

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

« ЗАТВЕРДЖУЮ »

Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології

Коломієць Ю.В.

протокол № 9 від «28» квітня 2022р.
вченої ради факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології

« РОЗГЛЯНУТО І СХВАЛЕНО »

на засіданні кафедри фітопатології ім. акад.
В.Ф. Пересипкіна протокол

№ 10 від «21» квітня 2022р.

Завідувач кафедри Гентош Д.Т.

Гарант ОП 202 «Захист і карантин рослин»

М. Доля проф. Доля М.М.

РОБОЧА ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
МОЛЕКУЛЯРНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ХВОРОБ РОСЛИН

Рівень вищої освіти – третій (освітньо-науковий) рівень

Галузь знань – 20 АГРАРНІ НАУКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВО

Спеціальність – 202 ЗАХИСТ І КАРАНТИН РОСЛИН

Освітньо-наукова програма – 202 ЗАХИСТ І КАРАНТИН РОСЛИН

Розробники: д.б.н., проф. Крючкова Л.О., к. б. н., с.п.с. Волощук Н.М.

1. Опис навчальної дисципліни
МОЛЕКУЛЯРНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ХВОРОБ РОСЛИН

Галузь знань, спеціальність, освітній ступінь		
Галузь знань	20 Аграрні науки та продовольство	
Освітньо-науковий рівень	Третій	
Освітній ступінь	доктор філософії	
Спеціальність	202 Захист і карантин рослин	
Освітньо-наукова програма	Захист і карантин рослин	
Характеристика навчальної дисципліни		
Вид	вибіркова	
Загальна кількість годин	150	
Кількість кредитів ECTS	5	
Кількість змістових модулів	не передбачено	
Курсовий проект (робота)	не передбачено	
Форма контролю	екзамен	
Показник навчальної дисципліни для денної та заочної форми навчання		
	денна форма навчання	заочна форма навчання
Рік підготовки (курс)	1	1
Семестр	2	2
Лекційні заняття	30	30
Практичні, семінарські заняття	30	30
Лабораторні заняття		
Самостійна робота	90	90
Індивідуальні завдання		
Кількість тижневих аудиторних годин для денної форми навчання	4	4

(п'ять)

1. Мета та завдання навчальної дисципліни

Основна мета навчальної дисципліни – оволодіння сучасними методами досліджень у фітопатології, вміти користуватися біохімічними та молекулярно-генетичними методами досліджень. Отримані знання – це основа більш ефективного, науково-обґрунтованого екологічно безпечного захисту сільськогосподарських культур від інфекційних захворювань.

У результаті вивчення навчальної дисципліни аспірант повинен:

знати:

- методи ідентифікації збудників хвороб рослин як за культурально-морфологічними ознаками, так і за допомогою сучасних технологій, що передбачає дослідження геному та метаболітів;
- загальну характеристику збудників хвороб рослин: грибів, вірусів, віроїдів, бактерій, мікоплазм, нематод; їх співвідношення в загальному патогенному комплексі культурних рослин; їх відмінності за розміром та способами ідентифікації;
- мікроскопічні методи ідентифікації грибів, нематод, бактерій, вірусів;
- методи світлової, люмінесцентної і флуорисцентної мікроскопії, використання радіоактивних та флуорисцентних міток у мікроскопії біологічних об'єктів;
- методи електронної мікроскопії при ідентифікації вірусів; використання імунферментного аналізу та імунно-електронної мікроскопії;
- методи біохімічних досліджень бактерій та дріжджів;
- метод гель-електрофорезу: ідентифікація віроїдів методом гель-електрофорезу та інші приклади використання гель-електрофорезу: розділення фрагментів ДНК, електрофоретичне розділення продуктів ПЛР-аналізу;
- молекулярні методи ідентифікації видів, використання ДНК-зондів для ідентифікації вірусів і віроїдів, ПЛР-аналіз, секвенування;
- методи аналізу структури і експресії генів.

вміти:

- за симптоматикою хвороби правильно визначати тип збудника;
- правильно визначати методологію ідентифікації видової належності фітопатогена в залежності від типу захворювання;
- проводити видову ідентифікацію збудників хвороб рослин з використанням сучасних мікроскопічних, біохімічних, молекулярно-генетичних методів досліджень;

Інтегральна компетентність

Здатність продукувати нові ідеї, розв'язувати комплексні проблеми в галузі професійної, в тому числі дослідницько-інноваційної діяльності у сфері захисту рослин, проводити власне наукове дослідження, результати якого мають наукову новизну, теоретичне та практичне значення

Загальні компетентності

ЗК01. Здатність до абстрактного мислення, аналізу і синтезу.

ЗК02. Здатність до пошуку, оброблення та аналізу інформації з різних джерел.

ЗК03. Здатність працювати в міжнародному контексті.

ЗК04. Здатність розв'язувати комплексні проблеми у сфері захисту і карантину рослин на основі системного наукового світогляду та загального культурного кругозору із дотриманням принципів професійної етики та академічної доброчесності.

Спеціальні (фахові, предметні) компетентності

СК4. Здатність інтегрувати знання з різних галузей, застосовувати системний підхід та враховувати нетехнічні аспекти при розв'язанні наукових та інноваційних задач у сфері захисту та карантину рослин.

Програмні результати

РН4. Розробляти та реалізовувати наукові та інноваційні інженерні проекти, які дають можливість переосмислити наявне та створити нове цілісне знання та професійну практику і розв'язувати значущі наукові та технологічні проблеми захисту та карантину рослин з урахуванням соціальних, економічних, екологічних та правових аспектів.

РН7. Застосовувати загальні принципи та методи математики, інформатики та інших наук, а також сучасні методи та інструменти, цифрові технології та спеціалізоване програмне забезпечення для провадження досліджень у сфері захисту та карантину рослин.

РН8. Розробляти та досліджувати концептуальні та комп'ютерні моделі процесів і систем, ефективно використовувати їх для отримання нових знань та/або створення інноваційних продуктів у сфері захисту та карантину рослин та дотичних міждисциплінарних напрямках, розробляти та організовувати спеціальні фітосанітарні заходи із захисту та карантину рослин.

РН10. Розробляти і застосовувати ефективні методи та інструменти спостереження, опису, ідентифікації, класифікації, культивування шкідливих об'єктів агробіоценозів України, ЄС і світу.

2. Програма навчальної дисципліни

Тема лекційного заняття 1. Загальна характеристика збудників хвороб рослин. Гриби, віруси, віроїди, бактерії, нематоди. Їх частка в загальному патогенному комплексі культурних рослин. Відмінності за розміром та способами ідентифікації.

Тема лекційного заняття 2. Прокаріоти і еукаріоти. Будова гена у прокаріотів і еукаріотів. Вірусні геноми.

Тема лекційного заняття 3. Мікроскопічні методи ідентифікації грибів, нематод, бактерій, вірусів. Світлова мікроскопія. Люмінесцентна і флуорисцентна мікроскопія. Використання радіоактивних та флуорисцентних міток. Флуорофори. Флуорисцентні білки. Конфокальний мікроскоп.

Тема лекційного заняття 4. Електронна мікроскопія. Ідентифікація вірусів. Імунно-ферментний аналіз. Імунно-електронна мікроскопія.

Тема лекційного заняття 5. Метаболітні профілі. Біохімічні дослідження бактерій.

Тема лекційного заняття 6. Метод гель-електрофорезу. Ідентифікація віроїдів методом гель-електрофорезу. Інші приклади використання гель-електрофорезу: розділення фрагментів ДНК, електрофоретичне розділення продуктів ПЛР-аналізу. Електрофорез в денатуруючих умовах.

Тема лекційного заняття 7. Молекулярні методи ідентифікації видів. Хімічна будова ДНК. Напрямок полінуклеотидного ланцюга. Принцип комплементарності. Шлях передачі інформації в живих клітинах. Організація геномів. Гени РНК і білкові гени. Явище гібридизації ДНК.

Тема лекційного заняття 8. Використання ДНК-зондів для ідентифікації вірусів і віроїдів. Клонування ДНК. Геномні бібліотеки. ПЛР-аналіз.

Тема лекційного заняття 9. Секвенування. Секвенування за Максамом і Гілбертом. Секвенування за Сенджером. Секвенування нового покоління. Секвенування за допомогою синтезу. Піросеквенування. Біоінформатика.

Тема лекційного заняття 10. Аналіз структури і експресії генів. Блот-гібридизація. Фінгерпринтинг.

3. Структура навчальної дисципліни

Назва теми	Кількість годин											
	денна форма						заочна форма					
	усього			у тому числі			усього			у тому числі		
	л	п	інд	л	п	інд	с.р.	л	п	інд	с.р.	
Тема 1. Загальна характеристика збудників хвороб рослин.	8	3	-				5	3	-		5	
Тема 2. Морфологічний метод ідентифікації грибів, бактерій, вірусів. Методи мікроскопії.	17	3	4				10	3	4		10	
Тема 3. Біохімічний метод ідентифікації збудників хвороб рослин. Метаболічні профілі.	17	3	4				10	3	4		10	
Тема 4. Прокаріоти і еукаріоти. Будова геному у прокаріотів і еукаріотів. Вірусні геноми.	16	3	3				10	3	3		10	
Тема 5. Молекулярний метод ідентифікації видів збудників хвороб рослин. Основні принципи.	17	3	4				10	3	4		10	
Тема 6. Гель-електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелі. Спектрофотометрія нуклеїнових кислот.	11	3	3				5	3	3		5	
Тема 7. Основи полімеразної ланцюгової реакції.	16	3	3				10	3	3		10	
Тема 8. ПЛР у реальному часі та аналіз отриманих даних.	16	3	3				10	3	3		10	
Тема 9. Гібридизація нуклеїнових кислот, ДНК-фінгерпрингінг. Дот блот аналіз.	16	3	3				10	3	3		10	
Тема 10. Секвенування нуклеїнових кислот.	16	3	3				10	3	3		10	
Усього годин	150	30	30				90	30	30		90	

4. Теми практичних занять

№ з/п	Назва теми	Кількість годин
1	Ідентифікація грибів – збудників хвороб рослин за морфологічними ознаками різними методами мікроскопії.	3
2	Ідентифікація фітопатогенних бактерій за морфологічними ознаками та тинкторіальними властивостями різними методами мікроскопії.	3
3	Ідентифікація рослинних вірусів за морфологічними ознаками.	3
4	Ідентифікація збудників-хвороб рослин за біохімічними властивостями.	3
5	Молекулярний метод ідентифікації. Виділення ДНК та РНК збудників хвороб рослин. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК і РНК.	3
6	Якісний і кількісний аналіз препаратів нуклеїнових кислот за допомогою гель-електрофорезу в агарозному гелі.	3
7	Фінгерпринтинг.	3
8	Полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР).	3
9	Кількісний аналіз експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі.	3
10	Підготовка зразків для секвенування. Аналіз секвенування нуклеотидних послідовностей.	3
	Всього	30

5. Методи навчання

Під час вивчення дисципліни використовуються нормативні документи, наочне обладнання, комп'ютерні програми з відповідним програмним забезпеченням, наочні стенди, каталоги нормативних документів, Закони України тощо.

6. Форми контролю

1. Усний і письмовий поточний контроль знань.
2. Формою самостійної роботи здобувача є вивчення спеціальної літератури та виконання індивідуальних завдань.
3. Екзамен

7. Методичне забезпечення

Науково-методичне забезпечення навчального процесу передбачає: державні стандарти, навчальні плани, підручники і навчальні посібники; інструктивно-методичні матеріали лабораторних занять; індивідуальні навчально-дослідні завдання; контрольні роботи; текстові та електронні

варіанти тестів для поточного і підсумкового контролю, методичні матеріали для організації самостійної роботи здобувачів.

8. Рекомендована література

1. Выделение и идентификация бактерий. Методические рекомендации / Сост. О.И. Винникова, А.М. Самойлов, Ю.В. Попова. Харьков: ХНУ им. В.Н. Каразина, 2011. 60 с.
2. Методичні рекомендації до розділу «Молекулярна біотехнологія» курсу «Загальна біотехнологія». // Драницина А. С., Савчук О. М., Гребіник Д. М., Кравченко О.О., Остапченко Л. І. – К. – 2018. – 185 с.
3. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.Й. Билай. К.: Наук. Думка, 1982. 550 с.
4. Молекулярна біологія клітини: навч. посіб. Ніжин: НДУ ім. М. Гоголя, 2021. – 135 с.
5. Основи молекулярної біології (курс лекцій). – Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 255 с.
6. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія. Підручник. К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет». 2008. 384 с.
7. Bioinformatics and data analysis in microbiology / ed. O. Bishop. Caister Academic Press. 2014. 248p.
8. Browning IA. Bioassay for diagnosis of plant viruses. *Methods Mol Biol.* 2009;508:1-13. doi: 10.1007/978-1-59745-062-1_1.
9. Fang Y, Ramasamy RP. Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. *Biosensors (Basel).* 2015 Aug 6;5(3):537-61. doi: 10.3390/bios5030537.
10. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition. Edited by N.W. Schaad, J.B. Jones, and W. Chun, St Paul, USA: American Phytopathological Society Press. – 2001. – 373 pp.
11. Molecular Identification of Fungi. Ed. Y. Gherbawy, K. Voigt. – 2014. – Springer. – P. 512.
12. Raja H. A., Miller A. N., Pearce C. J., Oberlies N. H. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. / *J. Nat. Prod.* 2017. – Vol. 80, P. 756–770. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085
13. Rubio L, Galipienso L and Ferriol I (2020) Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Front. Plant Sci.* 11:1092. doi: 10.3389/fpls.2020.01092
14. Srinivasa C., Sharanaiah U., Shivamallu C. Molecular detection of plant pathogenic bacteria using polymerase chain reaction single-strand

9. Інформаційні ресурси

1. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308960-002-gb-b-apiweb-booklet.pdf>
2. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch
3. <https://www.mycobank.org/>
4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
5. <https://universe84a.com/collection/api-test-bacteria/>
6. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
7. Database of Genotype and Phenotype ([ncbi.nlm.nih.gov/dbgap](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbgap))

10. Контрольні питання для визначення рівня засвоєння знань здобувачами

1. Етапи діагностики інфекційних хвороб рослин.
2. Методи діагностики хвороб рослин.
3. Методи ідентифікації збудників хвороб рослин.
4. Наведіть приклади інструментальних методів, які використовуються для діагностики хвороб рослин та ідентифікації збудників.
5. Опишіть мікроскопічні методи ідентифікації мікроорганізмів-збудників хвороб рослин.
6. Які збудники хвороб рослин відносяться до мікроорганізмів? Укажіть розміри окремих груп мікроорганізмів-збудників хвороб рослин.
7. В яких одиницях вимірюють розміри мікроорганізмів?
8. Яке збільшення необхідне для візуалізації таких фітопатологічних об'єктів: спор, плодових тіл мікроміцетів, бактерій, вірусів, мікоплазм, нематод?
9. Скільки видів мікроскопічних грибів описано на даний час, скільки серед них збудників хвороб рослин?
10. Несправжні гриби, подібність і відмінність між справжніми і несправжніми грибами.
11. Класичні та сучасні методи ідентифікації грибів – збудників хвороб рослин.
12. В чому переваги сучасних інструментальних методів в діагностиці грибних хвороб рослин?
13. Хто винайшов оптичний мікроскоп і в якому столітті?
14. Які типи оптичної мікроскопії Ви знаєте? Охарактеризуйте розвиток оптичної мікроскопії.
15. Історія відкриття вірусів.
16. Історія відкриття бактерій.
17. Розміри вірусів, одиниці вимірювання.
18. Наведіть приклади розмірів бактерій, мікоплазм, вірусів.

19. Що таке віроїди, чим вони відрізняються від вірусів?
20. Що таке віріони?
21. Охарактеризуйте класичні і сучасні методи діагностики вірусів. Дайте їм порівняльну оцінку.
22. В яких одиницях вимірюються розміри геномів мікроорганізмів?
23. Наведіть приклади розміру геномів віруса, мікоплазми, бактерії, гриба.
24. У чому відмінності між прокаріотами та еукаріотами?
25. Який відсоток становлять кодуючі послідовності в геномі бактерії?
26. Який відсоток становлять кодуючі послідовності в геномах грибів?
27. Які мікроорганізми домінують у ґрунті за чисельністю?
28. Які мікроорганізми домінують у ґрунті за біомасою?
29. В яких одиницях вимірюється чисельність мікроорганізмів у ґрунті?
30. До групи яких мікроорганізмів за сучасною систематикою належать актиноміцети, мікоплазми, рикетсії?
31. У чому полягає унікальність актиноміцетів? Наведіть приклади актиноміцетних хвороб рослин.
32. У чому полягає унікальність мікоплазм? Симптоми мікоплазмових хвороб рослин.
33. Методи діагностики мікоплазмових хвороб рослин.
34. Що таке роздільна здатність мікроскопу? Укажіть роздільну здатність людського ока, світлового мікроскопа, електронного мікроскопа.
35. Які групи мікроорганізмів-збудників хвороб рослин можна ідентифікувати за допомогою світлового мікроскопа?
36. Що покладено в основу ідентифікації виду мікроміцета за допомогою світлового мікроскопа?
37. Для ідентифікації яких збудників хвороб рослин використовується імуноелектронна мікроскопія?
38. Завдяки винаходу якого типу мікроскопу стала можлива візуалізація грибів?
39. Завдяки винаходу якого типу мікроскопу стала можлива візуалізація бактерій?
40. Завдяки винаходу якого типу мікроскопу стала можлива візуалізація вірусів?
41. Завдяки винаходу якого типу мікроскопу стала можлива візуалізація нематод?
42. Завдяки винаходу якого типу мікроскопу стала можлива візуалізація мікоплазм?
43. Використання явища флуорисцентності в дослідженнях біологічних об'єктів.
44. Флуорисцентний.
45. Конфокальний мікроскоп.
46. Електронна мікроскопія. Які типи електронних мікроскопів Ви знаєте? Порівняйте їх можливості.
47. Метаболітні профілі мікроорганізмів і їх використання в ідентифікації збудників хвороб рослин.

48. Для ідентифікації яких видів мікроорганізмів використовують біохімічні тести?
49. Наведіть приклади грам-позитивних і грам-негативних бактерій – збудників хвороб рослин.
50. Охарактеризуйте серологічний метод ідентифікації мікроорганізмів.
51. Метод імуноферментного аналізу і його використання в діагностиці хвороб рослин.
52. Опишіть метод гель-електрофорезу і його використання в дослідженні біологічних об'єктів.
53. Для ідентифікації яких збудників хвороб рослин використовують гель-електрофорез?
54. Завдяки чому при гель-електрофорезі відбувається розділення субстанцій?
55. Наведіть приклади використання «міток» в дослідженнях біологічних об'єктів.
56. Назвіть інструментальні методи дослідження біологічних об'єктів, в яких використовуються такі мітки: барвник, флуорофор, білок, радіоактивний С.
57. Охарактеризуйте метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-аналіз).
58. Яка властивість ланцюга ДНК лежить в основі даної реакції?
59. Який метод ідентифікації віроїдів можна вважати передвісником методу ПЛР?
60. Історія винаходу ПЛР-аналізу.
61. Які основні етапи ПЛР-аналізу?
62. Обладнання, необхідне для ПЛР-аналізу. Термоциклери.
63. Що таке праймери?
64. Опишіть роль ДНК-полімерази в методі ПЛР.
65. Структура ДНК. Нуклеотиди, нуклеозиди, нуклеозидтрифосфати, дезоксинуклеозидтрифосфати.
66. Азотисті основи ДНК і РНК.
67. Пентози у складі нуклеїнових кислот.
68. Як відбувається синтез нуклеїнових кислот? В якому напрямку записуються нуклеотиди у ланцюгу ДНК при їх синтезі?
69. Наведіть приклади послідовностей нуклеотидів і розшифруйте їх.
70. Наведіть приклади структурних формул ділянок ДНК (РНК).
71. Що означає принцип комплементарності у нуклеїнових кислотах?
72. В сонві яких молекулярних методів біології лежить принцип комплементарності ДНК?
73. Що таке реплікація ДНК? Основний матеріал, який необхідний для реплікації ДНК.
74. Що таке ренатурація і денатурація ДНК?
75. Що таке рестрикція? Рестриктази.
76. В яких одиницях вимірюються фрагменти ДНК. Розмір праймерів.
77. Рестриктази і лігаза у ПЛР.
78. Трансформація ДНК.

79. Що таке «липкі кінці» у фрагментів ДНК (РНК)?
80. Використання методу гель-електрофрезу в ПЛР.
81. ПЛР в реальному часі.
82. Що таке «експресія генів»? Як визначається експресія генів у молекулярних дослідженнях?
83. Етапи синтезу білка: трансляція, транскрипція.
84. Біосенсорний аналіз в діагностиці хвороб та ідентифікації збудників.
85. Метод мікроареїв. Наведіть приклади використання методу мікроареїв в дослідженнях біологічних об'єктів та їх функцій.
86. Секвенування. Історія секвенування ДНК. Секвенатори.
87. Які інструментальні методи використовують для ідентифікації мікроскопічних грибів-збудників хвороб рослин?
88. Які інструментальні методи використовують для ідентифікації бактерій – збудників хвороб рослин?
89. Які інструментальні методи використовують для ідентифікації вірусів-збудників хвороб рослин?
90. Які інструментальні методи використовують для ідентифікації віроїдів-збудників хвороб рослин?
91. Які інструментальні методи використовують для ідентифікації мікоплазм-збудників хвороб рослин?
92. Які інструментальні методи використовують для ідентифікації нематод-збудників хвороб рослин?
93. Опишіть етапи діагностики грибної хвороб яблуні на прикладі чорного раку, та методи, які б вами використовувалися.
94. Опишіть етапи діагностики грибної хвороби пшениці на прикладі фузаріозу колоса та методи, які будуть використовуватися.
95. Опишіть етапи та методи досимптомної діагностики прикореневої гнилі пшениці на прикладі церкоспорельозу.
96. Опишіть етапи та методи діагностики вірусної хвороби рослини на прикладі ризоманії цукрового буряка.
97. Опишіть етапи та методи діагностики бактеріальної хвороби рослини на прикладі звичайної парші картоплі.
98. Опишіть етапи та методи діагностики віроїдної хвороби рослини на прикладі веретеноподібності бульб картоплі.
99. Опишіть етапи та методи діагностики нематодозу рослини на прикладі гетеродерозу цукрового буряка.
100. Опишіть етапи та методи діагностики мікоплазмової хвороби рослини на прикладі стовбура томатів.