

АНАЛІЗ МЕТОДІВ ДІАГНОСТИКИ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ ТОМАТІВ В УКРАЇНІ

Ю. В. КОЛОМІЄЦЬ, доцент кафедри екобіотехнології
та біорізнноманіття

Національний університет біоресурсів і природокористування України
<http://orcid.org/0000-0002-1919-6336>

Л. М. БУЦЕНКО, старший науковий співробітник

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
<http://orcid.org/0000-0002-3575-4289>
E-mail: julyja12345@gmail.com

Анотація. Ефективні та економічні методи виявлення й ідентифікації необхідні для дослідження екології, патогенезу й обмеження поширення фітопатогенних бактерій, а також для програм сертифікації насіння. Наведено доступні методи виявлення й ідентифікації чотирьох основних збудників бактеріальних хвороб томатів *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, які поширені в Україні. До цих методів належать мікробіологічні із застосуванням селективних середовищ, серологічні, молекулярні методи, що ґрунтуються на ампліфікації унікальних послідовностей ДНК. Застосування сучасних біохімічних тест-систем усунуло необхідність в ідентифікації фітопатогенних бактерій за допомогою тривалих рутинних методів. Наявні в продажі комерційні тест-системи забезпечують швидку ідентифікацію на рівні видів, а також виявляють нові й карантинні збудники. Методи, що ґрунтуються на ПЛР, мають переваги перед традиційними діагностичними тестами, оскільки ізоляти не потрібно культивувати до їхнього виявлення, а протоколи є високочутливими і швидкими.

Ключові слова: бактеріальні хвороби, томати, діагностичні методи, серологія, ПЛР.

Актуальність.

Томат є найважливішою овочевою культурою, яка уражається численними збудниками хвороб, серед яких значну шкідливістю мають бактеріози. Основними бактеріальними патогенами томатів, які спричиняють значну шкоду насадженням цієї культури в Україні, є *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, ксантомонади, які спричиняють бактеріальні плями (BSX) і збудник м'якої гнилі *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* [1, 2].

Збудник бактеріального в'янення й раку томатів, вважається одним із найбільш небезпечних бактеріальних патогенів у посівах томатів у всьому світі. Потрапивши всередину рослини, патоген розмножується в судинах ксилеми, утворюючи великі біоплівкові структури, які сприяють колонізації й переміщенню рослиною [3]. Симптоми хвороби проявляються на надземних частинах і включають в'янення листя і зміну кольору судинних тканин, що призводить до раку стебла [4].

Бактеріальна крапчастість томатів, що викликається *P. syringae* pv. *tomato*, є одним із найбільш поширених на території нашої країни бактеріальних захворювань як у тепличному, так і в польовому виробництві томатів [5]. Збудник потрапляє в міжклітинний простір листя через продихи або основу трихоми листка [6].

Симптоми чорної бактеріальної плямистості на листках томатів, які спричиняють декілька видів роду *Xanthomonas*, аналогічні тим, які описані для *P. syringae* pv. *tomato*. Бактерії проникають у рослини-господарі через продихи на поверхні листя або через рани й колонізують судинну систему [7].

P. carotovorum subsp. *carotovorum* це фітопатогенні ентєробактерії, які спричиняють м'яку гниль і здатна завдати серйозної шкоди багатьом рослинам у всьому світі в польових умовах і під час зберігання. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* продукують широкий спектр ферментів, що руйнують стінки клітин рослин, спричиняючи мацерацію різних органів і тканин рослин [8, 9].

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* і BSX є карантинними організмами в Європейському Союзі (Список А2 Європейської організації з карантину та захисту рослин (ЄОК-ЗР)) і підлягають міжнародному фітосанітарному контролю [10]. Також в останні роки регулярно з'являються повідомлення підрозділів Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів про виявлення в деяких господарствах карантинного організму – збудника бурої гнилі *Ralstonia solanacearum*, внесеного до Списку А2 ЄОКЗР та карантинні списки багатьох країн світу [11]. Повідомляється про природне ураження томатів збудником кільцевої гнилі картоплі *C. michiganensis* subsp. *sepedonicum* [11], який включений в список А2 ЄОКЗР і у список А3 (регульовані некарантинні організми) Переліку регульованих шкідливих організмів (№ 879/33850 від 08 серпня 2019 р.) (табл. 1).

Норми Європейського Союзу вимагають, щоби розсадники перевірялися на фітосанітарний статус у відношенні поширених патогенів до виходу на комерційний ринок. Боротьба з хворобами, які спричинені патогенними бактеріями, зазвичай вимагає точного виявлення з подальшою правильною ідентифікацією

Таблиця 1. Економічно важливі збудники бактеріальних хвороб томатів

Збудники, які поширені в Україні	Карантинні збудники, по- ширення яких контролю- ється в Україні	Збудники, які є карантинни- ми в Євросоюзі
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>X. vesicatoria</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>P. carotovorum</i> , <i>P. corrugate</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i> <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicum</i>

збудника. З іншого боку, виявлення бактерій у безсимптомному рослинному матеріалі для профілактичного контролю необхідно, але може бути надзвичайно важким, оскільки можуть виникати невеликі популяції з нерівномірним розподілом патогена, тому потрібні високочутливі методи. Зважаючи на економічну важливість цих патогенів точне виявлення збудників хвороб має вирішальне значення, а також є однією з найбільш ефективних стратегій запобігання їхнього подальшого поширення.

Мета роботи – всебічний аналіз доступних методів діагностики збудників, зокрема, мікробіологічних, заснованих на селективних середовищах для вирощування, біохімічних і фізіологічних аналізах, серологічних і ампліфікації на основі послідовностей нуклеїнових кислот.

У 2019 – 2020 рр. для уточнення видового складу хвороб на томатах нами проводилися маршрутні обстеження фермерських господарств Київської, Херсонської й Сумської областей. У результаті моніторингу, упродовж усього вегетаційного періоду серед бактеріальних хвороб відзначали розвиток чорної бактеріальної плямистості, бактеріальної крапчастості, бактеріального раку і м'якої гнилі в посівах томатів. У Сумській області поширеність чорної

бактеріальної плямистості в червні становила 2–3,5 % за ступеня розвитку 1,5–2,0 %; упродовж вегетації рослин поширеність хвороби досягала 6,5–7,2 %, а ступінь розвитку хвороби 3,8–4,7 %. Поширеність збудника бактеріальної крапчастості була характерна для всіх господарств Київської, Херсонської й Сумської областей. Симптоми ураження томатів збудником з'являлися в першій декаді липня, а в серпні місяці ураженість становить 1,0–4,5 %, максимальна – 6,8, з розвитком хвороби – 0,3–6, плодів – 0,5–1,2 %. У трьох областях розвиток бактеріальної крапчастості на посадках томатів у вересні наприкінці вегетації був у межах 24,4–27,2 %. У Херсонській і Київській областях бактеріальний рак у посадках томатів проявився в першій декаді липня на 20 % рослин із розвитком хвороби 4,8 %. Масове ураження томатів бактеріальним раком припало на першу декаду серпня, коли ознаки хвороби в середньому розвивалися на – 35 %, максимально – 57 % рослин томатів. Так, під час обстеження тепличних господарств Київської області встановлено, що розвиток м'якої гнилі в другій і третій декаді липня склав 10–12 %. З другої декади серпня, у період плодоношення й дозрівання зазначається інтенсивний розвиток хвороби. До кінця вегетації

розвиток хвороби на стеблах і плодах досягав 30–34 % за поширеності 45 %. Отже, за сучасного стану вирощування томатів в умовах України видовий склад збудників бактеріальних хвороб томатів представлений *X. vesicatoria*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Більш інтенсивний розвиток бактеріальних хвороб спостерігався в другій половині вегетаційного періоду, що пов'язано із загущеністю посадок томатів і утриманням вологості на рослинах. Отримані дані можуть бути використані для прогнозування фітосанітарного стану насаджень томатів в Україні та розроблення рекомендацій щодо захисту томатів від збудників бактеріальних хвороб. Своєчасна діагностика і визначення збудника дасть змогу аграрним підприємствам використовувати здоровий посадковий матеріал, забезпечити ефективний захист рослин та своєчасно знизити ймовірність поширення шкодочинних фітопатогенів.

У сучасній діагностиці бактеріальних хвороб овочевих культур використовують мікробіологічний, серологічний і молекулярний підходи.

Застосування мікробіологічних методів часто буває достатнім для більшості лабораторій для проведення рутинних аналізів при виявленні та діагностиці збудників бактеріальних хвороб. Крім того, їхньою перевагою є можливість отримати інформацію про біологічні особливості агента й дані, необхідні для виявлення джерел зараження. Однак застосування таких методів обмежено великою тривалістю аналізу й необхідністю використання великої кількості різних селективних середовищ і реагентів.

Посів на селективне середовище дає змогу кількісно визначати, ізолювати й повністю ідентифікувати життєздатні клітини патогена; однак для отримання результатів потрібно відносно тривалий час від 5 до 14 діб і вимагає занадто багато роботи. До того ж, ефективність залежить від мікробного фону, оскільки ріст колоній збудника може пригнічуватися присутністю інших мікроорганізмів. Наприклад, *Clavibacter* демонструє велику варіабельність характеристик росту на різних селективних середовищах, тому рекомендується використовувати більше одного середовища (табл. 2). Використовуючи середовище SCM, можна виявити наявність однієї зараженої насінини, що містить >50 бактерій, в 10 000 неінфікованих насінинах. Бактерії в насінні томатів були виявлені з використанням як SCM, так і D2ANX. 95 % колоній на обох селективних середовищах дійсно були *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* з рівнями виявлення від 1 до 10 КУО/мл [12].

Нещодавно було введено в діагностику нове середовище: ВСТ, яке дозволяє виявити *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* в присутності високого сапрофітного фону [13].

Для виділення збудника чорної бактеріальної плямистості рекомендується дріжджовий агар з глюкозою і карбонатом кальцію (YGCA), і інші неселективні середовища, такі як середовище Уілбрінка, поживний агар (NA), агар із живильною декстрозою (ND), дріжджовий екстракт-декстроза-карбонат кальцію (YDC). Також можна використовувати агар, агар з поживним бульйоном і дріжджовим екстрактом (NBY) або дріжджовий пептонно-глюкозний агар з добавкою аденіну (YPGA).

Таблиця 2. Селективні середовища для ідентифікації збудників бактеріальних хвороб томатів

Хвороба томатів	Збудник	Середовища для виявлення збудника
Бактеріальний рак	<i>Clavibacter michiganensis</i> <i>subsp. michiganensis</i>	Селективні: SCM, mSCM [13], SCM-fast, D2ANX [12], CNS, BCT [14] Неселективні: YDS [13], NBY [15]
Бактеріальна крапчастість	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	King's B [16]
Чорна бактеріальна плямистість	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Селективні: CKTM, mMXV, mTMB [17] Неселективні: YGCA, Wilbrink's medium, NA, ND, YDC, NBY, YPGA [18]
М'яка гниль	<i>Pectobacterium carotovorum</i> <i>subsp. carotovorum</i>	CVP, CVPB [19]

Напівселективні середовища, такі як агар СКТМ, mMXV, або агар mTMB, можуть полегшити ізоляцію в зразках, де висока популяція сапрофітів перешкоджає успішному виділенню досліджуваних колоній *Xanthomonas* [17]. На YGCA колонії *X. vesicatoria* яскраво-жовті, круглі, з рівним краєм, вологі і блискучі, слизові і злегка підняті. На інших середовищах колонії виглядають блідо або яскраво-жовтими, круглими, слизовими і злегка піднятими. На середовищі СКТМ колонії виглядають круглими, опуклими, жовтими й оточеними білим кристалічним ореолом. Ізоляти із томатів зазвичай утворюють непрозорі білі ореоли навколо колоній упродовж 3-7 діб. На mTMB колонії *Xanthomonas* жовті, злегка слизові, опуклі і круглі. Використання Tween викликає утворення прозорого ореолу навколо жовтої колонії через 3-7 діб. Для подальшого очищення виділяють окремі колонії з жовтим пігментом і проводять тести необхідні для ідентифікації *Xanthomonas* spp. [18].

Були розроблені різні щільні середовища для виділення *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* із тканин рослин, ґрунту і води, проте до теперішнього

часу тільки одне середовище – CVP – широко використовується в усьому світі. Селективність середовища CVP ґрунтується на присутності кристалічного фіолетового, який пригнічує ріст більшості грампозитивних видів бактерій, і використанні поліпектата в якості єдиного джерела вуглецю [19].

Для прискорення рутинних мікробіологічних аналізів багато компаній пропонують доступні комерційні діагностичні набори відомих мікробіологічних тестів і обробку їхніх результатів за допомогою комп'ютеризованих систем цифрової ідентифікації (табл. 3).

Усі комерційні системи ідентифікації ґрунтуються на одній із п'яти різних технологій або їхні комбінації. До них належать реакції на основі рН, що вимагають від 15 до 24 годин інкубації, реакції на основі ферментів, для яких потрібно від 2 до 4 годин, використання джерел вуглецю, візуальне виявлення росту бактерій або виявлення летких або нелетких жирних кислот за допомогою газової хроматографії [26].

У реакціях на основі рН позитивний результат тесту визначається зміною кольору одного або декількох

барвників. Коли використовується вуглевод, рН стає кислим; коли використовується білок або відбувається вивільнення азотовмісної сполуки, рН стає лужним. На ці реакції впливають розмір посівного матеріалу, час інкубації й температура реакції.

Зміна кольору в системі на основі ферментів відбувається через гідроліз безбарвного комплексу відповідним ферментом із виділенням хромогену або флюорогена. Оскільки час інкубації, необхідний для аналізу ферментативної активності, 6 годин коротший, ніж час інкубації для середовищ на основі рН, випадкове забруднення не є критичним чинником [27].

У третьому типі реакції, використанні джерел вуглецю, відбувається перенесення електронів від органічного продукту на барвник тетразолій фіолетовий, який вводиться в кожную тестову лунку. Це перенесення зумовлює колориметричну зміну барвника, сигналізуючи про посилення клітинного дихання, яке відбувається під час процесу окислення. Ці реакції можуть відбуватися за 4 години.

Четвертий метод – це просте візуальне виявлення росту тест-організму (підвищеної каламутності) у

присутності субстрату. Результати визначаються внаслідок порівняння досліджуваної лунки з контрольною лункою, і для визначення каламутності можна використовувати карту Wickerham і завжди вимагає мінімальної інкубації упродовж 12 годин [26].

У своїх дослідженнях біохімічну ідентифікацію ізолятів *P. syringae* pv. *tomato* I3-9, I3-13, I3-28, I3-46 і *X. vesicatoria* I3-10, I3-11, I3-15, I3-17, I3-20, I3-23, I3-25, I3-30 і I3-31 проводили на стріпах API 20 NE (BioMérieux, Франція), яка включає 8 загальноприйнятих і 12 асиміляційних тестів для ідентифікації невимогливих до умов культивування грамнегативних паличок. Керуючись вищевикладеними результатами біохімічних аналізів виділені ізоляти ідентифіковані як збудник відповідно бактеріальної крапчастості й чорної бактеріальної плямистості.

Нині в Україні переважна більшість лабораторій, які рутинно здійснюють діагностику фітопатогенів, у якості основного методу використовують імунно-ферментний аналіз (ІФА). На сьогодні запропоновано десятки варіантів ІФА, але найпрактичніше значення в діагностиці бактеріальних хвороб має гетеро-

Таблиця 3 – Комерційні набори для ідентифікації збудників бактеріальних хвороб томатів

Збудник	Назва комерційного набору
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	API 50CH (bioMérieux) [20], API ZYM (bioMérieux) [21], Biolog [22]
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Biolog, API (bioMérieux) [23], MALDI-TOF MS [24]
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	API ZYM (bioMérieux), API 20NE (bioMérieux), API 50CH (bioMérieux), BBL DrySlide (Becton, Le Pont de Claix)
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	NEFERM-test (Lachema as, Brno), API 20E (bioMérieux), API RapiD 20E (bioMérieux), Crystal E/NF (BD), Enterotube II (BD), EPS (V1107) (bioMérieux), GN2 (Biolog), ID Tri-Panel, ID 32E, Microbact, Micro-ID, RapID onE, RapID SS/u, r/b Enteric, UID/UID-3 [25].

генний твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA). Наразі ELISA з mABs застосовують для детекції і внутрішньовидової ідентифікації багатьох шкідливих збудників бактеріальних хвороб рослин, що належать до родів *Clavibacter*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia* та *Xylophilus*. Чутливість ELISA для бактерій, як правило, становить 10^5 – 10^6 КУО мл⁻¹, що достатньо для виявлення бактеріальних патогенів в ураженій рослині й серед колоній, вирощених *in vitro*. Однак найнадійніші діагнози вдається поставити, якщо аналізований зразок отримують із зони активного розвитку некрозів, де підтримується високий титр фітопатогену [28].

Серологічні методи визначення також включають у себе метод імунофлюоресценції (IF), непрямого імунофлюоресцентного фарбування колоній (IFC) та імуномагнітну сепарацію (IMS). Для імунофлюоресцентного (IF) аналізу певні бактеріальні клітини прикріплюються до скла мікроскопа через нагрівання або фіксацією спирту. Флуорофор-кон'юговані антитіла зв'язуються з зовнішньою клітинною стінкою і флуоресцентні клітини візуалізуються з використанням епіфлюоресцентної мікроскопії. Рівень виявлення IF становить 10^3 КУО/мл для природно зараженого насіння [29]. Імунофлюоресцентне фарбування колоній (IFC) виявляє тільки живі бактерії і використовує відносно велику кількість антитіл, що робить цей метод дорогим. Однак, перевагою є те, що можна виявити навіть 10 КУО/мл збудника [30], що робить його в сто раз більше чутливим, ніж IF [31].

Метод імуномагнітної сепарації (IMS) ґрунтується на використанні імуномагнітних мікрочастинок, по-

критих специфічними антитілами для захоплення цільових бактеріальних клітин, має поріг виявлення 10 КУО/мл в гетерогенній суміші насіння [32].

Підвищена чутливість і можливість в деяких модифікаціях метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) проводити кількісну оцінку присутності фітопатогенів робить цей метод більш привабливим за діагностики карантинних об'єктів. Наприклад, компанія ТОВ «АгроДіагностика» розробила набори для діагностики ряду карантинних фітопатогенів методом ПЛР із флуоресцентною детекцією результатів (FLASH-ПЛР, ПЛР у реальному часі). Застосування таких діагностичних наборів дозволяє отримати надійні, швидкі й достовірні (специфічність аналізу становить понад 99 %) результати, що забезпечують перевірку підкарантинних матеріалів на наявність об'єктів внутрішнього і / або зовнішнього карантину.

ДНК-діагностика збудників овочевих культур із використанням видів ПЛР: BIO-ПЛР, STS-ПЛР, MLST/MLSA-ПЛР, nested-ПЛР, PRIMSPЛР, real-time ПЛР та мультиплексні ПЛР-тест-системи уможливають ідентифікувати одночасно кілька збудників. Висока чутливість ПЛР-діагностики дозволяє визначати причину бактеріальних хвороб рослин томата на ранніх стадіях розвитку захворювання, зокрема в пробах, що містять 2×10^2 КУО/мл збудника, коли істотної шкоди рослинам ще не завдано [33].

Важливими складовими діагностичної системи є розробка специфічних праймерів для ідентифікації роду і виду фітопатогенних бактерій, для яких специфічними можуть бути ділянки, що кодують так звані чинники патогенності і визначають специфіку ураження рослини-хазяїна (табл. 4-7).

Таблиця 4. Специфічні праймери для діагностичних систем до збудника бактеріального раку

Праймер Цільовий ген	Варіант ПЛР	Зразок	Посилання
<i>C. michiganensis subsp. michiganensis</i>			
CMM-5/CMM-6 Pat-1 gene plasmid DNA	Стандартна	Рослинна тканина та насіння (ДНК екстракція), бактерії (прогріті)	Dreier et al. [34]
CM3/CM4 DNA fragment from a cloned pathogenic isolate	Стандартна	Бактерії (лужний лізис і прогріті), насіння	Santos et al. [35]
CMM5/CMM6 Pat-1 gene plasmid DNA PSA-4/PSA-R 16S-23S rDNA spacer region	Стандартна	Бактерії (прогріті)	Anonymous [36]; Miliasevic et al. [37]
CMM-5/CMM-6 Pat-1 gene plasmid DNA	Стандартна	Бактерії (екстракція ДНК)	Hadas et al. [38]
CM3/CM4 DNA fragment from a cloned pathogenic isolate	BIO	Бактерії (екстракція ДНК)	Hadas et al. [38]

З літературних джерел відомо, що геном *C. michiganensis subsp. michiganensis* включає плазмиди pCM1 (27,5 kb) і pCM2 (72 kb), які кодують гени вірулентності, стійкості проти антибіотиків. Показано, що штами, які не містять плазмід, не зумовлюють інфекційний процес у рослинах томата, хоча здатність до розмноження *in planta* зберігається. Плазміда pCM1 містить ген *celA* і кодує ендо-1,4-глюканазу (целюлазу). Питання щодо важливості *celA* гена для розвитку бактеріального раку була встановлена за умов вивчення *celA* мутантних штамів, які, як і безплазмідні штами, були не вірулентними. Дослідження [34] показали, що плазміда pCM2 містить ген *pat-1*, що кодує білок із 280 амінокислотних залишків, обов'язковий для розвитку *C. michiganensis subsp. michiganensis* в рослинах томата. У своїх дослідженнях зі зразками ДНК, виділеної з ізолятів *C. michiganensis subsp. michiganensis* ІЗ-38, ІЗ-48, ІЗ-51, ІЗ-58, ІЗ-59, ІЗ-60, проводили ПЛР із

парою праймерів CMM5-CMM6 специфічних до маркерної ділянки *pat-1* гена. Наявність продукту ампліфікації 614 н.п. свідчила про належність ізолятів до *C. michiganensis subsp. michiganensis*

Бактерії *P. syringae* pv. *tomato* продукують коронатін, який містить циклопропанове кільце й синтезується із коронафацинової й коронамислової кислот. З'єднуючий фермент являє собою лігазу коронафацинової кислоти, яка кодується *cfl*-геном [40]. Ця реакція характерна для коронатін-продукуючих патогенів *P. syringae* і, відповідно, є специфічним інструментом їхньої ідентифікації. У наших дослідженнях під час проведення ПЛР зі зразками ДНК, виділеної з ізолятів *P. syringae* pv. *tomato* ІЗ-9, ІЗ-13, ІЗ-28 і ІЗ-46 з парою праймерів P1-P2 специфічних до маркерної ділянки *cfl* гена утворювалися ПЛР продукти розміром 650 н.п., що свідчило про присутність у зразках бактерій *P. syringae* pv. *tomato*.

Таблиця 5. Специфічні праймери для діагностичних систем до збудника бактеріальної крапчастості

Праймер Цільовий ген	Варіант ПЛР	Зразок	Посилання
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MM5F/MM5R hrpZpst gene	Стандартна	Бактерії (прогріті), рослини (екстракція ДНК)	Zaccardelli et al. [39]
RcalFor1/RTRev RAPD fragment 27F/1492R+HSP1/HSP2 16S rDNA+specific to <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> Rtimefor/RTRev Probe (molecular beacon)	Стандартна Мультиплексна Real-time	Бактерії, рослини (екстракція ДНК)	Fanelli et al. [40]
P1-P2 <i>cfl</i> - gene	Стандартна	Бактерії, рослини (екстракція ДНК)	Fanelli et al. [40]
cff primer1/cff primer2 Coronatine biosynthesis gene cluster	Стандартна, RFLP	Бактерії (екстракція ДНК)	Bereswill et al. [41]
COR1/COR2 Coronafacic acid cfa7 gene	Стандартна	Чисті культури або рослинна тканина (екстракція ДНК)	Cuppels et al. [42]

Встановлені відмінності в розташуванні та будові *hrp*-генів роду *Xanthomonas*, дали змогу звузити коло пропонованих праймерів для молекулярної діагностики бактеріальної плямистості. Використання тест-систем, праймери яких гомологічні до *hrp*-ділянки генома *X. vesicatoria*, уможливорює забезпечити високу точність та специфічність ідентифікації

збудника [43]. Зі зразками ДНК, виділеної з ізолятів *X. vesicatoria* ІЗ-10, ІЗ-11, ІЗ-15, ІЗ-17, ІЗ-20, ІЗ-23, ІЗ-25, ІЗ-30, ІЗ-31, проводили сайт специфічну ПЛР із парою праймерів RST2-RST3 специфічних до регуляторної ділянки гена *hrp* В. Наявність продукту ампліфікації 840 н.п. свідчило про присутність у зразках бактерій *X. vesicatoria*.

Таблиця 6. Специфічні праймери для діагностичних систем до збудника чорної бактеріальної плямистості

Праймер Цільовий ген	Варіант ПЛР	Зразок	Посилання
<i>X. vesicatoria</i>			
BSX1/BSX2 Genomic DNA (unknown)	Стандартна	Бактерії, рослини (ДНК екстракція)	Cuppels et al. [42]
RST2/RST3 RST9/RST10 hrpB (hypersensitive reaction and pathogenicity gen cluster)	Стандартна	Змиви насіння (екстракція ДНК) (аскорбат натрію та PVPP)	Leite et al. [43]
XCVF/XCVR Rhs-gen	Стандартна	Бактерії (екстракція ДНК)	Dong Suk Park et al. [44]

Таблиця 7. Специфічні праймери для діагностичних систем до збудника м'якої гнилі

Праймер Цільовий ген	Варіант ПЛР	Зразок	Посилання
<i>P. carotovorum subsp. carotovorum</i>			
EXPCCF/EXPCCR Chromosomal DNA (unknown)	Конкурентна	Бактерії (необроблені), рослини (екстракція ДНК)	Kang et al. [45]
INPCCF/INPCCR Nested to EXPCCF/ EXPCCR	Нестед	Бактерії (необроблені), рослини (екстракція ДНК)	Kang et al. [45]
SR3F/SR1cR 16S rRNA gene	Стандартна, RFLP	Бактерії (необроблені), мікророслини	Toth et al. [46]
MpdEc-F/MpdEc-R mpd gene	Real-time (iQ Supermix SBYRGreen)	Рослинна тканина (ДНК екстракція)	Atallah, Stevenson [47]
Y1/Y2 Y family of pectate lyase (pel) genes	Стандартна, RFLP	Бактерії (екстракція ДНК), бактерії (прогріті), росли- ни, ґрунт та вода (екстрак- ція ДНК)	Darrasse et al. [48]; Helias et al. [49]

Починаючи з 1990-х років було розроблено декілька методів, заснованих на ампліфікації ДНК для виявлення видів *Pectobacterium*, а також нові варіанти ПЛР, включаючи мультиплексну ПЛР, ПЛР у реальному часі і LAMP. Darrasse A. et al., сконструйовано специфічні праймери (Y1, Y2) для детектування *pel*-гену відповідального за синтез пектатліази в декількох видів пектолітичних бактерій *P. carotovorum subsp. carotovorum*, *P. carotovorum subsp. odoriferum* і *P. carotovorum subsp. atrosepticum* [48].

Нині ПЛР вважається рутинним методом і рекомендується в більшості протоколів, розроблених Європейським союзом і Європейською та Середземноморською організацією захисту рослин.

Висновки та перспективи.

Отже, комплексне використання мікробіологічних, серологічних та ПЛР-діагностик фітопатогенів ство-

рює передумови для розробки і реалізації в практиці епідеміологічного нагляду за бактеріальними хворобами принципово нових біотехнологічних схем вивчення ареалу розповсюдження збудників і попередження розвитку епіфітотій.

Reference:

1. Peňázová E., Dvořák M., Ragasová L., Kiss T., Pečenka J., Čechová J., Eichmeier A. Multiplex real-time PCR for the detection of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. tomato and pathogenic *Xanthomonas* species on tomato plants. PLoS One. 2020, 7;15(1), e0227559. doi: 10.1371/journal.pone.0227559
2. Kolomiets JV, Grygoryuk IP, Butsenko LM. Bacterial diseases of tomato plants in terms of open and covered growing of Ukraine. Annals of Agrarian Science. 2017; 15(2): 213–216.
3. De León L, Siverio F, López MM, Rodríguez A. *Clavibacter michiganensis subsp. michi-*

- ganensis, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Dis.* 2011; 95: 1328–1338. doi: 10.1094/PDIS-02-11-0091
4. Chalupowicz L, Zellermann E-M, Fluegel M, Dror O, Eichenlaub R, Gartemann K-H, et al. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology.* 2012; 102: 23–31. doi: 10.1094/PHYTO-05-11-0135
5. Butsenko, L., Pasichnyk, L., Kolomiets, Y., Kalinichenko, A. (2020) The effect of pesticides on the tomato bacterial speck disease pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *toma-to*. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(9), 3263. doi:10.3390/app10093263
6. Kolomiets, Y.V., Grygoryuk, I.P. & Butsenko, L.M. (2017) Bacterial diseases of tomato plants. Monograph. Kyiv: CP Kompyrnt, 348 p.
7. Schwartz AR, Potnis N, Timilsina S, Wilson M, Patane J, Martins J, et al. Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Front Microbiol.* 2015; 6:535. doi: 10.3389/fmicb.2015.00535
8. Agyemang PA., Kabir MdN, Kersey CM, Dumenyo CK. The bacterial soft rot pathogens, *Pectobacterium carotovorum* and *P. atrosepticum*, respond to different classes of virulence-inducing host chemical signals. *Horticulturae* 2020, 6, 13; doi:10.3390/horticulturae6010013
9. Kolomiets, Y., Grygoryuk, I., Butsenko, L., Bohoslavets, V., Blume, Y., Yemets, A. (2020) Identification and biological properties of the pathogen of soft rot of tomatoes in the greenhouse. *Open Agriculture Journal*, 14(1), 290–298. doi:10.2174/1874331502014010290
10. EPPO. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests, version 2018–09. 2018 [cited 1 May 2019]. In: European and Mediterranean Plant Protection Organisation [Internet]. Available from: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list.
11. Review of the spread of quarantine organisms in Ukraine. Available from: <https://dpss.gov.ua/fitosanitariya-kontrol-u-sferi-nasinnictva-ta-rozsadnictva/fitosanitarnij-kontrol/oglyad-poshirennya-karantinnih-organizmiv-v-ukrayini>.
12. Olivier, V., Baloché, A., Drouin, A., Audusseau, C., Paillard, S., and Soubelet, H. (2010). Internal methods comparison study and inter-laboratory study on *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds1. *EPPO Bull.* 40: 248–256.
13. Sen Y., Wolf J., Visserand R. G. F., Heusden S. (2015) Bacterial Canker of Tomato: Current Knowledge of Detection, Management, Resistance, and Interactions. *Plant Disease*, 99 (1), P. 4–13.
14. Ftayeh, R. M., von Tiedemann, A., and Rudolph, K. W. E. (2011). A new selective medium for isolation of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seed. *Phytopathology*, 101, 1355–1364. doi: 10.1111/j.1365-2338.2010.02380.x
15. Xu, X. L., Miller, S. A., Baysal-Gurel, F., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R., and Rajashekara, G. 2010. Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3978–3988.
16. Saint-Vincent PMB, Ridout M, Engle NL, Lawrence TJ, Yeary ML, Tschaplinski TJ., Newcombe G, Pelletier DA. (2020) Isolation, characterization, and pathogenicity of two *Pseudomonas syringae* pathovars from *populus trichocarpa* seeds. *Microorganisms*, 8, 1137. doi:10.3390/microorganisms8081137
17. Sijam K, Chang CJ & Gitaitis RD (1992) A medium for differentiating tomato and pepper strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14, 182–184. doi: 10.1080/07060669209500896
18. OEPP/EPPO, (2013) “PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*)”.

- ria, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper," OEPP/EPPO Bulletin, 43, 7–20. doi: 10.1111/epp.12018
19. Czajkowski R, Pérombelon McM, Jafra S, Lojkowska E, Potrykus M, van der Wolf Jm, Sledz W. (2015) Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Ann Appl Biol*, 166(1), 18–38. doi: 10.1111/aab.12166.
20. EPPO (2013). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. OEPP/ EPPO Bull 43, 46–67.
21. Palomo, J. L., Lo´pez, M. M., Garc´ıa-Benevides, P., Vela´zquez, E. & Mart´ınez-Molina, E. (2006). Evaluation of the API 50CH and API ZYM systems for rapid characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, causal agent of potato ring rot. *Eur J Plant Pathol* 115, 443–451
22. Yasuhara-Bell J, Alvarez AM. (2015) Seed-associated subspecies of the genus *Clavibacter* are clearly distinguishable from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 811–826. doi: 10.1099/ij.s.0.000022
23. Choi O, Kang B, Cho SK. (2017) Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf blight of *Miscanthus sinensis*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124, 97–100. doi: 10.1007/s41348-016-0058
24. Datta S, Kumar RS, Ayyadurai N, Kumar S, Sakthivel N. (2004) Polysaccharides of *pseudomonas* pathovar strains that infect pea, tomato, and soya bean. *Curr Microbiol*, 49(1), 35–41. doi: 10.1007/s00284-004-4252-4.
25. O'Hara, C. M. (2005) Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic Gram-negative Bacilli. *Clin Microbiol Rev.*, 18(1), 147–162. doi: 10.1128/CMR.18.1.147-162.2005
26. O'Hara, C. M., Weinstein M. P., Miller J. M. (2003) Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms, p. 185–207. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, J. H. Jorgensen, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
27. Franco-Duarte R. (2019) Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms - from past to present. *Microorganisms*, 7(5), 130. doi: 10.3390/microorganisms7050130
28. Fundamental phytopathology. Ed. Yu. T. Dyakova. M., 2012. 512 p.
29. Olivier V., Baloché A., Drouin A., Audusseau C., Paillard S., Soubelet H. (2010) Internal methods comparison study and inter-laboratory study on *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *EPPO Bull*, 40, 248–256.
30. Veena M. S., van Vuurde J. W. Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato. *Journal of Microbiological Methods*. 2002. Vol. 49 (1). P. 7–11.
31. Nemeth J., Vuurde, J. W. L. V. Development of immunofluorescence colony staining (IFC) for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Seed Science and Technology*. 2006. Vol. 34. P. 85–100.
32. de Leon L., Siverio F., Rodriguez A. 2006. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 67. P. 141–149.
33. Palacio-Bielsa A. (2009) PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria updated review of protocols (1989–2007). *Journal of Plant Pathology*, 91, 249–297.
34. Dreier J., Bempohl A., Eichenlaub R., 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter*

- michiganensis subsp. michiganensis. *Phytopathology* 85: 462–468.
35. Santos M.S., Cruz L., Nørskov P., Rasmussen O.F., 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Science and Technology* 25: 581–584.
36. Anonymous, 2005a. EPPO Standards PM 7/42 (1) Diagnostics. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35: 275–284.
37. Miličević S., Todorović B., Balaz J., 2006. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, bacterial canker of tomato: 1. Conventional and molecular identification. *Pesticides and Phytomedicine* 21: 185–192.
38. Hadas R., Kritzman G., Klietman F., Gefen T., Manulis S., 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology* 54: 643–649.
39. Zaccardelli M., Spasiano A., Bazzi C., Merighi M., 2005. Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZPst*. *European Journal of Plant Pathology* 111: 85–90.
40. Fanelli V., Caridì C., Finetti-Sialer M., 2007. Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. *Plant Pathology* 56: 683–691.
41. Bereswill S., Bugert P., Völksy B., Ullrich M., Bender C.L., Geider K., 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2924–2930.
42. Cuppels D.A., Louws F.J., Ainsworth T., 2006. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens in tomato. *Plant Disease* 90: 451–458.
43. Leite R.P., Jones J.B., Somodi G.C., Min-savage G.V., Stall R.E., 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Disease* 79: 917–922.
44. Parka D S, Shima J K, Kima J S, Limb C K, Shresthab R, Hahna J H, Kimd H G (2009) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on *rhs* family gene sequences. *Microbiological Research*, 164, 36–42. doi:10.1016/j.micres.2006.11.005
45. Kang H.W., Kwon S.W., Go S.J., 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology* 52: 127–133.
46. Toth I.K., Hyman L.J., Wood J.R., 1999. A one step PCRbased method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *Journal of Applied Microbiology* 87: 158–166.
47. Atallah Z.K., Stevenson W.R., 2006. A methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology* 96: 1037–1045.
48. Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y., 1994. PCR and Restriction-Fragment-Lenght Polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1437–1443.
49. Helias V., Le Roux A.C., Bertheau Y., Andri-von D., Gauthier J.P., Jouani B., 1998. Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology* 104: 685–699.

Kolomiets Y.V., Butsenko L.M. (2021). ANALYSIS OF METHODS OF DIAGNOSIS OF BACTERIAL DISEASES OF TOMATOES IN UKRAINE. BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 12(1): 16-29. <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/15093>. <https://doi.org/10.31548/biologiya2021.01.002>.

Annotation. Effective and economical methods of detection and identification necessary for the study of ecology, pathogenesis and limiting the spread of phytopathogenic bacteria, as well as for seed certification programs. The available methods for the detection and identification of four main causative agents of bacterial diseases of tomatoes *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, which are common in Ukraine. These methods include microbiological using selective media, serological, molecular methods based on the amplification of unique DNA sequences. The use of modern biochemical test systems has eliminated the need to identify phytopathogenic bacteria using long-term routine methods. Commercially available commercial test systems provide rapid identification at the species level and also detect new and quarantine pathogens. PCR-based methods have advantages over traditional diagnostic tests because isolates do not need to be cultured before detection and protocols are highly sensitive and fast.

Keywords: bacterial diseases, tomatoes, diagnostic methods, serology, PCR.
