в'янення широко спектру рослин та буру гниль бульб картоплі, через що внесений до списку карантинних організмів EPPO [92]. *X. vesicatoria* викликає бактеріальну плямистість томатів та перцю, а також інших представників родини Пасльонові і може бути виявлена на плодах картоплі [244]. Інші фітопатогенні бактерії не уражують представників родини Пасльонові, включаючи картоплю. *P. syringae* уражає деревні та трав'янисті рослини-господарі [245], а *X. campestris* pv. *campestris* викликає чорну гниль хрестоцвітих [246] Ці два фітопатогени слугували потенційно негативним контролем.

Результати моніторингу латентного інфікування врожаю картоплі збудниками м'якої та кільцевої гнилі, виявлена кореляційна залежність ступеню ураження бульб збудниками зазначених бактеріозів від кліматичних характеристик зони вирощування, а також істотний вплив агрокліматичних факторів на генетично детерміновану стійкість різних сортів картоплі до збудників гнилей спонукали нас до планування у майбутніх дослідженнях проведення за розробленим алгоритмом скринінгу ураження врожаю картоплі представниками комплексу видів *Ralstonia solanacearum*. Як зазначено в огляді літератури, представники RSSC становлять серед економічно важливих

видів фітопатогенних бактерій рослин особливий інтерес для наукової спільноти у зв'язку з тим, що картопля займає одне з провідних місць серед цінних сільськогосподарських культур, що уражуються представниками цього комплексу. Представники RSSC здатні виживати довгий період часу, швидко поширюватися та адаптуватися до різних екологічних ніш, включаючи ґрунт, воду та нові види рослин [247].

Хвороба, що викликається даними збудниками, завдає значних збитків виробництву картоплі у всьому світі [96, 248-249]. В Європейському Союзі (ЄС) RSSC включений до Списку А2 шкідливих організмів, рекомендованих для контролю та ліквідації [92]. Також, варто зазначити, що згідно наказу Міністерства розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України №750 від 13.04.2021 «Про затвердження інструкцій з виявлення, локалізації та ліквідації деяких регульованих шкідливих організмів картоплі», відповідно до затверджених інструкцій, фітосанітарна експертиза (аналіз) з метою виявлення та діагностики збудників бурої бактеріальної гнилі, раку картоплі, кільцевої гнилі та картопляних цистоутворюючих нематод проводиться відповідно до методів, зазначених у ДСТУ 4709:2006, стандартах ЕРРО, інших міжнародних, регіональних, галузевих або національних стандартах, з використанням рекомендованих виробниками обладнання або тест-систем, описаних у відповідних наукових чи науково-практичних фахових публікаціях, з урахуванням положень законодавства України про карантин рослин [14]. Такий широкий спектр дозволених до використання стандартів та методів, лише констатує той факт, що для України постає гостра потреба у розробці та впровадженні нових, оптимізації вже існуючих тест-систем з виявлення та діагностики вищезазначених збудників. Використання власних, уніфікованих методів фітосанітарної експертизи дозволить коректно дослідити наявність та поширення в агрофітоценозі України збудників бактеріальних гнилей картоплі.

Нещодавня рекласифікація видів *Ralstonia* та багатокрокові методики ідентифікації на основі внутрішньовидових відмінностей вимагають глибокого розуміння біології та еволюції збудника. Саме тому розробка уніфікованого методу для виявлення комплексу видів *Ralstonia* дозволить швидко та якісно проводити регулярний епідеміологічний моніторинг.

З огляду на вище зазначене, другий етап роботи щодо вдосконалення методології виявлення збудників бактеріальних гнилей картоплі, був присвячений оптимізації протоколу детекції представників RSSC методом ПЛР. Для цього на початкових кроках для виявлення комплексу видів *Ralstonia solanacearum* було використано пару праймерів OLI-1/Y-2 (Seal et al.). Згідно з протоколом Seal et al. [92, 250], використання специфічного праймера OLI-1 разом із неспецифічним праймером Y2, що був синтезований Young et al. для ампліфікації часткового фрагменту, що відповідає положенню 40-337 16S рРНК *Escherichia coli*, для більшості ДНК, що кодують 16S рРНК, при ПЛР за температури відпалу 66°C дозволяє отримати специфічний амплікон розміром 287–288 п.н. для штаму К60. У наших експериментах пара праймерів OLI1/Y2 давала несподівано коротший фрагмент довжиною 250 п.н. замість очікуваного фрагмента довжиною 288 п.н. для обох штамів *R. solanacearum*: ICMP 5712 і ICMP 7859 (рис.3.16.). Індукований відносною вологістю або температурою перехід від В-ДНК до А-ДНК може бути однією з причин отримання продукту ПЛР, який є коротшим, ніж очікувалося, оскільки під час переходу В-А довгий і вузький В-дуплекс перетворюється на нижню і компактну структуру А-ДНК [251-253].

На основі отриманих даних, щодо неоднозначної роботи рекомендованої пари OLI1/Y2. Нами було прийнято рішення, розробити власні пари праймерів до консенсусної послідовності 16S рРНК RSSC.

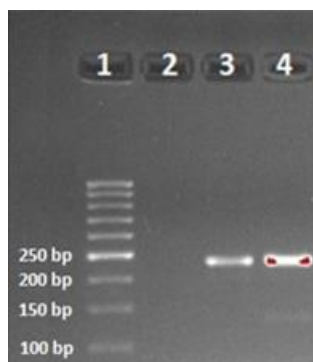


Рис.3.16. Продукти ампліфікації специфічних праймерів OLI1/Y2 при розділенні у 2% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію з використанням горизонтального електрофорезу. 1 – маркер молекулярної маси, крок 50 п.н.; 2 - негативний контроль; 3 – *R. solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1992 ICMP 5712; 4 – *R. solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1992 ICMP 7859.

Специфічність та гомологію запропонованих послідовностей праймерів аналізували за допомогою інструменту пошуку базового локального вирівнювання (BLAST) та бази даних GenBank. Аналіз і множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили з використанням програмного забезпечення T-Coffee, щоб уникнути невідповідностей праймерів та підвищити їх специфічність до широкого діапазону ізолятів (табл.3.2.).

Праймери були розроблені для отримання відносно коротких продуктів ПЛР, які чітко відрізнятимуться за довжиною після електрофоретичного розділення. Зворотні праймери (OLI-160 і OLI-248) були сконструйовані на основі прямого праймера, запропонованого Seal et al. [250]. Додатково було підібрано пару праймерів Rs-28 і Rs-193, яка утворювала продукт ампліфікації в межах 228 п.н.

**Характеристика сконструйованих прямих та зворотних праймерів
використаних у дослідженні комплексу видів *R. solanacearum***

Назва праймера	Вміст GC, %	Кількість основ	T _m , °C	Кількість нуклеотидів				Вид праймера
				A	C	G	T	
OLI160	60,0	20	63	4	7	5	4	Зворотній
OLI248	60,0	20	63	3	5	7	5	Зворотній
Rs28	50,0	20	58	6	2	8	4	Прямий
Rs193	55,0	20	60	5	9	2	4	Прямий

Сконструйовані у дослідженні пари праймерів, були перевірені на специфічні взаємодії з генетичним матеріалом штамів *R. solanacearum*:

- *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1992 ATCC 11696 (ICMP 5712), також відомий як K60, що належить до філотипу II, біовару I та секвевару 7, був виділений у 1953 році з томатів Marglobe (*Lycopersicon esculentum*) у Ролі, Північна Кароліна, США, і широко використовувався для дослідження бактеріального в'янення [254];
- *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1992 ICMP 7859 був виділений I. Herrera у 1974 році з картоплі (*Solanum tuberosum* L.) у Морропоні, Піура, Перу та депонований у ICMP у 1983 році та відноситься до біовару I [255].

та 12 штамів інших фітопатогенних бактерій. Як негативний контроль при постановці ПЛР використовувалась ddH₂O.

Аналіз семи сконструйованих пар праймерів дав розуміння розмірів очікуваних продуктів ампліфікації: 160, 248, 193, 166, 132, 220 і 260 п.н. відповідно. Пари праймерів OLI/OLI-160, OLI/OLI-248 і OLI/Rs193 не давали жодних продуктів ампліфікації. На рис.3.17. представлено лише чотири з шести перевірених пар праймерів, що давали специфічні фрагменти ампліфікації очікуваної довжини для штамів бактерій *R. solanacearum*.

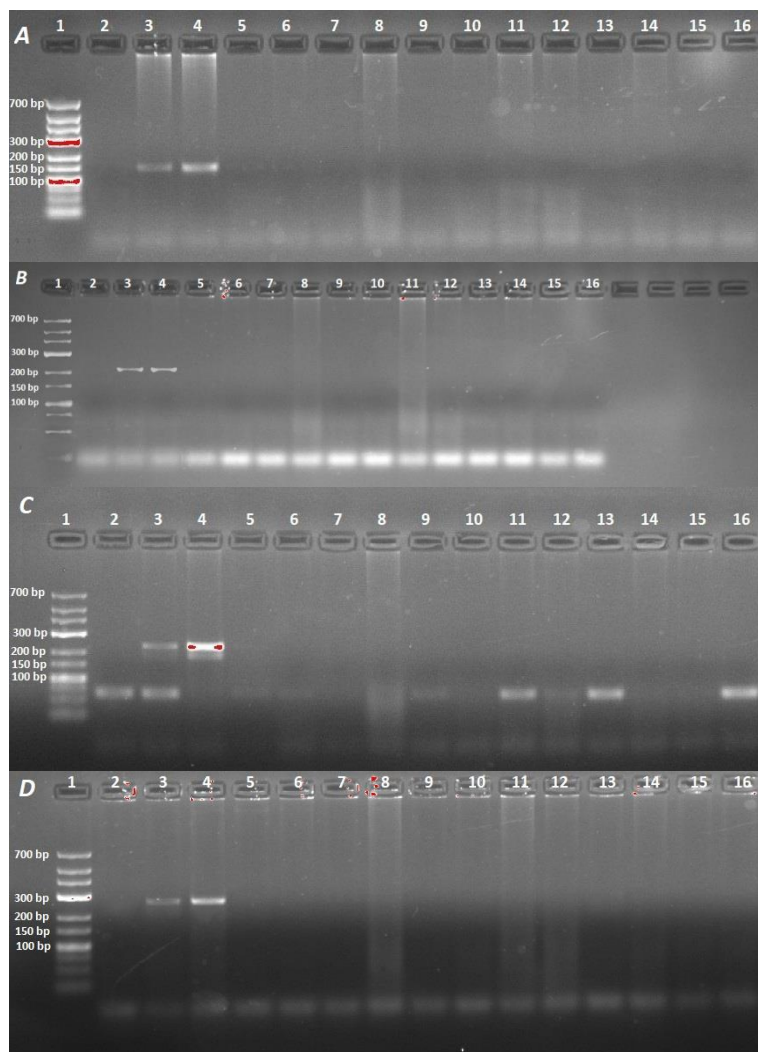


Рис.3.17. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з використанням сконструйованих пар праймерів: Rs-28/Rs-193 (A), Rs-28/OLI-160 (B), Rs28/ OLI248 (C) та Rs28/Y2 (D). 1 — Маркер молекулярної маси, крок 50 п.н.; 2 - негативний контроль; 3 - *R. solanacearum* (Smith 1896)Yabuuchi et al. 1992 ICMP 5712; 4 - *R. solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1992 ICMP 7859; 5 - *C. michiganensis subsp. michiganensis* (Ac-1996), 6 - *C. michiganensis subsp. sepedonicus* (Ac-1995), 7 - *C. michiganensis subsp. sepedonicus* (Ac-1997), 8 - *P. carotovorum* (B-1075), 9 - *P. atrosepticum* (B-1084), 10 - *P. atrosepticum* (B-1103), 11 - *P. carotovorum subsp. carotovorum* (1097), 12 - *P. carotovorum subsp. carotovorum* (B-1079), 13 - *P.syringae pv. syringae* (B-1022), 14 - *P. syringae pv. syringae* (B-1028), 15 - *X. campestris pv.campestris* (B-1070), 16 - *X. vesicatoria* (B-1060).

Саме пари сконструйованих праймерів: Rs-28(F)/Rs-193(R), Rs-28(F)/OLI-160(R), Rs28(F)/OLI248(R) у ході ПЛР формували амплікони довжиною 166 п.н., 132 п.н. і 220 п.н. відповідно. Пара Rs28(F)/Y2(R) давала фрагмент довжиною 260 п.н. Жодних продуктів ампліфікації при ПЛР не було отримано для негативного контролю або нецільових матриць ДНК з інших видів бактерій, мотивація вибору яких для проведення цього дослідження була аналогічною тій, що використовувалася для вибору переліку тестованих мікроорганізмів при розробці праймерів для тестування *P. carotovorum subsp. carotovorum* – охоплення широко спектру збудників бактеріозів картоплі, а також фітопатогенів, для яких картопля не є рослиною-хазяїном, з метою якомога більш широкої перевірки потенційної перехресної реактивності розроблених праймерів.

Отже, на першому етапі цієї частини роботи, присвяченої вдосконаленню методів детекції збудників бактеріальних гнилей картоплі було досліджено та розроблено пару праймерів PCCs/PCCa до ділянки внутрішнього транскрибованого спейсеру *P. carotovorum subsp. carotovorum*, що розташований між 59-378 нуклеотидом 16S-23S рРНК.. На другому етапі нами було перевірено рекомендовану пару праймерів OLI1/Y2 Seal at. all з протоколу ЕРРО для ідентифікації представників комплексу видів *Ralstonia solanacearum*. Проаналізовано та сконструйовано пари праймерів до фрагменту, що відповідає положенню 40-337 16S рРНК. Сконструйовані пари праймерів можуть бути використані для розробки ПЛР-системи щодо якісної та кількісної детекції комплексу видів *Ralstonia solanacearum* та збудника м'якої гнилі *P. carotovorum subsp. carotovorum*.

3.3.2. Кількісне визначення комплексу видів *Ralstonia solanacearum* та *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* з використанням оптимізованого протоколу ПЛР

Наступний етап нашої роботи був присвячений розробці методу кількісного визначення комплексу видів *Ralstonia solanacearum* та *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*. У даному випадку саме кількісна ПЛР у реальному часі або qPCR, окрім простого виявлення ДНК збудника у зразку дозволяє у режимі реального часу визначити його кількість, співставляючи отримані дані з калібрувальною кривою [256,169], що дозволить у майбутньому виявити джерела максимальної концентрації збудника, а також провести диференційну оцінку чутливості сортів картоплі за кількістю накопиченого збудника як під час польових досліджень, так і у процесі лабораторних експериментів.

На даному етапі роботи нами були використані розроблені на попередньому етапі пари праймерів для виявлення та ідентифікації представників комплексу видів *Ralstonia solanacearum* та *P. carotovorum subsp. carotovorum* та сконструйовані ДНК-зонди (таблиця 3.3.) для проведення ПЛР у реальному часі, які є нуклеотидною послідовністю, на 5'-кінці котрої приєднана флуоресцентна репортерна молекула, а на 3'-кінці молекула-гасник флуоресценції. Послідовність ДНК-зондів була підібрана аби гібридизація відбувалась зі специфічною ділянкою послідовності ДНК, що розташована у межах між прямим і зворотнім праймерами.

При розробці ПЛР системи для ідентифікації методом ПЛР у реальному часі для комплексу видів *R. solanacearum* була відібрана пара праймерів Rs28/OLI248, а для представника пектолітичних бактерій *P. carotovorum subsp. carotovorum* була обрана розроблена нами пара праймерів PCCs/PCCa.

Сконструйовані олігонуклеотидні зонди були мічені флуоресцентним репортерним барвником FAM та гасником флуоресценції BHQ1.

Таблиця 3.3.

Характеристика сконструйованих ДНК-зондів

Назва ДНК-зонда	Вміст GC, %	Кількість основ	T _m , °C	Кількість нуклеотидів			
				A	C	G	T
Probe_Rs	55	20	60	6	6	5	3
Probe_Pcc	64,0	25	72	4	10	6	5

Для приготування реакційної суміші (табл.3.4.) використовували набір реактивів Luna Universal Probe qPCR Master Mix, який є готовим до використання оптимізованим буферним розчином та містить у своєму складі ДНК-полімераза *Taq* та суміш dNTP. Після підготування реакційної суміші її добре суспендували та струшували, аби не створити піни та бульбашок. Суміш вносили у всі пробірки, але у різні пробірки додавали стандартні зразки збудників, що містять визначену кількість ДНК фітопатогенів *R. solanacearum* B1109T, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* та воду як негативний контроль.

Ампліфікацію здійснювали в режимі реального часу, використовуючи прилад CFX96 за наступною програмою (табл.3.5.), налаштовуючи детекцію за каналом FAM. Під час проведення ПЛР у реальному часі при наявності цільової ДНК відбувалося накопичення у реакційній суміші продуктів ампліфікації, що призводило до збільшення флуоресценції, на довжинах хвиль 450-490 нм.

Посилення флуоресценції у FAM каналі у ході ампліфікації цільових послідовностей ДНК, задокументовано на графіку ампліфікації, де вісь ординат виражена у відносних одиницях флуоресценції, а вісь абсцис виражена у кількості циклів.

Табл. 3.4.

Реакційна суміш для проведення ПЛР у реальному часі

Комплекс видів <i>R. solanacearum</i>	
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10 мкл
Rs28/OLY248 суміш праймерів (10 пмоль)/	1 мкл
Probe_Rs (5 пмоль)	0,5 мкл
ДНК	2,0 мкл
Вода деіонізована	6,5 мкл
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10 мкл
PeCCf/PeCCr суміш праймерів (10 пмоль)/	1 мкл
Probe_Pcc (5 пмоль)	0,5 мкл
ДНК	2,0 мкл
Вода деіонізована	6,5 мкл

Таблиця 3.5.

**Протокол ПЛР у реальному часі, використаний для ампліфікації
послідовностей цільової ДНК**

Температура,	Тривалість, с	Кількість повторів
Комплекс видів <i>R. solanacearum</i>		
95°C	180 с	Один повтор
95°C	20 с	39 циклів
60°C	20 с	
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>		
94°C	180 с	Один повтор
94°C	20 с	39 циклів
64°C	20 с	

При детекції рівнів флуоресценції, що перевищують граничне значення або поріг ПЛР-реакції в реальному часі (горизонтальна суцільна лінія) (рис.3.18.), вказує на присутність цільової ДНК *R. solanacearum* В 1109^T. та *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

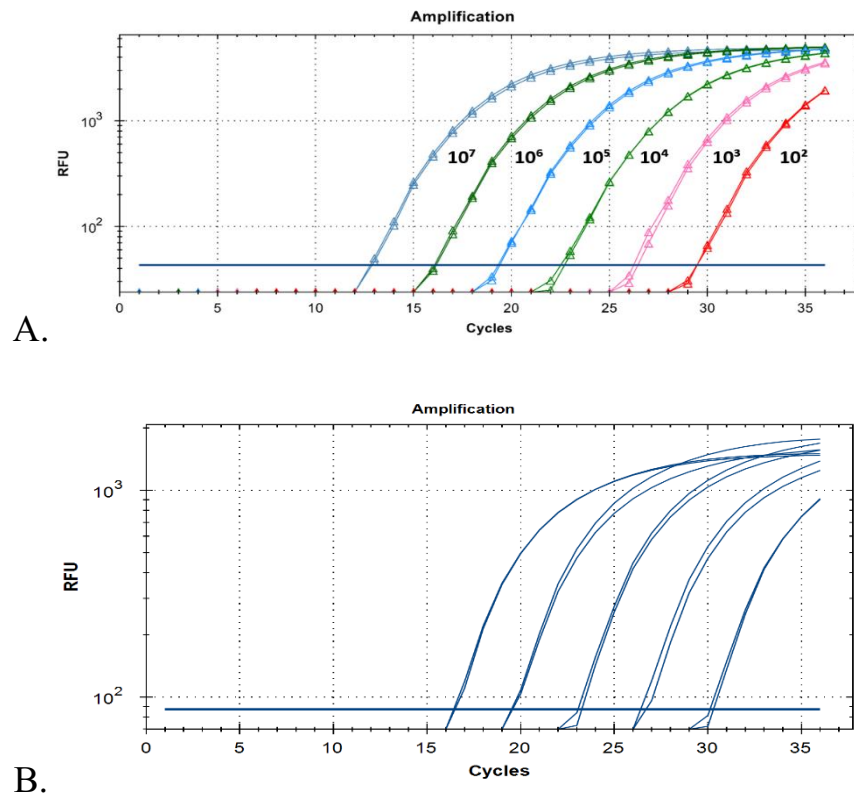


Рис.3.18. А. Графік ампліфікації серії десятикратних розведень тотальної ДНК *R. solanacearum* В 1109^T, для кількісного визначення (від 10⁷ до 10² КУО/мл). В. Графік ампліфікації серії десятикратних розведень тотальної ДНК *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, для кількісного визначення (від 10⁶ до 10² КУО/мл). Вісь ординат – відносні одиниці флуоресценції, вісь абсцис – кількість циклів.

Для побудови стандартної кривої використовували серію десятикратних розведень тотальної ДНК відомої концентрації (рис. 3.19.). Для цього суспензію добових культур *R. solanacearum* В1109^T та *P. carotovorum* subsp.

carotovorum стандартизували за Макфарландом 0,5 MFU* (1.5×10^8 кл/мл). Після чого проводили серію десятикратних розведень суспензії (від 10^7 до 10^2 КУО/мл) та виділяли ДНК.

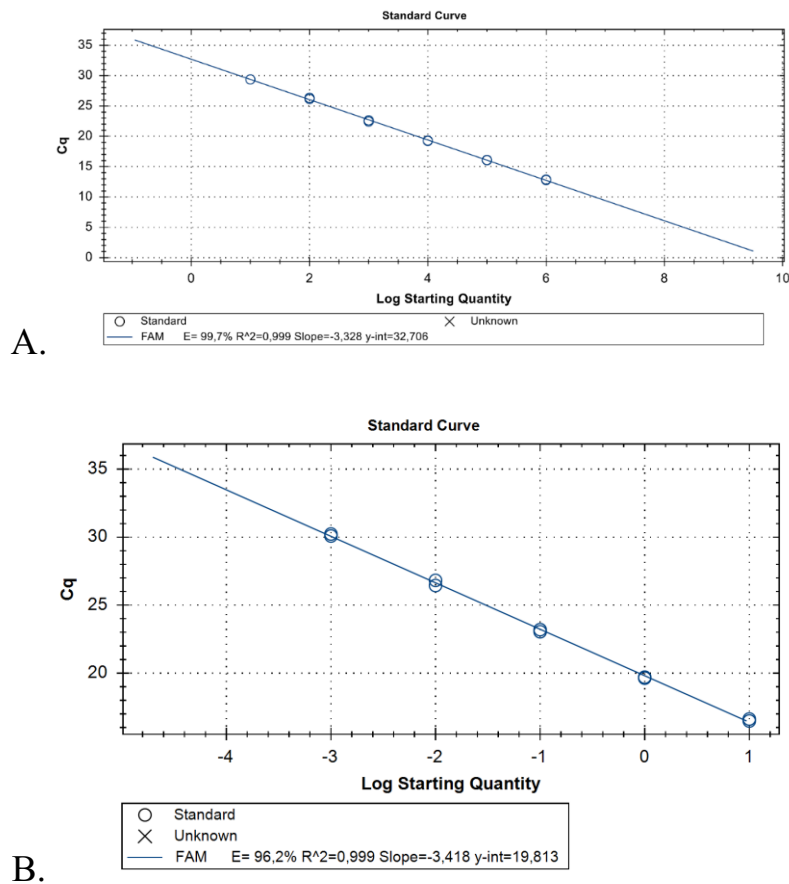


Рис.3.19. А. Стандартна крива залежності кількості циклів ПЛР у реальному часі (Cq) та кількості ДНК фітопатогенної бактерії *R. solanacearum* В 1109^T у стандарті, що виражена як логарифм значення. В. Стандартна крива залежності кількості циклів ПЛР у реальному часі (Cq) та кількості ДНК фітопатогенної *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* у стандарті, що виражена як логарифм значення. Серії десятикратних розведень тотальної ДНК *R. solanacearum* В 1109^T та *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, для кількісного визначення (від 10^7 до 10^2 КУО/мл).

Побудова логарифмічної цільової кількості в залежності (Cq) від кількості циклів ПЛР у реальному часі, необхідних для отримання порогового

значення флуоресценції по осі ординат та (log) кількості ДНК цільового патогену, вираженого як логарифм даного значення по осі абсцис, генерує лінію, в якій ефективність ампліфікації виводиться з нахилу (Slope). Між нахилом стандартної кривої та ефективністю існує теоретична залежність. За ефективності процесу у 100%. нахил стандартної кривої матиме від'ємне значення та дорівнюватиме 3,32. Значення R^2 є коефіцієнтом кореляції і має бути $> 0,9999$, що дозволяє побачити, чи існує правильний лінійний зв'язок між значеннями кожного зразка, щоб забезпечити достовірність у межах кореляції.

Отже, ефективність реакції (E) для *R. solanacearum* B 1109^T становила 99,7%, що підтверджувалось кутом нахилу лінії (Slope), з показником -3,328, а коефіцієнт кореляції лінійної регресії – $R^2 = 0,999$, вказував на те, що залежність концентрації продуктів ампліфікації від кількості циклів ПЛР у реальному часі у ході всіх десятикратних розведень зберігала лінійну залежність. Одержані значення куту нахилу калібрувальної кривої (Slope) та коефіцієнту кореляційної лінійної регресії (R^2) свідчать про задовільну ефективність ампліфікації. Для *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ефективність реакції (E) становила 96,2 %, що підтверджувалось кутом нахилу лінії Slope, з показником -3,418, а коефіцієнт кореляції лінійної регресії – $R^2 = 0,999$.

Таким чином, на даному етапі роботи були підібрані флуоресцентні зонди, що специфічно взаємодіють з цільовою ДНК патогену у межах розроблених нами праймерів. Нами була створена та відпрацьована методика кількісного визначення збудників бурої гнилі та м'якої гнилі методом ПЛР у реальному часі, що дозволить проводити якісні та кількісні дослідження даних збудників у рослинному та насіннєвому матеріалі картоплі та інших культурних рослин у діагностичних лабораторіях України.

3.3.3. Оцінка поширення *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* у досліджуваних партіях урожаю картоплі з використанням розробленого протоколу ПЛР у реальному часі

В подальшому, для апробації розробленого протоколу ПЛР у реальному часі для детекції та кількісного визначення *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* була проведена оцінка поширення *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* у врожаї картоплі з різних агроґрунтових районів та кліматичних зон України: з Київської та Одеської областей. Однією з задач цього апробаційного дослідження було оцінити діагностичну інформативність у виявленні латентного інфікування врожаю картоплі розробленого нами протоколу ПЛР у реальному часі на зразках бульб врожаю 2022 року. Однак, повномасштабне вторгнення росії на територію нашої країни ускладнило отримання зразків врожаю 2022 року, тому апробацію було проведено на зразках врожаю 2021 року. При цьому слід зазначити, що ПЛР у реальному часі проводився через рік після отримання бульб, що робить кількісне визначення не цілком релевантним, зважаючи на вплив тривалості зберігання бульб на маніфестацію латентного ураження.

За результатами проведеного дослідження було виявлено *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* у обох областях, однак з різною інтенсивністю поширення.

Так, поширення збудника м'якої гnilі та чорної ніжки картоплі *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* у Одеській області (35,0%) у 3,5 рази перевищувало аналогічний показник у Київській області, що сягав 10,0% (рис.3.20.). Як зазначає Su et al. [133] *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* віддає перевагу помірним і тропічним середовищам, що робить його надзвичайно вірулентним як при низьких, так і при високих температурах. А оптимальна температура для росту і розвитку *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* коливається в межах від 28 до 34°C, однак, слід звернути увагу, що

температура ґрунту зазвичай нижча за оптимальну температуру росту бактерій.

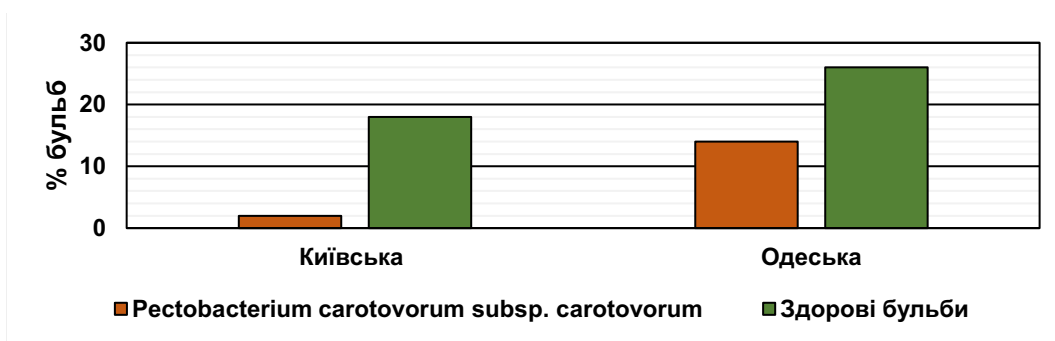


Рис.3.20. Поширеність *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* у досліджуваних партіях картоплі врожаю з Одеської та Київської областей у 2021 році.

Аналіз погодних умов у досліджуваних областях у 2021 (табл. Г.1.) році показав, що найбільша кількість опадів у Київській та Одеській областях за період картопляного сезону спостерігалась у травні – 104,5 мм та червні– 114,0 мм, відповідно, а середня температура для Київської області коливалась від 14,3°C у травні до 13,9°C у вересні та від 16,2°C у травні до 16,9°C у вересні для Одеської області. Отримані показники вказують, що середня температура за період вирощування картоплі була більше ніж на 2 градуси вище у Одеській області у порівнянні з аналогічним показником для Київської області, що вірогідніше і стало причиною різного ступеню поширення збудника м'якої гнилі картоплі

Отже, підводячи підсумки даного етапу роботи, можна зробити висновок, що поширення збудника м'якої гнилі картоплі та чорної ніжки картоплі *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* у досліджуваних партіях картоплі залежить від температур зовнішнього середовища у період вегетації культури. Розроблений нами протокол детекції та кількісного визначення *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* є валідним для використання в агродіагностичних лабораторіях.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Картопля одна з небагатьох сільськогосподарських культур, що відноситься до стратегічно важливих, забезпечуючи продовольчу безпеку у всьому світі [3, 15]. Світове виробництво картоплі, протягом останніх десятиліть заслужено утримує четверте місце серед вироблених сільськогосподарських культур, поступаючись за кількістю лише декільком основним представникам родини Злакові. На даний час, основний обсяг виробництва та культивування картоплі, зосереджений у країнах, що розвиваються [2]. Як повідомляє Продовольча та сільськогосподарська організація ООН, Україна входить до складу, основних виробників картоплі у світі, у той час як в Європі внесок України у виробництво картоплі становив більше 5% з валовим врожаєм у 2021 році близько 20,8 млн т [1]. Відповідно до концепції потенціалу врожайності, потенційна врожайність ніколи не досягається повністю в природних системах виробництва, оскільки біотичні та абіотичні фактори негативно впливають на врожай картоплі та впливають на ріст рослин і розвиток бульб [257]. В Україні виробництво картоплі більше ніж на 95% зосереджено у господарствах населення та відбувається у примітивних умовах [5] з використанням несертифікованого насіннєвого матеріалу, що призводить до поширення та накопичення інфекційних агентів як на сільськогосподарських угіддях так і в популяції картоплі, через її вегетативне розмноження [258]. Незважаючи на те, що Україна входить до країн-лідерів щодо виробництва картоплі у світі, урожайність картоплі більше ніж у 3 рази менша за аналогічний показник у розвинутих країнах Європи та Америки [1, 38]. Нехтування основними агротехнічними засадами виробництва у комплексі з біотичними та абіотичними стресами, що впливають на виробництво культури, призводить до зменшення не лише кількості, а і якості урожаю [39]. Бактеріальні хвороби картоплі є одним з найважливіших біотичних чинників зниження якості і кількості її врожаю [259]. Відсутність ефективних та екологічно безпечних засобів боротьби з бактеріальними

хворобами картоплі обумовлює виключну важливість профілактичних заходів з метою попередження поширення інфекції і запобігання втрат врожаю цієї стратегічно важливої для продовольчої безпеки України сільськогосподарської культури. Важливим компонентом профілактики поширення бактеріальних хвороб картоплі є моніторинг та скринінг поширення збудників у садивному матеріалі, який є їх основним джерелом, аналіз структури патогенного комплексу, а також дослідження чутливості сортів, які культивуються на території України. Важливість комплексу цих питань і зумовила формулювання мети дисертаційного дослідження, яка полягала у дослідженні та аналізі поширення основних збудників бактеріальних інфекцій та оптимізації методів їх молекулярно-генетичної ідентифікації. Останнє глобальне дослідження поширеності одного з основних бактеріальних збудників провели Положенець В.М. та колеги [260], аналізуючи рослини та бульби картоплі з візуальними ознаками ураження чорною ніжкою та м'якою гниллю картоплі та території України. Однак, масовий імпорт насінневого матеріалу картоплі, істотні зміни у перерозподілі опадів і вологи та зростання температури, а також нові знання щодо екології та етіології бактеріальних збудників призводять до перерозподілу інфекційних агентів та вказують на необхідність проведення регулярних досліджень щодо поширення основних збудників бактеріальних інфекцій картоплі. Саме тому на першому етапі роботи було проведено аналіз поширення збудника кільцевої гнилі *C. sepedonicus* та м'якої гнилі *P. atrosepticum* в урожаї картоплі протягом 2020 та 2021 років. Скринінг проводили методом ІФА, який широко впроваджений у практику агродіагностики і загально визнано характеризується достатньо високою діагностичною точністю та інформативністю. У дослідження були включені зразки бульб з 8 областей України (Одеської, Київської, Донецької, Херсонської, Черкаської, Миколаївської, Дніпропетровської та Житомирської), які охоплювали зони найбільш інтенсивного вирощування культури. Обидва збудники були виявлені практично на всій дослідженій території України. В етіологічній

структурі моноінфекції значно переважали змішану форму. Однак частка бульб з латентним ураженням варіювала як між різними областями, так і з року в рік. У 2020 році збудник м'якої гнилі *P. atrocepticum* був виявлений у 7-ми досліджуваних областях (крім Одеської) з найбільшим показником виявлення у Миколаївській області. *C. sepedonicus* був детектований у 6-ти з 8-ми досліджуваних областей (крім Херсонської та Житомирської), з переважанням частки уражених бульб з Київської області. У порівнянні з 2020 роком, у 2021 році обидва збудники були виявлені у всіх областях без виключення. Найвищі показники для *C. sepedonicus* у 2021 році були зареєстровані у Донецькій області, де у 2020 році було зареєстровано найнижчі показники. У 2021 р. загалом незначно зросла загальна частка ураження змішаною інфекцією. В цілому у більшості випадків частка ураження бульб збудниками м'якої і мокрої гнилі збільшилася.

Відомо, що розвиток інфекційного процесу вимагає не лише вірулентного патогену та сприйнятливої до нього рослини, а й оптимальних умов середовища, що у фітопатології прийнято називати трикутником хвороб [142]. Зважаючи на те, що загалом у всіх областях використовувалися сорти картоплі із зазначеною у паспортах виробника достатньо високою стійкістю до чорної ніжки та м'якої гнилі (бульб), обґрунтованим було припущення про те, що одним з механізмів збільшення частки уражених бульб у врожаї 2021 року можуть бути змінені погодні умови, більш сприятливі для реалізації патогенності збудників гнилей. Тому логічним продовженням нашого дослідження став аналіз поширення аналізованих збудників у контексті кліматичних умов, що у період виробництва картоплі спостерігались на сільськогосподарських угіддях. Найважливішими показниками, що впливають на ріст і метаболізм *P. atrocepticum* та *C. sepedonicus*, є температура та вологість [208, 214]. З огляду на це ми проаналізували показники середньомісячних температур та кількості опадів на обстежених територіях у періоди посадки, вегетації та збору врожаю картоплі. Було розраховано, що

сума опадів у період посадки-вегетації-збору урожаю у 2021 році майже у 2 рази перевищувала аналогічний показник у 2020 році, що свідчить про збільшення вологості на досліджуваних територіях. Значення ГТК, який об'єднує температурні показники і показники кількості опадів, у 2021 році вказували на різні рівні посухи лише у серпні для південних, центральних та східних областей та частково для південних областей, у порівнянні з 2020 роком, коли показники ГТК вказували на глибоку та помірну посуху у серпні місяці для всіх областей та помірну посуху у липні для південних та центральних областей. Аналізуючи вже наявні дані щодо поширення бактеріальних збудників у контексті коефіцієнтів ГТК, суми опадів та температур, нами був знайдений кореляційний зв'язок між часткою латентного ураження бульб збудником м'якої гнилі та коефіцієнтом ГТК у період вегетації культури. Також сильна позитивна кореляція прослідковувалась між поширеністю *P. atrocepticum* та сумарною кількістю опадів між червнем та липнем, однак сильний негативний кореляційний зв'язок прослідковувався між сумою середніх температур у період з серпня по вересень та поширенням збудника м'якої гнилі. Результати кореляційного аналізу вказують на те, що як підвищена (наближена до оптимальної для даного збудника [134]) температура, так і достатня вологість [143], точніше – відсутність посухи, у період вегетації картоплі однаковою мірою важливі для реалізації патогенного потенціалу пектобактерій. При цьому теплий кінець літа і початок осені, коли проводять збір врожаю, можуть бути несприятливими для латентного інфікування *P. atrocepticum*.

Для збудника кільцевої гнилі *C. sepedonicus* було встановлено лише помірний кореляційний зв'язок між сумою середніх температур у період висадки бульб картоплі та його поширенням. Наші результати узгоджуються з даними Gryń et al., 2021, аналогічні експерименти яких були проведені на території сусідньої Польщі, і які також зазначають про мінімальний вплив температурних умов впродовж всього періоду виробництва картоплі на

інфікування бульб *C. sepedonicus* і висловлюють припущення про домінуючу роль генетично детермінованого рівня стійкості сорту для ураження цим збудником [198].

Аналізовані партії бульб картоплі містили зразки 23 сортів зарубіжної (в основному Німеччина, Нідерланди) та 1 – вітчизняної селекції з широким діапазоном стійкості до збудника чорної ніжки, відображеної у паспортах виробників: 13 сортів (54%) з високою/середньою стійкістю, 3 (12,5%) – із середньою/низькою стійкістю. Для 6 сортів (25%) рівень стійкості був не вказаний. Така статистика вказує на часткове врахування виробниками картоплі рівня її стійкості до однієї з найбільш поширених і шкочочиних хвороб. У частині випадків велика частка ураження врожаю пектолітичними бактеріями була асоційована з використанням сортів з меншим генетично детермінованим рівнем стійкості до цього патогену. Однак, з іншого боку, використання одних і тих же сортів у різних областях було асоційоване з різною часткою латентного інфікування бульб. Цей факт, а також факт відсутності для доволі значної частки культивованих на території України сортів картоплі інформації щодо ступеню їх резистентності до збудника чорної ніжки і м'якої гнилі (бульб) спонукали нас до формулювання наступного завдання роботи: перевірити стійкість найпоширеніших в Україні сортів картоплі до музейного штаму збудника чорної ніжки та м'якої гнилі картоплі *P.atrosepticum* В 1084^T. До найпоширеніших сортів картоплі, що культивуються на території України відносять сорти німецької – Bellarosa і Queen Anne та нідерландської Riviera та Picasso селекції, тому саме вони були відібрані для проведення лабораторного дослідження. Результатами цього дослідження стали два важливі спостереження. Першим спостереженням було те, що ступінь ураження бульб (яку визначали за площею мацерації та масою мацерованої тканини) сортів із заявленою у паспорті виробника високою стійкістю до чорної ніжки була вищим щодо музейного штаму пектобактерій, ніж у бульб сорту з середньою/низькою стійкістю, згідно даних

селекціонера. Це свідчить про те, що визначена виробником стійкість до референтного штаму пектолітичних бактерій може не повністю відображати стійкість до штамів, які циркулюють на даній конкретній території. Наше припущення узгоджується з даними Su et al., 2022, які наголошують на значних відмінностях у патогенності різних видів пектолітичних бактерій-збудників чорної ніжки [133], а також підкреслюють імовірність підвищеного ураження врожаю картоплі за умов інфікування у змішаній формі, коли один з етіологічних чинників змішаної інфекції має високий ступінь вірулентності. Другим важливим спостереженням було те, що бульби одного й того сорту, вирощені на різних територіях, демонстрували різний ступінь ураження музейним штамом пектолітичної бактерії. Зокрема, бульби двох сортів з високою, згідно даних виробника, стійкістю до чорної ніжки – Bellarosa і Riviera – вирощені в Одеській і Чернігівській областях, різнилися за рівнем ушкодження пектолітичною бактерією в лабораторних умовах. В даному випадку стандартизованими в процесі інокуляції збудником були три умови: генетичні характеристики сорту, температура та вологість у процесі інкубації. Головними чинниками, які відрізняли бульби зразків з різних територій, є склад мікроелементів та видові і кількісні характеристики ендofітного мікробного угруповання, які залежать від ґрунту, на якому вирощували картоплю [261]. В Одеській області ґрунти представлені в основному чорноземами [262, 263]. Чернігівська область представлена дерново-підзолистими (які займають 30 % орних земель), сірими лісовими та дерновими ґрунтами – 19 %, темно-сірими ґрунтами та чорноземами опідзоленими – 13 %, чорноземами типовими, лучно-чорноземними та лучними ґрунтами – 38 % [264]. Особливої уваги заслуговує питання впливу ендofітної мікробіоти бульби на стійкість до збудників бактеріозів, у т.ч. м'якої гнилі. Відомо, що у складі ендofіту бульб картоплі можуть бути присутні представники з антагоністичною активністю проти збудників бактеріальних інфекцій. Крім того, відомо про здатність ендofітних мікроорганізмів посилювати механізми стійкості за рахунок стимуляції

антимікробних механізмів рослини-хазяїна [265]. Використання агробіотехнологічно ефективних ендofітних мікроорганізмів для передпосадкової обробки бульб може бути перспективним підходом для профілактики бактеріозів і заслуговує поглибленого дослідження.

Виявлення нами кореляційного взаємозв'язку між кліматичними характеристиками зони вирощування та рівнем ураження бульб картоплі збудниками м'якої та кільцевої гнилей, а також численні літературні дані, які обговорюють імовірний вплив глобальних змін клімату на біологічні властивості фітопатогенних мікроорганізмів обумовили проведення експерименту з порівняльної оцінки ступеню ушкодження бульб, інокульованих музейним штамом пектолітичної бактерії за різних температурних умов: оптимальної для даного збудника і вищої за оптимальну. Результати цього експерименту показали, що підвищення температури інкубації інокульованих бульб спричиняє посилення (різного ступеню) рівня ушкодження за площею мацерації та вагою мацерованої тканини у всіх досліджених сортів. Це дозволяє зробити припущення про імовірне посилення фітопатогенних властивостей пектолітичних бактерій в умовах глобального потепління. Однією з причин може бути температурна залежність деяких генів, залучених у патогенність цих мікроорганізмів [130]. Однак, не виключено, що цей феномен поширюється лише на досліджений нами штам, тому для оцінки загальної тенденції щодо зміни патогенних властивостей збудників м'якої гнилі необхідно провести аналогічні дослідження з максимально широким спектром представників цієї групи.

Останній етап роботи був присвячений оптимізації методів детекції і кількісної оцінки збудників бактеріальних гнилей картоплі. Аналіз літератури та власний досвід під час проведення скринінгових досліджень щодо латентного інфікування врожаю дозволив виявити найбільш актуальні потреби у питаннях методичних підходів до детекції цих мікроорганізмів. Одне з них стосувалося відсутності на ринку простого, надійного і високо

інформативного методу детекції важливого для наших територій представника пектолітичних бактерій - *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, що унеможливує моніторинг і скринінг його поширення в агрофітоценозах України. Враховуючи широкий спектр рослин-хазяїв, цей вид має потенційно високий потенціал розповсюдження і становить серйозну загрозу для картоплі, як однієї з рослин-хазяїв. З огляду на це нами було розроблено і апробовано протокол ПЛР у реальному часі, який може бути застосований в агродіагностичних лабораторіях. Іншим важливим питанням була наявність релевантного протоколу для детекції і кількісного визначення особливо небезпечних карантинних збудників бактеріозів картоплі – представників комплексу видів *R. solanacearum*. З метою оптимізації рекомендованого в літературі протоколу детекції цих мікроорганізмів нами було вдосконалено існуючий протокол розробкою релевантної пари праймерів, що також може знайти використання у діагностичних лабораторіях агропромислового комплексу.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та представлено вирішення одного з важливих питань сільськогосподарської мікробіології: проведено скринінг та досліджено етіологічну структуру збудників м'якої та кільцевої гнилей картоплі, проаналізовано взаємозв'язок ураження врожаю зазначеними збудниками від кліматичних факторів, а також вдосконалено методологію їх детекції та кількісного визначення молекулярно-генетичним методом. Результати дисертаційного дослідження знайшли відображення у наступних висновках:

1. Встановлено, що в етіологічній структурі латентного інфікування врожаю картоплі 2020-2021 років збудниками м'якої та кільцевої гнилей домінують моноінфекції. У 2020 році *C. sepedonicus* був виявлений у 6-ти областях з найвищим показником у Київській області - 16,1%; *P. atrosepticum* був виявлений у 7-ми областях, з найвищим показником у Миколаївській області – 16,1%. У 2021 році збудники м'якої та кільцевої гнилі були виявлені у 8-ми областях з найвищими показниками у Донецькій області для *C. sepedonicus* -11,1% та *P. atrosepticum* – 31,1%. Змішана інфекція у 2020 році була виявлена у 50,0% областей та не перевищувала показника у 5,0%, у той час як у 2021 році даний показник був у 62,5% областей з максимальним значенням ураження у Донецькій області - 8,9%.

2. Вперше в Україні, встановлено зв'язок між поширеністю *P. atrosepticum* та значеннями гідротермічного коефіцієнта у вегетаційний період картоплі (червень-липень) ($r=0,721$, $p < 0,05$), виявлена сильна позитивна кореляція між поширеністю *P. atrosepticum* та місячною сумою опадів протягом вегетаційного періоду картоплі ($r=0,721$, $p < 0,05$) та сильна негативна кореляція між поширеністю *P. atrosepticum* та місячною сумою середньодобових температур протягом сезону збирання картоплі (серпень-вересень) ($r=-0,736$, $p < 0,05$), для *C. sepedonicus* було виявлено помірну

кореляцію між поширеністю та місячною сумою середньодобових температур протягом сезону садіння картоплі (травень) ($r= 0,591$, $p \geq 0,05$).

3. За результатами аналізу чутливості сортів картоплі різного ступеню стійкості до чорної ніжки, згідно даних виробника, до музейного штаму *P. atrosepticum* В 1084Т виявлено високий рівень ураження бульб сортів із зазначеною у паспорті високою стійкістю (Riviera, Bellarosa) і нижчий ступінь ураження сорту (Picasso) із заявленою селекціонером помірною стійкістю до даної хвороби. Встановлено залежність ступеню ураження інокульованих *P. atrosepticum* В 1084Т бульб одного й того сорту (Riviera, Bellarosa) від зони їх вирощування з вищими показниками площі мацерації та маси мацерованої тканини для бульб, культивованих у південному регіоні (Одеська область).

4. Показано, що культивування інокульованих музейним штамом *P. atrosepticum* В 1084Т бульб картоплі за температури 30°C (вищої за оптимальну для даного збудника - 26°C), супроводжується підвищенням площі мацерації та маси мацерованої тканини, в середньому, у півтора рази.

5. Розроблено специфічні праймери та протокол класичної та кількісної ПЛР у реальному часі для виявлення та кількісного визначення представників комплексу видів *R. solanacearum* – збудників бурої гнилі картоплі та *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* – збудника м'якої гнилі картоплі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. "Faostat" (б. д.). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
2. K. Jabran, M. E. Caliskan та A. Bakhsh, *Potato Production Worldwide* (Elsevier Science & Technology Books, 2022).
3. Т. Артюх, О. Безсмертна та Д. Мельник, "Проблеми та перспективи розвитку ринку картоплі в Україні з врахуванням зональної спеціалізації галузі", *Економіка та сусп-во* 2022(39). <https://doi.org/10.32782/2524-0072/2022-39-54>
4. О. Krupa та V. Krupa, "Potato market conjuncture in ukraine and prospects of its optimization", *Ef. Ekon.* 2019(12). <https://doi.org/10.32702/2307-2105-2019.12.86>
5. "Державна Служба Статистики України" (б. д.). <https://www.ukrstat.gov.ua/>
6. R. Chacón-Cerdas, L. Barboza-Barquero, F. J. Albertazzi та W. Rivera-Méndez, "Transcription factors controlling biotic stress response in potato plants", *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 112, 101527 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101527>
7. В. П. Пати́ка, Р. І. Гвоздяк, Л. А. Пасічник, Л. М. Яковлева, С. М. Мороз, О. О. Литвинчук, Н. В. Житкевич, С. Ф. Ходос, Л. М. Буценко, Л. А. Данкевич та І. В. Гриник, *Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин*, редактор В. П. Пати́ка (ТОВ "НВП "Інтерсервіс", Київ, 2011).
8. "PM 7/59 (2) *Clavibacter sepedonicus*", *EPPO Bull.* 2022. <https://doi.org/10.1111/epp.12755>
9. A. Charkowski, K. Sharma, M. L. Parker, G. A. Secor та J. Elphinstone, "Bacterial diseases of potato", у *The potato crop* (Springer International Publishing, Cham, 2020), с. 351–388. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_10

10. I. K. Toth, "Microbe Profile: Pectobacterium atrosepticum: An enemy at the door", *Microbiology* 168(8) (2022). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001221>
11. J. K. Tiwari, "Potato a global scenario and omis research", у *Potato Improvement in the Post-Genomics Era* (CRC Press, Boca Raton, 2022), с. 1–15. <https://doi.org/10.1201/9781003260233-1>
12. G. Fenu та F. M. Malloci, "Forecasting plant and crop disease: An explorative study on current algorithms", *Big Data Cogn. Comput.* 5(1), 2 (2021). <https://doi.org/10.3390/bdcc5010002>
13. A. El-Sayed та M. Kamel, "Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases", *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27(18), 22336–22352 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08896-w>
14. "Про затвердження інструкцій з виявлення, локалізації та ліквідації деяких регульованих шкідливих організмів картоплі", Наказ Міністерства розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України № 750 (Україна) (13 квітня 2021). <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0545-21#Text>
15. Y. Gelaye, M. Alemayehu та D. Ademe, "Potato (*solanum tuberosum* L.) growth and quality as influenced by inorganic fertilizer rates in northwestern ethiopia", *Int. J. Agron.* 2022, 1–9 (2022). <https://doi.org/10.1155/2022/9476021>
16. L. Yan, Z. Zhu, P. Wang, C. Fu, X. Guan, P. Kear, C. Zhang та G. Zhu, "Comparative analysis of 343 plastid genomes of *Solanum* section *Petota* : Insights into potato diversity, phylogeny and species discrimination", *J. Syst. Evol.* 2022. <https://doi.org/10.1111/jse.12898>
17. A. S. R, S. S, R. N, G. Ts, M. Karthikeyan, A. Gnanasekaran, C. Gk та K. M. Basalingappa, "*Solanum tuberosum* L: Botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance", *Int. J. Phytomed.* 10(3), 115 (2018). <https://doi.org/10.5138/09750185.2256>

18. M. del Mar Martínez-Prada, S. J. Curtin and J. J. Gutiérrez-González, "Potato improvement through genetic engineering", *GM Crop. & Food* 12(1), 479–496 (2021). <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1993688>
19. R. K. Maiti and V. Singh, "A mini review on origin, history and taxonomic status of the potato", *Farming & Manag.* VOLUME 7(ISSUE-1 (JUNE)) (2022). <https://doi.org/10.31830/2456-8724.2022.fm-104>
20. M. W. Nasir and Z. Toth, "Effect of drought stress on potato production: A review", *Agronomy* 12(3), 635 (2022). <https://doi.org/10.3390/agronomy12030635>
21. N. Lutaladio and L. Castaldi, "Potato: The hidden treasure", *J. Food Compos. Anal.* 22(6), 491–493 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.05.002>
22. S. Volodin, "Cluster model of seed production of domestic potato varieties on a virus-free basis", *Econ. Her. Donbas* 2021(1 (63)), 52–60. [https://doi.org/10.12958/1817-3772-2021-1\(63\)-52-60](https://doi.org/10.12958/1817-3772-2021-1(63)-52-60)
23. B. J. Reddy, R. Mandal, M. Chakroborty, L. Hijam and P. Dutta, "A review on potato (*solanum tuberosum* L.) and its genetic diversity", *Int. J. Genet.* 10(2), 360 (2018). <https://doi.org/10.9735/0975-2862.10.2.360-364>
24. H. Hellmann, A. Goyer and D. A. Navarre, "Antioxidants in potatoes: A functional view on one of the major food crops worldwide", *Molecules* 26(9), 2446 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26092446>
25. K. A. Beals, "Potatoes, nutrition and health", *Am. J. Potato Res.* 96(2), 102–110 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12230-018-09705-4>
26. J. Xu, Y. Li, L. Kaur, J. Singh and F. Zeng, "Functional food based on potato", *Foods* 12(11), 2145 (2023). <https://doi.org/10.3390/foods12112145>
27. W. Khalid, M. Z. Khalid, A. Aziz, A. Tariq, A. Ikram, M. Rehan, S. Younas, A. Bashir and A. Fatima, "Nutritional composition and health benefits of potato", *Adv Food & Nutr Sci.* 5, 7-16 (2020).

28. K. Zaheer та M. H. Akhtar, "Potato production, usage, and nutrition—a review", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56(5), 711–721 (2014). <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.724479>
29. L. Yafetto, G. T. Odamtten та M. Wiafe-Kwagyan, "Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case", *Heliyon* 2023, e14814. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14814>
30. S. Khanal, K. Karimi, S. Majumdar, V. Kumar, R. Verma, S. K. Bhatia, K. Kuca, J. Esteban та D. Kumar, "Sustainable utilization and valorization of potato waste: State of the art, challenges, and perspectives", *Biomass Convers. Biorefinery* 2023. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04521-1>
31. N. Pinchuk, P. Verheles та T. Kovalenko, "Influence of technological prioms of potato rotation on product quality", *Agric. For.* 2020(3), 91–103. <https://doi.org/10.37128/2707-5826-2020-3-8>
32. A. Pęksa та J. Miedzianka, "Potato industry by-products as a source of protein with beneficial nutritional, functional, health-promoting and antimicrobial properties", *Appl. Sci.* 11(8), 3497 (2021). <https://doi.org/10.3390/app11083497>
33. S. L. Sampaio, S. A. Petropoulos, A. Alexopoulos, S. A. Heleno, C. Santos-Buelga, L. Barros та I. C. F. R. Ferreira, "Potato peels as sources of functional compounds for the food industry: A review", *Trends Food Sci. & Technol.* 103, 118–129 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.015>
34. A. Devaux, J.-P. Goffart, A. Petsakos, P. Kromann, M. Gatto, J. Okello, V. Suarez та G. Hareau, "Global food security, contributions from sustainable potato agri-food systems", у *The potato crop* (Springer International Publishing, Cham, 2020), с. 3–35. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_1
35. В. Лукач, В. Василюк та Т. Гуцол, "Сучасний стан виробництва картоплі в Україні", *Інженерія природокористування* 1(1), 30–37 (2014).

36. А. Тюхтій та П. Сухий, "Географічні особливості розвитку картоплярства в Україні", *Ен. та соц. географія* 2012(3).
37. А. В. Шимко, О. З. Бундза та В. Л. Мартинюк, "Пошкодження бульб картоплі під час транспортування", *Сільськогосп. машини* 2023(49), 46–52. <https://doi.org/10.36910/acm.vi49.1018>
38. T. D. Sonets, V. V. Borodai та M. M. Furdyha, "Adaptive potential of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) for resistance of cultivars to fusarium rot", *Adv. Agritechnologies* 2020(8). <https://doi.org/10.47414/na.8.2020.226090>
39. J. González-Jiménez, B. Andersson, L. Wiik та J. Zhan, "Modelling potato yield losses caused by *Phytophthora infestans*: Aspects of disease growth rate, infection time and temperature under climate change", *Field Crop. Res.* 299, 108977 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2023.108977>
40. М. Ostrenko, L. Pravdyva, Y. Fedoruk, M. Grabovskiy та S. Pravdyvyi, "Potato productivity depending on variety specialties under cultivating in the right-bank Forest-Steppe of Ukraine", *Agrobiologia* 2020(1(157)), 120–127. <https://doi.org/10.33245/2310-9270-2020-157-1-120-127>
41. Б. Тактаєв та І. Подберезко, "Розвиток хвороб на сортах картоплі різних груп стиглості на природному інфекційному фоні в зоні південного полісся України", *Картоплярство* 2020(45), 3–14.
42. Т. Андрійчук та А. Скорейко, "Елементи захисту картоплі від фомозної гнилі", *Картоплярство* 2019(44), 111–118.
43. S. Thomas-Sharma, A. Abdurahman, S. Ali, J. L. Andrade-Piedra, S. Bao, A. O. Charkowski, D. Crook, M. Kadian, P. Kromann, P. C. Struik, L. Torrance, K. A. Garrett та G. A. Forbes, "Seed degeneration in potato: The need for an integrated seed health strategy to mitigate the problem in developing countries", *Plant Pathol.* 65(1), 3–16 (2015). <https://doi.org/10.1111/ppa.12439>

44. O. Kvasko, Y. Kolomiets, A. Buziashvili ta A. Yemets, "Biotechnological approaches to increase the bacterial and fungal disease resistance in potato", *Open Agric. J.* 2022(16), e187433152210070.
45. T. Xie, S. Shen, Y. Hao, W. Li ta J. Wang, "Comparative analysis of microbial community diversity and dynamics on diseased tubers during potato storage in different regions of qinghai china", *Front. Genet.* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.818940>
46. M. Fiers, V. Edel-Hermann, C. Chatot, Y. Le Hingrat, C. Alabouvette ta C. Steinberg, "Potato soil-borne diseases. A review", *Agron. Sustain. Dev.* 32(1), 93–132 (2011). <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0035-z>
47. S. Bomok, B. Taktaiev, M. Pikovskyi ta O. Marieva, "Biochemical changes in affected potato tubers", *Karantin I Zahist Rosl.* 2020(1), 9–12. <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2020.01.9-12>
48. Y. Peng, S. J. Li, J. Yan, Y. Tang, J. P. Cheng, A. J. Gao, X. Yao, J. J. Ruan ta B. L. Xu, "Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents", *Front. Microbiol.* 12 (2021). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670135>
49. T. R. Usharani, M. Ganachari ta H. D. Sowmya, "Omics in vegetable crops under the family Solanaceae", y *Omics in horticultural crops* (Elsevier, 2022), c. 303–332. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-89905-5.00022-7>
50. J. Kiptoo, A. Abbas, A. M. Bhatti, H. M. Usman, M. A. Shad, M. Umer, M. N. Atiq, S. M. Alam, M. Ateeq, M. Khan, N. W. Peris, Z. Razaq, N. Anwar ta S. Iqbal, "Rhizoctonia solani of potato and its management: A review", *Plant Prot.* 5(3), 157–169 (2021). <https://doi.org/10.33804/pp.005.03.3925>
51. R. Zrenner, B. Verwaaijen, F. Genzel, B. Flemer ta R. Grosch, "Transcriptional changes in potato sprouts upon interaction with rhizoctonia solani

- indicate pathogen-induced interference in the defence pathways of potato", *Int. J. Mol. Sci.* 22(6), 3094 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22063094>
52. B. T. L. H. Vossenbergh, C. Prodhomme, J. H. Vossen та T. A. J. Lee, "Synchytrium endobioticum, the potato wart disease pathogen", *Mol. Plant Pathol.* 23(4), 461–474 (2022). <https://doi.org/10.1111/mpp.13183>
53. "PM 7/28 (2)Synchytrium endobioticum", *EPPO Bull.* 47(3), 420–440 (2017). <https://doi.org/10.1111/epp.12441>
54. E. Lysøe, M. W. Dees та M. B. Brurberg, "A three-way transcriptomic interaction study of a biocontrol agent (*clonostachys rosea*), a fungal pathogen (*helminthosporium solani*), and a potato host (*solanum tuberosum*)", *Mol. Plant-Microbe Interact.*® 30(8), 646–655 (2017). <https://doi.org/10.1094/mpmi-03-17-0062-r>
55. R. K. Tiwari, R. Kumar, S. Sharma, K. C. Naga, S. Subhash та V. Sagar, "Continuous and emerging challenges of silver scurf disease in potato", *Int. J. Pest Manag.* 2020, 1–13. <https://doi.org/10.1080/09670874.2020.1795302>
56. L. Zhong, L. Li, Y. Zheng, Y. Zhou, Y. Zeng, W. Zhu та F. Chen, "First report of black dot caused by *colletotrichum coccodes* on potato in the tibet autonomous region of china", *Plant Dis.* 2022. <https://doi.org/10.1094/pdis-01-22-0242-pdn>
57. Y. Cui та C. Yang, "Infection process of *Colletotrichum coccodes* tagged with GFP on *Solanum tuberosum*", *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 115, 101665 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101665>
58. Л. В. Мінка та О. Я. Бокшан, "Фомозна гниль (гангрена) картоплі", *Наук. вісн. Ужгор. ун-ту Серія Біологія* 2010(28), 26–29.
59. M. Leiva-Mora, M. Herrera-Capote, M. Acosta-Suárez, C. L. Silva Agurto, N. Solis, W. O. Veloz Naranjo, R. Núñez та M. A. Osejos Merino, "Characterization of *Fusarium* species causing dry rot of potato mini tubers produced by

- biotechnological approaches", *Bionatura* 8(3), 1–10 (2023).
<https://doi.org/10.21931/rb/2023.08.03.48>
60. O. M. Nevmerzhytska, N. M. Plotnytska, O. V. Hurmanchuk, L. M. Karpiuk, D. V. Vinnihovskyi ta N. V. Oleksiuk, "Peculiarities of fusarium dry rot manifestation depending on the cultivar stability", *Taurian Sci. Her.* 2(116), 41–46 (2020). <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2020.116.2.6>
61. R. K. Tiwari, B. M. Bashyal, V. Shanmugam, M. K. Lal, R. Kumar, S. Sharma, Vinod, K. Gaikwad, B. Singh ta R. Aggarwal, "Impact of Fusarium dry rot on physicochemical attributes of potato tubers during postharvest storage", *Postharvest Biol. Technol.* 181, 111638 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111638>
62. R. K. Tiwari, R. Kumar, S. Sharma, V. Sagar, R. Aggarwal, K. C. Naga, M. K. Lal, K. N. Chourasia, D. Kumar ta M. Kumar, "Potato dry rot disease: Current status, pathogenomics and management", *3 Biotech* 10(11) (2020).
<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02496-8>
63. *Fusarium - An Overview on Current Status of the Genus [Working Title]* (IntechOpen, 2022). <https://doi.org/10.5772/intechopen.95213>
64. E. Stefańczyk, S. Sobkowiak, M. Brylińska ta J. Śliwka, "Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland", *Eur. J. Plant Pathol.* 145(4), 871–884 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0875-0>
65. L. Yan, Y. Li, Y. Qing, X. Tao, H. Wang, X. Lai ta Y. Zhang, "Integrative analysis of genes involved in the global response to potato wart formation", *Front. Plant Sci.* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.865716>
66. A. Zelya, G. Zelya, T. Oliynyk, L. Pylypenko, M. Solomiykiuk, R. Kordulean, A. Skoreyko, Y. Bunduc ta V. Ghunchak, "Screening of potato varieties for multiple resistance to *Synchytrium endobioticum* in the western region of Ukraine", *Agric. Sci. Pract.* 5(3), 3–11 (2018). <https://doi.org/10.15407/agrisp5.03.003>

67. R. Zrenner, F. Genzel, B. Verwaaijen, D. Wibberg та R. Grosch, "Necrotrophic lifestyle of *Rhizoctonia solani* AG3-PT during interaction with its host plant potato as revealed by transcriptome analysis", *Sci. Rep.* 10(1) (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68728-2>
68. H. Xue, Q. Liu та Z. Yang, "Pathogenicity, mycotoxin production, and control of potato dry rot caused by *Fusarium* spp.: A review", *J. Fungi* 9(8), 843 (2023). <https://doi.org/10.3390/jof9080843>
69. J. L. Pérez-Mora, D. A. Cota-Rodríguez, E. E. Rodríguez-Palafox, E. García-León, H. Beltrán-Peña, N. B. Lima та J. M. Tovar-Pedraza, "First confirmed report of *Colletotrichum coccodes* causing black dot on potato in Mexico", *J. Plant Dis. Prot.* 127(2), 269–273 (2019). <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00291-z>
70. J. Massana-Codina, S. Schnee, N. Lecoultre, E. Droz, B. Dupuis, A. Keiser, P. Werra, J. Wolfender, K. Gindro та S. Schürch, "Influence of abiotic factors, inoculum source, and cultivar susceptibility on the potato tuber blemish diseases black dot (*Colletotrichum coccodes*) and silver scurf (*Helminthosporium solani*)", *Plant Pathol.* 70(4), 885–897 (2021). <https://doi.org/10.1111/ppa.13350>
71. M. Urooj, U. Arif та A. Intikhab, "A brief review for identification and detection of potato viruses", *World J. Biol. Biotechnol.* 1(1), 33 (2016). <https://doi.org/10.33865/wjb.001.01.0003>
72. S. Fuentes, R. A. C. Jones, H. Matsuoka, K. Ohshima, J. Kreuze та A. J. Gibbs, "Potato virus Y; the Andean connection", *Virus Evol.* 5(2) (2019). <https://doi.org/10.1093/ve/vez037>
73. G. Polder, P. M. Blok, H. A. C. de Villiers, J. M. van der Wolf та J. Kamp, "Potato virus Y detection in seed potatoes using deep learning on hyperspectral images", *Front. Plant Sci.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00209>
74. L. Torrance та M. E. Talianksy, "Potato virus Y emergence and evolution from the andes of south america to become a major destructive pathogen of potato

and other solanaceous crops worldwide", *Viruses* 12(12), 1430 (2020).
<https://doi.org/10.3390/v12121430>

75. M. He, C.-Q. He ta N.-Z. Ding, "Evolution of Potato virus X", *Mol. Phylogenetics Evol.* 167, 107336 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107336>

76. G. Cowan, S. MacFarlane ta L. Torrance, "A new simple and effective method for PLRV infection to screen for virus resistance in potato.", *J. Virol. Methods* 2023, 114691. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114691>

77. R. Kumar, R. K. Tiwari, J. A, P. Kaundal, S. Sharma ta S. Chakrabarti, "Potato viruses and their diagnostic techniques: An overview", *J. Pharmacogn. Phytochem.* 8(6) (2019).

78. Y. Zeng, A. C. Fulladolsa, A. Houser ta A. O. Charkowski, "Colorado seed potato certification data analysis shows mosaic and blackleg are major diseases of seed potato and identifies tolerant potato varieties", *Plant Dis.* 103(2), 192–199 (2019). <https://doi.org/10.1094/pdis-03-18-0484-re>

79. A. Jeevalatha, S. K. Chakrabarti ta S. M. P. Khurana, "Functional biology of potato-virus interactions", y *Plant Virus-Host Interaction* (Elsevier, 2021), c. 139–168. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821629-3.00022-1>

80. N. M. Petrov, M. I. Stoyanova ta R. K. Gaur, "Biodiversity and characterization of economically important viruses on potato cultivars", y *Plant RNA viruses* (Elsevier, 2023), c. 245–270. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-95339-9.00007-7>

81. A. Jeevalatha, S. K. Chakrabarti ta S. M. P. Khurana, "Functional biology of potato-virus interactions", y *Plant Virus-Host Interaction* (Elsevier, 2021), c. 139–168. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821629-3.00022-1>

82. Л. М. ,. Решотько, "Моніторинг вірусних інфекцій картоплі в агроценозах України", *Agroecol. J.* 2020(4). <https://doi.org/10.33730/2077-4893.4.2020.219441>
83. M. Coca Morante, E. C. Salazar, J. Burgos Villegas та N. Tapia Ponce, "Virus incidence associated with native potato yield in microcenters of potato genetic diversity of bolivian", *Am. J. Potato Res.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s12230-021-09850-3>
84. E. J. Wenninger та A. Rashed, "Biology, ecology, and management of the potato psyllid, *bactericera cockerelli* (hemiptera: Triozidae), and zebra chip disease in potato", *Annu. Rev. Entomol.* 69(1) (2023). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020123-014734>
85. A. Biessy та M. Filion, "Biological control of potato common scab by plant-beneficial bacteria", *Biol. Control* 165, 104808 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104808>
86. J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, D. K.l.mackerron, M. A. Taylor та H. A. Ross, *Potato Biology and Biotechnology Advances and Perspectives* (Elsevier, 2007).
87. M. C. Asensio-S.-Manzanera, Y. Santiago-Calvo, J. L. Palomo-Gómez, R. Marquínez-Ramírez, S. Bastin, E. M. García-Méndez, E. Hernández-Suárez та F. Siverio-de-la-Rosa, "Survey of *candidatus liberibacter solanacearum* and its associated vectors in potato crop in spain", *Insects* 13(10), 964 (2022). <https://doi.org/10.3390/insects13100964>
88. R. K. Cruzado, M. Rashidi, N. Olsen, R. G. Novy, E. J. Wenninger, N. A. Bosque-Pérez, A. V. Karasev, W. J. Price та A. Rashed, "Effect of the level of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” infection on the development of zebra chip disease in different potato genotypes at harvest and post storage", *Plos One* 15(4), e0231973 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231973>

89. A. Abdurahman, M. L. Parker, J. Kreuze, J. G. Elphinstone, P. C. Struik, A. Kigundu, E. Arengo та K. Sharma, "Molecular epidemiology of *Ralstonia solanacearum* species complex strains causing bacterial wilt of potato in Uganda", *Phytopathology*® 109(11), 1922–1931 (2019). <https://doi.org/10.1094/phyto-12-18-0476-r>
90. A. K. L. Pais, L. V. S. d. Santos, G. M. R. Albuquerque, A. R. G. d. Farias, W. J. Silva Junior, V. d. Q. Balbino, A. M. F. Silva, M. A. S. d. Gama та E. B. d. Souza, "Comparative genomics and phylogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Moko ecotype and its symptomatological variants", *Genet. Mol. Biol.* 45(4) (2022). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2022-0038>
91. R. O. Garcia-Rodriguez та L. Thiessen, "Comparative analysis of the rhizospheric bacterial communities of flue-cured tobacco affected by granville wilt", *PhytoFrontiers*™ 2022. <https://doi.org/10.1094/phytofr-02-22-0010-r>
92. "PM 7/21 (3) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex)", *EPPO Bull.* 2023. <https://doi.org/10.1111/epp.12911>
93. C. Bragard, K. Dehnen-Schmutz, F. Di Serio, P. Gonthier, J. A. Jaques Miret, A. F. Justesen, A. MacLeod, C. S. Magnusson, P. Milonas, J. A. Navas-Cortes, S. Parnell, R. Potting, P. L. Reignault, H. Thulke, W. Van der Werf, A. Vicent Civera, J. Yuen, L. Zappalà, J. Van der Wolf, T. Kaluski, M. Pautasso та M. Jacques, "Pest categorisation of the *Ralstonia solanacearum* species complex", *EFSA J.* 17(2) (2019). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5618>
94. Z. Wang, W. Luo, S. Cheng, H. Zhang, J. Zong та Z. Zhang, "*Ralstonia solanacearum* – A soil borne hidden enemy of plants: Research development in management strategies, their action mechanism and challenges", *Front. Plant Sci.* 14 (2023). <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1141902>
95. W. Ahmed, J. Yang, Y. Tan, S. Munir, Q. Liu, J. Zhang, G. Ji та Z. Zhao, "*Ralstonia solanacearum*, a deadly pathogen: Revisiting the bacterial wilt biocontrol

- practices in tobacco and other Solanaceae", *Rhizosphere* 21, 100479 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100479>
96. S. Paudel, S. Dobhal, A. M. Alvarez ta M. Arif, "Taxonomy and phylogenetic research on *Ralstonia solanacearum* species complex: A complex pathogen with extraordinary economic consequences", *Pathogens* 9(11), 886 (2020).
<https://doi.org/10.3390/pathogens9110886>
97. P. Sharma, M. A. Johnson, R. Mazloom, C. Allen, L. S. Heath, T. M. Lowe-Power ta B. A. Vinatzer, "Meta-analysis of the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) based on comparative evolutionary genomics and reverse ecology", *Microb. Genom.* 8(3) (2022). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000791>
98. C. Bragard, K. Dehnen-Schmutz, F. Di Serio, P. Gonthier, J. A. Jaques Miret, A. F. Justesen, A. MacLeod, C. S. Magnusson, P. Milonas, J. A. Navas-Cortes, S. Parnell, R. Potting, P. L. Reignault, H. Thulke, W. Van der Werf, A. Vicent Civera, J. Yuen, L. Zappalà, J. Van der Wolf, T. Kaluski, M. Pautasso ta M. Jacques, "Pest categorisation of the *Ralstonia solanacearum* species complex", *EFSA J.* 17(2) (2019). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5618>
99. A. Akarapisan, A. Kumvinit, C. Nontaswatsri, T. Puangkrit ta W. Kositratana, "Phylotype, sequevar and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* species complex from Northern Thailand", *J. Phytopathol.* 170(3), 176–184 (2021).
<https://doi.org/10.1111/jph.13065>
100. H. Shi, W. Li, Y. Zhou, J. Wang ta S. Shen, "Can we control potato fungal and bacterial diseases? — microbial regulation", *Heliyon* 2023, e22390.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22390>
101. R. O. García, J. P. Kerns ta L. Thiessen, "*Ralstonia solanacearum* species complex: A quick diagnostic guide", *Plant Health Prog.* 20(1), 7–13 (2019).
<https://doi.org/10.1094/php-04-18-0015-dg>

102. Z. Wang, W. Luo, S. Cheng, H. Zhang, J. Zong та Z. Zhang, "Ralstonia solanacearum – A soil borne hidden enemy of plants: Research development in management strategies, their action mechanism and challenges", *Front. Plant Sci.* 14 (2023). <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1141902>
103. M. F. Hossain, M. Billah, M. R. Ali, M. S. A. Parvez, Z. F. Zaoti, S. M. Z. Hasan, M. F. Hasan, A. K. Dutta, M. Khalekuzzaman, M. A. Islam та B. Sikdar, "Molecular identification and biological control of *Ralstonia solanacearum* from wilt of papaya by natural compounds and *Bacillus subtilis*: An integrated experimental and computational study", *Saudi J. Biol. Sci.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.069>
104. F. C. Peritore-Galve, M. A. Tancos та C. D. Smart, "Bacterial canker of tomato: Revisiting a global and economically damaging seedborne pathogen", *Plant Dis.* 2020. <https://doi.org/10.1094/pdis-08-20-1732-fe>
105. "Ralstonia solanacearum species complex (RALSSO)[Datasheet] EPPO Global Database" (б. д.). <https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/datasheet>
106. H. Xue, R. Lozano-Durán та A. P. Macho, "Insights into the root invasion by the plant pathogenic bacterium *ralstonia solanacearum*", *Plants* 9(4), 516 (2020). <https://doi.org/10.3390/plants9040516>
107. R. Geng, L. Cheng, C. Cao, Z. Liu, D. Liu, Z. Xiao, X. Wu, Z. Huang, Q. Feng, C. Luo, Z. Chen, Z. Zhang, C. Jiang, M. Ren та A. Yang, "Comprehensive analysis reveals the genetic and pathogenic diversity of *ralstonia solanacearum* species complex and benefits its taxonomic classification", *Front. Microbiol.* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.854792>
108. R. de Pedro-Jové, M. Puigvert, P. Sebastià, A. P. Macho, J. S. Monteiro, N. S. Coll, J. C. Setúbal та M. Valls, "Dynamic expression of *Ralstonia solanacearum* virulence factors and metabolism-controlling genes during plant infection", *BMC Genom.* 22(1) (2021). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07457-w>

109. F. Vaillau ta S. Genin, "Ralstonia solanacearum: An arsenal of virulence strategies and prospects for resistance", *Annu. Rev. Phytopathol.* 61(1) (2023). <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021622-104551>
110. B. Wang, W. He, M. Huang, J. Feng, Y. Li, L. Yu, Y. Wang, D. Zhou, C. Meng, D. Cheng, N. Tang, B. Song ta H. Chen, "Ralstonia solanacearum type III effector RipAS associates with potato type one protein phosphatase StTOPP6 to promote bacterial wilt", *Hortic. Res.* 2023. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad087>
111. K. Kai, "The phc quorum-sensing system in ralstonia solanacearum species complex", *Annu. Rev. Microbiol.* 77(1) (2023). <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032521-030537>
112. S. Razia, M. S. M. Chowdhury, F. M. Aminuzzaman, N. Sultana ta M. Islam, "Morphological, pathological, biochemical and molecular characterization of *ralstonia solanacearum* isolates in bangladesh", *Am. J. Mol. Biol.* 11(04), 142–164 (2021). <https://doi.org/10.4236/ajmb.2021.114012>
113. I. Krym, "Laboratory determination of brown rot potato defeating of different varieties", *Interdep. Themat. Sci. Collect. Plant Prot. Quar.* 2020(66), 127–136. <https://doi.org/10.36495/1606-9773.2020.66.127-136>
114. "Potato bacterial wilt management for quality seed potato production in Ethiopia: A training manual for agricultural extension experts, development agents, farmers' seed grower cooperatives and decentralized seed multipliers" (International Potato Center, 2021). <https://doi.org/10.4160/9789290606291>
115. Yuliar, Y. A. Nion ta K. Toyota, "Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by ralstonia solanacearum", *Microbes Environ.* 30(1), 1–11 (2015). <https://doi.org/10.1264/jsme2.me14144>
116. B. Álvarez, M. M. López ta E. G. Biosca, "Biocontrol of the major plant pathogen ralstonia solanacearum in irrigation water and host plants by novel

waterborne lytic bacteriophages", *Front. Microbiol.* 10 (2019).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02813>

117. X. Ma, K. L. Perry та B. Swingle, "Complete genome sequence resource for a recently isolated potato ring rot pathogen, *Clavibacter sepedonicus* K496", *Plant Dis.* 2022. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-22-1404-a>

118. E. Osdaghi, J. M. Wolf, H. Abachi, X. Li, S. H. De Boer та C. A. Ishimaru, "Bacterial ring rot of potato caused by *Clavibacter sepedonicus* : A successful example of defeating the enemy under international regulations", *Mol. Plant Pathol.* 2022. <https://doi.org/10.1111/mpp.13191>

119. "Clavibacter sepedonicus (CORBSE)[World distribution]| EPPO Global Database" (б. д.). <https://gd.eppo.int/taxon/CORBSE/distribution>

120. J. Van Vaerenbergh, B. De Paepe, A. Hoedekie, C. Van Malderghem, J. Zaluga, P. De Vos та M. Maes, "Natural infection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in tomato (*Solanum tuberosum*)", *New Dis. Rep.* 33, 7 (2016). <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.033.007>

121. X. Li, J. Tambong, K. (. Yuan, W. Chen, H. Xu, C. A. Lévesque та S. H. De Boer, "Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(1), 234–240 (2018). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002492>

122. E. Osdaghi, T. Rahimi, S. M. Taghavi, M. Ansari, S. Zarei, P. Portier, M. Briand та M.-A. Jacques, "Comparative genomics and phylogenetic analyses suggest several novel species within the genus *Clavibacter*, including nonpathogenic tomato-associated strains", *Appl. Environ. Microbiol.* 86(6) (2020). <https://doi.org/10.1128/aem.02873-19>

123. C. Bragard, K. Dehnen-Schmutz, F. Di Serio, P. Gonthier, J. A. Jaques Miret, A. F. Justesen, A. MacLeod, C. S. Magnusson, P. Milonas, J. A. Navas-Cortes, S. Parnell, R. Potting, P. L. Reignault, H. Thulke, W. Van der Werf, A. Vicent Civera,

- J. Yuen, L. Zappalà, J. Van der Wolf, T. Kaluski, M. Pautasso та M. Jacques, "Pest categorisation of *Clavibacter sepedonicus*", *EFSA J.* 17(4) (2019). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5670>
124. P. Persson, M. Pirhonen та D. B. Collinge, "Bacterial plant pathogens.", y *Plant pathology and plant diseases* (CABI, Wallingford, 2020), c. 89–106. <https://doi.org/10.1079/9781789243185.0089>
125. H. Sagcan та N. Turgut Kara, "Detection of Potato ring rot Pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay", *Sci. Rep.* 9(1) (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56680-9>
126. L. H. Stevens, J. Y. Tom, O. Mendes, P. S. van der Zouwen та J. M. van der Wolf, "Chemical disinfection of potato cutting machinery to avoid dissemination of *Clavibacter sepedonicus*", *Potato Res.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09506-z>
127. G. Gryń, K. Franke, M. M. Nowakowski та M. Nowakowski, "Latent infection by *Clavibacter sepedonicus* and correlation with ring rot symptoms development in potato cultivars", *Potato Res.* 64(3), 459–468 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11540-020-09486-6>
128. R. J. Howard, M. W. Harding, G. C. Daniels, S. L. Mobbs, S. L. I. Lisowski та S. H. De Boer, "Efficacy of agricultural disinfectants on biofilms of the bacterial ring rot pathogen, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*", *Can. J. Plant Pathol.* 37(3), 273–284 (2015). <https://doi.org/10.1080/07060661.2015.1078413>
129. T. Popović та S. Marković, "Risk of introduction of quarantine organisms: Case *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*", y XI international scientific agriculture symposium "AGROSYM 2020", Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 8–9 жовтня 2020 (Elektronski izvor, 2020), c. 541–546.

130. N. Kaczynska, E. Lojkowska, M. Narajczyk ta R. Czajkowski, "Genome-Wide analyses of the temperature-responsive genetic loci of the pectinolytic plant pathogenic *Pectobacterium atrosepticum*", *Int. J. Mol. Sci.* 22(9), 4839 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22094839>
131. T. J. M. van den Bosch, O. Niemi ta C. U. Welte, "Single gene enables plant pathogenic *Pectobacterium* to overcome host-specific chemical defence", *Mol. Plant Pathol.* 21(3), 349–359 (2019). <https://doi.org/10.1111/mpp.12900>
132. S. Sarfraz, S. T. Sahi, S. Oulghazi, K. Riaz, N. A. Rajput, M. Atiq, M. R. Tufail, A. Hameed ta D. Faure, "Species diversity of *Dickeya* and *Pectobacterium* causing potato blackleg disease in pakistan", *Plant Dis.* 104(5), 1492–1499 (2020). <https://doi.org/10.1094/pdis-08-19-1743-re>
133. Z. Su, X. Liu, Q. Guo, L. Xuan, X. Lu, L. Dong, X. Zhang, P. Wang, W. Zhao, Y. Qu, S. Li ta P. Ma, "Insights into complex infection by two *Pectobacterium* species causing potato blackleg and soft rot", *Microbiol. Res.* 261, 127072 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127072>
134. W. Sledz, A. Motyka-Pomagruk, D. Zukowska, W. Babinska-Wensierska, S. Zoledowska ta E. Lojkowska, "Genotypic and phenotypic uniformity among the population of *Pectobacterium atrosepticum* strains isolated during three growing seasons from potato fields in Poland", *Eur. J. Plant Pathol.* 2023. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02687-y>
135. M. Hashemi Tameh, E. Primiceri, M. S. Chiriaco, P. Poltronieri, M. Bahar ta G. Maruccio, "*Pectobacterium atrosepticum* biosensor for monitoring blackleg and soft rot disease of potato", *Biosensors* 10(6), 64 (2020). <https://doi.org/10.3390/bios10060064>
136. J. van der Wolf, M. Krijger, O. Mendes, V. Kurm ta J. Gros, "Natural infections of potato plants grown from minitubers with blackleg-causing soft rot *pectobacteriaceae*", *Microorganisms* 10(12), 2504 (2022). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122504>

137. A. Jelušić, P. Mitrović, S. Marković, R. Iličić, P. Milovanović, S. Stanković ta T. Popović Milovanović, "Diversity of bacterial soft rot-causing pectobacterium species affecting cabbage in serbia", *Microorganisms* 11(2), 335 (2023). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020335>
138. X. Ma, A. Schloop, B. Swingle ta K. L. Perry, "Pectobacterium and dickeya responsible for potato blackleg disease in new york state in 2016", *Plant Dis.* 102(9), 1834–1840 (2018). <https://doi.org/10.1094/pdis-10-17-1595-re>
139. P. A. Agyemang, M. N. Kabir, C. M. Kersey ta C. K. Dumenyo, "The bacterial soft rot pathogens, pectobacterium carotovorum and P. atrosepticum, respond to different classes of virulence-inducing host chemical signals", *Horticulturae* 6(1), 13 (2020). <https://doi.org/10.3390/horticulturae6010013>
140. N. Padilla-Gálvez, P. Luengo-Urbe, S. Mancilla, A. Maurin, C. Torres, P. Ruiz, A. France, I. Acuña ta H. Urrutia, "Antagonistic activity of endophytic actinobacteria from native potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* L.) against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*", *BMC Microbiol.* 21(1) (2021). <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02393-x>
141. J. M. van der Wolf, I. Acuña, S. H. De Boer, M. B. Brurberg, G. Cahill, A. O. Charkowski, T. Coutinho, T. Davey, M. W. Dees, Y. Degefu, B. Dupuis, J. G. Elphinstone, J. Fan, E. Fazelisanagri, T. Fleming, N. Gerayeli, V. Gorshkov, V. Helias, Y. le Hingrat, S. B. Johnson, A. Keiser, I. Kellenberger, X. (. Li, E. Lojkowska, R. Martin, J. I. Perminow, O. Petrova, A. Motyka-Pomagruk, S. Rossmann, S. Schaerer, W. Sledz, I. K. Toth, L. Tsrer, J. E. van der Waals, P. de Werra ta I. Yedidia, "Diseases caused by pectobacterium and dickeya species around the world", y *Plant diseases caused by dickeya and pectobacterium species* (Springer International Publishing, Cham, 2021), c. 215–261. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1_7

142. B. Slippers, "The Plant Disease Pyramid: The relevance of the original vision of plant pathology in 2020", *South Afr. J. Sci.* 116(11/12) (2020). <https://doi.org/10.17159/sajs.2020/9011>
143. P. Werra, C. Kopp, M. Häberli, I. Stöcker, A. Keil, C. Debonneville, T. Oberhänsli, D. Altenbach ta A. Keiser, "Monitoring potato seed lots to control blackleg in fields in Switzerland and southern Germany", *Plant Pathol.* 69(7), 1331–1346 (2020). <https://doi.org/10.1111/ppa.13226>
144. J. Luck, M. Spackman, A. Freeman, P. Trećbicki, W. Griffiths, K. Finlay ta S. Chakraborty, "Climate change and diseases of food crops", *Plant Pathol.* 60(1), 113–121 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02414.x>
145. S. Sapre, I. Gontia-Mishra, V. V. Thakur, S. Sikdar ta S. Tiwari, "Molecular techniques used in plant disease diagnosis", y *Food security and plant disease management* (Elsevier, 2021), c. 405–421. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821843-3.00001-5>
146. S. Tewari ta S. Sharma, "Molecular techniques for diagnosis of bacterial plant pathogens", y *Microbial diversity in the genomic era* (Elsevier, 2019), c. 481–497. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814849-5.00027-7>
147. S. Loreti, "The diagnosis of plant pathogenic bacteria a state of art", *Front. Biosci.* 10(3), 449–460 (2018). <https://doi.org/10.2741/e832>
148. I. Buja, E. Sabella, A. G. Monteduro, M. S. Chiriaco, L. De Bellis, A. Luvisi ta G. Maruccio, "Advances in plant disease detection and monitoring: From traditional assays to in-field diagnostics", *Sensors* 21(6), 2129 (2021). <https://doi.org/10.3390/s21062129>
149. B. Tibebu ta B. Nuh, "Biotechnological tools for detection, identification and management of plant diseases", *Afr. J. Biotechnol.* 18(29), 797–807 (2019). <https://doi.org/10.5897/ajb2018.16591>

150. A. Khakimov, I. Salakhutdinov, A. Omolikov та S. Utaganov, "Traditional and current-prospective methods of agricultural plant diseases detection: A review", *IOP Conf. Ser.* 951(1), 012002 (2022). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/951/1/012002>
151. M. A. John, I. Bankole, O. Ajayi-Moses, T. Ijila, O. Jeje та P. Lalit, "Relevance of advanced plant disease detection techniques in disease and pest management for ensuring food security and their implication: A review", *Am. J. Plant Sci.* 14(11), 1260–1295 (2023). <https://doi.org/10.4236/ajps.2023.1411086>
152. Q. Ali, H. Zheng, M. J. Rao, M. Ali, A. Hussain, M. H. Saleem, Y. Nehela, M. A. Sohail, A. M. Ahmed, K. A. Kubar, S. Ali, K. Usman, H. Manghwar та L. Zhou, "Advances, limitations, and prospects of biosensing technology for detecting phytopathogenic bacteria", *Chemosphere* 296, 133773 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133773>
153. Q. Liu, X. Jin, J. Cheng, H. Zhou, Y. Zhang та Y. Dai, "Advances in the application of molecular diagnostic techniques for the detection of infectious disease pathogens (Review)", *Mol. Med. Rep.* 27(5) (2023). <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.12991>
154. P. Kralik та M. Ricchi, "A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything", *Front. Microbiol.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
155. A. Khakimov, I. Salakhutdinov, A. Omolikov та S. Utaganov, "Traditional and current-prospective methods of agricultural plant diseases detection: A review", *IOP Conf. Ser.* 951(1), 012002 (2022). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/951/1/012002>
156. M. Ferone, A. Gowen, S. Fanning та A. G. M. Scannell, "Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches", *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19(6), 3106–3129 (2020). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>

157. S. Vilanova, D. Alonso, P. Gramazio, M. Plazas, E. García-Forteza, P. Ferrante, M. Schmidt, M. J. Díez, B. Usadel, G. Giuliano ta J. Prohens, "SILEX: A fast and inexpensive high-quality DNA extraction method suitable for multiple sequencing platforms and recalcitrant plant species", *Plant Methods* 16(1) (2020). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00652-y>
158. D. Daurov, A. Argynbayeva, A. Daurova, K. Zhapar, Z. Sapakhova, K. Zhambakin ta M. Shamekova, "Monitoring the spread of potato virus diseases in kazakhstan", *Am. J. Potato Res.* 2022. <https://doi.org/10.1007/s12230-022-09895-y>
159. R. Kumar, P. Kaundal, R. K. Tiwari, S. Siddappa, H. Kumari, M. K. Lal, K. C. Naga, S. Sharma, V. Sagar ta M. Kumar, "Establishment of a one-step reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the detection of potato virus S", *J. Virol. Methods* 2022, 114568. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114568>
160. Ş. Tüzmen, Y. Baskın, A. Feyda Nursal, S. Eraslan, Y. Esemen, G. Çalıbaşı, A. Banu Demir, D. Abbasoğlu ta C. Hızel, "Techniques for nucleic acid engineering", *y Omics Technologies and Bio-Engineering (Elsevier, 2018)*, c. 247–315. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804659-3.00014-2>
161. G. Verma, B. Raigond, S. Pathania, T. Kochhar ta K. Naga, ""Development and comparison of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP), RT-PCR and real time PCR for detection of Potato spindle tuber viroid in potato"", *Eur. J. Plant Pathol.* 158(4), 951–964 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02129-z>
162. Y. M. Wang, B. Ostendorf, D. Gautam, N. Habili ta V. Pagay, "Plant viral disease detection: From molecular diagnosis to optical sensing technology—a multidisciplinary review", *Remote Sens.* 14(7), 1542 (2022). <https://doi.org/10.3390/rs14071542>
163. J. Liu, S. Deng, W. Chang, D. Yu ta H. Wang, "Development of a multiplex PCR assay for the detection of tomato wilt caused by co-infection of *Fusarium*

brachygibbosum, *Fusarium oxysporum*, and *Ralstonia solanacearum* based on comparative genomics", *Plant Dis.* 2023. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-23-0962-sr>

164. M. Bangratz, I. Wonni, K. Kini, M. Sondo, C. Brugidou, G. Béna, F. Gnacko, M. Barro, R. Koebnik, D. Silué ta C. Tollenaere, "Design of a new multiplex PCR assay for rice pathogenic bacteria detection and its application to infer disease incidence and detect co-infection in rice fields in Burkina Faso", *Plos One* 15(4), e0232115 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232115>

165. N. A. Ashmawy, A. F. El-Bebany, A. H. M. Shams ta A. A. Shoeib, "Identification and differentiation of soft rot and blackleg bacteria from potato using nested and multiplex PCR", *J. Plant Dis. Prot.* 127(2), 141–153 (2019). <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00257-1>

166. B. Safaiefarahani, R. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa ta A. Habibi, "Identification and detection of *Phytophthora erythroseptica* and its hybrids using specific primers", *Iran. J. Plant Pathol.* 55(3), 243–259 (2020).

167. N. Gupta, "DNA extraction and polymerase chain reaction", *J. Cytol.* 36(2), 116 (2019). https://doi.org/10.4103/joc.joc_110_18

168. M. Venbrux, S. Crauwels ta H. Rediers, "Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection", *Front. Plant Sci.* 14 (2023). <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968>

169. R. Mumford, N. Boonham, J. Tomlinson ta I. Barker, "Advances in molecular phytodiagnosics – new solutions for old problems", *Eur. J. Plant Pathol.* 116(1), 1–19 (2006). <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9037-0>

170. P. C. Foo, A. B. Nurul Najian, N. A. Muhamad, M. Ahamad, M. Mohamed, C. Yean Yean ta B. H. Lim, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: A comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR)

based on *Entamoeba histolytica* DNA derived from faecal sample", *BMC Biotechnol.* 20(1) (2020). <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00629-8>

171. S. Broeders, I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens ta D. Morisset, "Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods", *Trends Food Sci. & Technol.* 37(2), 115–126 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>

172. E. Sohlberg, V. Virkajärvi, P. Parikka, S. Rämö, A. Laitila ta T. Sarlin, "Taqman qpcr quantification and fusarium community analysis to evaluate toxigenic fungi in cereals", *Toxins* 14(1), 45 (2022). <https://doi.org/10.3390/toxins14010045>

173. R. Patel, B. Mitra, M. Vinchurkar, A. Adami, R. Patkar, F. Giacomozzi, L. Lorenzelli ta M. S. Baghini, "A review of recent advances in plant-pathogen detection systems", *Heliyon* 8(12), e11855 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11855>

174. M. Abd El-Aziz, "Three modern serological methods to detect plant viruses", *J. Plant Sci. Phytopathol.* 3(3), 101–106 (2019). <https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001039>

175. M. S. Tabatabaei, R. Islam ta M. Ahmed, "Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno-PCR assays: A review", *Anal. Chim. Acta* 1143, 250–266 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.030>

176. R. Salwan ta V. Sharma, *Laboratory Methods in Microbiology and Molecular Biology* (Elsevier, 2023).

177. A. Singh, A. Mishra ta A. Verma, "Antibodies: Monoclonal and polyclonal", *y Animal biotechnology* (Elsevier, 2020), c. 327–352. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811710-1.00015-x>

178. M. Mrkvová, R. Hančinský, S. Grešíková, Š. Kaňuková, J. Barilla, M. Glasa, P. Hauptvogel, J. Kraic ta D. Mihálik, "Evaluation of new polyclonal antibody

developed for serological diagnostics of tomato mosaic virus", *Viruses* 14(6), 1331 (2022). <https://doi.org/10.3390/v14061331>

179. K. Dyussebayev, P. Sambasivam, I. Bar, J. C. Brownlie, M. J. A. Shiddiky ta R. Ford, "Biosensor technologies for early detection and quantification of plant pathogens", *Front. Chem.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.636245>

180. Q. Shakeel, R. T. Bajwa, I. Rashid, H. M. U. Aslam, Y. Iftikhar, M. Mubeen, G. Li ta M. Wu, "Immunotechnology for plant disease detection", y *Trends in plant disease assessment* (Springer Nature Singapore, Singapore, 2022), c. 145–165. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5896-0_9

181. P. Peng, C. Liu, Z. Li, Z. Xue, P. Mao, J. Hu, F. Xu, C. Yao ta M. You, "Emerging ELISA derived technologies for in vitro diagnostics", *TrAC Trends Anal. Chem.* 152, 116605 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116605>

182. C. A. Hernández, M. Pérez-Bernal, D. Abreu, O. Valdivia, M. Delgado, D. Dorta, A. G. Domínguez, E. R. Pérez ta J. M. Sánchez-Ríos, "Step-by-step full factorial design to optimize a quantitative sandwich ELISA", *Anal. Biochem.* 674, 115195 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115195>

183. S. Shojaeian, N. Maslehat Lay ta A.-H. Zarnani, "Detection systems in immunohistochemistry", y *Immunohistochemistry - the ageless biotechnology* (IntechOpen, 2020). <https://doi.org/10.5772/intechopen.82072>

184. L. Zhang, Y. Mazouzi, M. Salmain, B. Liedberg ta S. Boujday, "Antibody-Gold nanoparticle bioconjugates for biosensors: Synthesis, characterization and selected applications", *Biosens. Bioelectron.* 165, 112370 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112370>

185. M. C. Dita, "Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)", *Nat. Sci. Eng. Technol. J.* 1(2), 29–38 (2021). <https://doi.org/10.37275/nasetjournal.v1i2.6>

186. M. Venbrux, S. Crauwels та H. Rediers, "Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection", *Front. Plant Sci.* 14 (2023). <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968>
187. A. K. Sharma, Ред., *Immunology* (Jenny Stanford Publishing, 2019). <https://doi.org/10.1201/b22453>
188. P. Peng, C. Liu, Z. Xue, Z. Li, P. Mao, J. Hu, F. Xu, C. Yao та M. You, "Emerging elisa derived technologies for in vitro diagnostics", *SSRN Electron. J.* 2021. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3988122>
189. H. Ma, C. Ó'Fágáin та R. O'Kennedy, "Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement", *Biochimie* 177, 213–225 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.08.019>
190. K. Im, S. Mareninov, M. F. P. Diaz та W. H. Yong, "An introduction to performing immunofluorescence staining", у *Methods in molecular biology* (Springer New York, New York, NY, 2018), с. 299–311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
191. P. Yang, L. Zhao, Y. G. Gao та Y. Xia, "Detection, diagnosis, and preventive management of the bacterial plant pathogen *pseudomonas syringae*", *Plants* 12(9), 1765 (2023). <https://doi.org/10.3390/plants12091765>
192. R. M. Cardoso, T. S. Pereira, M. H. M. Facure, D. M. dos Santos, L. A. Mercante, L. H. C. Mattoso та D. S. Correa, "Current progress in plant pathogen detection enabled by nanomaterials-based (bio)sensors", *Sens. Actuators Rep.* 4, 100068 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100068>
193. КАТАЛОГ ШТАММОВ української колекції мікроорганізмів інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України (б. д.).
194. Картопля насіннева. Відбір проб і методики визначення посівних якостей, ДСТУ 4014:2001 (2001).

195. R. Lebecka, I. Wasilewicz-Flis та D. Mańkowski, "Diploid potato germplasm with resistance to *dickeya solani*", *Potato Res.* 64(3), 375–385 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11540-020-09482-w>
196. R. Lebecka, "Screening for potato resistance to blackleg and soft rot", *Plant Breed. Seed Sci.* 75(1), 97–104 (2017). <https://doi.org/10.1515/plass-2017-0013>
197. N. Maidanovych, R. Saydak та V. Knysh, "Comparative analysis of the drought events frequency in southern ukraine according to spi and htc indicators", *Tech. Technol. Asp. Dev. Test. New Mach. Technol. Agric. Ukr.* 2(31(45)), 137–144 (2022). [https://doi.org/10.31473/2305-5987-2022-2-31\(45\)-13](https://doi.org/10.31473/2305-5987-2022-2-31(45)-13)
198. G. Gryń, M. Pietraszko, W. Przewodowski, K. Franke, M. Nowakowski та M. Nowakowski, "Reaction of selected potato varieties to *Clavibacter sepedonicus* infestation under changing weather conditions", *Eur. J. Plant Pathol.* 160(1), 113–125 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02226-7>
199. О. В. Перегуда, О. А. Капустян та О. Б. Курилко, Статистична обробка даних, рецензент О. Бурилко та К. Ральченко (Електронне видання, Київ, 2022).
200. J. J. Burdon та J. Zhan, "Climate change and disease in plant communities", *PLOS Biol.* 18(11), e3000949 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000949>
201. L. Wilson, S. New, J. Daron та N. Golding, *Climate Change Impacts for Ukraine* (Met Office, 2021).
202. J. E. Bradshaw, *Potato Breeding: Theory and Practice* (Springer International Publishing, Cham, 2021). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-64414-7>
203. В. Бородай та А. Парфенюк, "Поширеність та розвиток основних хвороб картоплі (*solanum tuberosum* l.) в Україні", *Агрокол. журн.* 2018(4), 82–87.
204. J. Mansfield, S. Genin, S. Magori, V. Citovsky, M. Sriariyanum, P. Ronald, M. Dow, V. Verdier, S. V. Beer, M. A. Machado, I. Toth, G. Salmond та G. D.

- Foster, "Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology", *Mol. Plant Pathol.* 13(6), 614–629 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
205. Y. V. Kolomiets ta L. M. Butsenko, "Analysis of methods of diagnosis of bacterial diseases of tomatoes in Ukraine", *Biol. Syst.* 12(1) (2021). <https://doi.org/10.31548/biologiya2021.01.002>
206. K. Naumann, R. Zielke, E. Gierz ta U. Meyer, "Auswirkung einer Infektion mit *Corynebacterium sepedonicum* (Spieckermann & Kotthoff) Skaptason & Burkholder im Feldbestand bei gleichzeitigem Befall mit *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye", *Zentralblatt Fur Mikrobiol.* 141(8), 615–631 (1986). [https://doi.org/10.1016/s0232-4393\(86\)80071-3](https://doi.org/10.1016/s0232-4393(86)80071-3)
207. M. Lal, S. Yadav, R. P. Pant, V. K. Dua, B. P. Singh ta S. K. Kaushik, "Impact of global climate change on potato diseases and strategies for their mitigation", y *Sustainable potato production and the impact of climate change* (IGI Global, 2017), c. 205–227. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-1715-3.ch010>
208. P. Skelsey, S. N. Humphris, E. J. Campbell ta I. K. Toth, "Threat of establishment of non-indigenous potato blackleg and tuber soft rot pathogens in Great Britain under climate change", *Plos One* 13(10), e0205711 (2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205711>
209. S. du Raan, T. A. Coutinho ta J. E. van der Waals, "Cardinal temperature differences, determined in vitro, between closely related species and subspecies of pectinolytic bacteria responsible for blackleg and soft rot on potatoes", *Eur. J. Plant Pathol.* 144(2), 361–369 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0773-x>
210. B. Smadja, X. Latour, S. Trigui, J. F. Burini, S. Chevalier ta N. Orange, "Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.)", *Can. J. Microbiol.* 50(1), 19–27 (2004). <https://doi.org/10.1139/w03-099>

211. M. C. M. Pérombelon, V. M. Lumb, D. Zutra, L. J. Hyman та E. M. Burnett, "Factors affecting potato blackleg development", y *Vascular wilt diseases of plants* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1989), c. 421–431. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73166-2_31
212. A. Moh, S. Massart, M. Jijakli та P. Lepoivre, "models to predict the combined effects of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* suhsp. *carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers", *J. Plant Pathol.* 94(1), 181–191 (2012).
213. M. Schenk, C. Melanie, M. Diakaki та S. Vos, "Pest survey card on *clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*", *EFSA Support. Publ.* 16(2) (2019). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.en-1569>
214. M. Pietraszko, G. Gryń та W. Przewodowski, "An effect of weather and soil conditions and their interaction on infection of leaves and tubers of potato with bacteria *clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*", *Am. J. Potato Res.* 95(3), 278–285 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9629-6>
215. K. Aung, Y. Jiang та S. Y. He, "The role of water in plant-microbe interactions", *Plant J.* 93(4), 771–780 (2018). <https://doi.org/10.1111/tpj.13795>
216. P. Balint-Kurti, "The plant hypersensitive response: Concepts, control and consequences", *Mol. Plant Pathol.* 2019. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>
217. N. Liaqat, M. A. Khan, M. Atiq та M. A. Khan, "Influence of environmental factors on the development of potato blackleg disease", *Appl. Ecol. Environ. Res.* 20(2), 1325–1333 (2022). https://doi.org/10.15666/aeer/2002_13251333
218. G. Sharabani, S. Manulis-Sasson, L. Chalupowicz, M. Borenstein, R. Shulhani, M. Lofthouse, M. Sofer, O. Frenkel, O. Dror та D. Shtienberg, "Temperature at the early stages of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection affects bacterial canker development

- and virulence gene expression", *Plant Pathol.* 63(5), 1119–1129 (2014).
<https://doi.org/10.1111/ppa.12199>
219. S. H. De Boer, X. Li ra L. J. Ward, "Pectobacterium spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in canada", *Phytopathology®* 102(10), 937–947 (2012). <https://doi.org/10.1094/phyto-04-12-0083-r>
220. R. Czajkowski, M. C. M. Pérombelon, J. A. van Veen ra J. M. van der Wolf, "Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by Pectobacterium and Dickeya species: A review", *Plant Pathol.* 60(6), 999–1013 (2011).
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>
221. A. S. Koroney, C. Plasson, B. Pawlak, R. Sidikou, A. Driouich, L. Menu-Bouaouiche ra M. Vicré-Gibouin, "Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*", *Ann. Bot.* 118(4), 797–808 (2016).
<https://doi.org/10.1093/aob/mcw128>
222. C. P. Leisner, N. Potnis ra A. Sanz-Saez, "Crosstalk and trade-offs: Plant responses to climate change-associated abiotic and biotic stresses", *Plant, Cell & Environ.* 2022. <https://doi.org/10.1111/pce.14532>
223. A. O. Charkowski, "The changing face of bacterial soft-rot diseases", *Annu. Rev. Phytopathol.* 56(1), 269–288 (2018). <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045906>
224. L. R. Morales-Cedeño, M. d. C. Orozco-Mosqueda, P. D. Loeza-Lara, F. I. Parra-Cota, S. de los Santos-Villalobos ra G. Santoyo, "Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives", *Microbiol. Res.* 242, 126612 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>

225. V. Kurm, O. Mendes, J. Gros ta J. van der Wolf, "Potato tuber origin and microbial composition determines resistance against soft rot Pectobacteriaceae", *Eur. J. Plant Pathol.* 2023. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02763-3>
226. N. Weinert, R. Meincke, C. Gottwald, H. Heuer, N. C. M. Gomes, M. Schloter, G. Berg ta K. Smalla, "Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars", *Appl. Environ. Microbiol.* 75(12), 3859–3865 (2009). <https://doi.org/10.1128/aem.00414-09>
227. F. Buchholz, L. Antonielli, T. Kostić, A. Sessitsch ta B. Mitter, "The bacterial community in potato is recruited from soil and partly inherited across generations", *Plos One* 14(11), e0223691 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223691>
228. J. M. van der Wolf, S. H. De Boer, R. Czajkowski, G. Cahill, F. Van Gijsegem, T. Davey, B. Dupuis, J. Ellicott, S. Jafra, M. Kooman, I. K. Toth, L. Tsrer, I. Yedidia ta J. E. van der Waals, "Management of diseases caused by pectobacterium and dickeya species", y *Plant diseases caused by dickeya and pectobacterium species* (Springer International Publishing, Cham, 2021), c. 175–214. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1_6
229. A. O. Charkowski, "Biology and control of Pectobacterium in potato", *Am. J. Potato Res.* 92(2), 223–229 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9447-7>
230. K. C. da Silva Felix, C. L. da Silva, W. J. de Oliveira, R. de Lima Ramos Mariano ta E. B. de Souza, "Calcium-mediated reduction of soft rot disease in Chinese cabbage", *Eur. J. Plant Pathol.* 147(1), 73–84 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0980-0>
231. E. Ngadze, T. A. Coutinho, D. Icishahayo ta J. E. van der Waals, "Effect of calcium soil amendments on phenolic compounds and soft rot resistance in potato tubers", *Crop Prot.* 62, 40–45 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.009>

232. P. Yang, L. Zhao, Y. G. Gao та Y. Xia, "Detection, diagnosis, and preventive management of the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae*", *Plants* 12(9), 1765 (2023). <https://doi.org/10.3390/plants12091765>
233. P.-E. Fournier, G. Dubourg та D. Raoult, "Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era", *Genome Med.* 6(11) (2014). <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0114-2>
234. C. D. Sibley, G. Peirano та D. L. Church, "Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology", *Infect., Genet. Evol.* 12(3), 505–521 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.011>
235. H. Abd-El-Khair, T. G. Abdel-Gaied, M. S. Mikhail, A. I. Abdel-Alim та H. I. S. El-Nasr, "Biological control of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, the causal agent of bacterial soft rot in vegetables, in vitro and in vivo tests", *Bull. National Res. Cent.* 45(1) (2021). <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00491-4>
236. J. R. Joshi, L. Yao, A. O. Charkowski та A. L. Heuberger, "Metabolites from wild potato inhibit virulence factors of the soft rot and blackleg pathogen *Pectobacterium brasiliense*", *Mol. Plant-Microbe Interact.*® 2020, MPMI—08–20–0224. <https://doi.org/10.1094/mpmi-08-20-0224-r>
237. M. Minzhi, M. Suleman, J. Duan, L. Bai та L. Hongyu, "Impairment of respiratory chain function and involvement of alternative respiratory pathway in mitochondria of potato tubers infected by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*", *Foods* 11(11) (2022).
238. І. Ф. Вернигора, "Мокра бактеріальна гниль картоплі та заходи щодо обмеження її розвитку в умовах полісся України", автореф. дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук (Національний Університет Біоресурсів і Природокористування України, Київ, 2011).

239. S. Asif, M. Khan, M. Waqar Arshad ta M. I. Shabbir, "PCR optimization for beginners: A step by step guide", *Res. Mol. Med.* 9(2), 81–102 (2021). <https://doi.org/10.32598/rmm.9.2.1189.1>
240. D. Y. Mercado-Meza, R. G. Guevara-González, K. Esquivel, I. Carbajal-Valenzuela ta G. D. Avila-Quezada, "Green silver nanoparticles display protection against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.)", *Plant Stress* 10, 100256 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100256>
241. "PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*", *EPPPO Bull.* 46(2), 202–225 (2016). <https://doi.org/10.1111/epp.12302>
242. H. F. Boyaci, A. Kabas, Y. Aysan ta J. Prohens, "Screening of eggplant genotypes for resistance to bacterial wilt disease caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*", *Plant Prot. Sci.* 57(No. 2), 112–121 (2021). <https://doi.org/10.17221/105/2020-pps>
243. M. S. Cho, D. H. Park, M. Namgung, T.-Y. Ahn ta D. S. Park, "Validation and application of a real-time PCR protocol for the specific detection and quantification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato", *Plant Pathol. J.* 31(2), 123–131 (2015). <https://doi.org/10.5423/ppj.oa.02.2015.0019>
244. J. A. Gutiérrez-Barranquero, F. M. Cazorla ta A. de Vicente, "*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the “hodgepodge” of the *Pseudomonas syringae* complex", *Front. Plant Sci.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00570>
245. X.-F. Xin, B. Kvitko ta S. Y. He, "*Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen", *Nat. Rev. Microbiol.* 16(5), 316–328 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
246. J. G. Vicente ta E. B. Holub, "*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica

- crops", *Mol. Plant Pathol.* 14(1), 2–18 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>
247. H. Zohoungbogbo, A. Quenum, J. Honfoga, J.-R. Chen, E. Achigan-Dako, L. Kenyon ta P. Hanson, "Evaluation of resistance sources of tomato (*solanum lycopersicum* L.) to phylotype I strains of *ralstonia solanacearum* species complex in benin", *Agronomy* 11(8), 1513 (2021). <https://doi.org/10.3390/agronomy11081513>
248. N. Peeters, A. Guidot, F. Vailleau ta M. Valls, "Ralstonia solanacearum, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era", *Mol. Plant Pathol.* 14(7), 651–662 (2013). <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>
249. Yuliar, Y. A. Nion ta K. Toyota, "Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *ralstonia solanacearum*", *Microbes Environ.* 30(1), 1–11 (2015). <https://doi.org/10.1264/jsme2.me14144>
250. S. E. Seal, L. A. Jackson, J. P. W. Young ta M. J. Daniels, "Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: Construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction", *J. Gen. Microbiol.* 139(7), 1587–1594 (1993). <https://doi.org/10.1099/00221287-139-7-1587>
251. J. M. Vargason, K. Henderson ta P. S. Ho, "A crystallographic map of the transition from B-DNA to A-DNA", *Proc. National Acad. Sci.* 98(13), 7265–7270 (2001). <https://doi.org/10.1073/pnas.121176898>
252. N. Pastor, "The B- to A-DNA transition and the reorganization of solvent at the DNA surface", *Biophys. J.* 88(5), 3262–3275 (2005). <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.058339>
253. X. Z. Feng, "Conformational transition in DNA on a cold surface", *Nucleic Acids Res.* 28(2), 593–596 (2000). <https://doi.org/10.1093/nar/28.2.593>

254. M. M. Hayes, A. M. MacIntyre та C. Allen, "Complete genome sequences of the plant pathogens *Ralstonia solanacearum* type strain K60 and *R. solanacearum* race 3 biovar 2 strain UW551", *Genome Announc.* 5(40) (2017). <https://doi.org/10.1128/genomea.01088-17>
255. "Ukrainian collection of microorganisms (UCM) - ІМВ НАН України UA" (б. д.). <https://imv.org.ua/ucm/>
256. L. Garibyan та N. Avashia, «Polymerase chain reaction», *J. Investig. Dermatol.* 133(3), 1–4 (2013). <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
257. M. Koch, M. Naumann, E. Pawelzik, A. Gransee та H. Thiel, "The importance of nutrient management for potato production part I: Plant nutrition and yield", *Potato Res.* 2019. <https://doi.org/10.1007/s11540-019-09431-2>
258. X. Carolina Lizana, P. Sandaña, A. Behn, A. Ávila-Valdés, D. A. Ramírez, R. P. Soratto та H. Campos, "Potato", у *Crop physiology case histories for major crops* (Elsevier, 2021), с. 550–587. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819194-1.00018-9>
259. M. J. Sjölund, R. Kelly, G. S. Saddler та D. M. Kenyon, "Bacterial diseases affecting potatoes", у *Achieving sustainable cultivation of potatoes Volume 2* (Burleigh Dodds Science Publishing, 2018), с. 189–208. <https://doi.org/10.19103/as.2017.0031.10>
260. V. Polozhenets та L. Nemerytska, "Diagnosis, symptoms and sources of infection of the black stalk of the potato", *Naukovì dopovidì Nacional'nogo unìversitetu bìoresursiv ì priroдокористuvannâ Ukraïni* 2019(6(82)). <https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.06.002>
261. B. R. Martins, R. Siani, K. Treder, D. Michałowska, V. Radl, K. Pritsch та M. Schloter, "Cultivar-specific dynamics: Unravelling rhizosphere microbiome responses to water deficit stress in potato cultivars", *BMC Microbiol.* 23(1) (2023). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03120-4>

262. A. Khokhryakova та E. Kulidzhanov, "Characteristic of soils of Odesa city", *Visnyk Lviv Univ. Ser. Geogr.* 2018(52), 293–302.
<https://doi.org/10.30970/vgg.2018.52.10195>
263. Є. Н. Красеха та Я. М. Біланчин, Ред., Чорноземи масивів зрошення Одещини, Рецензент С. А. Балюк, С. П. Позняк та В. І. Михайлюк (Одеса, 2016).
264. О. Пархоменко та А. Ашихміна, "Сучасний стан та шляхи покращення родючості ґрунтів чернігівської області", у *Specialized and multidisciplinary scientific researches (European Scientific Platform, 2020)*.
<https://doi.org/10.36074/11.12.2020.v5.13>
265. W. Shi, G. Su, M. Li, B. Wang, R. Lin, Y. Yang, T. Wei, B. Zhou та Z. Gao, "Distribution of bacterial endophytes in the non-lesion tissues of potato and their response to potato common scab", *Front. Microbiol.* 12 (2021).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616013>

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. N. Hrytseva, "DEVELOPMENT OF SPECIFIC PRIMERS FOR 16S rRNA GENE ANALYSIS IN THE DETECTION OF *Ralstonia solanacearum* SPECIES COMPLEX", *Biotechnol. Acta* 15(3), 5–12 (2022). <https://doi.org/10.15407/biotech15.03.005>

(Особистий внесок здобувача – пошук інформації, дизайн дослідження, проведення експерименту, написання рукопису, підготовка статті до друку)

2. N. G. Hrytseva та L. M. Skivka, "Prevalence of causative agents of ring rot *clavibacter sepedonicus*, blackleg and wet rot *pectobacterium atrocepticum* in the 2021 year potato harvest in the territory of ukraine", *Microbiology&Biotechnology* 2023(1(57)), 6–17. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2023.1\(57\).274279](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2023.1(57).274279)

(Особистий внесок здобувача – розробка концепції, проведення дослідження, обробка даних, написання рукопису, підготовка статті до друку)

3. N. G. Hrytseva та L. M. Skivka, "Latent infestation of potato tubers with soft rot and ring rot pathogens under changing weather conditions in ukraine", *Mikrobiolohichniy Zhurnal* 85(6), 26–40 (2023). <https://doi.org/10.15407/microbiolj85.06.026>

(Особистий внесок здобувача – розробка концепції та проведення дослідження, аналіз даних, статистична обробка даних, написання рукопису, підготовка статті до друку)

4. N. Hrytseva, T. Babych, A. Andriienko, K. Rubanik та Y. Yumyna, "Assessment of resistance to the pathogen of soft rot and blackleg common in ukraine potato varieties", *Bull. Taras Shevchenko National Univ. Kyiv. Ser.* 95(4), 39–44 (2023). <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.95.39-44>

(Особистий внесок здобувача – дизайн дослідження, інокуляція збудником, написання рукопису, підготовка статті до друку)

Опубліковані праці апробаційного характеру:

6. Грицева Н.Г., Сківка Л.М. Нові підходи в детекції комплексу видів *Ralstonia solanacearum* на основі 16s РНК». Біологічні процеси оптимізації продукційного процесу культурних рослин: матеріали Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції, присвяченої 60-річчю ІСМАВ НААН, 2021, 176 с.

7. N. Hrytseva. Development of real-time pcr to detect *Ralstonia solanacearum* species complex based on 16s RNA. IV International Scientific Conference «Microbiology and Immunology– the development outlook in the XXI Century», 2022. 106 p.

8. Грицева Н.Г., Сківка Л.М. Поширення *Pectobacterium atrosepticum* та *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* в урожаї картоплі на півдні України у 2021 році. Біологічні дослідження – 2022: за матеріалами XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції, 2022, 300 с.

9. Грицева Н.Г., Сківка Л.М. Аналіз поширення кільцевої гнилі та м'якої гнилі в урожаї бульб картоплі на території Львівської області у 2022 році, Молодь і поступ біології: за матеріалами XIX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «МОЛОДЬ І ПОСТУП БІОЛОГІЇ», присвячена 90-річчю від дня народження академіка НАН України, професора Шеляга-Сосонка Юрія, 2023, 238 с.

10. Грицева Н.Г., Сківка Л.М. Порівняльний аналіз поширення збудників чорної ніжки та м'якої гнилі картоплі *Pectobacterium atrosepticum* та *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* в урожаї картоплі 2021 року, Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: матеріали XVI наукової конференції молодих учених, 2023. 162 с.

11. Hrytseva N., Babych T., Andriienko A., Rubanik K., Skivka L., Yumyna J. Susceptibility of Bellarosa and Riviera potato varieties from different regions to the *Pectobacterium atrosepticum* B-1084T, The International Scientific and Practical Conference Kyiv, Ukraine "MODERN ASPECTS OF MICROBIOLOGY, VIROLOGY, AND BIOTECHNOLOGY IN WARTIME AND POST-WAR PERIOD", 2023. 299 p.

ДОДАТОК Б

Таблиця Б.1.

Характеристика праймерів використаних у дослідженнях

Об'єкт	Назва праймеру	Послідовність (5'–3')	Орієнтація	Джерело
<i>Ralstonia solanacearum</i>	OLI	GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC	Прямий	Seal et al. (1993)
	Y2	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	Зворотній	
	OLI160	CGGCCGCCTCCTATAGCATGA	Прямий	(У цій роботі)
	OLI248	AGTCCCAGTGTGGCTGATCG	Зворотній	
	Rs28	TGGCGAACGGGTGAGTAATA	Прямий	
	Probe	5'-6-FAM-ATACCGCATACGACCTGAGG-BHQ-1-3	ДНК-зонд	
	Rs193	GGCCTTTACCCCACTA	Зворотній	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	PeCCf	AACAGTAATGTGGTGTGAGTGATGCA	Прямий	(У цій роботі)
	PeCCr	CGCATCAACAGGTGCGCTTG	Зворотній	
	Probe	5'-6-Fam-GCCTAGGACACTGCCCTTTCACGG-BHQ-1-3'	ДНК-зонд	

ДОДАТОК В

Таблиця В.1.

Погодні умови в період посадки, вегетації та збору урожаю картоплі у 2020 році

2020		Одеса	Миколаїв	Херсон	Дніпро	Донецьк	Черкаси	Київ	Житомир
Квітень (IV)	ΣR^* , мм	8,0	8,0	10,7	12,2	13,7	22,9	27,1	21,2
	t_{avg}^{**} , °C	11,2	10,3	10,1	9,3	8,7	9,3	9,1	9,1
ГТК		0,71	0,78	1,06	-	-	-	-	-
Травень (V)	ΣR^* , мм	58,7	51,9	36,6	63,1	45,7	111,2	124,5	116,7
	t_{avg}^{**} , °C	14,8	14,4	15,1	14,7	14,6	13,2	12,4	11,9
ГТК		4,0	3,60	2,42	4,29	3,13	8,42	10,04	9,81
Червень (VI)	ΣR^* , мм	41,8	42,5	30,5	35	29,8	69,5	65,7	78,5
	t_{avg}^{**} , °C	22,1	22,5	22,9	22,6	22,4	21,3	20,9	20,1
ГТК		1,89	1,89	1,33	1,56	1,33	3,26	3,14	3,91
Липень (VII)	ΣR^* , мм	22,4	21,5	14,5	7,3	27,6	23,9	35,6	43,2
	t_{avg}^{**} , °C	24,8	24,9	25,9	24,6	24,7	22,4	21,4	20,3
ГТК		0,9	0,86	0,56	0,30	1,12	1,07	1,66	2,13
Серпень (VIII)	ΣR^* , мм	3,4	4,2	7	5,9	6,1	7,2	13,9	25,2
	t_{avg}^{**} , °C	23,9	23,9	24,6	23,4	23	22,3	21,2	20,5
ГТК		0,14	0,18	0,28	0,25	0,27	0,32	0,66	1,23
Вересень (IX)	ΣR^* , мм	9,9	18,4	35,9	22,6	0,8	31	24,6	29,5
	t_{avg}^{**} , °C	20,6	20,7	21,2	20,2	19,8	19,2	18,4	17,5
ГТК		0,48	0,89	1,69	1,12	0,04	1,61	1,34	1,69

Примітки: * ΣR - сума опадів, мм; ** t_{avg} - середня температура повітря, °C;

ДОДАТОК Г

Таблиця Г.1.

Погодні умови в період посадки, вегетації та збору урожаю картоплі у 2021 році

2021		Одеса	Миколаїв	Херсон	Дніпро	Донецьк	Черкаси	Київ	Житомир
Квітень (IV)	ΣR^* , мм	43,5	45,8	42	45,2	31,6	52,5	40,1	44,2
	t_{avg}^{**} , °C	9,5	9,3	9,9	9,6	9,6	8,4	8,1	7,6
ГТК	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Травень (V)	ΣR^* , мм	60,5	51,9	25,8	29,8	41,6	59,4	104,5	117,0
	t_{avg}^{**} , °C	16,2	16,2	17,1	16,7	17,1	15,1	14,3	13,6
ГТК		3,73	3,20	1,51	1,78	2,43	3,93	7,31	8,60
Червень (VI)	ΣR^* , мм	114	90,2	75,0	129,3	130,9	77,8	50,7	47,6
	t_{avg}^{**} , °C	21,2	21,5	21,8	21,2	21,2	20,4	20,4	20,1
ГТК		5,38	4,20	3,44	6,10	6,18	3,81	2,49	2,36
Липень (VII)	ΣR^* , мм	37,9	36,5	59,9	44,9	44,8	36,8	50	44,2
	t_{avg}^{**} , °C	26	26,5	27,1	26,3	26,2	25,2	24,7	24
ГТК		1,46	1,38	2,21	1,71	1,71	1,46	2,02	1,84
Серпень (VIII)	ΣR^* , мм	13,9	12	21,7	17,1	11,7	46,9	37,5	60,5
	t_{avg}^{**} , °C	24,7	25,3	26,5	26	26,3	23,4	22	20,8
ГТК		0,56	0,47	0,82	0,66	0,45	2,00	1,71	2,91
Вересень (IX)	ΣR^* , мм	10,9	22,5	12,2	16,9	26,9	25,2	27,6	28,4
	t_{avg}^{**} , °C	16,9	16,3	17	15,6	15,8	14,6	13,9	13,6
ГТК		0,65	1,38	0,72	1,08	1,70	1,73	1,99	2,09

Примітки: * ΣR - сума опадів, мм; ** t_{avg} - середня температура повітря, °C.