

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ Олена КВАСКО
“ ____ ” _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему “Встановлення видового складу попелиць (Aphididae) —
переносників вірусів рослин за допомогою молекулярних маркерів”**

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент, завідувач кафедри
екобіотехнології та
біорізноманіття

Олена КВАСКО

(підпис)

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук,
старший викладач кафедри
екобіотехнології та
біорізноманіття

Оксана ТАРАН

(підпис)

Виконала

Анастасія ЯНОВИЧ

(підпис)

КИЇВ – 2025

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ Олена КВАСКО

“ ____ ” _____ 2025 р.

ЗАВДАННЯ
на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи
студенту

Янович Анастасії Ігорівни

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи “Встановлення видового складу попелиць (Aphididae) — переносників вірусів рослин за допомогою молекулярних маркерів”

затверджена наказом ректора НУБіП України від “22” жовтня 2024р. №1880

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2025 року

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: зразки попелиць, реактиви для виділення ДНК, праймери COI, NSVI, бази даних для ідентифікації, літературні джерела

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Провести аналіз наукових джерел щодо біологічних особливостей попелиць та їх ролі як переносників фітовірусів.
2. Провести морфологічне визначення зразків попелиць, зібраних із сільськогосподарських культур.
3. Знайти праймери гена COI
4. Порівняти результати морфологічної та молекулярної ідентифікації.

Дата видачі завдання 1 вересня 2024 року

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

(підпис)

Оксана ТАРАН

**Завдання прийняв до
виконання**

(підпис)

Анастасія ЯНОВИЧ

РЕФЕРАТ

Робота включає 50 сторінок та складається зі вступу, трьох розділів, висновків. До того ж, вона вміщує 10 рисунків, 1 таблицю, перелік умовних позначень, список використаних джерел та додатки.

Мета дослідження — встановлення видового складу попелиць за допомогою молекулярних маркерів гена COI для ідентифікації потенційно небезпечних векторів фітовірусів у агроценозі.

Завдання дослідження:

1. Провести аналіз наукових джерел щодо біологічних особливостей попелиць та їх ролі як переносників фітовірусів.
2. Узагальнити дані щодо механізмів вірусної трансмісії, сезонності розвитку популяцій попелиць та способів їх ідентифікації.
3. Провести морфологічне визначення зразків попелиць, зібраних із сільськогосподарських культур.
4. Знайти праймери гена COI
5. Порівняти результати морфологічної та молекулярної ідентифікації.

Об'єкт дослідження – попелиці (*Aphididae*), які виступають переносниками вірусів сільськогосподарських культур.

Предмет дослідження – молекулярно-генетичні особливості попелиць (*Aphididae*) як переносників фітовірусів, зокрема маркерні послідовності гена COI, що використовуються для видового визначення.

Результати дослідження:

У ході виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи було проведено порівняльну оцінку морфологічного та молекулярного методів ідентифікації попелиць (*Aphididae*) як переносників вірусів сільськогосподарських культур. Морфологічний аналіз дозволив попередньо ідентифікувати зразки, зібрані з

рослин картоплі, однак він виявився недостатньо точним у випадках схожих або незрілих особин.

Метод молекулярної діагностики на основі ампліфікації гена COI із використанням ПЛР та подальшим секвенуванням забезпечив точне видоведення зразків. За допомогою бази даних NCBI допомагає встановити належність зразків.

Молекулярний підхід виявився значно ефективнішим за точністю та універсальністю, що підтверджує доцільність його використання для моніторингу популяцій попелиць у польових умовах. Додатково підтверджено, що метод є екологічно безпечним і не потребує використання хімічних засобів.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	7
ВСТУП.....	9
Актуальність теми:.....	9
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	11
1.1 Як попелиці впливають на врожайність агрокультур	11
1.2 Морфологічні особливості попелиць	12
1.3 Попелиці – переносники вірусів.....	14
1.4 Встановлення виду за допомогою молекулярних маркерів	17
1.5 Екологічність методу виявлення маркерів попелиць	21
1.6 Переваги мітохондріальних маркерів	22
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	25
2.1 Забір і підготовка до аналізу попелиць	25
2.2 Виділення ДНК.....	26
2.3 Проведення ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції).....	27
2.5 Секвенування ампліфікованих фрагментів.....	29
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	31
3.1 Морфологічна характеристика зразків попелиць <i>Myzus persicae</i>	31
3.2 Якість та концентрація виділеної ДНК 3.3 Праймери для ПЛР для попелиці <i>Myzus persicae</i>	32
3.3 Ампліфікація гена COI методом ПЛР	37
3.4 Біоінформатичний аналіз та визначення видового складу.....	38
3.5 Порівняння результатів морфологічної та молекулярної ідентифікації ...	38
ВИСНОВКИ	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:.....	42
ДОДАТОК А	48

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Alatae — крилата форма попелиць

APL — apical membrane (апикальна мембрана)

Arterae — безкрилі форми попелиць

BL — basal lamina (базальна мембрана)

BLAST — Basic Local Alignment Search Tool (базовий інструмент локального вирівнювання послідовностей)

BLASTn — інструмент для пошуку схожості нуклеотидних послідовностей

bp — base pairs (пари основ)

BPL — basal plasmalemma (базальна плазмалема)

CDS — coding DNA sequence (кодуєча послідовність ДНК)

Chromas — програма для перегляду хроматограм ДНК-секвенування

COI (COX1) — cytochrome c oxidase subunit I (цитохром-с оксидаза субодиниця I)

CTAB — cetyltrimethylammonium bromide (цетилтриметиламоній бромід)

CV — clathrin vesicle (клатринова везикула)

ddNTPs — dideoxynucleoside triphosphates (дидезоксинуклеозидтрифосфати)

DNA barcoding — штрихкодування ДНК (метод ідентифікації видів за генетичними маркерами)

dNTPs — deoxynucleoside triphosphates (дезоксинуклеозидтрифосфати)

FASTA — текстовий формат для представлення нуклеотидних або білкових послідовностей

GC — гуанін-цитозинний вміст (показник вмісту нуклеотидів G і C у послідовності)

Geneious — програмне забезпечення для біоінформатики та аналізу послідовностей

In silico — експеримент або аналіз, проведений за допомогою комп'ютерного моделювання

MEGA — Molecular Evolutionary Genetics Analysis (програмне забезпечення для аналізу еволюційних зв'язків)

MI/HI — midgut/hindgut (середня/задня кишка)

MultAlin — програма для вирівнювання послідовностей

NCBI — National Center for Biotechnology Information (Національний центр біотехнологічної інформації)

OD — optical density (оптична щільність)

PBS — phosphate buffered saline (фосфатно-сольовий буфер)

PCR — polymerase chain reaction (полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР)

Primer3 — онлайн-інструмент для проектування ПЛР-праймерів

SD — salivary duct (слинний канал)

SG — salivary gland (слинна залоза)

T_m — melting temperature (температура плавлення праймера)

T_m — температура плавлення праймера

TV — tubular vesicle (тубулярна везикула)

ДНК — дезоксирибонуклеїнова кислота

МШП — малоцінні швидкозношувані предмети (якщо згадується, інакше прибрати)

ВСТУП

Актуальність теми:

Стабільне виробництво сільськогосподарської продукції потребує і традиційного пильнування за врожаєм, і постійного моніторингу хвороб, які можуть суттєво впливати на врожайність. Найбільш небезпечними для аграрної галузі вважаються вірусні захворювання рослин. Вони стрімко поширюються, особливо в умовах інтенсивного землеробства. В окремих випадках можуть познизити врожайність до 70–80%. Одними з головних переносників фітовірусів є попелиці (*Aphididae*) — дрібні, поліфагові комахи, які завдяки колючо-сисному ротовому апарату легко проникають у провідні тканини рослин і вводять вірус безпосередньо в флоему [1].

Визначення виду попелиці тільки за зовнішніми ознаками не завжди є точним, адже через варіативність форми, сезонні зміни й наявність дуже схожих між собою видів, морфологічна ідентифікація є ускладненою. Саме тому на допомогу приходять молекулярні методи аналізу гена субодиниці I цитохром-оксидази (COI), який міститься в мітохондріях і є молекулярним маркером для розпізнавання видів [3].

У цій роботі застосовано біотехнологічні методи — екстракцію ДНК, дослідження гена COI і аналіз отриманих послідовностей *in silico* – ці методи дозволяють точно визначити видову належність попелиці, навіть якщо вона сильно пошкоджена або перебуває на ранній стадії розвитку.

Зразки були зібрані в польових умовах, а далі проводилась оптимізація методу виділення ДНК з використанням СТАВ-буфера. Також була проведена оцінка якості ДНК, ампліфікація цільового фрагмента гена COI та його секвенування з подальшим біоінформатичним аналізом [4, 5].

Ця кваліфікаційна робота об'єднує як теоретичні знання про біологію попелиць, так і практичні навички молекулярної біології. Отримані результати можуть бути використані для створення бази молекулярних маркерів

попелиць і застосовані в майбутньому для розробки систем раннього виявлення вірусних інфекцій у агроєкосистемах.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Як попелиці впливають на врожайність агрокультур

Попелиці (*Aphididae*) — це одна з найпоширеніших груп шкідників у сільському господарстві. Завдяки невеликому розміру, вони завдають серйозної шкоди культурним рослинам і суттєво впливають на врожайність.



Рис.1.1 Зелена персикова попелиця (*Myzus persicae*) під мікроскопом

Попелиці шкодять агрокультурам кількома способами. По-перше, вони харчуються соками рослин, проколюючи тканини своїм колючо-сисним ротовим апаратом, вони висмоктують поживні речовини з флоєми, як наслідок спричиняє до уповільнення росту, викривлення листків, пожовтіння й навіть в'янення рослин – це безпосередньо впливає на врожай, особливо у фазах активного вегетативного росту [15]. По-друге, попелиці виділяють липку речовину — медв'яну росу, на якій легко розвиваються сажисті гриби, а отже поверхня листків покривається чорним нальотом, який перешкоджає фотосинтезу. В наслідок рослина послаблюється і стає вразливою до інших патогенів [7].

Найбільш небезпечною вважається особливість попелиць — передавати віруси. На сьогодні відомо, що близько 200 видів попелиць є переносниками понад 270 різних рослинних вірусів. При цьому один вид може бути вектором одразу кількох вірусних патогенів. Наприклад, *Myzus persicae* (персикова попелиця) здатна переносити вірус жовтухи турнепсу (TuYV) і картопляної Y-мозаїки (PVY) [1, 12].

Ще один фактор, на який слід звернути увагу, — це сезонність попелиць. Найбільше зростання чисельності популяції відбувається у весняно-літній період (травень–липень), коли погодні умови сприяють активному розмноженню. Попелиці мають дуже короткий життєвий цикл, розмножуються партеногенетично, й за сезон можуть дати десятки поколінь. Через що, у цей час зростає й ризик передачі вірусів, особливо у фазу масової появи крилатих форм, які здатні легко мігрувати на інші ділянки [17].

Через швидке розмноження, швидке розповсюдження і широкий спектр переносимих вірусів, попелиці є важливим об'єктом для біотехнологічного моніторингу в агросфері. Їхнє своєчасне виявлення та точна ідентифікація, зокрема за допомогою молекулярних маркерів, можуть стати важливим кроком вперед у збільшенні врожайності та покращенні фітосанітарного стану полів.

1.2 Морфологічні особливості попелиць

Морфологічні особливості попелиць відіграють ключову роль не лише у взаємодії з рослиною-хазяїном, але й у процесах передачі вірусів фітопатогенам. Попелиці належать до ряду рівнокрилих (Homoptera), родини Aphididae, мають дрібні розміри тіла, нормально не перевищують 1–5 мм. Форма тіла овальна або грушоподібна, м'якотіла, з вираженою сегментацією. Голова у попелиць відносно невелика, містить пару фасеткових очей, а також 1–3 простих вічка (оцели). Хоботок (рострум) три або чотирисегментний, призначений для проколювання тканин рослини та живлення соком з флоєми [5, 13].

Характерною ознакою попелиць є наявність парних сифонів — трубчастих виростів на п'ятому черевному сегменті, які виконують функцію захисту (виділення восковидної або липкої рідини), а також мають значення в міжособинній комунікації. У багатьох видів добре розвинений хвостик (кауда), який допомагає в пересуванні та підтримці тіла.

Морфологічна мінливість серед попелиць є надзвичайно високою і залежить від фази розвитку, сезону, виду рослини-хазяїна та екологічних умов. Наприклад, *Myzus persicae* має характерне зелене або рожеве забарвлення, округле тіло і темні сифонні трубочки. Цей вид є поліфагом, уражує більше 400 видів рослин і часто зустрічається на картоплі, томатах, персику [7, 15]. *Aphis gossypii*, бавовняна попелиця, має дрібніше тіло, забарвлене у жовтуваті або темно-зелені тони, та часто колонізує гарбузові, пасльонові, зокрема томати та баклажани [2]. *Macrosiphum euphorbiae*, або картопляна попелиця, має видовжене тіло, довгі ноги та сифонні трубки, найчастіше паразитує на картоплі, де також виступає вектором *Potato virus Y (PVY)* [17].

Зовнішній вигляд попелиць напряму пов'язаний з їх здатністю передавати віруси — стилет хоботка попелиць дозволяє точно проникати у флоему, де локалізуються фітовіруси, а отже під час живлення комаха може вводити вірус до рослини або, навпаки, інфікуватися сама. Дослідження показують, що структура слинних залоз попелиць також має значення у передачі вірусів — вона забезпечує секрецію ферментів і білків, які полегшують зараження тканин рослини [16].

Попелиці проходять доволі складний життєвий цикл, що включає як безкрилих, так і крилатих форм. Безкрилі форми (*apterae*) переважають у колоніях при стабільних умовах, тоді як крилаті форми (*alatae*) формуються у відповідь на стрес — перенаселення чи виснаження рослини, чи зміни температури. Вони мають добре розвинені передні й задні крила, що дозволяє їм активно розселятися [3].

Саме крилаті форми мають найбільше значення у поширенні вірусів. Завдяки здатності до перельоту на великі відстані вони переносять патогени з інфікованих рослин на здорові, навіть між полями. Крім того, ці форми частіше змінюють рослини-хазяї, що збільшує вірогідність контактів з різними вірусами [13, 15].

Життєвий цикл попелиць включає як партеногенетичне (живонародження) розмноження, так і статеву фазу (зазвичай восени), коли з'являються самці та яйцекладні самки. У тропічних і теплих регіонах цикл може бути цілорічним, у помірних зонах відбувається зимова діпауза у формі яєць. Ці стадії мають вагоме значення в епідеміології вірусів, бо навіть незрілі особини можуть бути носіями вірусів [8].

Морфологічні особливості попелиць, а саме: їх поліфагія, здатність до формування крилатих форм і спеціалізовані ротові органи – створюють ідеальні умови для поширення вірусів рослин. За цих факторів точна видова ідентифікація попелиць, зокрема за допомогою молекулярних методів, є необхідною умовою для фітосанітарного моніторингу та своєчасного реагування на потенційні вірусні спалахи в агроecosистемах.

1.3 Попелиці – переносники вірусів

Попелиці (Aphididae) є одними з найважливіших переносників вірусів рослин, передаючи близько 30% усіх відомих фітовірусів. Їхня ефективність як векторів зумовлена спеціалізованою поведінкою харчування: під час живлення вони досліджують усі тканини рослини — від епідермісу до флоєми та ксилеми, що сприяє захопленню та передачі вірусних частинок [42].

Деякі віруси, такі як огірковий мозаїчний вірус (*Cucumber mosaic virus*, CMV), здатні маніпулювати фізіологією рослини-господаря, змінюючи її запах для приваблення попелиць. Після короткого живлення на інфікованій рослині попелиця переносить вірус на здорові рослини, сприяючи його поширенню [44].

Завдяки своїй здатності до швидкого розмноження, утворення крилатих форм та широкому спектру рослин-господарів, попелиці є ефективними переносниками вірусів, що становить серйозну загрозу для сільського господарства.

На зображенні (Рис.1.2) схематично представлено два основні механізми передачі вірусів рослин попелицями: циркулятивний та нециркулятивний, які суттєво відрізняються за шляхами руху вірусу в тілі комахи, а також за взаємодією з тканинами вектора [16].

У нециркулятивному типі передачі, віріони не проникають усередину тканин попелиці. Вони утримуються зовні, на стилеті або в загальному каналі (common canal) — структурі, що утворюється внаслідок злиття харчового та слинного каналів. Залежно від типу вірусу виділяють дві основні стратегії:

- *capsid strategy* — це вірусна частинка зв'язується напряму з рецепторами на кутикулі стилету, як у випадку *Cuscutoviruses* (чорні частинки);

- *helper strategy* — це вірус прикріплюється опосередковано за допомогою специфічного білка — *helper*-компонента (НС), що характерно для *Potyviruses* (зелені частинки) та *Caulimoviruses* (жовті частинки). Для прикладу, у *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) для зв'язування з рецептором потрібна попередня асоціація віріона з неструктурним вірусним білком (зображеним на схемі як синій трикутник), що забезпечує специфічне розпізнавання рецептора у спільному каналі [16].

У випадку циркулятивної передачі, віруси проникають у клітини середньої (MI) або задньої (HI) кишки вектора через взаємодію з рецепторами на апікальній мембрані (APL). Подальший шлях залежить від типу вірусу:

Rhabdoviruses (червоні частинки) після потрапляння до клітини проходять процес злиття з мембраною, вивільнення генетичного матеріалу та реплікацію. Такий шлях називається циркулятивно-пропагативним.

Luteoviruses (рожеві частинки) та Nanoviruses (зелені частинки) не реплікуються у клітинах кишківника, а просто транспортуються через них за механізмом транзитозитозу — з одного боку клітини на інший без розмноження. Такий механізм класифікується як циркулятивно-недуплікативний [16].

Після проникнення через кишковий епітелій віріони потрапляють у гемолімфу, а звідти до клітин слинної залози (SG). Для цього вони повинні пройти кілька бар'єрів:

- базальну мембрану (BL);
- базальну плазмалему (BPL);
- і, зрештою, проникнути у слинний канал (SD).

Особливо цікавим є механізм транспорту Luteoviruses, який включає участь тубулярних везикул (TV) та клатринових везикул (CV), що забезпечують точкове переміщення віріонів всередині клітини. Для Nanoviruses також передбачається залучення helper-компонента для проникнення у слинну залозу [16].

Ці дані свідчать про високий рівень спеціалізації вірусів до біохімічного та морфологічного середовища векторів, що є однією з причин ефективного переносу фітовірусів попелицями.

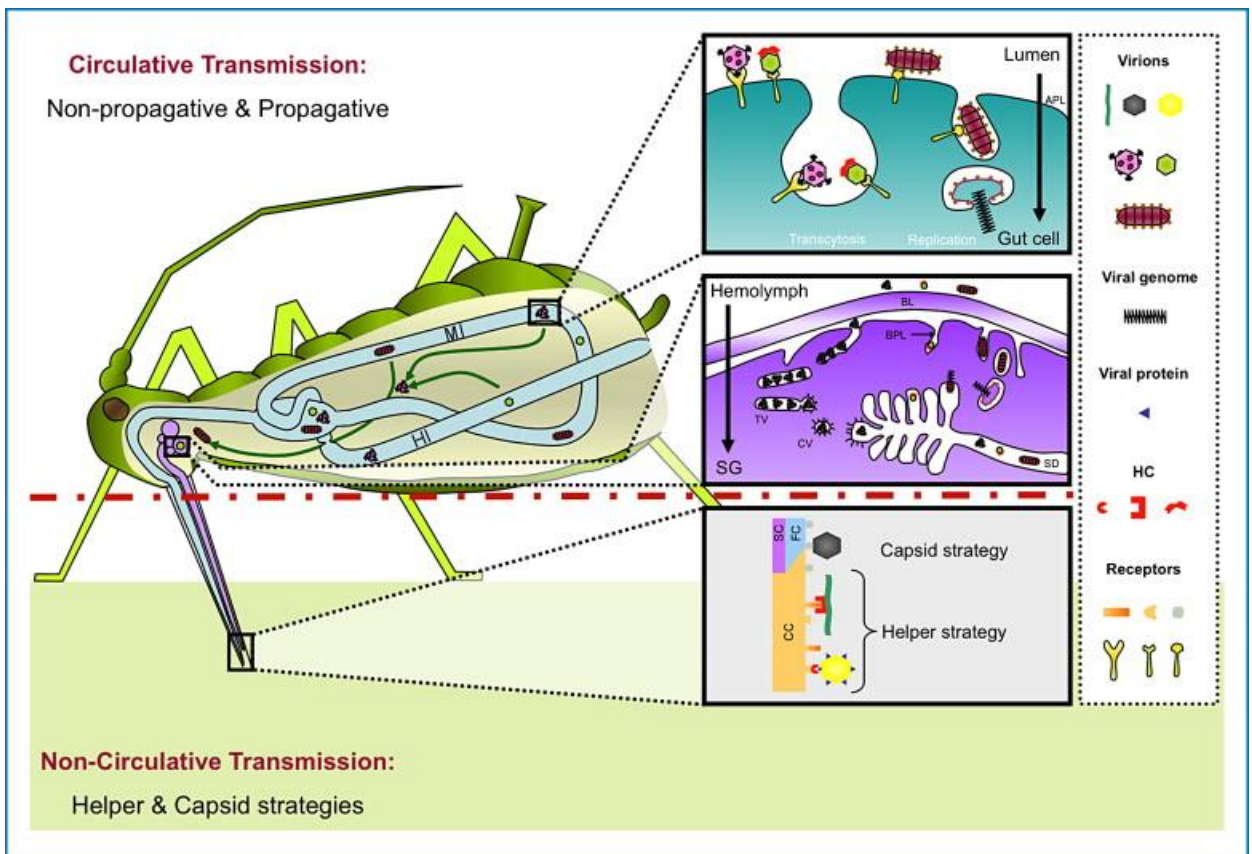


Рис. 1.3 Моделі циркулярного та нециркулярного механізму вірусів у попелиць [42].

1.4 Встановлення виду за допомогою молекулярних маркерів

Історично ген COI (cytochrome c oxidase subunit I), що кодує субодиницю I цитохром-с оксидази, почали активно досліджувати саме на прикладі комах. Ще наприкінці XIX – на початку XX століття Чарльз МакМанн і Девід Кейлін проводили фундаментальні дослідження, під час яких з'ясувалося, що грудні м'язи літаючих комах, зокрема у медоносної бджоли (*Apis mellifera*), містять велику кількість цитохромів і є зручними моделями для вивчення дихальних пігментів [25]. Пізніше ці структури були ідентифіковані як мітохондрії, і встановлено, що концентрація цитохромів у польотних м'язах підвищується на етапі переходу з лялечки у дорослу особину [25, 26]. Це підтверджує важливу роль цитохромів у біологічному окисненні та енергозабезпеченні процесів метаморфозу у комах.

Сьогодні ген COI активно використовується як молекулярний маркер для ідентифікації видів. Завдяки поєднанню високої стабільності всередині виду та достатньої варіативності між видами, цей маркер дозволяє точно розрізнити близькі таксони. Підхід, заснований на аналізі цієї ділянки ДНК, відомий як ДНК-штрихкодування (DNA barcoding), широко використовується в таксономії, біомоніторингу та вивченні біорізноманіття [1, 3, 24].

Згідно з дослідженням Porter та співавт. (2014), “Rapid and accurate taxonomic classification of insect (class Insecta) cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) DNA barcode sequences using a naïve Bayesian classifier” [24].

Традиційні методи визначення виду комах, зокрема попелиць, засновані переважно на морфологічних ознаках але ці методи не завжди точні, особливо коли йдеться про дрібних або криптичних (морфологічно схожих) представників. У такій ситуації сучасна біотехнологія пропонує більш надійний підхід — встановлення видів за допомогою молекулярних маркерів.

Молекулярні маркери — це специфічні ділянки ДНК, які є унікальними або майже унікальними для певного виду або популяції, їх використовують у багатьох напрямках біотехнології: для ідентифікації видів, вивчення генетичної різноманітності, філогенетичних досліджень, а також для виявлення стійких до хвороб або шкідників сортів рослин і збудників хвороб. У випадку з попелицями молекулярні маркери дають можливість визначити вид навіть тоді, коли зразок пошкоджений, молодий або морфологічно неповноцінний.

Одним з найпоширеніших маркерів, що застосовуються для ідентифікації комах – це фрагмент мітохондріального гена цитохром с оксидази субодиниці 1 (COI), використовується в методі, який називається “штрихкодування” ДНК (DNA barcoding). Він зручно застосовується для аналізу, оскільки мітохондріальна ДНК передається по материнській лінії, має відносно стабільну структуру в межах виду, але відрізняється між видами.

Саме завдяки цим властивостям COI дозволяє ефективно відрізнити один вид попелиць від іншого [6, 9].

У лабораторних умовах для аналізу цього гена найчастіше використовують ПЛР (полімеразну ланцюгову реакцію). Це метод, який дозволяє багаторазово копіювати вибрану ділянку ДНК — у конкретному випадку, фрагмент COI. Після ампліфікації отримані продукти аналізують методом електрофорезу або направляють на секвенування, вони з високою точністю (до 99,9%) можуть визначити видову належність зразка, навіть якщо він містить лише залишки ДНК.

Перевагами методу є не лише висока точність, а й відносна швидкість (кілька годин для аналізу одного зразка), невелика кількість потрібного біоматеріалу, а також доступність обладнання: термоциклер для ПЛР, електрофорезна камера, гель-документаційна система. Деякі сучасні лабораторії навіть оснащуються компактними ПЛР-станціями, які можуть використовуватись у польових умовах.

Хоча витрати на проведення молекулярного аналізу вищі, ніж при морфологічному дослідженні, однак інформативність, надійність і об'єктивність результатів роблять ці методи незамінними для точного встановлення видового складу, особливо у випадках, коли йдеться про фітосанітарний контроль або біобезпеку в агросфері.

У дослідженні “Rapid and accurate taxonomic classification of insect (class Insecta) cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) DNA barcode sequences using a naïve Bayesian classifier [24]” для таксономічної класифікації комах використовувався маркер молекулярний маркер cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) ДНК були отримані результати наведені в цитаті.

“Training set composition is summarized in Table 1, with the GenBank-genus and GenBank-family sets being the largest and the GenBank-barcode set being the smallest. A breakdown of the total number of unique taxa at each rank is shown in

Table S2 (Supporting Information). The GenBank-genus and GenBank-family training sets are represented by 27 370 and 46 815 species, respectively. Note that insufficiently identified species were retained in the GenBank-family training set to increase the diversity of insects represented. Approximately 32% of the genera in the GenBank-genus set, 20% of the genera in the GenBank-barcode set and 13% of the families in the GenBank-family set are comprised of singletons (represented by a single sequence; Table S3, Supporting Information). The taxonomic profile for each training set is summarized in Fig. 1 and for each set is dominated by Lepidoptera sequences [24]”.

“Склад навчальних наборів наведено в Таблиці 1, причому набори GenBank-род і GenBank-сімейство є найбільшими, а набір GenBank-штрих-код - найменшим. Розподіл загальної кількості унікальних таксонів кожного рангу наведено в Таблиці S2 (Допоміжна інформація). Навчальні набори GenBank-genus та GenBank-family представлені 27370 та 46815 видами відповідно. Зверніть увагу, що недостатньо ідентифіковані види були залишені в навчальному наборі GenBank-family для збільшення різноманітності представлених комах. Приблизно 32% родів у наборі GenBank-genus, 20% родів у наборі GenBank-barcode і 13% родин у наборі GenBank-family складаються з синглетонів (представлених однією послідовністю; Таблиця S3, допоміжна інформація). Таксономічний профіль для кожного навчального набору показано на рис. 1, і для кожного набору домінують послідовності Lepidoptera [24]”.

Table 1. Composition of three COI insect training sets for the naïve Bayesian classifier

Training set	Trained rank	Number of taxa (all ranks)	Number of sequences
GenBank-genus	Genus	9350	190 333
GenBank-barcode	Genus	3841	92 098
GenBank-family	Family	750	279 130

Рис. 1.4 “Table 1. Composition of three COI insect training sets for the naïve Bayesian classifier [24]”. Таблица 1. Склад трьох навчальних наборів комах ІСП для наївного байєсівського класифікатора [24].

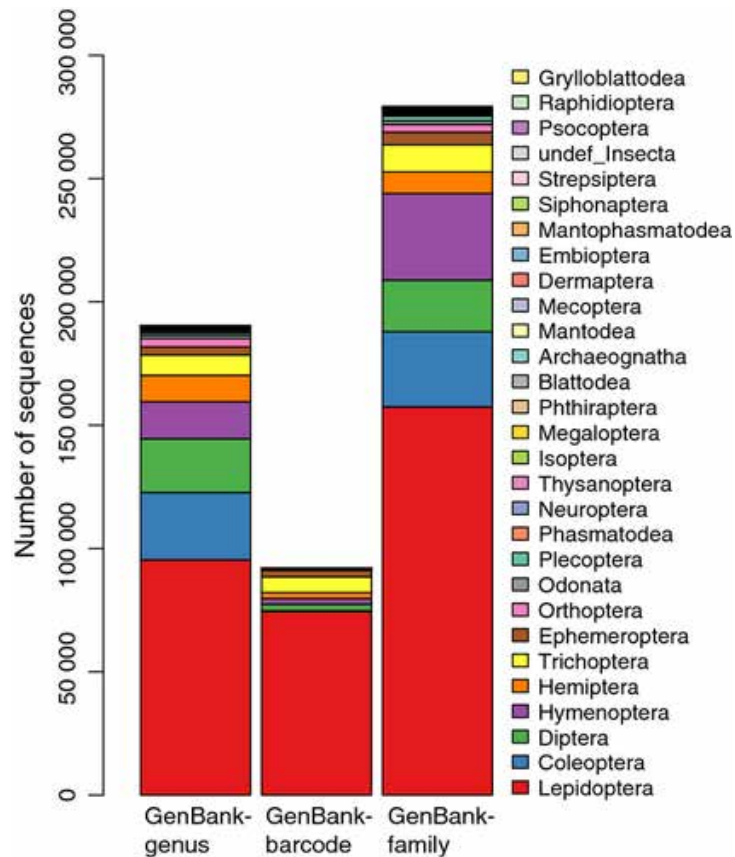


Рис. 1.5 “Figure 1. Taxonomic profiles for three insect COI naïve Bayesian classifier training sets. The height of each coloured bar represents the number of sequences from each insect order in three training sets: GenBank-genus, GenBank-barcode and GenBank-family.[24]”, “Таксономічні профілі для трьох навчальних наборів базисного класифікатора комах, наївних для COI. Висота кожної кольорової смуги відображає кількість послідовностей з кожного ряду комах у трьох навчальних наборах: GenBank-рід, GenBank-штрих-код та GenBank-родина [24]”.

1.5 Екологічність методу виявлення маркерів попелиць

При виявленні попелиць, які є переносниками хвороб, традиційно супроводжується використанням хімічних засобів захисту рослин, а саме пестицидів, для контролю чисельності шкідників, але такі методи мають

низку екологічних недоліків, зокрема забруднення навколишнього середовища, негативний вплив на ґрунтову мікрофлору, зниження чисельності корисних ентомофагів та ризику для здоров'я людини. До того ж, при інтенсивному застосуванні пестицидів виникає резистентність у популяції комах, що ускладнює подальший контроль їх чисельності [1, 12].

На відміну від хімічних методів, молекулярно-генетичні підходи є екологічно безпечними. Вони не потребують використання токсичних речовин у польових умовах і не впливають на структуру агроєкосистем. До того ж, такі методи дозволяють точно і швидко ідентифікувати види попелиць навіть у личинковій стадії або у пошкодженому стані [3, 18]. Метод ПЛР не залишає забруднень у середовищі, оскільки реакції проводяться в лабораторних умовах у невеликих об'ємах, а відходи утилізуються відповідно до стандартів біобезпеки. Також цей метод не вимагає масового відлову комах, що знижує антропогенне навантаження на ентомофауну. За допомогою ДНК-маркерів можливо створити бази даних, які дозволяють ефективно спостерігати векторний склад у різних регіонах, що особливо важливо для прогнозування спалахів вірусних захворювань у сільському господарстві [9, 15].

Отже, використання методів молекулярної ідентифікації маркерів попелиць відповідає принципам сталої біотехнології, знижує екологічні ризики та сприяє точнішому моніторингу шкідників без шкоди довкіллю. З огляду на ці причини, подальший розвиток біотехнологічних методів діагностики у фітосанітарній практиці є актуальним і перспективним напрямом [21].

1.6 Переваги мітохондріальних маркерів

У сучасних біотехнологічних дослідженнях дедалі частіше для ідентифікації видів та побудови філогенетичних дерев використовують саме мітохондріальну ДНК (mtDNA). Це зумовлено її низкою біологічних особливостей, які забезпечують високу ефективність молекулярної

діагностики у широкому колі організмів, зокрема комах. У порівнянні з ядерною ДНК, мітохондріальні маркери демонструють більшу стабільність, чутливість і точність при визначенні навіть близькоспоріднених видів [28].

По-перше, гени мітохондріальної ДНК у комах мають значно вищі темпи еволюції — у 2–9 разів швидші, ніж ядерні білок-кодуючі гени. Завдяки цьому mtDNA ідеально підходить для вивчення внутрішньовидових відмінностей, спорідненості між популяціями та з'ясування систематичного положення видів у межах роду або родини [28, 29, 30, 31].

Другою важливою перевагою є відсутність інтронів у більшості мітохондріальних генів, що полегшує їх ампліфікацію. Для багатьох ділянок mtDNA вже розроблені універсальні ПЛР-праймери, які забезпечують високу специфічність та ефективність навіть у складних зразках [32, 33, 34]. Мітохондріальна ДНК також успадковується материнською лінією і не піддається рекомбінації, що робить її структурно стабільною та зручною для аналізу [35].

Більш того, кожна клітина містить багато копій мітохондрій, що забезпечує достатню кількість ДНК навіть при дослідженні дрібних особин або їхніх частин [9]. Усі копії мітохондріальної ДНК в організмі зазвичай ідентичні через т. зв. “вузьке горлечко популяції”, яке виникає під час передачі мітохондрій від матері до нащадка - забезпечує гомогенність послідовностей, відсутність рекомбінації та високу надійність у філогенетичних реконструкціях [37, 32, 35, 33].

Крім того, саме характер перебудови мітохондріальних генів (наприклад, у розташуванні генів або послідовностях проміжків між ними) дозволяє використовувати ці маркери не лише для видового розпізнавання, але й для глибшого еволюційного аналізу [38, 39]

Не менш важливою перевагою є циркулярна структура мітохондріального геному, яка дозволяє за допомогою стандартних ПЛР-

праймерів ампліфікувати весь геном або великі його фрагменти шляхом перекриття вже відомих ділянок [40].

Усі вищезазначені властивості роблять mtDNA універсальним інструментом для молекулярної ідентифікації комах, зокрема попелиць. Найбільш поширеним маркером є фрагмент гена cytochrome oxidase I (COI), який застосовується у методі DNA barcoding і дає можливість точно визначити видову належність навіть при мінімальній кількості зразкового матеріалу [33, 41].

“Overall, credibility of mitochondrial DNA as a tool for identification and phylogenetic analysis has raised several questions but various studies suggest that this tool is convenient, fast, coherent, and genuine for identification of species when, compared to traditional taxonomical approaches. One can never deny the importance of morphotaxonomy, but in cases of fragmented, forensic, and doubtful specimens, molecular approach proves wonders. At this point, we can conclude that mtDNA tends to unlock mysteries, catalogues voluminous biodiversity, and intensify our efforts to tame and conserve biodiversity [28]”. Відповідно до цитати з роботи Kaur R., Singh D. “Molecular markers a valuable tool for species identification of insects a review” [28], відповідно до цитати зі статті Kaur R., Singh D. “Molecular markers a valuable tool for species identification of insects” [28], таким чином, використання мітохондріальних маркерів, зокрема гена COI, дозволяє ефективно вирішувати задачі фітосанітарного моніторингу, таксономічного аналізу та виявлення хворих особин серед комах, переносників збудників захворювань агрокультур.

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Забір і підготовка до аналізу попелиць

Для проведення лабораторного дослідження з ідентифікації попелиць як переносників вірусів рослин зразки комах збирали з культурних рослин у період вегетації. Збір проводився в ранкові години, коли попелиці малорухливі, що полегшує їх вилучення з рослин. Основна увага приділялася листовим пластинкам, черешкам та верхівковим частинам пагонів, де зазвичай концентруються найбільші колонії попелиць [2, 15]. Зібрані зразки переносили у пластикових пробірках, попередньо промаркованих відповідно до ділянки збору. Для уникнення деградації ДНК та зараження зразків пліснявою чи бактеріями, матеріал одразу після збору фіксували в етанолі концентрацією 70% [17, 18].



Рис.2.1 Пробірки з відібраними попелицями у етанолі 70%

Перед початком ДНК-екстракції попелиці очищали від забруднень: комах промивали у стерильній воді або PBS-розчині, після чого переносили у стерильні пробірки для подальшої обробки. При потребі морфологічна ідентифікація проводилася під стереомікроскопом за наявними визначниками

[3]. Кожна проба маркувалася з дотриманням вимог трасування біологічного матеріалу, що є важливою складовою для подальшого аналізу у базах даних та при повторних дослідженнях [21].

2.2 Виділення ДНК

Виділення ДНК із попелиць здійснювали згідно з адаптованими протоколами молекулярної ентомології, з урахуванням малих розмірів зразків та можливого низького вмісту нуклеїнових кислот у кожній особині, у роботі використовували модифікований метод лужного лізису з подальшим очищенням шляхом осадження етанолом, який показав високу ефективність для комах дрібних розмірів [18].

Перед виділенням кожен зразок попелиці переносили в окрему стерильну 1,5 мл мікропробірку, до якої додавали лізисний буфер (TE-буфер з додаванням протеїнази К). Гомогенізацію комах проводили одноразовими пестиками або за допомогою автоматичного гомогенізатора, щоб забезпечити повне руйнування хітинового покриву. Інкубацію зразків проводили при температурі 56 °C протягом 1–3 годин до завершення розщеплення білків. Після інкубації додавали ізопропанол або етанол для осадження ДНК, з наступним промиванням 70% етанолом. Отриманий осад висушували при кімнатній температурі та ресуспендували у 30–50 мкл стерильного буфера [17, 20].

Якість і концентрацію ДНК оцінювалася за допомогою гель-електрофорезу в агарозному гелі (1,2%) з використанням еталонних маркерів мас. У деяких випадках використовували спектрофотометрію (Nanodrop) для визначення співвідношення абсорбції при 260/280 нм, що свідчить про чистоту ДНК [21]. Для подальшого аналізу відбирали тільки ті зразки, які мали чіткі смуги на гелі та показники чистоти в межах норми (1,7–2,0). Виділену ДНК зберігали при температурі –20 °C до моменту проведення ПЛР.

2.3 Проведення ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції)

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є методом ампліфікації специфічних ділянок ДНК, який ґрунтується на використанні термостабільної ДНК-полімерази, специфічних праймерів та контрольованих температурних циклів. Цей метод дозволяє отримати мільйонні копії фрагмента ДНК навіть з мізерної кількості початкового зразка [4].

ПЛР складається з трьох основних стадій, які циклічно повторюються:

- а) денатурація — нагрівання реакційної суміші до 94–95 °С з метою розриву водневих зв'язків між ланцюгами ДНК;
- б) анелінг (відпал праймерів) — охолодження до температури 50–65 °С, коли праймери приєднуються до комплементарних ділянок;
- в) елонгація — синтез нового ланцюга ДНК ДНК-полімеразою за температури близько 72 °С.

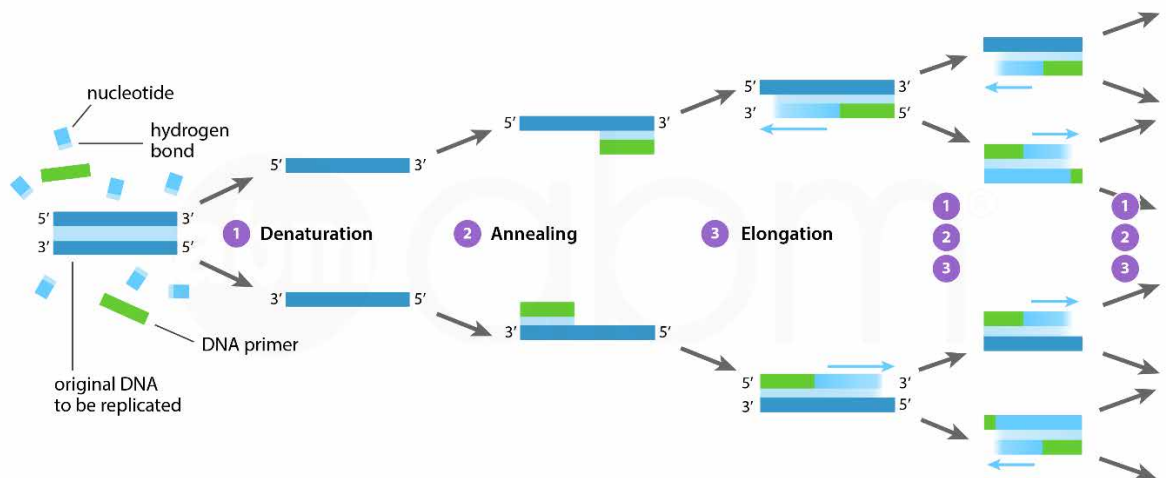


Рис.2.2 Схема принципу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР): етапи денатурації, відпалу (анелінгу) та елонгації ДНК [45].

Ці три етапи повторюються 30–40 разів, що забезпечує експоненціальне накопичення цільового амплікона.

У рамках цього дослідження ПЛР застосовувалась для ампліфікації фрагмента гена cytochrome c oxidase subunit I (COI), який розташований у

мітохондріальній ДНК і широко використовується як молекулярний маркер для видового визначення комах [4, 9]. Його послідовність має достатній рівень консервативності в межах виду і варіабельності між різними видами, що робить COI ідеальним для застосування в систематиці [18].

Крім практичного застосування, вибір цього гена також обґрунтовано з біологічної точки зору. Він кодує ключовий субодиничний компонент комплексу cytochrome c oxidase, що бере участь у формуванні мітохондріального електронно-транспортного ланцюга. Цей комплекс є еволюційно стабільним, але допускає видоспецифічні варіації, що підтверджується даними досліджень Pierron et al. (2012) та Pacelli et al. (2011) [46, 47].

Таким чином, ПЛР стала базовим методом для підтвердження видової належності попелиць у межах молекулярного аналізу, що було необхідним етапом перед проведенням секвенування. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) була проведена з метою ампліфікації фрагменту гена cytochrome c oxidase subunit I (COI), який широко використовується для ідентифікації комах, зокрема попелиць, у межах підходу DNA barcoding [6, 9].

Для ампліфікації використовували праймери:

5'–ACGAGCATATCTTTACATCAGCA–3'

5'–ACTCCGTGTA AACACCACATTTGT–3'

Реакційну суміш готували в об'ємі 25 мкл, яка включала:

12,5 мкл 2× PCR Master Mix (Taq-полімераза, dNTPs, буфер),

0,5 мкл кожного праймера (концентрація 10 мкМ),

1 мкл шаблонної ДНК,

10,5 мкл нуклеазо-вільної води.

ПЛР проводили в термоциклері за наступною програмою [3, 18]:

Початкова денатурація — 95 °С, 2 хв,

35 циклів:

- денатурація — 95 °С, 30 с,
- анелінг (гібридизація праймерів) — 48–52 °С, 40 с,
- елонгація — 72 °С, 1 хв,
- Фінальна елонгація — 72 °С, 5 хв.

Отримані ПЛР-продукти аналізували методом електрофорезу в 1,2% агарозному гелі з використанням стандартного ДНК-маркеру (наприклад, 100 bp ladder) для оцінки розміру ампліфікованого фрагмента. Очікуваний розмір продукту складав приблизно 650 п.н. (base pairs).

Для перевірки якості ампліфікації використовували позитивні та негативні контроли. Негативний контроль (без ДНК) виключав можливість контамінації, а позитивний — дозволяв переконатися у справності реакційних компонентів [21].

Ампліфіковані фрагменти з характерною смугою очікуваної довжини надсилали на секвенування або очищували за допомогою наборів для очищення ПЛР-продуктів, якщо передбачалося подальше використання у біоінформатичному аналізі [4].

2.5 Секвенування ампліфікованих фрагментів

Після успішного проведення ПЛР і перевірки ампліфікації за допомогою електрофорезу, зразки з чітко вираженими смугами відповідного розміру (~650 п.н.) були відібрані для подальшого секвенування. Метою секвенування було визначення нуклеотидної послідовності ампліфікованої ділянки гена COI, що дозволяє провести видову ідентифікацію попелиць методом DNA barcoding [9]. Перед секвенуванням ПЛР-продукти очищували за допомогою комерційного набору для очищення ДНК, що дозволяло видалити залишки праймерів, dNTPs (дезоксинуклеозидтрифосфати) будівельні блоки ДНК, та ферментів, які можуть заважати реакції секвенування [18].

Секвенування проводили за методом Сенгера, який є класичним підходом до визначення послідовності ДНК. Реакція секвенування включала використання одного з праймерів, флуоресцентно мічених дидезоксинуклеотидів (ddNTPs) та ДНК-полімерази. Секвенування виконувалося на автоматичних секвенаторах за стандартним протоколом лабораторії-підрядника. Отримані електроферограми перевіряли на наявність шуму, двозначностей та обрізали фрагменти низької якості вручну або за допомогою програмного забезпечення (Chromas або MEGA). У випадках, коли секвенування проводилось у двох напрямках, прямі та зворотні послідовності вирівнювали та консолідували в консенсус-послідовність [4, 21].

Якісно відредаговані послідовності зберегли у форматі FASTA для подальшого аналізу з використанням онлайн-інструментів, зокрема BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), для порівняння з наявними у базах даних послідовностями і встановлення видів [2, 15].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Морфологічна характеристика зразків попелиць *Myzus persicae*

У результаті польового збору попелиць з різних пасльонових культур (зокрема картоплі) було відібрано 37 особин, які були розподілені на три пробірки відповідно до території. Попереднє визначення виду базувалося на морфологічних ознаках під стереомікроскопом, зокрема на формі тіла, кольорі, довжині сифонів та хвостика (кауди), як це рекомендується в сучасних методичних підходах [17].

Візуально одним з домінуючих видів у зразках виявилася *Myzus persicae* — зелена персикова попелиця. Вона є поліфагом і часто уражує культури родини пасльонових, серед яких особливо поширена на картоплі. Морфологічно цей вид характеризується наступними ознаками:

- тіло видовжено-овальне, м'яке, завдовжки 1,2–2,5 мм;
- забарвлення варіює від світло-зеленого до жовтуватого або рожевого;
- сифонні трубки темні, довгі, циліндричні;
- кауда довга, палецьоподібна;
- антенний туберкул виражений, антени з 6 сегментів;
- очі складні, наявні три вічка (оцели) [1, 15].

Морфологічна мінливість цього виду, особливо за умов різних екологічних факторів, є досить високою. Це ускладнює його визначення виключно за зовнішніми ознаками.

Особливої уваги заслуговує наявність крилатих форм (*alatae*), які мають менші розміри тіла, добре розвинені прозорі крила з характерним жилкуванням, темні сифони та значну міграційну здатність. Крилаті форми попелиць беруть активну участь у перенесенні вірусів на інші рослини-хазяї [2, 13].

Хоботок попелиць, що складається з кількох сегментів, що дозволяє проколувати тканини рослин і досягати соку флоєми, де концентруються фітовіруси – цей механізм живлення є ключовим для ефективної трансмісії вірусів, адже попелиця під час харчування або передає вірус, або сама заражається ним [5].

Розвиток *Myzus persicae* включає кілька стадій: яйце, личинки 1–4 інстару, імаго (безкрила або крилата форма). Найчастіше у зразках були виявлені безкрилі імаго та личинки III–IV віку. Слід зазначити, що навіть личинки можуть бути ефективними переносниками вірусів [23], що обумовлює їхній епідеміологічний потенціал.

Враховуючи це, попереднє морфологічне визначення зібраного матеріалу дозволило зробити припущення щодо домінування *Myzus persicae* у пробірках, що згодом було підтверджено методом ПЛР та секвенуванням. Це підтверджує релевантність морфологічного аналізу на етапі попередньої ідентифікації, однак також вказує на необхідність його доповнення молекулярними підходами [3].

3.2 Якість та концентрація виділеної ДНК

З кожної пробірки було виділено тотальну ДНК методом лужного лізису з наступним осадженням етанолом. Оцінка якості ДНК за допомогою електрофорезу показала наявність чітких смуг у більшості зразків. Концентрація ДНК варіювала від 20 до 70 нг/мкл, що виявилось достатнім для подальшої ампліфікації. Вміст білкових домішок був у межах прийнятних значень (співвідношення $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$).

3.3 Праймери для ПЛР для попелиці *Myzus persicae*

Для проведення ампліфікації гена cytochrome c oxidase subunit I (COI) у попелиці *Myzus persicae* було здійснено підбір специфічних праймерів з використанням молекулярних баз даних та біоінформатичних інструментів. Пошук нуклеотидної послідовності гена здійснювали через платформу NCBI.

У полі пошуку обирали фільтр “Nucleotide”, а далі вводили запити типу “Myzus persicae mitochondrion COI complete sequence”, щоб отримати повну мітохондріальну послідовність із зазначенням потрібного гена. У межах знайденого запису в розділі “FEATURES” потрібно звертати увагу на рядок /product="cytochrome c oxidase subunit I", поруч із яким знаходилася позначка CDS (coding sequence). Саме ця послідовність є цільовим фрагментом для ампліфікації. Її копіювали у форматі FASTA та використовували для подальшого аналізу.

Щоб переконатися у консервативності послідовності серед різних ізолятів *Myzus persicae*, її було проаналізовано за допомогою інструменту BLAST (blastn). Це дозволило виявити подібні послідовності з різних географічних регіонів та скласти набір референсів для багаторазового вирівнювання.

Вирівнювання декількох COI-послідовностей виконували в програмі MultAlin, де будувалась консенсусна послідовність. У процесі вирівнювання визначали поліморфні ділянки (зони нуклеотидних відмінностей), які можуть ускладнювати специфічність зв'язування праймерів, такі ділянки виключали вручну або позначали як небажані для праймер-дизайну.


```

1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
AATAAATGaa TTTTTCaAC TAATCATAAA GATATTGGAA CTTTATATTT TTTATTGGT
ATTGATCAG gTATAATTGG ATCATCACTT AGAATCTTAA TTCGTCTTGA ATTAAGACAA
ATTAATTCaA TTATTAATAA TAATCAATTA TATAATGTTA TTGTTACAAT TCACGCTTTT
ATTATAATTT TTTTATAAAC AATACCAATT GTTATTGGTG GATTTGGAAA TTGGTTAATT
CCTATAATAA TAGGATGTCC TGATATATCT TTCCCACGAT TAAATAACAT TAGATTCTCa
TTATTACCAC CCTCATTAAT AATAATAATT TGTAGTTTTT TAATTAATAA TGGAACAGGA
ACAGGATGaa CTATTTACCC ACCCTTATCA AATAATATTG CACATAATAA TATTTCACTT
GATTTAACTA TTTTTCATT ACATTTAGCA GGAATTCAT CAATTTTAGG AGCAATTAAT
TTTATTGGTA CAATCTTAAA TATAATACCA AACAATATAA AATTAACCA AATCCSTTTA
TTTCCATGat CAATTTAAT TACAGCTATT TTATTAATTT TATCTTTACC TGTTCTAGCA
GGTGCTATTA CAATATTATT AACTGATCGT AATTTAAATA CTTCAATTTT TGACCCAGCA
GGGGGAGGTG ACCCAATCTT GTATCAACAT TTATTTGat TTTTGGTCA TCCTGAAGTA
TATATTTTAA TTTTACCAGG ATTTGGTTTA ATTTCTCATA TTATTAGACA AGAAAGAAAT
AAAAATGAAA CATTTGGAAA TATTAGAATA ATTTATGCTA TATTAACAT TGGATTATTA
GAAATTTATG TATGAGCTCa TCATATATTT ACAATTGGTA TAGATGTGGA TACAGGACA
TACTTTACAT CAGCAACAAT AATTATTGCT ATTCCAACAG GAATTAATAA TTTTAGATGa
TTAGCTACAA TTTATGGGTC TAAAATTAAT TTTTCACCTT CAACAATTTG ATCATTAGGA
TTTATTTTTT TATTACAAT TGGTGGTTTA ACAGGAGTTA TTCTTGCTAA TTCATCTATT
GATATTATTC TTCATGATAC TACTATGTA GTAGCCCAT TCCATTATGT ATTATCAATA
GGAATTTGAT TCGCAATTAT TGCTAGATTA ATTCATGat TTCCAATTT TACAGGATTC
TCTATAAATA ATTTATTTT AAAAATTCaA TTTATCTTTA TATTTATTGG AGTTAATTTA
ACATTTTCC CTCAACACTT TTTAGGTTTA AATGGTATGC CAGCAGATA TACAGATTAC
CCTAATAATT TTTTATTATG GAATATAATT TCTTCAATTG GATCAATAAT TTCAACATTT
AGTATTATTA TTTAATTTA TTTCAATTTGa AACAGAATTT TTTAAAAA AACTACAATT
TTAAATTA ATTTAAGTAA TTCTATTGAA TGAATCCATA ATTTACCTCC TTTAGAACAC
TCATATTCAG AATlaccttt aattattaat t

```

9,1 66,6 300,1 369,1 549,1 699,1 855,1 960,1 1011,1 1179,1 1410,1 1473,1
|1514,18

Рис. 3.2 Консенсусна послідовність COI та порашовані для випалювання поліморфні ділянки

ADDITIONAL OLIGOS

	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin	seq
1 LEFT PRIMER	894	22	57.88	40.91	0.00	0.00	0.00	ACGAGCATACTTTACATCAGCA
RIGHT PRIMER	1058	23	58.46	39.13	4.43	0.00	0.00	ACTCCTGTAAACCACCAATTGT
PRODUCT SIZE: 165, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
2 LEFT PRIMER	1036	23	58.46	39.13	10.83	0.00	0.00	ACAATTGGTGGTTTAAACAGGAGT
RIGHT PRIMER	1315	22	58.50	50.00	0.00	0.00	0.00	CTGTATATCGTCGTGGCATAAC
PRODUCT SIZE: 280, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
3 LEFT PRIMER	896	23	57.20	39.13	0.00	0.00	0.00	GAGCATACTTTACATCAGCAACA
RIGHT PRIMER	1321	23	58.84	47.83	0.00	0.00	0.00	GGTAATCTGTATATCGTCGTGGC
PRODUCT SIZE: 426, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								
4 LEFT PRIMER	256	23	57.53	43.48	13.79	0.00	0.00	TGTCTGATATATCTTTCCCACG
RIGHT PRIMER	917	23	58.17	43.48	0.00	0.00	0.00	GTTGCTGATGAAAGTATGCTCG
PRODUCT SIZE: 662, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00								

Рис. 3.3 Результатами підбору праймерів у програмі Primer3

Табл. 2.1

Основні параметри, які характеризують кожен праймер

Позначка	Назва	Пояснення
----------	-------	-----------

start	Початок	Нуклеотидна позиція, з якої починається праймер на послідовності (відлік із 1).
len	Length	Довжина праймера в нуклеотидах. Оптимально: 18–25 нуклеотидів.
tm	Melting temperature	Температура плавлення (Tm) — температура, при якій 50% праймерів від'єднується від ДНК-матриці. Рекомендовано: 55–65 °С.
gc%	GC вміст	Відсоток гуаніну (G) та цитозину (C) у праймері. Впливає на міцність зв'язування (оптимально 40–60%).
any_th	Any complementarity	Оцінка самокомплементарності праймера (його здатність утворювати димери з іншим праймером або з собою). Чим менше — тим краще (оптимально < 8).
3'_th	3'-end complementarity	Комплементарність на 3'-кінці праймера, що найбільше впливає на утворення неспецифічних димерів. Має бути дуже низькою (ідеально — 0.00).
hairpin	Hairpin structure	Чи може праймер утворювати шпилькову структуру (вторинну структуру всередині себе). Високе значення небажане.
seq	Sequence	Нуклеотидна послідовність праймера (від 5' до 3').

Найкращим для використання у ПЛР серед представлених варіантів є пара праймерів №1, з такими перевагами: Найменша довжина амплікона — 165 п.н., що знижує ймовірність неспецифічної ампліфікації. Температура плавлення (Tm) обох праймерів — близька (57.88 °С та 58.46 °С), що

забезпечує ефективне зв'язування. Низька кількість неспецифічних зв'язувань (Any_TH) — 0.00 та 4.43, що в межах допустимого. Відсутність шпильок та димерів (Hairpin = 0.00).

Додатково перевірку вже запропонованих або класичних праймерів виконували в програмі Geneious. Імпортували послідовність, у вкладці “Primers” обирали “Test with Existing Primers”, вставляли праймери й аналізували їхню здатність приєднуватися до вибраної ділянки. Також перевіряли відсутність вторинних структур (димерів, шпильок) та наявність неспецифічного зв'язування.

3.3 Ампліфікація гена COI методом ПЛР

Для проведення молекулярної ідентифікації видового складу попелиць використовували ампліфікацію фрагмента гена cytochrome c oxidase subunit I (COI) — молекулярного маркера, що широко застосовується у систематиці комах у рамках підходу DNA barcoding [6, 9]. Попередньо підібрані праймери (ACGAGCATATCTTTACATCAGCA — прямий та ACTCCGTGTA AACACACATTTGT — зворотний) були оптимізовані у програмі Primer3, з урахуванням параметрів температури плавлення, вмісту GC, відсутності шпильок і димерів.

ПЛР проводили у 25 мкл реакційної суміші, до складу якої входили:

- 12,5 мкл 2× PCR Master Mix (Taq полімераза, буфер, dNTPs),
- 0,5 мкл кожного праймера (10 мкМ),
- 1 мкл шаблонної ДНК,
- 10,5 мкл нуклеазо-вільної води.

Програма ПЛР включала:

- початкову денатурацію — 95 °C протягом 2 хвилин;
- 35 циклів:
- денатурація — 95 °C, 30 секунд,

- анелінг — 50 °С, 40 секунд,
- елонгація — 72 °С, 1 хвилина;
- фінальну елонгацію — 72 °С, 5 хвилин.

Для візуалізації ампліфікованих продуктів проводили електрофорез у 1,2% агарозному гелі з еталонним ДНК-маркером 100 bp ladder. У більшості зразків на гелі спостерігали чітко виражену смугу довжиною приблизно 650 пар основ, що відповідало очікуваному розміру СОІ-фрагмента. У декількох зразках, зокрема з першої пробірки, ПЛР-продукти були слабо виражені або ледь помітні. Це могло бути зумовлено низькою концентрацією або частковою деградацією ДНК, що, своєю чергою, пояснюється меншою кількістю особин у пробі, або тривалим зберіганням зразків у неналежних умовах [17, 20].

Для підвищення точності результатів у реакцію також включали негативний контроль (без ДНК) для виключення контамінації, а також позитивний контроль, які підтверджували правильність функціонування праймерів і реакційної суміші.

3.4 Біоінформатичний аналіз та визначення видового складу

Отримані послідовності були проаналізовані за допомогою BLAST на сайті NCBI. *Muzus persicae* — виявлена в зразках пробірок (ідентичність 99,7–100%). Цей вид підтверджений у літературі як основний переносник вірусів картоплі та інших пасльонових культур, зокрема *Potato virus Y* (PVY), *Potato leafroll virus* (PLRV) та *Cucumber mosaic virus* (CMV) [1, 2, 3, 15, 17].

3.5 Порівняння результатів морфологічної та молекулярної ідентифікації

Проведене дослідження дозволило порівняти ефективність двох підходів до ідентифікації попелиць — морфологічного та молекулярного. На етапі попереднього визначення зразків використовувалась стереомікроскопія з аналізом характерних морфологічних ознак, таких як форма тіла, довжина

сифонів, забарвлення, довжина кауди та антен, що відповідає загальноприйнятим ентомологічним критеріям [17].

Попередній аналіз дозволив припустити, що основним видом у зразках є *Muzus persicae* — зелена персикова попелиця, яка є відомим переносником великої кількості фітовірусів, зокрема PVY, TuYV, PLRV [1, 2, 23]. Однак під час морфологічної ідентифікації спостерігалися труднощі з розрізненням деяких особин, особливо в молодих стадіях або при нехарактерному забарвленні, що узгоджується з літературними даними про високу мінливість морфологічних ознак у цього виду [3, 8].

На відміну від цього, молекулярна ідентифікація за допомогою ампліфікації гена COI методом ПЛР із подальшим секвенуванням дала змогу з високою точністю підтвердити видову належність. Аналіз послідовностей методом BLAST на платформі NCBI показав 99,7–100% відповідність з *Muzus persicae* [6; 9]. Навіть у зразках, де морфологічна ідентифікація була ускладнена (наприклад, пошкоджені або личинкові форми), ДНК-аналіз дозволив точно встановити вид.

Отже, морфологічний метод ідентифікації має свої переваги — швидкість, низьку вартість, доступність. Але його точність суттєво знижується при роботі з криптичними видами, незрілими особинами або при обмеженій кількості діагностичних ознак. Натомість молекулярні методи, зокрема ПЛР та секвенування COI-маркеру, є більш надійними, специфічними та застосовними до широкого спектру зразків, навіть у складних польових умовах [4, 18].

У рамках фітосанітарного моніторингу та для підвищення точності виявлення вірусних векторів доцільно поєднувати обидва підходи: використовувати морфологічне визначення як первинний етап скринінгу, а молекулярне — для підтвердження результатів або у складних випадках [5, 20].

ВИСНОВКИ

1. У результаті літературного огляду було встановлене, що попелиці найбільші переносники фітовірусів у агроєкосистемах, адже здатні передавати понад 270 типів вірусів сільськогосподарським культурам, зокрема картоплі. Морфологічні особливості ротового апарату попелиць, їх висока швидкість розмноження та здатність до міграції сприяють ефективному вірусному зараженню.
2. Традиційна, морфологічна ідентифікація попелиць обмежена, через наявність криптичних видів, молодих або пошкоджених особин. Визначення за морфологічними ознаками потребує високої кваліфікації та часто не дозволяє достовірно встановити вид.
3. Проведено екстракцію ДНК з особин попелиць методом із використанням СТАВ-буфера, що дозволило отримати якісний генетичний матеріал, придатний для подальшого ПЛР-аналізу. Ампліфікація гена COI продемонструвала успішне виділення фрагменту, придатного для секвенування.
4. Молекулярна ідентифікація дозволила з високою точністю встановити видовий склад зібраних зразків попелиць. Послідовності, отримані в результаті секвенування, були проаналізовані з використанням бази NCBI (BLAST) і виявили високу відповідність з *Myzus persicae* — одним із найпоширеніших вірусоносіїв.
5. Порівняння морфологічного та молекулярного методів вирізнило вищу специфічність, точність і об'єктивність молекулярного методу. Використання ПЛР-аналізу для виявлення молекулярних маркерів є екологічно безпечним, неінвазивним методом, який дозволяє проводити ранній фітосанітарний моніторинг без використання хімічних засобів.

Запропонований підхід може бути інтегрований у систему моніторингу сільськогосподарських угідь для оперативного виявлення потенційно небезпечних переносників вірусів, що дозволить зменшити залежність від

інсектицидів і впровадити більш екологічно обґрунтовані методи захисту рослин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Ahmed M., Hameed A., Aslam M. Insect vectors and plant virus disease management // American Journal of Plant Sciences. 2015. Vol. 6. P. 1136–1142. DOI: 10.4236/ajps.2015.68117 URL: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=59151>
2. Ahmed M., Ibrahim I., Tariq R., Hassan S. Impact of aphid-transmitted viruses and their vectors on wheat production: current status and management strategies // Agronomy. 2024. Vol. 14(6). Article 1093. DOI: 10.3390/agronomy14061093
3. Barbagallo S., Cocuzza G.E.M. Description of a new Myzocallis (Hemiptera: Aphididae) and DNA barcoding of allied species // Zootaxa. 2022. Vol. 5183. P. 187–202. DOI: 10.11646/zootaxa.5183.1.15.
4. Vaxevanis A.D. DNA Barcoding // Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Springer. URL: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/3-540-29623-9_2800 (дата звернення: 1.05.2025).
5. Fereres A., Raccach B. Plant virus transmission by insects // Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd, 2015. DOI: 10.1002/9780470015902.a0026837.
6. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1994. Vol. 3(5). P. 294–299. URL: <https://www.researchgate.net/publication/15316743>
7. Freeman A.J., Bishop A.L., Tyrrell R., Charles J.G. Insects as transport devices of plant viruses // Journal of Plant Protection Research. 2020. Vol. 60(2). P. 123–134. DOI: 10.24425/jppr.2020.133943 URL: <https://www.researchgate.net/publication/341705147>

8. Gupta A., Saini D., Thomas G., Ramasamy R. Identification of aphid species using machine learning and image analysis: a precision entomology approach // *Current Research in Insect Science*. 2023. Vol. 3. Article 100102. DOI: 10.1016/j.cris.2023.100102
9. Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003. Vol. 270. Suppl. 1. P. S96–S99. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025
10. Klingler J. et al. Aphid resistance in *Medicago truncatula* involves antixenosis and phloem-specific, inducible antibiosis: Plant resistance to aphids // *Parasites & Vectors*. 2017. Vol. 10, Article 29. DOI: [10.1186/s13071-017-2457-1](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2457-1).
11. Kumar S., Joshi M., Pal P., et al. Identification and development of markers linked to aphid resistance in apple // *Journal of Applied Entomology*. 2013. Vol. 137(3). P. 219–226. DOI: [10.1111/jen.12028](https://doi.org/10.1111/jen.12028)
12. Luo K., Zhao H., Wang X., Kang Z. Prevalent pest management strategies for grain aphids: opportunities and challenges // *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. Article 790919. DOI: 10.3389/fpls.2021.790919
13. Ng J.C.K., Falk B.W. Virus–vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses // *Annual Review of Phytopathology*. 2006. Vol. 44. P. 183–212. DOI: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325
14. NOAA. DNA Barcoding // NOAA Ocean Explorer – Seamounts Expedition. 2024. URL: <https://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/24skq-ak-seamounts/features/dna-barcoding.html> (дата звернення: 1.05.2025).
15. Przybylska A., Grochowska M., Kamasa J. Occurrence and diversity of aphid vectors of plant viruses in agroecosystems // *Insects*. 2024. Vol. 15(12), 935. DOI: 10.3390/insects15120935

16. Sauvion N., et al. Aphid-plant interactions: The role of aphid saliva in plant virus transmission // *Comptes Rendus Biologies*. 2010. Vol. 333(6–7). P. 516–523. DOI: 10.1016/j.crv.2010.04.002
17. Sridhar J., Singh A., Sharma A., et al. Mapping of aphid species associated with potato in India using morphological and molecular taxonomic approaches // *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2018. Vol. 6(3). P. 1001–1006. URL: <https://www.researchgate.net/publication/325842160>
18. Suganthi M. et al. A method for DNA extraction and molecular identification of Aphids // *MethodsX*. 2023. Vol. 10. Article 102100. DOI: 10.1016/j.mex.2023.102100.
19. Таран О. П., Міщенко Л. Т., Орловська Г. М., Чумак В. О. Видовий склад вірусів і векторне навантаження в оцінці фітосанітарного стану насаджень картоплі // *Наукові доповіді НУБіП України*. 2015. № 5. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2015_5_3
20. Янович А.І., Таран О.П. Оптимізація виділення ДНК із зразків попелиць (Aphididae) для виявлення видів-векторів рослинних вірусів // *Матеріали студентської конференції НУБіП України*. Київ: НУБіП, 2025. С. 42–45.
21. Попов В.М., Лиманська С.В., Чернищенко Г.Є., Тереняк Ю.М. Основи біоінформатики : навч. посіб. / Міністерство освіти і науки України, Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва, Випробувальна лабораторія ТОВ “Агроген Ново”. – Харків : ХНАУ, 2021. – 108 с.
22. The FANTOM Consortium and the RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team. CDS annotation in full-length cDNA sequence. *Genome Research*. 2003;13(6b):1478–1487. doi:10.1101/gr.1067403.
23. Dedryver C.-A., Le Ralec A., Fabre F. Aphids and their transmitted viruses in seed potato production. *Insects*. 2019. Vol. 10, No. 12. Article 435. DOI: 10.3390/insects10120435.

24. Porter T.M., Gibson J.F., Shokralla S., Baird D.J., Golding G.B., Hajibabaei M. Rapid and accurate taxonomic classification of insect (class Insecta) cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) DNA barcode sequences using a naïve Bayesian classifier // *Molecular Ecology Resources*. 2014. Vol. 14. P. 929–942. DOI: 10.1111/1755-0998.12240
25. Keilin D. 1925 On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants *Proc. R. Soc. Lond. B*. 98:312–339 URL: <http://doi.org/10.1098/rspb.1925.0039>
26. WATANABE MI, WILLIAMS CM. Mitochondria in the flight muscles of insects. I. Chemical composition and enzymatic content. *J Gen Physiol*. 1951 May;34(5):675-89. DOI: 10.1085/jgp.34.5.675.
27. Clarke L.J., Soubrier J., Weyrich L.S., Cooper A. Environmental metabarcodes for insects: in silico PCR reveals potential for taxonomic bias // *Molecular Ecology Resources*. 2014. Accepted article. DOI: 10.1111/1755-0998.12265.
28. Kaur R., Singh D. Molecular markers a valuable tool for species identification of insects: a review // *Annals of Entomology*. 2020. Vol. 38(1–2). P. 1–9.
29. Brown W.M., George M., Wilson A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1979. Vol. 76(4). P. 1967–1971. DOI: 10.1073/pnas.76.4.1967.
30. Monteiro A., Pierce N.E. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1 α gene sequences // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2001. Vol. 18(2). P. 264–281.
31. Lin C.P., Danforth B.N. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004. Vol. 30(3). P. 686–702.
32. Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a

- compilation of conserved PCR primers // *Annals of the Entomological Society of America*. 1994. Vol. 87(6). P. 651–701.
33. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003. Vol. 270(1512). P. 313–321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.
 34. Xu S., Xie C., Li S., Tan M. DNA barcoding of economically important aphid species in China // *Journal of Economic Entomology*. 2012. Vol. 105(5). P. 1771–1778. DOI: 10.1603/EC12052.
 35. Harrison R.G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology // *Trends in Ecology and Evolution*. 1989. Vol. 4(1). P. 6–11.
 36. Holland M.M., Parsons T.J. Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework // *Forensic Science Review*. 1999. Vol. 11(1). P. 21–50.
 37. Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics // *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1987. Vol. 18. P. 489–522.
 38. Boore J.L. Animal mitochondrial genomes // *Nucleic Acids Research*. 1999. Vol. 27(8). P. 1767–1780. DOI: 10.1093/nar/27.8.1767.
 39. Larget B., Simon D.L., Kadane J.B., Sweet D. A Bayesian analysis of metazoan mitochondrial genome arrangements // *Molecular Biology and Evolution*. 2002. Vol. 19(7). P. 1106–1113.
 40. Cameron S.L., Lambkin C.L., Barker S.C., Whiting M.F. A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision // *Systematic Entomology*. 2007. Vol. 32(1). P. 40–59.

41. Rebijith K.B., Asokan R., Krishna Kumar N.K., Krishna V., Ramamurthy V.V. DNA barcoding of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) from India // *Genome*. 2012. Vol. 55(4). P. 294–305.
42. Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E., & Blanc, S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes Rendus Biologies*, 333(6-7), 524–538. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.03.003>
43. Ng, J. C. K., & Perry, K. L. (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology*, 5(5), 505–511. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x>
44. Mauck, K. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2010). Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3600–3605. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907191107>
45. АВМ. Polymerase Chain Reaction (PCR) – Introduction [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://info.abmgood.com/polymerase-chain-reaction-pcr-introduction> – Назва з екрана. – Дата звернення: 1.05.2025.
46. Pierron D., Wildman D.E., Hüttemann M. et al. Cytochrome c oxidase: Evolution of control via nuclear subunit addition // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2012. Vol. 1817(4). P. 582–590. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.08.009.
47. Pacelli C., Latorre D., Cocco T. et al. Tight control of mitochondrial membrane potential by cytochrome c oxidase // *Mitochondrion*. 2011. Vol. 11(2). P. 334–341. DOI: 10.1016/j.mito.2010.11.008.

ДОДАТОК А

індукують ендогенний синтез регуляторів росту. Проведене оцінювання ростових характеристик трансформованих кореневих ліній в умовах *in vitro* виявило високий рівень накопичення біомаси, що є важливою передумовою для подальшої оптимізації культивування [1].

Проведена *A. rhizogenes*-опосередкована трансформація *Salvia officinalis L.* є перспективною біотехнологічною стратегією для створення стабільних продуцентів цінних біологічно активних сполук – ефірних олій, фенольних кислот, флавоноїдів, терпенів. Це відкриває можливості для використання отриманих культур як альтернативного джерела стандартизованої сировини для фармацевтичної, косметичної та харчової промисловості. Крім того, створена трансформована система може бути застосована для вивчення регуляції експресії метаболічних генів та глибшого розуміння біосинтетичних шляхів у лікарських рослин.

Таким чином, результати дослідження є вагомим внеском у розвиток прикладної рослинної біотехнології та підтверджують доцільність застосування генетичної трансформації за допомогою *A. rhizogenes* для створення нових високопродуктивних біоінженерних систем на основі *Salvia officinalis L.*

Список використаних джерел

1. Effects of various *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analyses of primary and secondary metabolites in *Ocimum basilicum*/ R. Sathasivam et al. *Frontiers*. 13th ed. 2022. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.983776/full>

УДК 577.29. 578.427

ОПТИМІЗАЦІЯ ВИДІЛЕННЯ ДНК ІЗ ЗРАЗКІВ ПОПЕЛИЦЬ *APHIDIDAE* ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ВИДІВ-ВЕКТОРІВ РОСЛИННИХ ВІРУСІВ

Янович А.І., студентка 4 курсу, факультет захисту рослин, біотехнології та екології

Таран О.П., кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Віруси рослин є природною частиною екосистем і їх вплив на формування ценозів ще недостатньо вивчений. Розуміння розповсюдження та контролю вірусних захворювань рослин вимагає дослідження переносника та його поведінки. Важливим питанням є поширення вірусів за допомогою векторів, зокрема, таких, як комахи. Найбільш успішними в передачі вірусів рослин є попелиці і це пов'язано з їх особливостями. Найперше, це поліфагова природа деяких видів попелиць, наприклад, *Myzus persicae*, що дозволяє їм

харчуватися широким спектром рослин-хазяїв. Це важливо для розповсюдження вірусів, які інфікують велику кількість видів рослин. Партеногенетичне розмноження сприяє швидкому відтворенню значної кількості потомства, і проколюючий ротовий апарат - стилет, який здатний пробивати стінки клітин рослин і доставляти віруси в клітину-хазяїна, роблять попелиць потужним вектором вірусів [1]. Всього в Україні відомо 757 видів попелиць, а тільки для зони Українських Карпат зареєстровано 424 види [2].

Сучасні дослідження взаємин залучених видів використовують молекулярно-біологічні методи для встановлення залежності між рослиною-хазяїном, комахо-переносником та вірусами, які вона передає. Так, було показано, що вектор-комаха і вірус співпрацюють у боротьбі або униканні механізмів захисту рослини-хазяїна. Крім того, виявлені симбіотичні зв'язки між попелицями і їх мікробіомом, які здатні впливати на фізіологію попелиць, що змінює фенотипи, важливі для передачі вірусів рослин, наприклад, збільшення крилатих особин та/або зниження плодючості на користь крилатого покоління. Останнє, як відомо, дає можливість розселенню популяції попелиць в ценозі [3]. Вияснення ключових моментів у такій складній екологічній системі, якою є комаха-вектор - рослина-хазяїн та рослинний вірус, має на меті розробку дієвих методів контролю, перспективних для практичного застосування у захисті культур від вірусних інфекцій. Важливою проблемою у практичному захисті культур є встановлення видового різноманіття попелиць та виявлення видів, що є активними векторами вірусів конкретної культури [4].

Широкі дослідження систематики безхребетних на сучасному етапі пов'язані із геном субодиниці I (COI) мітохондріальної цитохром-оксидази, тому що він є одним із найбільш консервативних генів, що кодують білки, у мітохондріальному геномі тварин [5,6]. Метою дослідження була оптимізація одержання ДНК крилатих форм попелиць для наступного секвенування та дослідження наявності у зібраних зразках відповідних видів попелиць. Дорослих попелиць збирали за допомогою пасток Мьоріке у польових умовах на насадженнях насінневої картоплі та зберігали в 70% етанолі. Етанол додавали, щоб уникнути бактеріального або грибного забруднення ДНК під час її виділення. Пробірки зберігали при 4 °C до подальших досліджень. Кожен зразок попелиці поміщали в стерильну пробірку Eppendorf об'ємом 1,5 мл і 600 мкл лізуючого буферу, що містив СТАВ (цетилтриметиламонію бромід). Зразок гомогенізували за допомогою стерильного товкачика.

Процедури екстракції включали відділення білків, осадження та очищення ДНК. Потім екстраговану ДНК зберігали при -20°C для подальших досліджень. Валідацію одержаної ДНК проводили в 1% агарозному гелі, що містив бромистий етидій (EtBr), і візуалізували під УФ-транслюмінатором. Були одержані чіткі смуги ДНК на 1% агарозному

гелі, отже оцінка цілісності геномної ДНК показала, що під час процесу виділення не відбулося розкладання ДНК. Спектрофотометричний аналіз встановив, що співвідношення A260/A280 було більше 1,8, а адсорбція зразка при 260/230 нм становила 2,0, що свідчило про відсутність контамінації зразка ДНК. Таким чином, була проведена оптимізація виділення ДНК із зразків попелиць. Наступні дослідження необхідні для розробки праймерів до послідовності гену субодиниці I (COI) мітохондріальної цитохром-оксидази, які дадуть можливість ідентифікувати види попелиць та визначити їх належність до вірофорних видів.

Список використаних джерел

1. Luo K., Zhao H., Wang X., Kang Z. (2022) Prevalent pest management strategies for grain aphids: opportunities and challenges. *Front. Plant. Sci.* doi: 10.3389/fpls.2021.790919.
2. Zhebina T. (2024). On the fauna of aphids (Hemiptera Aphidoidea: Aphididae) of the Uzhanskyi National Nature Park and its vicinity (Transcarpathia, Ukraine). *Науковий вісник Ужгородського університету Серія Біологія*, вип. 57: 27–32 <https://doi.org/10.32782/1998-6475.2024.57.27-32>
3. Pinheiro, P.V., Zheng, Y., Xu, Y., Kramer, M., Fei, Z., Dos Silva, R.S., Gray, S., Giovannoni, J., Wilson, J.R., Rebelo, A.R., Xu, Y., Heck, M., Kruse, A., & Fattah-Hosseini, S. (2019). Plant Viruses Transmitted in Two Different Modes Produce Differing Effects on Small RNA-Mediated Processes in Their Aphid Vector. *Phytobiomes Journal*, 3(1), 71–81. <https://doi.org/10.1094/pbiomes-10-18-0045-r>
4. Таран О.П., Міщенко Л.Т., Орловська Г.М., Чумак В.О. (2015). Видовий склад вірусів і векторне навантаження в оцінці фітосанітарного стану насаджень картоплі. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. - № 5. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2015_5_3
5. Suganthi M., Abirami G., Jayanthi M., Kumar K.A., Karuppanan K., Palanisamy S. (2023). A method for DNA extraction and molecular identification of Aphids. *MethodsX*. 10:102100. doi: 10.1016/j.mex.2023.102100.
6. Barbagallo, S., Cocuzza, G.E.M. (2022). Description of a new *Myzocallis* (Hemiptera Aphididae) living on *Valonia* oak in Southern Italy with DNA barcoding accounts on allied species-group. *Zootaxa*, 5183, 187–202. doi: 10.11646/zootaxa.5183.1.15.