

**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 «Дослідження імуногенних та молекулярно-біологічних властивостей вірусів, що уражають рослини родини *Solanacea* для розробки систем діагностики»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

(підпис)

Олена КВАСКО

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук,
старший викладач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

(підпис)

Оксана ТАРАН

Виконала

(підпис)

Ярина КОВТОНЮК

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
_____ **Олена КВАСКО**
«_____» _____ 2025 р.

З А В Д А Н Н Я

**на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студентки
Ковтонюк Ярини Ігорівни**

1. Тема роботи «Дослідження імуногенних та молекулярно-біологічних властивостей вірусів, що уражають рослини родини *Solanacea* для розробки систем діагностики»

Керівник роботи к. б. н., старший викладач Таран О. П.

2. Строк подання студентом роботи 19 травня 2025 року

3. Вихідні дані до роботи: приблизний список літературних джерел; орієнтовний, перелік методів діагностики; перелік методик виявлення патогенів.

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

4.1. Розробка специфічного праймера PVM (M вірус картоплі, Potato virus M, Carlavirus misolani).

4.2. Імунологічний аналіз зразку.

4.3. Створення позитивного контролю для ІФА.

4.4. Перевірка створеного позитивного контролю на активність протягом року.

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	к.б.н., ст.викл. Таран О. П.	01.09.2024	01.09.2024
2	к.б.н., ст.викл. Таран О. П.	08.12.2024	08.12.2024
3	к.б.н., ст.викл. Таран О. П.	21.02.2025	21.02.2025

6. Дата видачі завдання 1 вересня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Огляд літературних джерел згідно обраної тематики	Вересень 2024р. - Грудень 2024р.	
2	Розділ 2. Матеріали та методи дослідження	Грудень 2024 р. - Лютий 2025 р.	
3	Розділ 3. Результати дослідження	Лютий 2025 р . - Квітень 2025 р.	
4	Висновки та оформлення списку літератури.	Квітень 2025 р . - Травень 2025 р.	

Завдання прийняла до виконання _____ **Ярина КОВТОНЮК**

Керівник кваліфікаційної роботи _____ **Оксана ТАРАН**

РЕФЕРАТ

Робота включає 53 сторінок та складається зі вступу, трьох розділів, висновків. До того ж, вона вміщує 16 рисунків, 6 таблиць, перелік умовних позначень, список використаних джерел та додатки.

Мета дослідження — визначення імуногенних та молекулярно-біологічних властивостей вірусів, що уражають рослини родини *Solaacea* для створення діагностикому на основі полімеразної ланцюгової реакції і імуноферментного аналізу.

Завдання дослідження:

- Провести огляд літератури для встановлення імуногенних та молекулярно-біологічних властивостей вірусів.
- Створити специфічний праймер для М вірусу картоплі.
- Провести імуноферментний аналіз на уражених патогеном зразках картоплі.
- Створити робочий позитивний тест.

Об'єкт дослідження – *Carlavirus misolani*.

Предмет дослідження – створення системи діагностики.

Результати дослідження:

- Проанізувавши літературні джерела нами з'ясовано молекулярні і імунологічні властивості М вірусу картоплі і методи діагностування захворювання. Це включало вивчення його геномної структури, білкового складу, механізмів реплікації та взаємодії з імунною системою рослини-господаря. Також було досліджено існуючі методи діагностики цього захворювання, їхні переваги та недоліки.
- Згідно до джерел обрані методи діагностування і створення діагностикума, таких як імуноферментний аналізу і полімеразна ланцюгова реакція. Ці методи вирізняються високою чутливістю, специфічністю та можливістю швидкого виявлення вірусу.

- Створенні і перевірені специфічні до вірусу праймери, що були використані у аналізі зразку. Ефективність та специфічність розроблених праймерів були підтверджені експериментально на зразках рослин.
- Розроблено методику створення позитивного контролю до М-вірусу картоплі для імуноферментного аналізу. Показано, що позитивний контроль зберігав антигенні властивості впродовж 12 місяців зберігання.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	8
ВСТУП.....	12
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	14
1.1. Молекулярно-біологічні властивості РVМ	14
1.3. Непрямі традиційні методи	17
1.4. Непрямі методи оптичних датчиків.....	17
1.5. Прямі методи. Лабораторне дослідження	18
1.5.1. Тест RT-PCR	19
1.5.2. Виявлення РНК-вірусів рослин за допомогою аналізу RT-RPA– CRISPR/Cas12a для РVХ	21
1.5.3. Ізотермічна ампліфікація, опосередкована петлею (LAMP).....	23
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	28
2.1. Методика створення праймера для ПЛР	28
2.2. Створення позитивного контролю для ІФА.....	32
2.3. ПЛР в реальному часі.....	34
2.4. Імуноферментний аналіз.....	35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	37
3.1. Створення праймера для ПЛР гену капсиду РVМ	37
3.3. Ампліфікація.....	45
3.4. Створення позитивного контролю для імуноферментного аналізу	46
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	50
ДОДАТКИ	54
Додаток А	54
Додаток Б.....	55
Розміщення праймерів на геномі.....	55
Додаток В.....	56

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- PVM/MBK — M вірус картоплі, Potato virus M, Carlavirus misolani
- PVY/YBK — Y вірус картоплі, Potato virus Y, Potyvirus yituberosi
- PVS/SBK — S вірус картоплі, Potato virus S , Carlavirus sigmasolani
- PLRV/BCJK — Вірус скручування листя картоплі, Potato leaf roll virus, Polerovirus PLRV
- TVM/BMT — вірус мозаїки тютюну, Tobacco mosaic virus, Tobamovirus tabaci
- WYMV/ВЖМП — вірус жовтої мозаїки пшениці, Wheat yellow mosaic virus, Bymovirus triticitessellati
- ssRNA/одРНК — одноланцюгова РНК
- ssRNA(+)/одРНК+ — одноланцюгова позитивно-ланцюгова РНК
- RBP/РНКЗБ — РНК-зв'язуючий білок мРНК
- мРНК — матрична РНК
- кДНК — комплементарна ДНК
- RdRp/ревертаза — РНК-залежна РНК-полімераза
- sgRNA/гРНК — одиночна направляюча РНК
- CRISPR-Cas — Кластерні регулярно розташовані короткі паліндромні повтори та CRISPR-асоційовані білки, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated proteins
- Cas-білок — CRISPR-асоційовані білки
- dsRNA/двРНК — дволанцюгова РНК
- TGBp/БПБГ — білки потрійного блоку генів
- Полі-А хвіст — довга послідовність аденінових нуклеотидів (поліаденілат), яка додається до 3'-кінця більшості еукаріотичних пре-мРНК (попередників матричної РНК) під час процесингу, щоб стати зрілою мРНК.
- PD — плазмодесма
- MP — білки вірусного руху
- SE — ситові елементи

- VP — судинна перенхіма
- CC — клітини- супутники
- BS — перетини оболонки пучка
- УФ — ультрафіолетове випромінювання
- БПЛА — безпілотні літальні апарати
- ІФА (ELISA) — імуноферментний аналіз
- ПЛР (PCR)— полімеразна ланцюгова реакція
- RT-PCR/ — полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією
- RT — зворотна транскриптаза
- qPCR — полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі
- LAMP — петлева ізотермічна реакція
- NGS — секвенування нового покоління
- FISH — флуоресцентна гібридизація in situ
- in situ — в природному середовищі
- In silico — модуляція в комп'ютерній системі
- in vitro — поза живим організмом
- SHERLOCK — Специфічне високоефективне ферментативне розблокування репортера, Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing
- DETECTR — ДНК-ендонуклеаза-націлений CRISPR транс-репортер, DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter
- iSCAN-TP — Ізотермічна кластерна ампліфікація та детекція нуклеїнових кислот Двофазний, Isothermal Clustered Amplification and Nucleic acid detection Two-Pot
- ssDNA-FQ — одноланцюговий зонд ДНК, мічений флуорофором (F) та гасником (Q).
- FAM — флуоресцентний барвник 6-карбоксіфлуоресцеїн
- HEX — флуоресцентний репортер

FIP — прями́й внутрі́шній праймер, приєднується що ділянок F1c і F2 під час LAMP

VIP — зворотній внутрі́шній праймер з'єднує B2 і B1c під час LAMP

F3 — прями́й праймер під час LAMP

V3 — зворотній праймер під час LAMP

LF — праймер прямої петлі під час LAMP

LB — праймер зворотньої петлі під час LAMP

NCBI - National Centre for Biotechnology Information

GenBank, DDBJ, ENA — власні назви баз даних

FASTA — формат запису нуклеїнових кислот

IUPAC — Міжнародний союз теоретичної та прикладної хімії

start — місце початку приєднання праймера;

len — довжина (кількість нуклеотидів) праймера;

tm — температура плавлення праймера, тобто температура при якій половина праймерів буде в дволанцюговому стані (з відпалом на матриці), а інша — в одноланцюговому;

gc% — вміст гуанін-цитозинового зв'язку;

any th — температура самовідпалу праймера з утворенням петлі при надмірно високій температурі;

3' th — температура утворення димерів на 3' кінці - небажаних побічних продуктів ПЛР, коли 2 праймери зв'язуються між собою;

hairpin seq — послідовність нуклеотидів в найбільшій петлі всередині праймера; при any th = 0.0, петлі не утворюються або дуже нестабільні;

PRODUCT SIZE — розмір отриманого амплікону, вимірюється в парах основ (bp);

PAIR ANY TH COMPL — найвища температура небажаного відпалу між правим і лівим праймером;

PAIR 3' TH COMPL — найвища температура небажаного відпалу між правим і лівим праймером на 3' кінці;

IgG — антигенспецифічне антитіло

CP — білок капсиду вірусу

ВСТУП

Актуальність досліджень. Дослідження вірусів, що вражають пасльонові рослини, мають вирішальне значення для забезпечення глобальної продовольчої безпеки, сприяння сталому сільському господарству, сприяння міжнародній торгівлі та пом'якшення впливу зміни клімату на рослинництво.

Однією з важливих культур родини Пасльонових для економіки України і світу є картопля, яка посідає четверте місце за споживанням. Вирішальне значення вона має в харчовій промисловості: має приємний, для більшості людей, смак; крохмаль, вміст якого складає 14-22%, розщеплюється на прості цукри і легко засвоюється організмом; містить 1,5-3% білка і незамінні амінокислоти, такі як: лізин, метіонін, треонін, триптофан, валін, фенілаланін, лейцин, ізолейцин; має в складі мінеральні речовини (0,8-1%): калій, кальцій, магній, фосфор, залізо; містить близько 1% клітковини і 0,7% пектинових речовин; присутні органічні кислоти: лимонна, щавлева, яблучна; містить вітаміни: В1, В2, В3, В6, С, Н, Р, РР, К, каротиноїди, вітамін С присутній в 20 мг на 100 г бульби; має високу калорійність – 70-85 кілокалорій [1].

Картопля має велике значення як кормова культура для тварин, також її використовують як сировину в промисловості для виготовлення спирту, крохмалю, декстрину, глюкози, каучуку.

Дослідження вірусів, що вражають картоплю, є дуже актуальним з кількох причин:

- Харчова безпека. Оскільки картопля є одним з найпоширеніших культур вживаних в харчовій промисловості, її захворювання вірусами може спричинити глобальну нестачу їжі. Віруси, здебільшого, мають властивість передаватись культурним рослинам від диких в межах однієї родини, тобто бур'янів, що ростуть поруч зі сховищами насіння, полями. Це несе негативний вплив на довкілля і глобальну торгівлю. Також, ураження великих площ культурних рослин, однорідних за генетичним складом,

призводить, у разі епідемії до швидкої загибелі посівів, що ще більше зменшує генетичну різноманітність.

- Економічний вплив. Україна станом на 2021 рік займає четверте позицію серед найбільших виробників картоплі в світ і друге місце серед споживання на одну людину. Епідемії вірусних захворювань здатні зменшити врожайність вдвічі, що нанесе величезні збитки для підприємців і економіки України. Наприклад, легкі, малосимптомні штами *Potato virus M* (PVM) зменшують врожайність на 10-18%, а ізоляти, присутні на території Східної Європи, можуть зменшити врожайність бульб до 75% [2].

Найпоширенішими вірусами, що уражають пасльонові культури і, у тому числі, картоплю є *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus M* (PVM), *Potato virus S* (PVS), *Potato leaf roll virus* (PLRV). Ці віруси передаються попелицями, тому можливе поширення захворювання на достатньо великі дистанції. Симптоми, що викликають ці віруси включають некрози, втрату або зниження врожайності, пошкодження бульб і плодів, мозаїки на листі, його скручування або зморшкуватість. Це призводить до зниження фотосинтетичної активності рослин і, в кінцевому рахунку, до значного зниження урожаю бульб.

Забезпечення необхідних заходів для запобігання ураження в великих масштабах насаджень культури картоплі та розробки методів контролю вірусних захворювань, включає розробку систем діагностики вірусів, що будуть мати низьку вартість, високу точність і легко доступними для широкого кола споживачів. Першим кроком для розробки є визначення імуногенних та молекулярно-біологічних властивостей вірусів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Молекулярно-біологічні властивості РВМ

Сучасна таксономічна назва М-вірусу картоплі – *Carlavirus misolani*, тривіальна назва – *Potato virus M*. Він належить до роду *Carlavirus*, підродини *Quinvirinae*, родини *Betaflexiviridae*, порядку *Tymovirales*, класу *Alsuviricetes*, типу *Kitrinoviricota*, царство *Orthornavirae*, надцарство *Riboviria* [3].

Віріон Карлавірусів не має суперкапсидної оболонки, гнучкий, ниткоподібний, довжина складає від 470 до 1000 нм, а в діаметрі становить від 12 до 13 нм [4].

Геном карловірусів лінійний однолонцюговий (ssRNA(+)) розміром приблизно 5,8-9 кб. На 3'-кінці розташована поліаденілова послідовність. Віруси цього роду кодують від 3 до 6 білків RBP (РНК-зв'язуючий білок) [4].

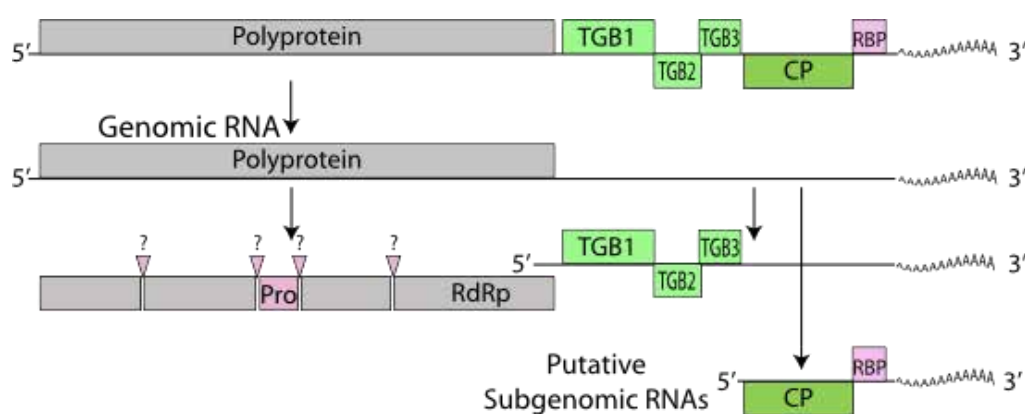


Рис. 1.1. Графічне зображення геному вірусів роду Карлавірус [4].

РНК віріону виступає одночасно в якості мРНК і геному вірусу. РНК-залежна РНК-полімераза (RdRp) транслюється напряму з вірусної РНК. Інші рамки зчитування, як припускають, транскрибуються як одиночні направляючі РНК (sgRNA), які слугують направляючою для Cas-білків [4].

Реплікація здійснюється в цитоплазмі наступним чином: вірус проникає через мембрану клітини господаря, де з оболонки вивільняється геномна РНК в цитоплазму, РНК транскрибується як моноцистронна мРНК з отриманням РНК-

залежної РНК-полімерази з 5'-проксимальної (яка знаходиться поблизу 5'-кінця) рамки зчитування. Реплікація відбувається в віріоплазмі (вірусній фабриці) (ділянка в цитоплазмі, де відбувається реплікація вірусу). Дволанцюгова РНК (dsRNA) створюється на основі позитивної (з неї безпосередньо транслюються вірусні білки) одноланцюгової РНК (ssRNA+). Щоб отримати капсид і білки руху створюється sgRNA з внутрішніх субгеномних промоторів. Опісля, відбувається збірка вірусу, а для переміщення між клітинами на далеку відстань використовується білки потрійного блоку генів (TGBp) [4].

У 1991 році опубліковано дані визначення і аналізу геному М вірусу картоплі з 8534 нуклеотидів. Геном PVM містить шість відкритих рамок зчитування і некодуючі ділянки: 75 нуклеотидів на 5- кінці; ділянка 70 нуклеотидів, після якої розташовується полі-А хвіст на 3'-кінці, 38 і 21 нуклеотидів між трьома великими блоками кодуєчих послідовностей [5].

На 76 нуклеотиді починається трансляція поліпептиду 223К, що, ймовірно, є РНК-полімеразою (фермент, що здійснює синтез РНК). Далі розташований блок з трьома відкритими з рамками зчитування, що кодуєть поліпептиди 25К, 12К і 7К. Наступний блок містить інформацію про поліпептиди 34К (білок оболонки PVM) і 11К. Поліпептид 11К містить структуру, яка допомагає зв'язати нуклеїнову кислоту з металом [5].

Фізико-хімічні характеристики, за якими можна визначити PVM: коефіцієнт седиментації ($S_{20,w}$) дорівнює 157 S, плавуча щільність у CsCl 1,322 г·см⁻³, коефіцієнт екстинкції (характеристика поглинання світла залежно від концентрації певної речовини у розчині) при 260 нм 2,88 см²·мг⁻¹, молекулярна маса капсиду дорівнює $35,7 \times 10^3$ [6].

1.2. Огляд сучасних методів діагностування вірусів рослин, їх переваги та недоліки

Віруси – неклітинна форма організації живої матерії, облігатні внутрішньоклітинні паразити, які здатні функціонувати лише всередині клітини-господаря, з різним ступенем залежності від систем синтезу нуклеїнових кислот

і повною залежністю від систем синтезу білків та енергетичних систем клітини, здатні до самостійної еволюції, не ростуть і не діляться.

Проникнення вірусу в рослинні клітини, переважно епідермальні та мезофіл, супроводжується розбиранням віріону та трансляцією/реплікацією геному в інокульованих тканинах. Потім вірусні транспортні комплекси переміщуються від клітини до клітини, і в нових інфікованих клітинах відбувається постійна реплікація. Цей рух на короткі відстані вимагає модифікації плазмодесми (PD) білками вірусного руху (MP). Транспорт вірусу в тканинах флоєми включає транслокацію від клітин мезофілу до ситових елементів (SE) через послідовні перетини оболонки пучка (BS), клітин судинної паренхіми (VP) і клітин-супутників (CC). Потрапляючи на SE, вірус транспортується разом із флоємним соком у віддалені місця, а потім виходить із SE, створюючи нові місця зараження та ефективно поширюючись по всій рослині [7].

Виявити і ідентифікувати вірус, що вже уразив рослину можна прямими і непрямими методами. Непрямі методи поділяються на традиційні й за допомогою оптичних сенсорів (Рис.2) [8].

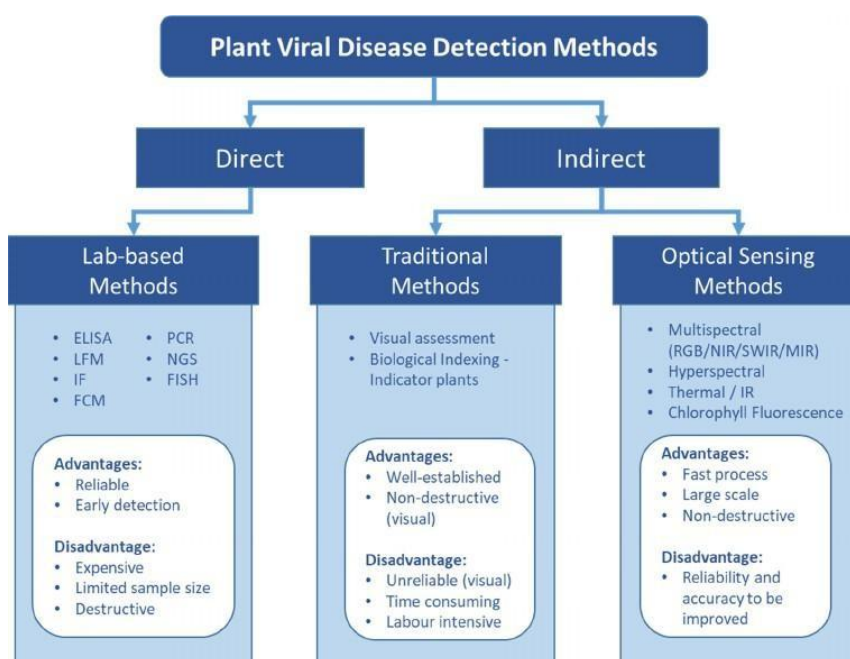


Рис.1.2. Схема різних типів методів виявлення вірусів рослин [8].

1.3. Непрямі традиційні методи

Традиційні методи засновані на видимій специфічній реакції організму на вірус. До цих методів входить візуальна оцінка і виявлення за допомогою рослин-індикаторів. Візуальні індикаторні симптоми можуть проявлятися як мозаїчні візерунки на листках, пожовтіння, скручування листків, кільцеві плями, некротичні тканини, в'янення та вузлуватість. До 2024 року більшість назв фітовірусів були засновані на рослині, у якої вперше його знайшли, і симптомі, спричинений захворюванням [9]. Але такі симптоми можуть бути спричинені не тільки патогеном, а й біотичними та абіотичними чинниками: механічні пошкодження, нестача або надлишок поживних речовин, водний і кислотний дисбаланс, бактеріальні, грибні та паразитні захворювання – це перший недолік методу, тому використовують рослини-індикатори, які теж мають свої недоліки у використанні.

Перевагами є дуже низька вартість, велика база даних і візуально зрозумілий результат.

Недоліки: недостовірність результатів, довготривалий (очікування прояву симптомів у рослин-індикаторів), декілька вірусів можуть викликати схожі симптоми, один вірус може викликати різні симптоми, неефективний, якщо наявні декілька вірусів в одній рослині, низька можливість автоматизації [8].

Візуально визначити PVM можна за такими симптомами: викликає плямистість, мозаїку, зморшкуватість і скручування листя та затримку росту пагонів. Але схожі симптоми мають PVS, PVX і PVY, тому традиційні методи не є доцільними в ідентифікації PVM [10].

1.4. Непрямі методи оптичних датчиків

Оптичні датчики вимірюють частоту та інтенсивність світла, які можна розрахувати для виявлення захворювання у рослині. Процес зондування

подібний до визначення людським очима, але він має здатність виявляти довжини хвиль світла за межами видимого спектру, які може виявити людське око, в діапазоні від УФ до довгохвильового інфрачервоного [11].

Деякі не візуальні датчики, такі як флуориметр хлорофілу, GreenSeeker, лазерний термометр і спектро радіометр, зазвичай використовуються близько або безпосередньо в контакті з листком [12]. Завдяки збільшенню відстані зчитування, датчики зображення можуть використовуватися поблизу (наприклад, встановлені на тракторах) або віддалено (наприклад, повітряні платформи, такі як безпілотні літальні апарати (БПЛА), літаки та супутники) для підтримки регіонального управління хворобами [13].

Перевагами є швидкість аналізування, можливість аналізу великої площі, не шкодить рослині.

Головним недоліком є те, що надійність і точність ще вимагають покращення [8].

1.5. Прямі методи. Лабораторне дослідження

Існує два основних методи прямої діагностики: серологічний та нуклеїнових кислот. Серологічні методи, до прикладу, ІФА, використовують ще з 1960-х років, в їх основі лежало використання антитіл, вироблених тваринами, для ідентифікації вірусних білків [14].

Методи на основі нуклеїнових кислот використовуються для виявлення вірусів рослин з 1979 року і безпосередньо визначають фрагменти вірусної ДНК або РНК [15]. У 1985 році розроблено революційний метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на основі нуклеїнових кислот [16], який значно покращив діагностику вірусів рослин. Після декількох циклів ампліфікації за дві години ПЛР може дублювати один ланцюг ДНК до 10^9 разів, що різко підвищує чутливість та ефективність виявлення вірусу [17]. На основі ПЛР згодом було розроблено багато модифікацій і вдосконалень, які широко використовуються для виявлення вірусів рослин, включаючи ПЛР зі зворотною транскрипцією (RT-PCR), кількісну ПЛР (qPCR) і петлеву ізотермічну ампліфікацію (LAMP) [8].

Секвенування наступного покоління (NGS) використовується у вірусології рослин з 2009 року. NGS забезпечує високоефективне, швидке, недороге секвенування ДНК або РНК з високою пропускнуою здатністю геномів вірусів рослин і віроїдів, а також специфічних малих РНК, що утворюються під час інфекційний процес. NGS забезпечив дуже потужну альтернативу для виявлення та ідентифікації вірусів рослин і віроїдів без попереднього знання послідовності патогенів, що вимагається для методів виявлення та ідентифікації на основі ПЛР. З цієї причини NGS став універсальним підходом для точного виявлення та ідентифікації багатьох нових і відомих вірусів рослин. Віроїди також точно та легко виявляються та ідентифікуються за допомогою NGS [18].

Флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) — це назва різноманітних методів, які зазвичай використовуються для візуалізації транскриптів генів в еукаріотичних клітинах і можуть бути додатково модифіковані для візуалізації інших компонентів клітини, таких як інфікування вірусами та бактеріями. За допомогою FISH можна відслідковувати переміщення вірусу організмом і досліджувати взаємодії з клітинними компонентами [19].

Переваги лабораторних методів: дуже чутливі, точні і надійні, не вимагають реакції рослини, оскільки націлені безпосередньо на вірус. Але необхідно приділяти багато уваги відбору проб задля чистоти аналізу, щоб не було перехресного зараження. Також, багато лабораторних методів вимагають дорогоцінного обладнання і реагентів, що унеможлиблює аналіз великої кількості рослин, тому залишається ризик поширення захворювання від особин, що не увійшли до аналізованих [8].

1.5.1. Тест RT-PCR

Для PVM довгий час найпопулярнішим методом був аналіз ELISA, але для аналізу необхідно порушувати стан спокою бульб, щоб використати для тесту пагони, задля уникнення хибнонегативного результату. Розробка молекулярно-біологічних методів діагностування сприяла появі можливості використовувати

метод RT-PCR, що вже використовувався для інших вірусів картоплі, RT-PCR є чутливим, специфічним, простим і швидким [10].

Розробка системи діагностики PVM цим методом проходить таким чином:

- відбираються зразки (бульби, листя, саджанці культури тканин) з підтвердженням позитивним ELISA тестом;
- створюються праймери для генів PVM на основі РНК вірусу; перевіряють праймер на дієвість (отримують очікувані результати на інших зразках) і специфічність (чи реагує праймер на інші віруси або віроїди);
- далі перевіряють на чутливість змішуючи сік ураженого зразка і сік здорового зразка в концентраціях від 1:0 до 1:799; наостанок необхідно провести повторні тести для уникнення хибнопозитивних результатів [10].

Кластеризовані регулярні короткі паліндромні асоційовані системи (CRISPR-Cas) походять від природної імунної системи, яка забезпечує молекулярний імунітет мікроорганізмам (видам бактерій і архей) проти чужорідних видів, що вторглися. CRISPR-Cas широко використовувався в еукаріотичних видах для геномної інженерії, молекулярного імунітету та регуляції транскриптомів. У кількох системах CRISPR ідентифікація та розщеплення мішеней призводить до активації їхньої неспецифічної ендонуклеазної активності, яка була використана для виявлення нуклеїнових кислот. Наприклад, добре відомі платформи виявлення нуклеїнових кислот SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing) і DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter) використовують побічні дії Cas13 і Cas12, відповідно, при використанні репортерів ssRNA або ssDNA. Кінцеві або кількісні вимірювання можна отримати за допомогою різноманітних репортерів, мічених флуорофором або біотином [20].

1.5.2. Виявлення РНК-вірусів рослин за допомогою аналізу RT-RPA–CRISPR/Cas12a для PVX

Спочатку очищували білок LbCas12a з бактерії *Lachnospiraceae* та оцінювали його активність. Для кожної вірусної матриці розробили 3- 4 набори праймерів RPA [18].

Тест виявлення iSCAN-Two-Pot (iSCAN-TP)

Загальну РНК, вилучену з інфікованих рослин, піддавали iSCAN-TP або iSCAN one-pot (iSCAN-OP) перед тим, як її передали на детекцію на основі CRISPR/Cas у реакції однієї або двох лунок. Флуоресцентний сигнал, отриманий в результаті побічного розщеплення репортера одноланцюгової ДНК-флуоресцентного гасника (ssDNA-FQ) на основі Cas12a, візуалізували за допомогою пристрою перегляду флуоресценції [20].

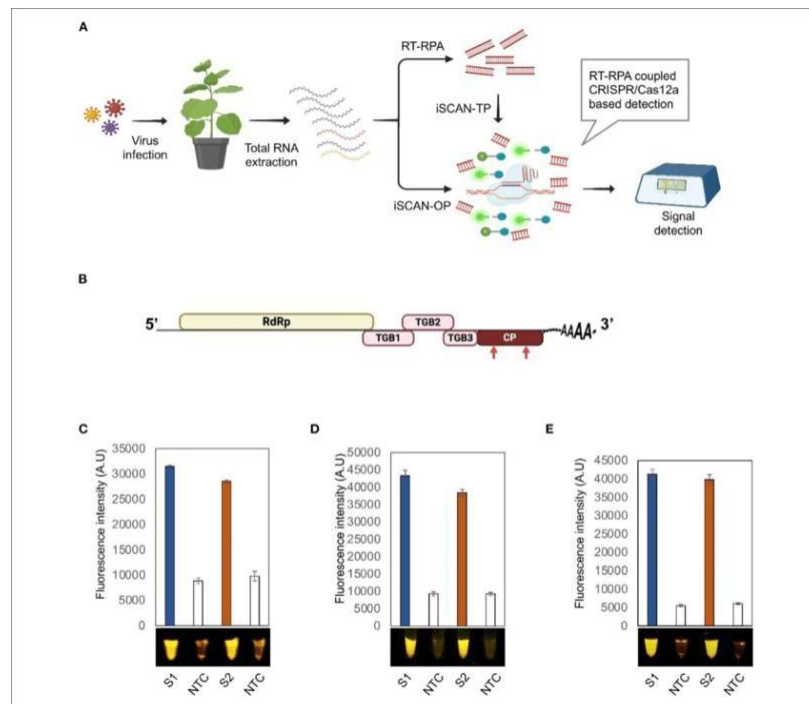


Рис. 1.3. Оптимізація аналізу iSCAN-OP для виявлення PVX та PVY . (A) Робочий процес RT-RPA системи виявлення на основі CRISPR/Cas12a. (B) Схематичне зображення геному вірусу картоплі X (PVX). Червоні стрілки вказують регіони, на які націлена система виявлення на основі RT-RPA CRISPR/Cas12a. (C) Візуалізація флуоресценції кінцевої точки аналізу

виявлення iSCAN-TP (транскрибована *in vitro* РНК) за допомогою P51 Molecular Fluorescence Viewer. S1: набір праймерів 1, S2: набір праймерів 2, NTC: контроль шаблону відсутній. Значення показано на графіку як середнє \pm SD (n = 3). (D) Візуалізація флуоресценції кінцевої точки аналізу виявлення iSCAN-OP (транскрибована *in vitro* РНК) за допомогою P51 Molecular Fluorescence Viewer. S1: набір праймерів 1, S2: набір праймерів 2, NTC: контроль шаблону відсутній. Значення показано на графіку як середнє \pm SD (n = 3). (E) Візуалізація флуоресценції кінцевої точки аналізу виявлення iSCAN-OP (транскрибована *in vitro* РНК) за допомогою P51 Molecular Fluorescence Viewer. S1: набір праймерів 1, S2: набір праймерів 2, NTC: контроль шаблону відсутній. Значення показано на графіку як середнє \pm SD (n = 3) [19].

Потім провели тест виявлення - iSCAN-OP. Ампліфікація цільової послідовності та детекція на основі Cas12a в одній пробірці при сталій температурі. Для тестування CRISPR/Cas12a при різних температурах.

Виявлення в режимі реального часу *in vitro* транскрибованої РНК TVM (Tobacco mosaic virus).

Щоб визначити чутливість методу виявлення RT-RPA-CRISPR/Cas12a, розбавили транскрибовану *in vitro* РНК TVM до фемтомолярних концентрацій і встановили RT-RPA в одному горщику, з додаванням 250 нМ репортера FAM (5' -/56-FAM/TTATT/31AVKFQ/-3', IDT) замість HEX репортера. Щоб виявити сигнал FAM у реальному часі, реакційні зразки запускали в системі ПЛР у реальному часі Applied Biosystems StepOne протягом 1 години при 42°C з флуоресцентними вимірюваннями кожні 2 хвилини [20].

Додаткова специфічність, яку надає аналіз CRISPR/Cas, дозволяє виявити специфічний вірус під час змішаних інфекцій, коли використовуються вірусоспецифічні праймери RPA, також аналіз є дуже чутливим [20].

1.5.3. Ізотермічна ампліфікація, опосередкована петлею (LAMP)

Цей метод є високочутливим, швидким, зручним, специфічним, має низьку вартість і не потребує термоциклічного обладнання. Технологія опосередкованої петлею ізотермічної ампліфікації (LAMP) — це технологія ізотермічної ампліфікації нуклеїнової кислоти, винайдена Нотомі Т. у 2000 році. При постійній температурі нуклеїнові кислоти можна ампліфікувати від кількох копій до $10^9 \sim 10^{10}$ за годину. На відміну від ПЛР, її можна проводити при постійній (ізотермічній) температурі в межах від 60 до 65 С° використовуючи водяну баню і використовувати необроблений матеріал, або навіть на зразках тканин. LAMP час то використовують для виявлення патогенів в рослинних організмах і цей метод легко підлягає модифікаціям [21, 22, 23].

В LAMP використовується 6 праймерів, які є комплементарними до 8 ділянок геному, вони з'єднані з ферментом ДНК полімеразою [24].

Внутрішні праймери використовуються на ранніх етапах процесу і для подальшого самоповтору. FIP – прямий внутрішній праймер, перший складний праймер утворений шляхом з'єднання послідовностей від 5' до 3', він з'єднує ділянки позначені як F1c і F2 (на рис.4). Другий, VIP – зворотній внутрішній праймер з'єднує B2 і B1c. Прямий (F3) і зворотний (B3) зовнішні праймери використовуються тільки в етапі нециклічного заміщення ланцюга. Праймерами прямої (LF) і зворотної (LB) петель, роль яких полягає в покращенні ампліфікації та прискоренні реакції, зв'язуються з додатковими послідовностями до яких не приєднуються інші праймери [24].

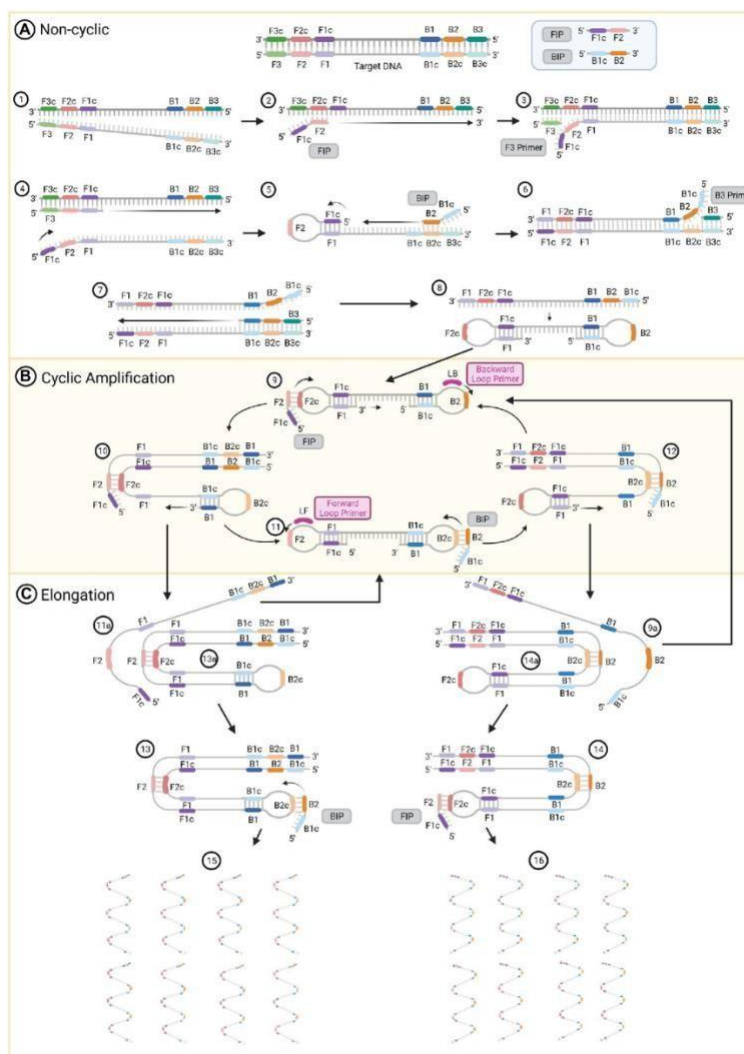


Рис.1.4. Процес ампліфікації методом ізотермічної ампліфікації, опосередкованої петлею (LAMP). (А) Нециклічні етапи, на яких утворюється ланцюг ДНК із двома петлями на 5' та 3' кінцях. (В) Етапи циклічної ампліфікації та (С) елонгації [24].

Для вірусних пагонів використовують ізотермічну ампліфікацію, опосередковану петлею зворотної транскрипції (RT-LAMP). Основними компонентами колориметричної реакції RT-LAMP є два ферменти (зворотна транскриптаза (RT) і полімераза зміщення ланцюга), колориметричний барвник (феноловий червоний) і набір праймерів (зазвичай складається з шести праймерів) [25].

У 2011 році для виявлення вірусу жовтої мозаїки пшениці WYMV використовували чотири набори праймерів націлених на білок капсиду. РНК виділили з вірусу і екстрагували, 65°C протягом 80 хвилин є оптимальним для

виявлення ампліконів ДНК. Амплікони ДНК візуалізували шляхом спостереження за каламутністю в розчині та електрофорезу в агарозному гелі. Завдяки RT-LAMP можливо виявити РНК, розведену до 10^{-5} [26].

Принцип методу RT-LAMP. Використовується 4 праймери для з'єднання 6 областей РНК. Необхідно виділити РНК, змішати її з реакційною сумішшю і інкубувати при $60-65^{\circ}\text{C}$. ВІР приєднується до матричної РНК, і за допомогою активності зворотної транскриптази синтезується комплементарної ДНК (кДНК). Далі В3 приєднується до області за межами ВІР, за допомогою активності зворотної транскриптази, синтезується нова кДНК, одночасно вивільняючи ланцюг кДНК, попередньо сформований ВІР. Потім FІР відпалюється до цієї одноланцюгової кДНК [27].

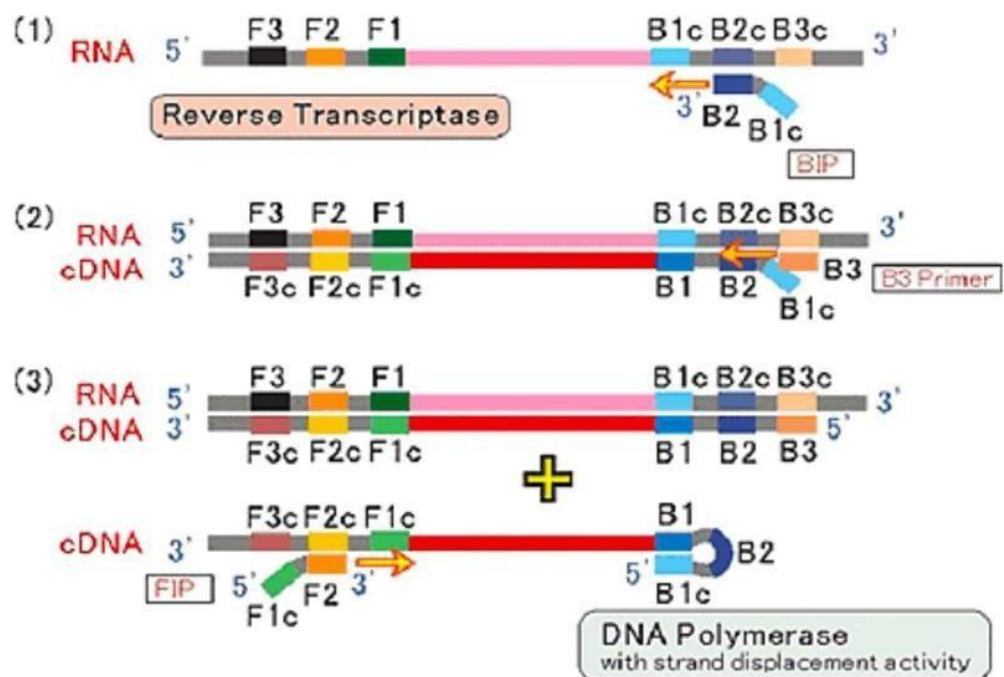


Рис.1.5 Процес зворотної транскрипції [27].

На минулому етапі активність ДНК-полімерази зміщення ланцюга 3'-кінець області F2 у FIP розпочинає синтез комплементарного ланцюга ДНК. F3 приєднується до області за межами FIP, і його 3'-кінець провокує

синтез, одночасно вивільняючи ланцюг ДНК, попередньо сформований за допомогою FIP. Ланцюг ДНК, синтезований праймером F3, разом із матричним ланцюгом ДНК утворює дволанцюгову ДНК. Оскільки ланцюг ДНК, пов'язаний з FIP, містить комплементарні послідовності на обох кінцях, він самовідпалюється та утворює структуру з двома петлями. Ця структура стає початковою структурою циклічної ампліфікації LAMP [27].

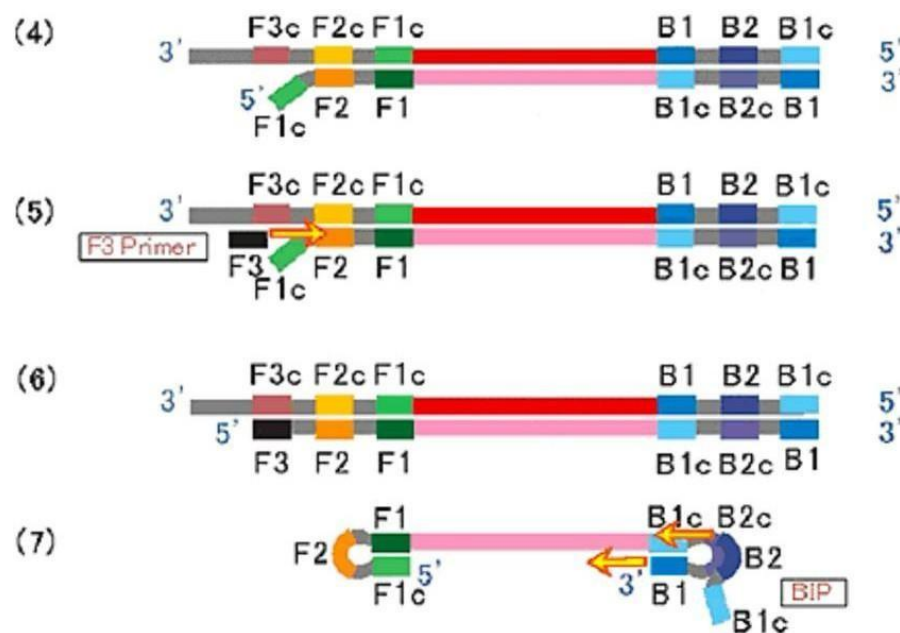


Рис.1.6 Формування структури [27].

ДНК-структура з двома петлями швидко перетворюється на ДНК зі п структурою завдяки самоспровакованому синтезу ДНК, який від'єднує петлю на 5'-кінці для подальшого подовження ланцюга. Потім VIP приєднується до одноланцюгової області у ДНК зі шпильковою структурою, ініціюючи синтез ДНК і вивільняючи раніше синтезований ланцюг. Цей ланцюг утворює шпилькову петлю на 3'-кінці через комплементарні ділянки F1c і F1. Синтез ДНК відбувається на основі власного шаблону з 3'-кінця області F1 і утворюється кДНК зв'язаний з VIP. VIP утворює структуру з двома петлями через комплементарні ділянки F1 – F1c і B1c – B1 відповідно, ця структура є оберненою до структури з початку цього етапу.

Далі продовжується синтез за принципом самозбурювання починаючи з 3'-кінця ділянки F1. FIP приєднується до області F2c і починає синтезувати ланцюг ДНК. Цей ланцюг ДНК, зв'язаний з FIP, вивільняється шляхом зміщення ланцюга під час синтезу самозбурюваної ДНК, так формується структура ідентична до початку цього етапу.

На етапі структури 9 рис.7 FIP (або VIP) відпалюється до одноланцюгової області F2c (або області B2c), і синтез ДНК продовжується шляхом вивільнення дволанцюгової ДНК.

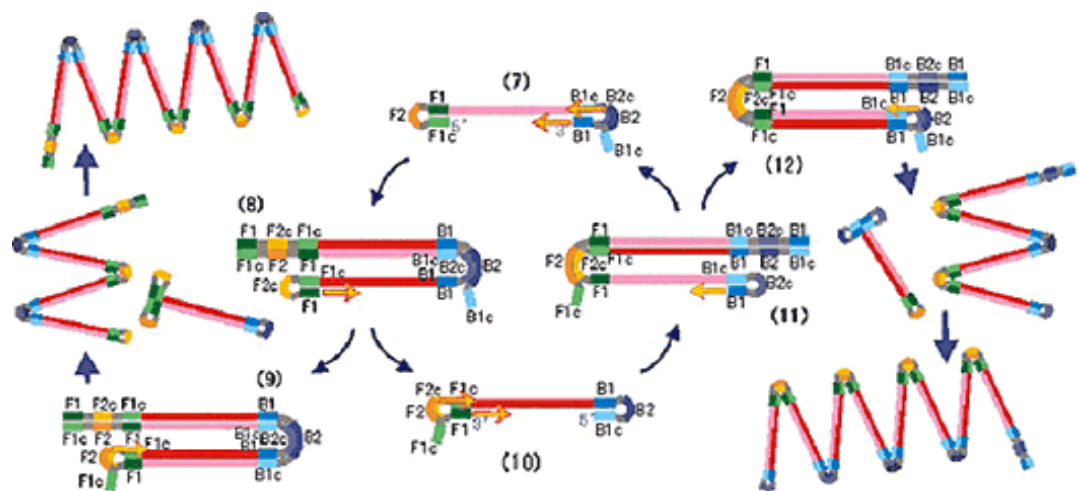


Рис. 1.7. Циклічний етап ампліфікації [27].

У результаті цього процесу утворюються структури різного розміру, що складаються з по черзі інвертованих повторів цільової послідовності на тому самому ланцюзі [27].

Таким чином для діагностування вірусів рослин застосовується широке коло методів, як молекулярно-біологічних, так і імунологічних. Проте необхідні нові дослідження для удосконалення методики діагностування вірусів та розширення бази наявних препаратів для діагностування.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Методика створення праймера для ПЛР

Перед початком створення праймера необхідно обрати базу даних, в якій зібрана велика кількість геномних бібліотек, такі бази даних використовують для накопичення, збереження, систематизації та аналізу великих масивів інформації [28].

Було обрано бібліотеку GenBank (розроблена National Centre for Biotechnology Information, NCBI), в ній є інформація в галузі геноміки, протеоміки і транскриптоміки з посиланнями на наукові статті. GenBank є частиною Міжнародного співробітництва баз даних нуклеотидних послідовностей, до складу якого входять Банк даних ДНК Японії (DDBJ), Європейський архів нуклеотидів (ENA) і GenBank при NCBI, вони постійно обмінюються даними між собою [28].

NCBI було засновано в 1988 р. у США при Національній медичній бібліотеці. В ній представлені різноманітні бази даних: нуклеотидні послідовності ДНК в розділі GenBank та амінокислотні послідовності білків в Protein, таксономічна інформація про певні біологічні види в Taxonomy, бази даних статей наукової літератури PubMed. Загалом наявні 35 баз даних, які можна дослідити через пошукову систему Entrez [28].

Нуклеїнові кислоти і протеїни в базах даних записані у форматі FASTA (FAST – швидкий та Alignment – вирівнювання), в ньому використовується однолітерне позначення для нуклеотидів і амінокислот відповідно до IUPAC (Міжнародний союз теоретичної та прикладної хімії) [28].

Таблиця 2.1

Позначення нуклеотидів згідно до IUPAC [29]

Символ	Основа	Оригінальне позначення
G	G	Guanine (Гуанін)

A	A	Adenine (Аденін)
T	T	Thymine (Тимін)
C	C	Cytosine (Цитозин)
R	G or A	puRine (Пурин)
Y	T or C	pYrimidine (Піримідин)
M	A or C	aMino (Аміно група)
K	G or T	Keto (Кето група)
S	G or C	Strong interaction (3 H bonds) (Сильний зв'язок)
W	A or T	Weak interaction (2 H bonds) (Слабкий зв'язок)
H	A or C or T	not-G, H follows G in the alphabet (Не гуанін)
B	G or T or C	not-A, B follows A (Не аденін)
V	G or C or A	not-T (not-U), V follows U (Не тимін/урацил)
D	G or A or T	not-C, D follows C (Не цитозин)
N	G or A or T or C	aNy (Будь-який)

Для виявлення вірусного патогену методом ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції), в класичному вигляді, праймери підбираються саме до білка капсиду. Оскільки в межах виду існує генетична варіативність наступний крок полягає в створення консенсусної послідовності, яка дає змогу уникнути зв'язування праймера з варіабельним сегментом.

Після того як було обрано модельний організм, здійснюється пошук геномів вірусу в межах виду, тобто схожих на модельний організм. Варто уникати надмірно високого відсотку схожості щоб створити універсальний праймер, але надто малий рівень збігу загрожує зв'язуванню з іншими видами в межах роду, що спричинить неспецифічність.

Для пошуку подібних послідовностей в NCBI є інструмент BLAST. В поле ввести нуклеотидну послідовність і натиснути “Run BLAST”. Обрати з виданого переліку 10-100 варіацій.

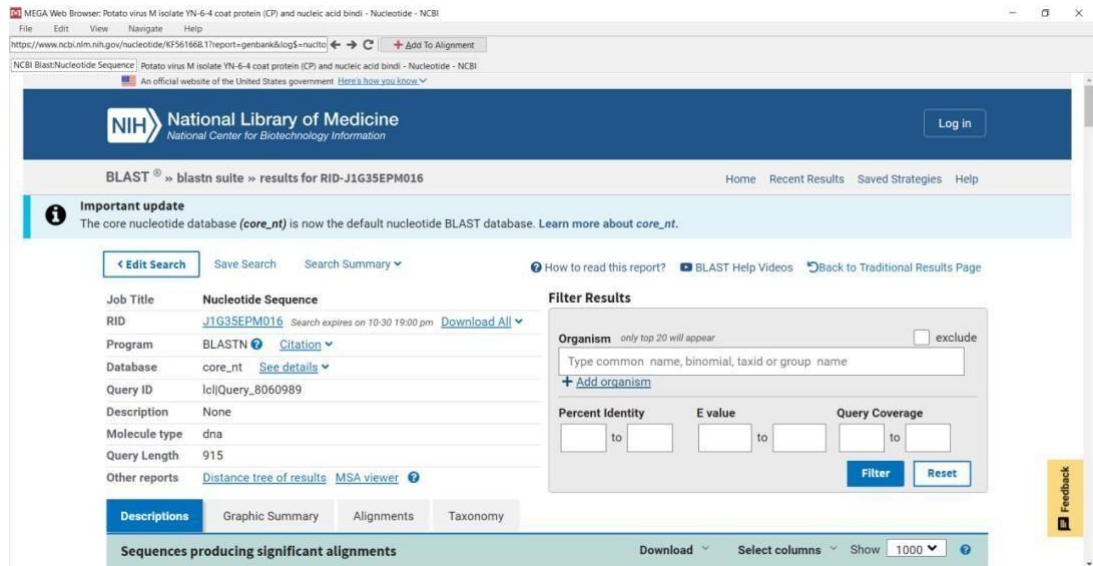


Рис. 2.1. Приклад результату пошуку послідовностей в NCBI

Для зручності вирівнювання і зберігання скопійованих геномів використовується застосунок MEGA11. MEGA11 має багато інструментів для відстеження відмінності в геномі для створення філогенетичних дерев різного характеру.

Для вирівнювання і отримання консенсної послідовності створенні спеціальні інструменти, одним з них є MultAlin. Копіювати в нього необхідно послідовності в форматі FASTA, обов'язково зі знаком “>”, геноми позначити цифрами, замість повної назви. Далі натиснути “Start MultAlin!”. В нижньому рядку буде розміщений консенсус. Червоним позначено нуклеотиди, що є універсальними для всього виду, синім – можлива варіація, чорним – поодинокі варіативність, також буде видно в якому саме геному відбулися мутації, такі як делеції (випадіння нуклеотиду, позначається “-”), інсерції (додається один або більше нуклеотидів, окремого позначення не має, але можна зробити припущення про наявність, якщо всі інші ізоляти мають позначку “-”), трансверсії (зміна пурину на інший пуриновий азот, або піримідину на піримідин, позначається чорним кольором) і трансдукції (зміна пурину на піримідин і

навпаки, також позначається чорним кольором). Якщо весь стовпчик має синє забарвлення – це означає, що даний нуклеотид консенсусу не варто використовувати як фрагмент матриці при створенні праймера, оскільки ця ділянка поліморфна в межах виду, що зробить праймер неспецифічним.

В інструмент для створення праймерів, наприклад Primer3, копіюється консенсус і в поле Excluded Regions обираємо фрагменти, котрі не мають брати участь при створенні (поліморфні ділянки), за принципом: номер нуклеотиду, кома, кількість видалених нуклеотидів. В налаштуваннях характеристик праймера обрати бажані, часто використовуваними при створенні для капсиду вірусів є: вміст гуанін-цитозину не менше 40%, оскільки між ними утворюється потрібний водневий зв'язок, що поліпшить силу зв'язку між праймером і матрицею; Product Size Ranges 150-700, тобто вихід продукту ПЛР бажано мати в діапазоні 150-700 пар основ; Nuber to Return 10 – це кількість праймерів, які згенерує інструмент.

Таблиця 2.2

Загально вживані характеристики при створенні праймера

Характеристика	Значення
%CG	Min 40.0, Opt. 50, Max 60.0
Product Size Ranges	150-700
Nuber to Return	10

Після завершення інших налаштувань при більш специфічних умовах, натиснувши Pick primers буде вичислення ряду праймерів, біля кожного варіанту, що складається з двох (лівий та правий) праймерів буде його характеристика:

start – місце початку приєднання праймера;

len – довжина (кількість нуклеотидів) праймера;

t_m – температура плавлення праймера, тобто температура при якій половина праймерів буде в дволанцюговому стані (з відпалом на матриці), а інша – в одноланцюговому;

$gc\%$ - вміст гуанін-цитозинового зв'язку; не менше 40%;

$any\ th$ – температура самовідпалу праймера з утворенням петлі при надмірно високій температурі; бажано отримувати якнайнижчий показник;

$3'\ th$ – температура утворення димерів на 3' кінці - небажаних побічних продуктів ПЛР, коли 2 праймери зв'язуються між собою; бажано отримувати якнайнижчий показник;

$hairpin\ seq$ – послідовність нуклеотидів в найбільшій петлі всередині праймера; при $any\ th = 0.0$, петлі не утворюються або дуже нестабільні;

PRODUCT SIZE – розмір отриманого амплікону, вимірюється в парах основ (bp);

PAIR ANY TH COMPL – найвища температура небажаного відпалу між правим і лівим праймером; бажано отримувати якнайнижчий показник;

PAIR 3' TH COMPL - найвища температура небажаного відпалу між правим і лівим праймером на 3' кінці; бажано отримувати якнайнижчий показник.

Кожну пару праймерів варто перевірити на відповідність характеристики до зазначених і обрати та пару, що найменше зачіпає поліморфні ділянки.

2.2. Створення позитивного контролю для ІФА

Для виробництва діагностичних сироваток до поширених вірусів рослин важливим етапом є одержання та тривале збереження позитивних контролів, тобто зразків, вміст вірусу в яких підтверджено багатьма дослідженнями. Зазвичай, ліофілізований рослинний матеріал перевіряють доступними методами, наприклад, імуноферментним аналізом або ПЛР.

Умови дослідження: Дослідження виконували на базі кафедри екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та

екології Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Бульби картоплі сорту Скарбниця одержали з Інституту картоплярства НААН. Бульби висаджували у горщики із ґрунтовим субстратом для пророщування. Використовували для вирощування торф'яний субстрат «Універсальний з біогумусом» (Україна).

Рослини вирощували в фітоткамері «Silverbox evolution» (Франція) за температурного режиму 22 ± 2 °С, та режиму освітлення: світло/темрява 14/10 годин. Для освітлення використовували лампу ДНаТ, 600 Вт. Режим вологості повітря у камері підтримували на рівні 70-80%, вологість ґрунту у горщиках – 50-80% найменшої вологоємності. Після сходів і досягнення рослинами висоти 20-25 см, відбирали зразки для проведення тестування на вміст антигенів вірусів.

Для зневоднення зразків використовували методику, описану в [8,9]. Заражені тканини рослин (листя, стебла) обгортали абсорбуючим (промокальним) папером, щоб видалити надлишок води. З листків видаляли центральну жилку, листки нарізали на шматочки, менше 1 см. Поміщали нарізану тканину в ексікаторну посудину, що містила щонайменше потрібну вагу дестканта до ваги листя.

Закривали ємність кришкою, щільно ізолювали і ставили в холодильник на 2-3 тижні.

Виймали зразки через 2–3 тижні та негайно поміщали в марковані пластикові пробірки з шаром безводного CaCl_2 та вати. Пробірки закривали щільним корком, покривали парафільмом і зберігали при 4 °С. Перед використанням зразків для аналізу пробірку витримували для повернення до кімнатної температури, щоб мінімізувати конденсацію.

Зневоднені зразки аналізували на вміст антигенів вірусів методом імуноферментного аналізу.

2.3. ПЛР в реальному часі

Матеріали та реактиви: РНК-мішені, ПЛР-суміші, негативні контролю, позитивні контролю, Таq полімераза, мікропробірки об'ємом 0,2 мл, стерильні наконечники з аерозольним фільтром, зворотня транскриптаза.

Обладнання: ПЛР-бокс, одноканальні піпет-дозатори, Real-time ампліфікатор Biorad CFX 96 (рис. 2.2.).



Рис. 2.2. Real-time ампліфікатор Biorad CFX 96.

Перед початком роботи обробити бокс УФ-оспроміненням не менше ніж 30 хв. Всі робочі поверхні, одноканальні піпет-дозатори та інше обладнання обробити розчином етанолу 70%. Всі реакційні суміші приготувати у окремі мікропробірки, струсити на вортексі та осадити короткочасним центрифугуванням. Розкапати аліквоти по 20 мкл реакційної суміші в кожную мікропробірку і щільно зікрити їх. Внести по 5 мкл досліджуваних РНК, в пробірку з негативним контролем внести 5 мкл негативного контролю, а в позитивний контроль — відому РНК вірусу. Спочатку вноситься негативний

контроль, далі вноситься РНК досліджуваних зразків відповідно до нумерації, останнім вноситься позитивний контроль.

Для налаштування ампліфікатора його необхідно увімкнути і відкрити на комп'ютері програмне забезпечення Biorad CFX Maestro, ввести розмір реакційної сумуші 25 мкл, ввести температурні режими, час і кількість циклів і назвати лунки.

“Run Status” показує температурні режими та який за рахунком цикл проходить.

Вкладка “Real-time status” показує криві ампліфікації в режимі реального часу.

Після завершення ампліфікації на екрані з'явиться робоче вікно “Preparing data file”. Після цього автоматично з'явиться вікно з кривими ампліфікації та розрахунковими C_q .

2.4. Імуноферментний аналіз

Для досліджень використовували реагенти LoeweBiochemica GmbH (ФРН), варіант аналізу - твердофазний «сендвіч». Протокол аналізу відповідно до рекомендацій виробника.

На першому етапі аналізу лунки мікропланшету покриваються антигенспецифічним антитілом (IgG). Потім вноситься зразок, що містить цільовий антиген, негативний і позитивний контроль. Відбувається реакція з іммобілізованим IgG і утворюється комплекс антиген-антитіло. Для виявлення цього комплексу додається мічений фермент-АР-кон'югант, утворюється подвійний «сендвіч» антитіл.

Для проявлення зв'язаного комплексу з антитіло-антиген-антитіло використовують лужну фосфатазу, кон'юговану з другими антитілами, вона реагує з субстратом 4-нітрофенілфосфатом у ферментативній реакції. Продуктом цієї реакції є жовтий 4-нітрофенол, виявляється візуально або за допомогою спектрофотометрії при 405 нм через 1-2 години. Між кожними етапами

необхідно робити промивку буфером по 4 рази. Вимірювання проводили за допомогою спектрофотометра Microelisa Stat Fax 303+ (рис. 2.3.).



Рис. 2.3. Спектрофотометр Microelisa Stat Fax 303+.

Прописи буферів, які використовували для аналізу :

1. Буфер для покриття: 1.59 г Na_2CO_3 , 2.93 г NaHCO_3 . Розчиняли у дистильованій воді і довести до 1 л, рН 9.6, зберігати в холодильнику.

2. Промивний буфер: 8.0 NaCl , 2.9 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 KH_2PO_4 , 0.2 KCl , 0.5 мл Tween 20. Розчиняли у дистильованій воді і довести до 1 л, рН 7.2-7.4, зберігали в холодильнику.

3. Буфер кон'югату/зразка для підготовки зразка та розведення кон'югату: так само як і промивний буфер, але додати 20 г полівінілпіролідону (К10-К20), 2 г сироватки альбуміну бика, 0,1 г NaN_3 . Розчиняли в дистильованій воді і доводили до 1л, зберігали в охолодженому середовищі не більше ніж 7 діб.

4. Субстратний буфер: 97 мм дієтоноламіну, 0.2 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Розчинити в дистильованій воді і довести до 1л, рН 9,8 (за допомогою HCl), зберігали в холодильнику. Розчин субстрату: 1 мг/мл 4-нітрофенілфосфат-ди- Na -сіль додати в субстратний буфер, готується безпосередньо перед використанням.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Створення праймера для ПЛР гену капсиду РVМ

Potato virus M — це вид ssRNA(+) вірусу в родині Betaflexiviridae.

Використовуючи пошукову систему зайти у базу даних NCBI. Метою пошуку вводимо Potato virus M та назву гену, до якого шукаємо праймер (coat protein) і обираємо послідовність з GenBank, геном має бути повноцінного розміру (complete genome).

Обираємо модельний геном:

Potato virus M isolate YN-6-4 coat protein (CP) and nucleic acid binding protein (NABP) genes, complete cds

GenBank: KF561668.1

```

1  tgagtatggg tgattcaaca aagaagctg aaactgcca agatgtgggc acttcgcatg
   61  agaagagaga ggcgcgacca ctgccaactg cagctgattt cgaggggagg gacacatcgg
  121  agaaactga tggaagcact gcagatgctg atggggagat gtcactggag cggaggcttg
  181  atagtctccg agaattcctg cgagagcgga ggggcgcaat tcgagtgaca aaccagggc
  241  tagagactgg caggccaagg ttgcagctag ctgaaaatat gcgcccagat cctacgaatc
  301  cgtacaacag gccgtccata gaagctctca gccgaatcaa gccaatcgcg atctcaaaac
  361  atatggctac gtctgaggat atgatgcgca tatatgtgaa cctggagggg ctaggtgtgc
  421  cgactgagca cgtgcaacag gtagtgattc aggcagtgct attttgcaag gatgcaagca
  481  gctccgtatt cctggatccg cgaggctcgt tcgaatggcc cagaggtgct ataaccgag
  541  atgccgtctt ggctgtgctg aagaaggatg cggaaacact gcgaagggtg tgtaggctgt
  601  atgccccggt aacatggaat cacatgctga cgcacaacgc gcctccagcc gactgggctg
  661  ccatgggggt tcagtacgag gatcgcttcg ctgccttcga ctgtttgat tacgttgaga
  721  atactgctgc ggttcagccc ctagagggat tgatcaggcg acctaccca agggagaaga
  781  tagctcacaac tacgcacaaa gacatcgcac tgcgtggagc aaatcgcaat caagcgttca
  841  gctctctcaa tgccgaggtc actggtggca tgaatggccc ggagctcact agggattatg
  901  gaaagtcgaa tagaaaatga agcacgtaac cagggtggct ttacttatag cgagagctat
  961  gtgtacttct tcaggtaact ttgtgttga aatagctttt agtattgctg agtgtgctgg

```

1021 tcgaccactt ggtggtggga gatctaagta cgcacgtcgt agacgtgcta ttagtatagc
 1081 taggtgtcac aggtgctatc gcttgtggcc cccaactgtg ttactacta ggtgtgataa
 1141 taaacattgt gtgcttgga tctcttaca tgtgcgctg gcgcaattta ttgatgaagg
 1201 agtaaccgag gtgatacctt cagtcacaa caagcaagag tggcattaa atcctattta
 1261 atatataacg tgtgctacta taaataaaaa ttgg

//

Оскільки обраний геном містить інформацію не тільки про білок капсиду, натискаємо на область гену де є /gene="CP". Копіюємо виділену область.

atggg tgattcaaca aagaagctg aaactgccaa agatgtgggc acttcgcatg

61 agaagagaga ggcgcgacca ctgccaactg cagctgattt cgaggggagg gacacatcgg
 121 agaaactga tggaagcact gcagatgctg atggggagat gtcactggag cggaggcttg
 181 atagtctccg agaattcctg cgagagcgga ggggcgcaat tcgagtgaca aaccagggc
 241 tagagactgg caggccaagg ttgcagctag ctgaaaatat gcgccagat cctacgaatc
 301 cgtacaacag gccgtcata gaagctctca gccgaatcaa gccaatcgcg atctcaaaaa
 361 atatggctac gtctgaggat atgatgcgca tatatgtgaa cctggagggg ctaggtgtgc
 421 cgactgagca cgtgcaacag gtagtattc aggcagtgtt atttgcaag gatgcaagca
 481 gctccgtatt cctggatccg cgaggctcgt tcgaatggcc cagaggtgct ataaccgag
 541 atgccgtctt ggctgtgctg aagaaggatg cggaaacact gcgaagggtg tgtaggctgt
 601 atgccccggt aacatggaat cacatgctga cgcacaacgc gcctccagcc gactgggctg
 661 ccatgggggt tcagtacgag gatcgctcgc ctgcctcga ctgtttgat tacgttgaga
 721 atactgctgc ggctcagccc ctagagggat tgatcaggcg acctaccca agggagaaga
 781 tagctcaca tacgcacaaa gacatcgcac tgcgtggagc aatcgcaat caagcgtca
 841 gctctctcaa tgccgaggtc actggtggca tgaatggccc ggagctcact agggattatg
 901 gaaagtcgaa tagaaatga

Відкриваємо інструмент BLAST і вставляємо обрану послідовність, підтверджуємо. Щоб в праймері не було поліморфних ділянок, необхідно використати достатню кількість ізолятів під час відбору. Зберігаємо подібність в

межах 98-90%, отримуємо 50 ізолятів, їх назви і філогенетичне дерево представлене на рис.

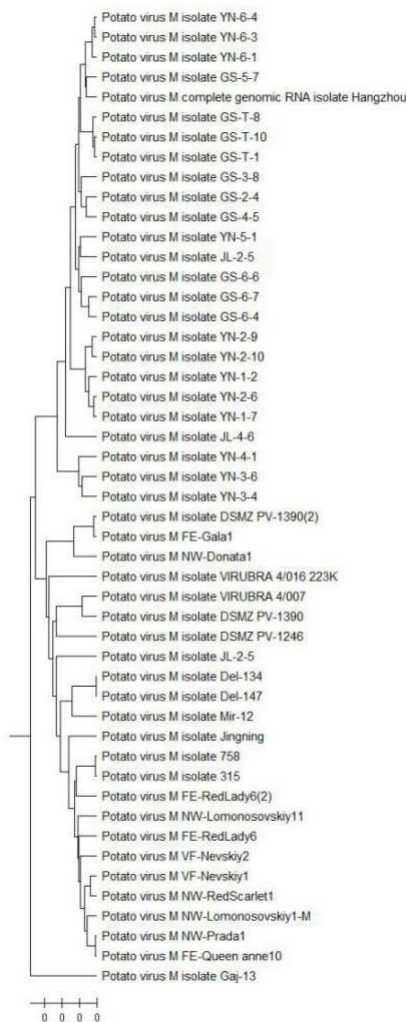


Рис. 3.1 Перелік використаних ізолятів М вірусу картоплі у вигляді філогенетичного дерева, що показує їхню спорідненість.

Ізоляти для зручності можна зберігати в MEGA11, потім цей список можна перетворити в філогенетичне дерево, згадане вище.

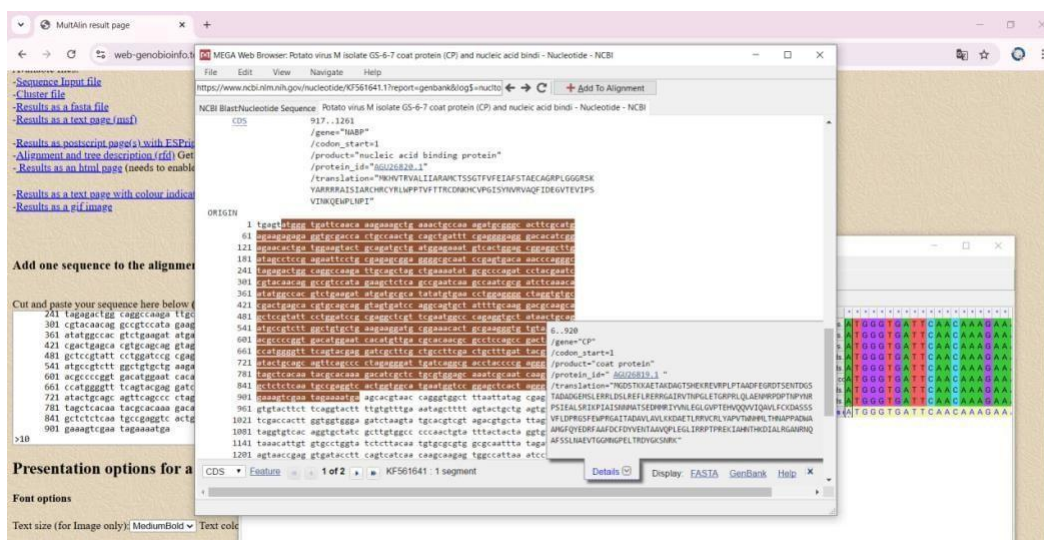


Рис. 3.2. Процес пошуку CP ізолятів і вирівнювання за допомогою інструменту MEGA11 і MultAlin.

Нуклеотидні послідовності CP ізолятів копіюємо в інструмент MultAlin. Після підтвердження маємо вирівняні і консенсусну послідовність. Червоним позначено нуклеотиди, що є універсальними для всього виду, синім – можлива варіація, чорним – поодинокі варіативності. ДОДАТОК А.

В найнижчому рядку бачимо послідовність під назвою Consensus:

Consensus ATGGGgGATT CAACgAAGaA AGCTGAAACT GCCAAAGAtG
tGgGCACTTC GCAaGAgAaG AGaGAAGcGC GaCCACTGCC aACTGctGCT
GAcTtCgAGG GGAgGGACAc AtCgGAGAAc ACtGATGGGc
GtgCtGCaGA TGCTGATGGa GAgATGTCAt TGGAgCGGAG
GCTTGAcAGc CTCCGaGAAT TCCTGCGaGA GCGGAGGGGc GCAATtCGaG
TGACaAACCC gGGGtTaGAG ACTGGCAGgC CAAGGTTgCA GCTaGCTGAA
aAtATGCGcC CtGATCCcAC GAATCCGTAC AACAGGCCGT CCATAGAAGC
tCTCAGCCGg ATcAAGCCAA TCGCgATCTC aACAAtATG GCcACaTCTG
AGGAtATGAT GCGCATATAT GTGAACCTGG AGGGGCTAGG tGTGCCgACT
GAGCACGTGC AgCAGGTaGT GATtCAGGCa GTGCTaTtT GCAAGGAcGC
aAGcAGCTCC GTATTCCTGG ATCCGCGaGG cTCGTTcGAg TGGCCcAGaG
GtGctATAAC tGCAGAtGCC GTCTTGGCTG TgCTGAAGAA GGATGCaGAA
ACACTaCGAA GGGTGTGTAG GCTGTATGCC CCGGTgACAT GGAATCAAt
GCTGACGCAc AACGCGCctC CaGCcGACTG GGCTGCCATG GGGTtCAGT

AcGAGGATCG CTTCGCTGct TTCGACTGCT TTGATTACGT TGAGAAtaCT
 GcTGCaGTcC AaCCCCTAGA GGGATTGATC AGGCGACCTA CCCCaA GGG
 AgAAGaTaGC tCACAATACG CACAAAGACA TCGCaCTGCG TGGaGCAAAT
 CGCAATCAgG tGTTcAGCTC TCTCAATGCC GAGGTcACTG GtGG tATGA
 ATGGTCCgGA GCTCACTAGg GATTATGGaA AGTCGAATAG AAAATGA

Далі відкриваємо інструмент Primer3, вставляємо консенсусну послідовність і вводимо характеристики: %CG Min 40.0, Opt. 50, Max 60.0, Product Size Ranges 150-700, Nuber to Return 10.

The screenshot shows the Primer3 web interface. The 'General Primer Picking Conditions' section includes fields for Primer Size (Min 18, Opt 20, Max 23), Primer Tm (Min 57.0, Opt 59.0, Max 62.0), Product Tm (Min -1000, Opt 0.0, Max 1000), and Primer GC% (Min 40, Opt 50.0, Max 60). It also shows Product Size Ranges (150-700), Number To Return (10), and Max 3' Stability (9.0). The 'Thermodynamic Secondary Structure Alignments' section is checked, showing values for TH: Max Self Complementarity (45.0), TH: Max 3' Self Complementarity (35.0), TH: Max Pair Complementarity (45.0), TH: Max 3' Pair Complementarity (35.0), and TH: Max Primer Hairpin (24.0). The 'Old Secondary Structure Alignments' section shows values for Max Self Complementarity (8.00), Max 3' Self Complementarity (3.00), Max Pair Complementarity (8.00), and Max 3' Pair Complementarity (3.00).

Рис. 3.3. Характеристики обрані для створення праймера

Видаляємо фрагменти, що можуть містити відмінності використовуючи Excluded Regions (за принципом: номер нуклеотиду, кома, кількість видалених нуклеотидів), на них інструмент не буде підбирати праймер:

6,15 30,14 54,19 81,16 104,11 119,20 150,16 177,10 198,1 210,28 249,1 258,1
 264,25 321,13 345,31 411,7 432,28 468,7 498,22 522,16 552,1 567,1 576,1 606,1
 618,1 630,1 639,7 666,7 690,1 717,16 765,13 780,1 804,1 813,1 828,3 855,10 876,1
 888,1 897,1

Натискаючи Pick primers, отримаємо декілька праймерів і їх характеристику.

Характеристика отриманих праймерів згенерованих інструментом

Primer3.

1

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any th</u>	<u>3' th</u>	<u>hairpin seq</u>
LEFT PRIMER CGAAGGGTGTGTAGGCTGTA	577	20	59.11	55.00	0.00	0.00	0.00
RIGHT PRIMER GTCGCCTGATCAATCCCTCT	757	20	59.24	55.00	0.00	0.00	0.00

PRODUCT SIZE: 181, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

2

OLIGO	<u>star t</u>	<u>le n</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any t h</u>	<u>3' t h</u>	<u>hairpi n seq</u>
LEFT PRIMER CGAAGGGTGTGTAGGCTG TA	292	19	59.3 2	52.3 2	0.00	0.00	0.00
RIGHT PRIMER GTCGCCTGATCAATCCCTC T	596	20	59.1 1	55.0 0	0.00	0.00	0.00

PRODUCT SIZE: 305, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

3

OLIGO	<u>star t</u>	<u>le n</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any t h</u>	<u>3' t h</u>	<u>hairpi n seq</u>
LEFT PRIMER CGAAGGGTGTGTAGGCTG TA	478	19	58.9 5	58.9 5	7.39	0.00	0.00
RIGHT PRIMER GTCGCCTGATCAATCCCTC T	803	21	58.5 7	47.6 2	0.00	0.00	0.00

PRODUCT SIZE: 326, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

На даному етапі можна передбачити, що робота з першою може мати переваги через меншу величину продукту і однакові показники вмісту гуанін-цитозину, температури плавлення, низьку ймовірність утворення побічних продуктів і петель. Натомість друга пара має середню довжину продукту і низьку ймовірність утворення побічних продуктів, єдиними недоліками є незначне

зменшення (53%) вміст гуанін-цитозинового зв'язку в порівнянні з заданим відсотком (55%) і несуттєву різницю в температурі плавлення між праймерами (0,2). Третя пара має високий показник ймовірності утворення побічних продуктів ($any_th = 7.39$) в лівому праймері. Розміщення праймерів на геномі показано в ДОДАТОК Б і В.

3.2. Перевірка праймерів *in silico*

За допомогою програмного забезпечення Geneious пари праймерів були перевірені на екстракцію продукту ПЛР з: матриці консенсусу, матриці повного геному ізолята М вірусу картоплі Т40 (GenBank: MH558037.1), геному картоплі (*Solanum tuberosum* UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) gene, UGPase-Lemhi10 allele, complete cds, GenBank: U20345.1), PVX (isolate Pun040, complete genome, GenBank: MT752936.1), PVY (isolate Pun029-2, complete genome, GenBank: OP429457.1), PLRV (isolate PLRV-AR, complete genome, GenBank: KY856831.1).

Пара під номером 1 успішно утворила продукт на матриці консенсусу і матриці повного геному М вірусу картоплі, не приєднуючись до інших об'єктів. Також підтвердилась відсутність сайтів неспецифічного зв'язування, вміст гуанін-цитозину в обох 55%, температура плавлення в обох 59,2 відсутність утворення всередині молекули петлі і на низьку ймовірність утворення димерів.

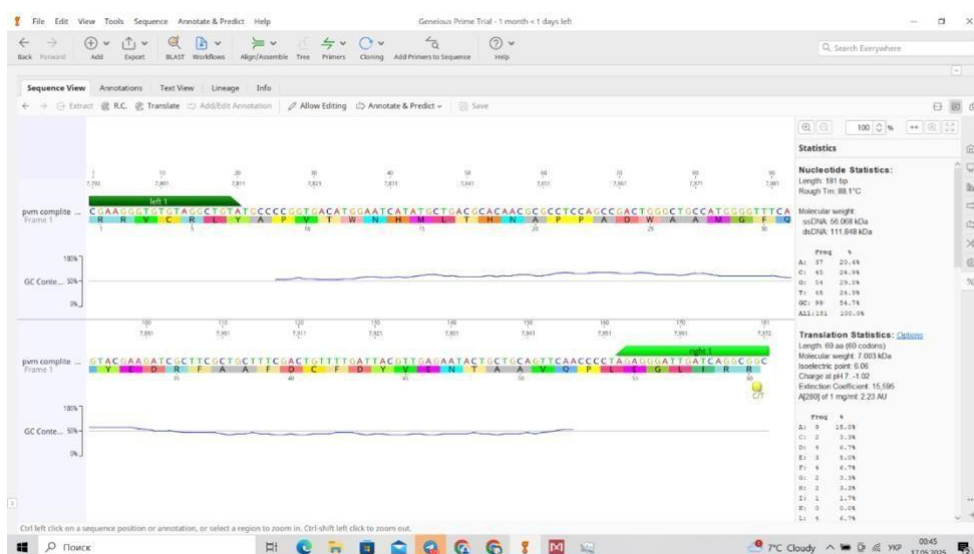


Рис. 3.4. Симуляція продукту першої пари праймерів на матриці повного геному ізоляту Т40 М вірусу картоплі.

Статистика нуклеотиду:

Довжина: 181 bp

Температура плавлення: 88.1°C

Молекулярна вага:

ssDNA: 56.068 kDa

dsDNA: 111.848 kDa

Пара під номером 2 успішно утворила продукт на матриці консенсусу і матриці повного геному М вірусу картоплі, не приєднуючись до інших об'єктів. Також підтвердилась відсутність сайтів неспецифічного зв'язування, вміст гуанін-цитозину 55% і 52,6% відповідно, температура плавлення 59,3 і 59,1 відповідно, відсутність утворення всередині молекули петлі і на низьку ймовірність утворення димерів.

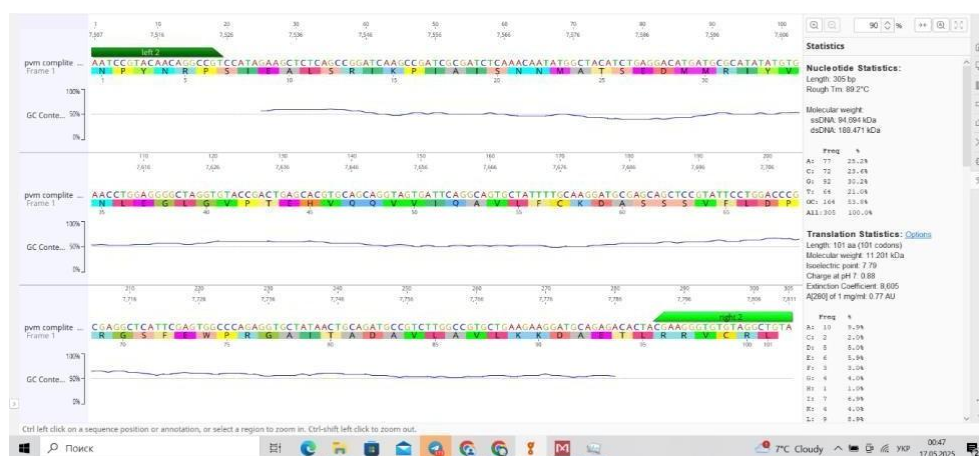


Рис. 3.5. Симуляція продукту другої пари праймерів на матриці повного геному ізоляту T40 М вірусу картоплі.

Статистика нуклеотиду:

Довжина: 305 bp

Температура плавлення: 89.2°C

Молекулярна вага:

ssDNA: 94.694 kDa

dsDNA: 188.471 kDa

Пара під номером 3 не здатна утворювати продукт, тому не розглядається для подальших досліджень.

3.3. Ампліфікація

Відібрані зразки рослин картоплі тестували методом ПЛР для виявлення патогенів: Y-вірусу картоплі (Potato Y potyvirus, PVY), M-вірусу картоплі (Potato M carlavirus, PVM), S-вірусу картоплі (Potato S carlavirus, PVS), X-вірусу картоплі (Potato X potexvirus, PVX) та вірусу скручування листків картоплі (Potato leafroll luteovirus, PLRV). Праймери для ідентифікації кожного патогену наведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Праймери для діагностики вірусів зі зразку

Вірус	Праймери	Очікуваний розмір продукту (bp)	Джерело
PVM	CGAAGGGTGTGTAGGCTGTA GTCGCCTGATCAATCCCTCT	181	Власна розробка
PVY	5' TCAAGGATCCGCAAATGACACAATTGATGCA GG 3' 5' AGAGAGAATTCATCACATGTTCTTGACTCC 3']	801	[30]
PVX	5'- GATAGAATTCAGATGACTACACCAGCCAACA CC-3 5' TACGCGTTCGGTTCCATGGACGTAGTTATGG TGG- '3	700	[30]

PLRV	5'AATAGAATTCTAATGAGTACGGTCGTGGTT ARAGG 3 5'AAAACCATGGCTATYTG GGGGTTYTG CARAG CYAC-3	548	[30]
PVS	5'-TGGGGAATCAGTCCGGCTAGTC-3' 5'-ACTGGACCTGCGCTTAGGCT-3'	1100	[31]

ПЛР в реальному часі, що використовується окремо або в поєднанні з іншими методами, є способом ефективного та надійного виявлення та диференціації цих вірусів.

Результати ПЛР представлені в таблиці 3.3, вони свідчать про наявність у зразках як моноінфекцій PVM, PVY, PVS, так і комплексного ураження вірусами PVS і PVY.

Таблиця 3.3

Результати ПЛР зразків картоплі, які культивували в умовах лабораторії.

№ зразка	Антигени вірусів				
	PVY	PVM	PVX	PLRV	PVS
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	+
3	-	+	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	+
6	-	+	-	-	-
Позитивний контроль	+	+	+	+	+
Негативний контроль	-	-	-	-	-

3.4. Створення позитивного контролю для імуноферментного аналізу

Відібрані зразки рослин картоплі тестували методом імуноферментного аналізу на вміст антигенів вірусів: Y-вірусу картоплі (Potato Y potyvirus, PVY), M-вірусу картоплі (Potato M carlavirus, PVM), S-вірусу картоплі (Potato S carlavirus, PVX), X-вірусу картоплі (Potato X potexvirus, PVX) та вірусускручування листків картоплі (Potato leafroll luteovirus, PLRV).

У дослідженнях встановлено, що зразки містили як моноінфекцію окремих вірусів, так і комплексну інфекцію (табл.3.4).

Таблиця 3.4

**Результати імуноферментного аналізу зразків картоплі, які
культивували в умовах лабораторії**

№ зразка	Антигени вірусів				
	PVY	PVM	PVX	PVS	PLRV
1	1,015±0,009	0,069±0,010	0,045±0,09	0,048±0,09	0,059±0,014
2	0,915±0,011	0,054±0,015	0,075±0,10	0,556±0,07	0,067±0,013
3	0,045±0,015	0,801±0,012	0,045±0,09	0,068±0,05	0,064±0,011
4	0,815±0,010	0,054±0,014	0,045±0,09	0,081±0,11	0,046±0,011
5	0,735±0,015	0,054±0,010	0,045±0,09	0,625±0,08	0,057±0,015
6	0,045±0,018	0,728±0,014	0,045±0,09	0,075±0,09	0,072±0,010
Позитивний контроль	1,013±0,015	0,718±0,09	0,645±0,09	0,818±0,09	0,425±0,011
Негативний контроль	0,043±0,010	0,047±0,010	0,043±0,08	0,046±0,10	0,041±0,09

Відібрані зразки рослин, які містили моноінфекцію PVM (зразки №3 і №6), збирали і проводили зневоднення, як описано вище. Оптична густина зразків становила 0,728 – 0,801, і перевищувала показник негативного контролю у 16 раз, що свідчить про високий вміст антигенів вірусу.

Після 3 місяців зберігання зневоднені препарати знову перевіряли на вміст антигенів PVM (рис.3.6). Встановлено, що вміст антигенів дещо знизився у порівнянні із сирими рослинними зразками до ліофілізації. Оптична густина продукту становила в середньому 0,750, і показник перевищував негативний контроль у 16 раз

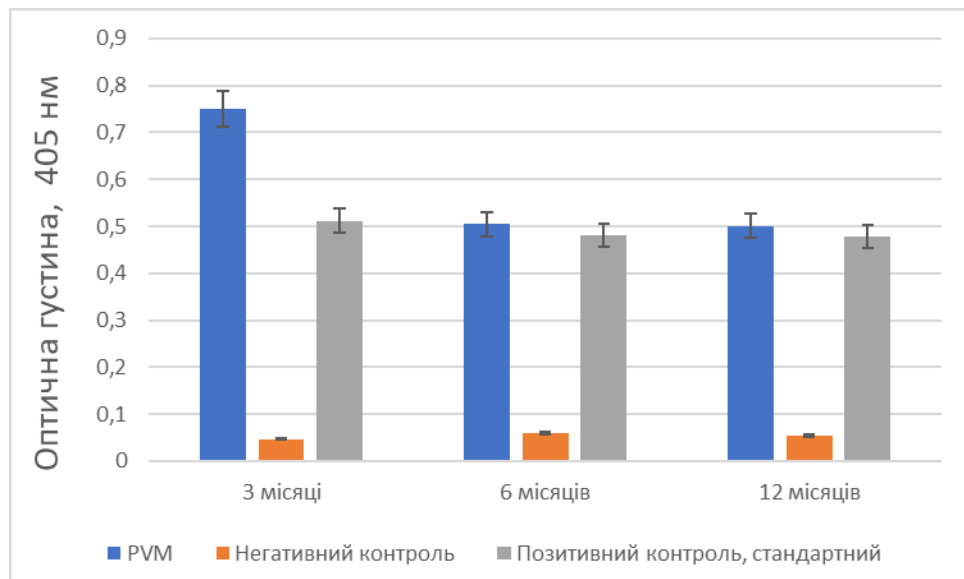


Рис.3.6. Результати збереження антигенних властивостей М-вірусу картоплі в дегідратованих зразках

Показники вмісту антигенів у дегідратованих зразках перевищували і комерційний позитивний препарат в 1,5 раза. Оскільки комерційний препарат це також ліофілізований рослинний матеріал, то, очевидно, можна спостерігати певну зміну антигенних властивостей відповідно до часу зберігання препарату.

Відповідно, одержаний дегідратований препарат протягом 6 місяців зберіг свої антигенні властивості, а оптичні показники зразка знизилися у порівнянні з попереднім аналізом 1,5 рази і відповідали рівню комерційного позитивного контролю. Також зразок перевищував негативний контроль у 10 раз, що свідчить про добре збереження антигенних властивостей.

В подальшому, до 12 місяців зберігання не спостерігали істотних змін в оптичних показниках дегідратованого зразка, які становили 0,501 і перевищували негативний контроль у 9 раз. Таким чином, показано, що антигенні властивості зразка зберігалися.

ВИСНОВКИ

1. Проанізувавши літературні джерела, нами з'ясовано молекулярні і імунологічні властивості М вірусу картоплі і методи діагностування захворювання. Це включало вивчення його геномної структури, білкового складу, механізмів реплікації та взаємодії з імунною системою рослини-господаря. Також було досліджено існуючі методи діагностики цього захворювання, їхні переваги та недоліки.
2. Згідно до джерел обрані методи діагностування і створення діагностикума, таких як імуноферментний аналіз і полімеразна ланцюгова реакція. Ці методи вирізняються високою чутливістю, специфічністю та можливістю швидкого виявлення вірусу.
3. Створенні і перевірені специфічні до вірусу праймери, що були використані у аналізі зразку. Ефективність та специфічність розроблених праймерів були підтверджені експериментально на зразках рослин.
4. Розроблено методику створення позитивного контролю до М-вірусу картоплі для імуноферментного аналізу. Показано, що позитивний контроль зберігав антигенні властивості впродовж 12 місяців зберігання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Значення картоплі AGROScience.COM.UA. AGROScience.COM.UA | База даних AGROScience.COM.UA. URL: https://agrosience.com.ua/plant/znachennya-kartopli#google_vignette (дата звернення: 13.03.2025).
2. Potato - Potato virus M (PVM). Accueil Ephytia. URL: <https://ephytia.inra.fr/en/C/21040/Potato-Potato-virus-M-PVM> (date of access: 13.03.2025).
3. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. Home | ICTV. URL: <https://ictv.global/taxonomy>(date of access: 10.03.2025).
4. Carlavirus ~ ViralZone. ViralZone. URL: <https://viralzone.expasy.org/268>(date of access: 10.03.2025).
5. Zavriev SK, Kanyuka KV, Levay KE. The genome organization of potato virus M RNA. J Gen Virol. 1991 Jan;72 (Pt 1):9-14. doi: 10.1099/0022-1317-72-1-9. PMID: 1990070. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1990070/>
6. Tavantzis SM. Physicochemical properties of potato virus M. Virology. 1984 Mar;133(2):427-30. doi: 10.1016/0042-6822(84)90408-2. PMID: 18639809. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18639809/>
7. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses / C. Hipper et al. Frontiers in plant science. 2013. Vol. 4. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154>(date of access: 17.10.2024).
8. Plant viral disease detection: from molecular diagnosis to optical sensing technology—a multidisciplinary review / Y. M. Wang et al. Remote sensing. 2022. Vol. 14, no. 7. P. 1542. URL: <https://doi.org/10.3390/rs14071542> (date of access: 17.10.2024).
9. Hull R. Plant virology. Elsevier Science & Technology Books, 2013. 1118 p. URL: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123611604/matthews-plant-virology>
10. Xu H, D'Aubin J, Nie J. Genomic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes. Virol J. 2010 Feb 1;7:25. doi: 10.1186/1743-422X-7-25. PMID: 20122168; PMCID: PMC2825510.

11. A review of advanced techniques for detecting plant diseases / S. Sankaran et al. *Computers and electronics in agriculture*. 2010. Vol. 72, no. 1. P. 1–13. URL: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2010CEAgr..72....1S/abstract> (date of access: 19.10.2024).
12. *Proximal soil sensing* / ed. by R. A. Viscarra Rossel, A. B. McBratney, B. Minasny. Dordrecht : Springer Netherlands, 2010. URL: https://www.researchgate.net/publication/270473713_Proximal_Soil_Sensing (date of access: 19.10.2024).
13. Jones RA. Trends in plant virus epidemiology: opportunities from new or improved technologies. *Virus Res.* 2014 Jun 24;186:3-19. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24275610/>
14. Torrance L., Jones R. A. C. Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. *Plant pathology*. 1981. Vol. 30, no. 1. P. 1–24. URL: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3059.1981.tb01218.x> (date of access: 19.10.2024).
15. Morris T. J. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*. 1979. Vol. 69, no. 8. P. 854. URL: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1979Articles/Phyto69n08_854.pdf (date of access: 19.10.2024).
16. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2999980/>
17. Olmos, A. and Capote, N. and Bertolini, E. and Cambra, M., 9781845932886.0227, CABI, URL: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi10.1079/9781845932886.0227> (227–249), CAB International, *Molecular diagnostic methods for plant viruses.*, (2007)
18. Hadidi A, Flores R, Candresse T, Barba M. Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology. *Front Microbiol.* 2016 Aug 26;7:1325. URL:

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.01325/full>

19. Kliot A, Kontsedalov S, Lebedev G, Brumin M, Cathrin PB, Marubayashi JM, Skaljic M, Belausov E, Czosnek H, Ghanim M. Fluorescence in situ hybridizations (FISH) for the localization of viruses and endosymbiotic bacteria in plant and insect tissues. *J Vis Exp*. 2014 Feb 24;(84):e51030. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24637389/>
20. Aman R, Mahas A, Marsic T, Hassan N and Mahfouz MM (2020) Efficient, Rapid, and Sensitive Detection of Plant RNA Viruses With One-Pot RT-RPA–CRISPR/Cas12a Assay. *Front. Microbiol.* 11:610872. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.610872/full>
21. Gomez-Gutierrez SV, Goodwin SB. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Plant Pathogens in Wheat (*Triticum aestivum*). *Front Plant Sci*. 2022 Mar 15;13:857673. doi: 10.3389/fpls.2022.857673. PMID: 35371152; PMCID: PMC8965322.
22. Le, D.T., Vu, N.T. Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases. *Appl Biol Chem* 60, 169–180 (2017). URL: <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0267-y>
23. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. 2002 Jun;16(3):223-9. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12144774/>
24. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):E63. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10871386/>
25. Amaral, C., Antunes, W., Moe, E. et al. A molecular test based on RT-LAMP for rapid, sensitive and inexpensive colorimetric detection of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Sci Rep* 11, 16430 (2021). URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95799-6>
26. Zhang ZY, Liu XJ, Li DW, Yu JL, Han CG. Rapid detection of wheat yellow mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virol J*. 2011 Dec

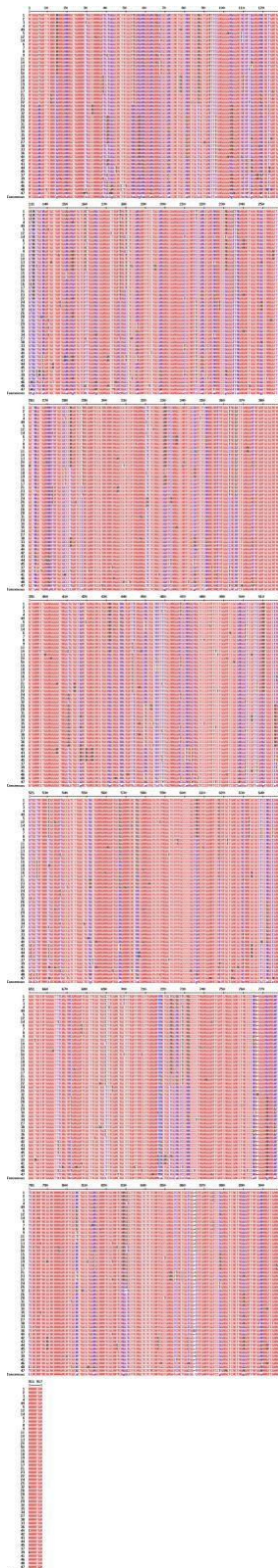
20;8:550. URL: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-550>

27. Eiken Genome Site. RT-LAMP method. URL: <https://loopamp.eiken.co.jp/en/lamp/0205.html> (дата звернення: 10.03.2025).
28. В.М Попов С.В Лиманська Г.Є Чернишенко Ю.М Тереняк. ОСНОВИ БІОІНФОРМАТИКИ. URL: https://repo.btu.kharkov.ua/bitstream/123456789/32083/1/NP_OSNOVY_BIOINFORMATYKY_21.pdf.
29. Genome Browser IUPAC Codes. UCSC Genome Browser Home. URL: <https://genome.ucsc.edu/goldenPath/help/iupac.html> (date of access: 17.05.2025).
30. Shalaby, A. A., M. K. Nakhla, A. M. Soliman, H. M. Mazyad, A. Hadidi and D. P. Maxwell (2002). Development of a highly sensitive multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (m-RT-PCR) method for detection of three potato viruses in a single reaction and nested PCR. Arab J . Biotech. 5(2): 275-286. URL: https://www.researchgate.net/publication/237806046_Development_of_a_highly_sensitive_multiplex_reverse_transcription-polymerase_chain_reaction_m-RT-PCR_method_for_detection_of_three_potato_viruses_in_a_single_reaction_and_nested_PCR
31. Topkaya Ş, Çelik A, Santosa AI, Jones RAC. Molecular Analysis of the Global Population of Potato Virus S Redefines Its Phylogeny, and Has Crop Biosecurity Implications. Viruses. 2023 Apr 30;15(5):1104. doi: 10.3390/v15051104. PMID: 37243190; PMID: PMC10224158. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10224158/>

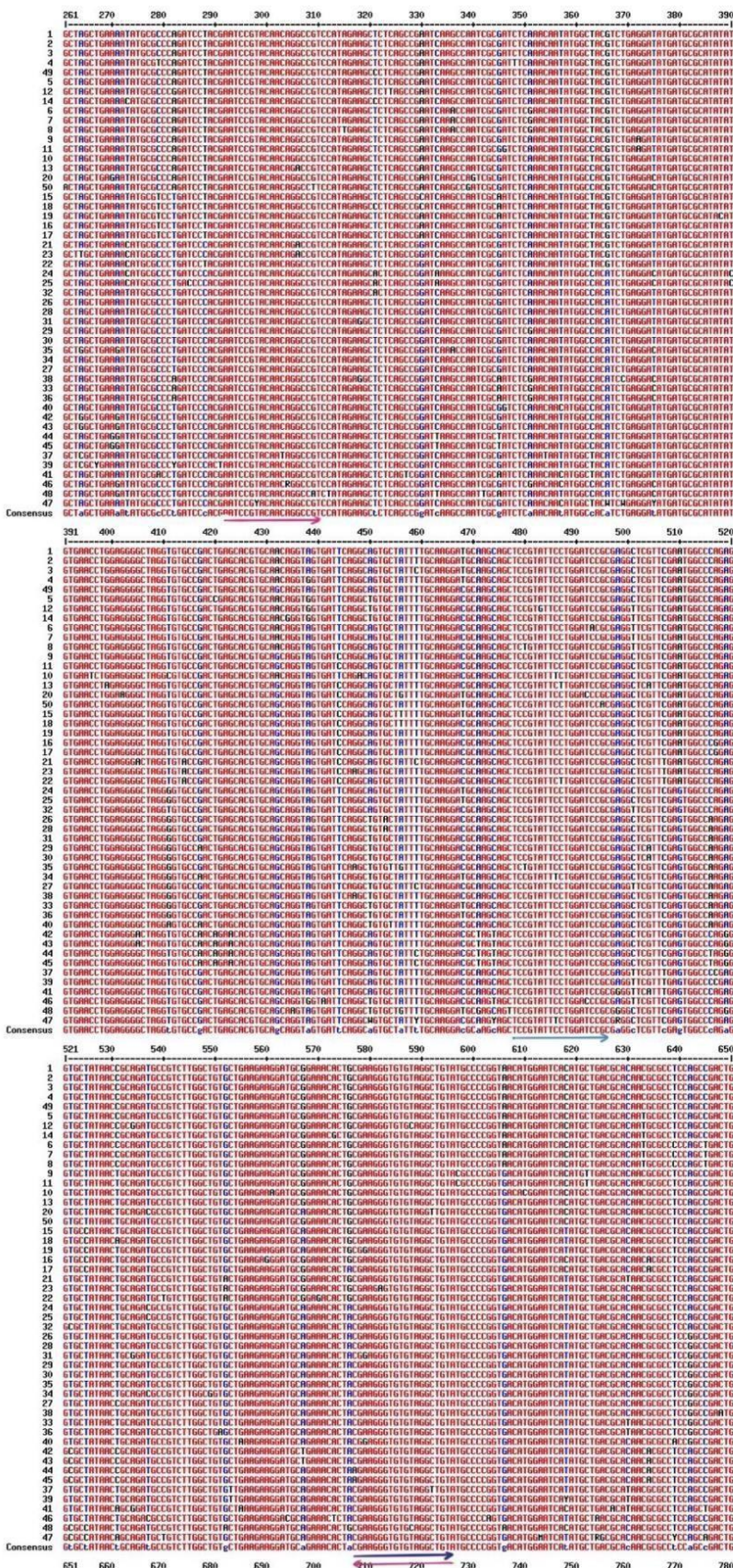
ДОДАТКИ

Додаток А

Ізоляти і їхній консенсус



Розміщення праймерів на геномі



Розміщення праймерів на геномі

