

Звіт про роботу наукового гуртка з «Вірусології» 2019-2020 н.р.



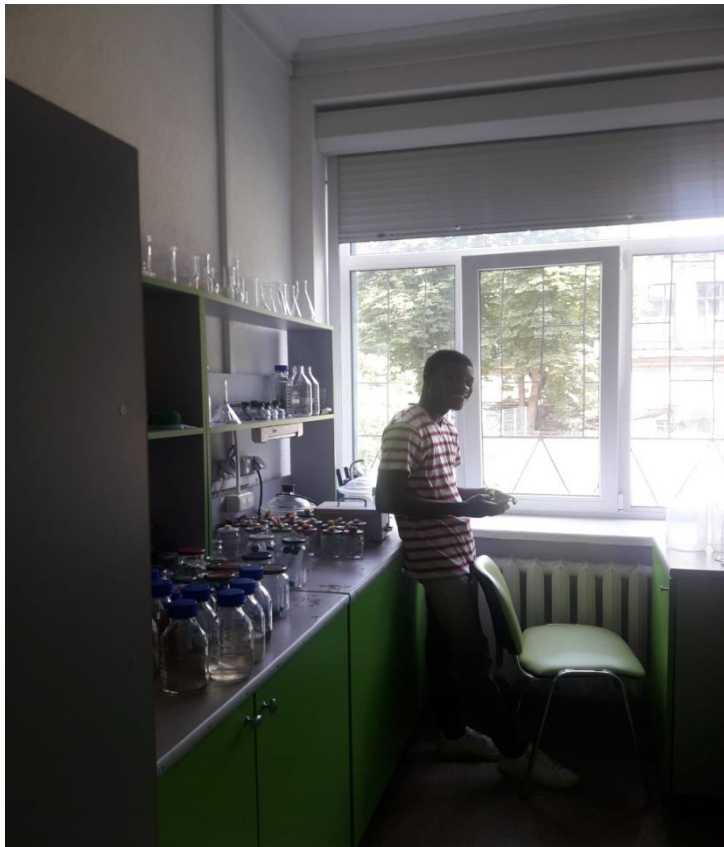
Староста гуртка Дудка Лілія,
4 курс, 2 гр



Заступник старости гуртка Дзуг Марина,
1
4 курс, 2 гр

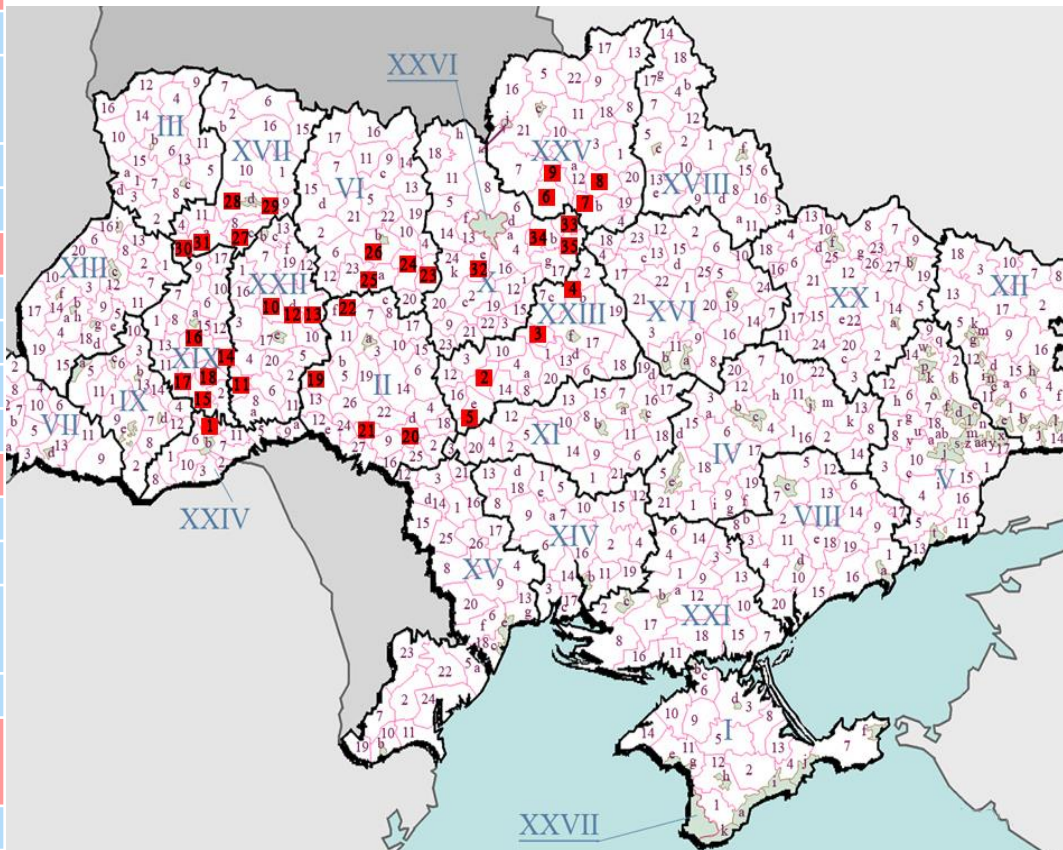


** Наукова спрямованість* гуртка оволодіння основними методами у роботі з інфекційним рослинним матеріалом, проведення діагностики та ідентифікації вірусів цінних сільськогосподарських культур різними методами діагностики, також ознайомлення з генетичними особливостями вірусних геномів та з біотехнологічними методами оздоровлення рослин.



СКРИНІНГ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ. ВІДБІР ЗРАЗКІВ.

№	Місце відбору проб
Чернівецька область	
1	Заставнівський р-н
Черкаська область	
2	Маньківський р-н
3	Корсунь-Шевченківський р-н
4	Золотоніський р-н
5	Уманський р-н
Чернігівська область	
6	Бобровицький р-н
7	Прилуцький р-н
8	Ічнянський р-н
9	Носівський р-н
Хмельницька область	
10	Красилівський р-н
11	Чемеровецький р-н
12	Старокостянтинівський р-н
13	Старосинявський р-н
Тернопільська область	
14	Гусятинський р-н
15	Заліщицький р-н
16	Теребовлянський р-н
17	Бучацький р-н
18	Чортківський р-н



№	Місце відбору проб
Вінницька область	
19	Барський р-н
20	Тростянецький р-н
21	Томашпільський р-н
22	Хмільницький р-н
Житомирська область	
23	Попільнянський р-н
24	Андрушівський р-н
25	Бердичівський р-н
26	Житомирський р-н
Рівненська область	
27	Острозький р-н
28	Рівненський р-н
29	Гоцанський р-н
30	Радивилівський р-н
31	Дубенський р-н
Київська область	
32	Васильківський р-н
33	Згурівський р-н
34	Баришівський р-н
35	Яготинський р-н

ОТРИМАННЯ ПОЛІКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ



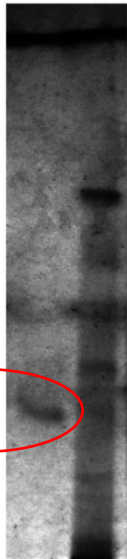
Підтверджена інфекційна природа захворювання рослин цукрових буряків за тріадою Коха

Листкова пластинка рослини-індикатора *B. vulgaris var. saccharifera*: мозаїка та посвітління жилки на поверхні листкової пластинки (18 доба після інокуляції).

Результати визначення титру специфічних антитіл до ВНПЖБ

Розведення	Показники оптичної визначення титру антитіл за довжини хвилі 405 нм			
	Повтори			Середнє значення
	1	2	3	
1:200	1,838	1,841	1,842	1,840
1:400	1,669	1,666	1,668	1,668
1:800	1,327	1,326	1,330	1,328
1:1600	0,957	0,959	0,962	0,960
1:3200	0,674	0,700	0,708	0,694
1:6400	0,456	0,476	0,462	0,465
1:12800	0,234	0,210	0,207	0,217

БО М



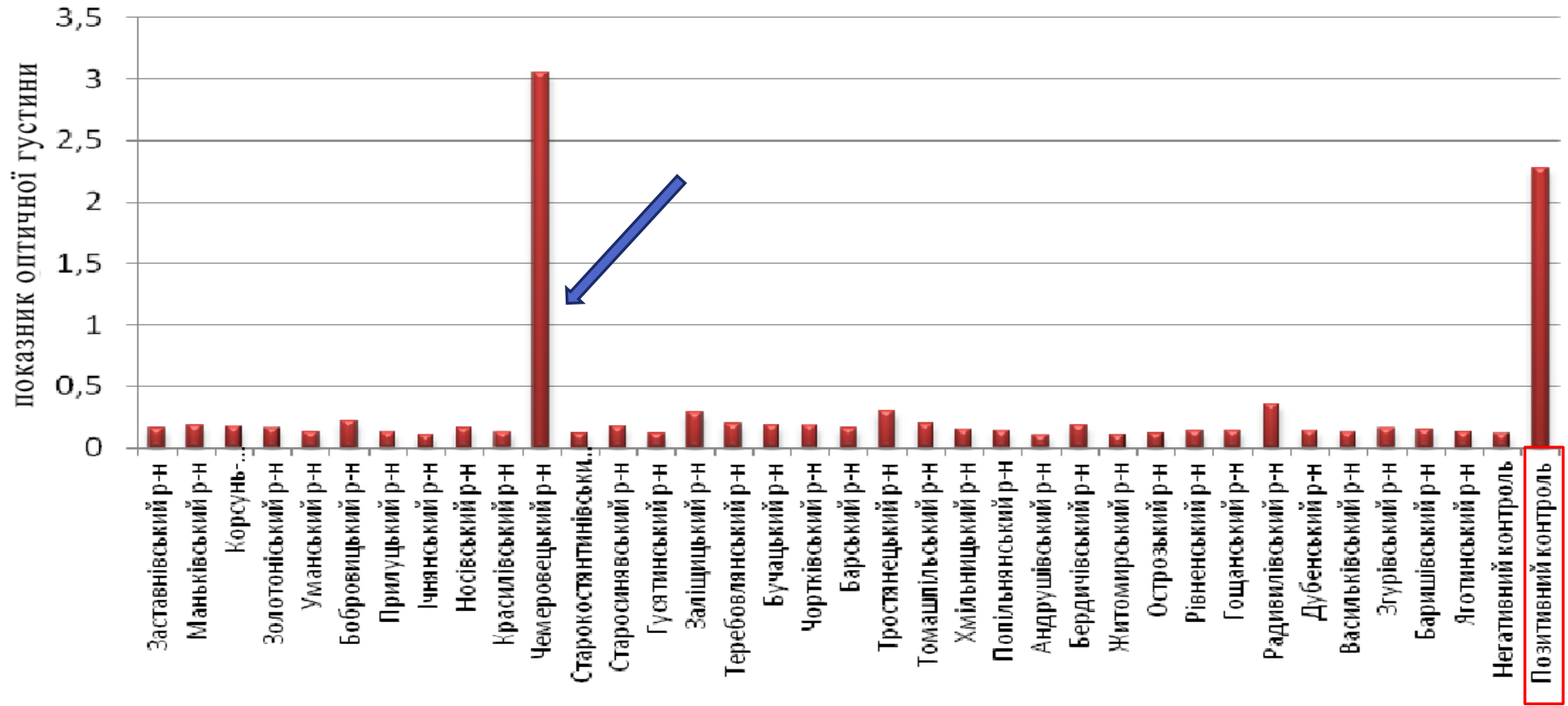
22 кДа

Електрофореграма білка оболонки ВНПЖБ:

БО – вірусний препарат,

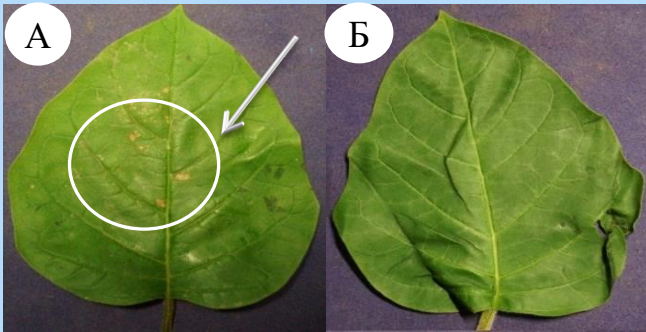
М – маркер.

НАБУТТЯ НАВИЧОК ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

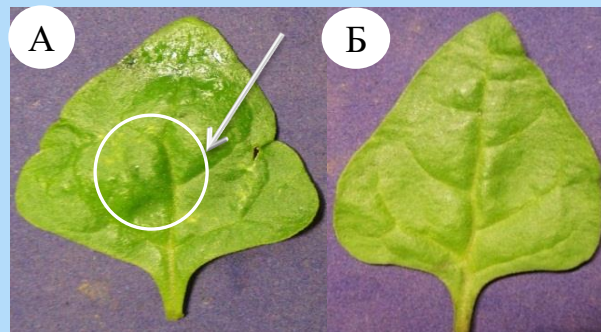


Діаграма імуноферментного аналізу зразків, відібраних в агрофітоценозах України. Отримання навичок роботи з ІФА рідером

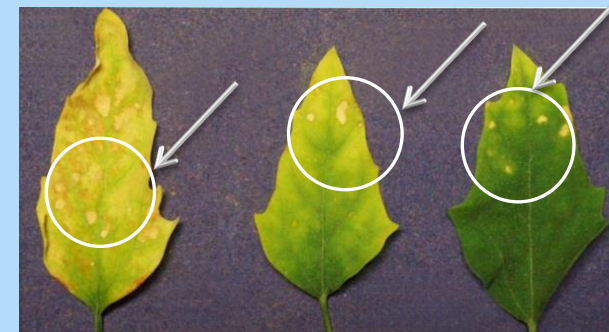
ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ МЕТОДОМ БІОЛОГІЧНОГО ТЕСТУВАННЯ



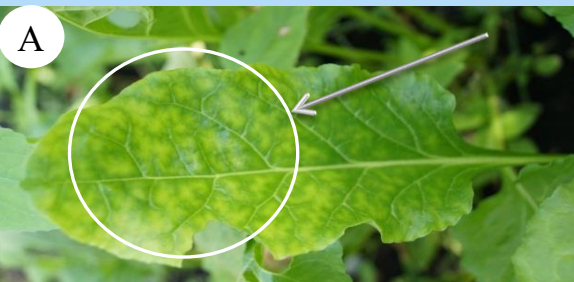
Листкові пластинки рослини-індикатора *Datura metel* L. :
А – некрози на поверхні листової пластинки (14 доба після інокуляції);
Б – контроль (без симптомів ураження).



Листкові пластинки рослини-індикатора *Tetragonia expansa* L.
А – некрози на поверхні листової пластинки,
Б – контроль (без симптомів ураження).



Листкові пластинки рослини-індикатора *Chenopodium murale* L.,
симптоми ураження у вигляді некрозів на поверхні листової пластинки (12 доба після інокуляції).



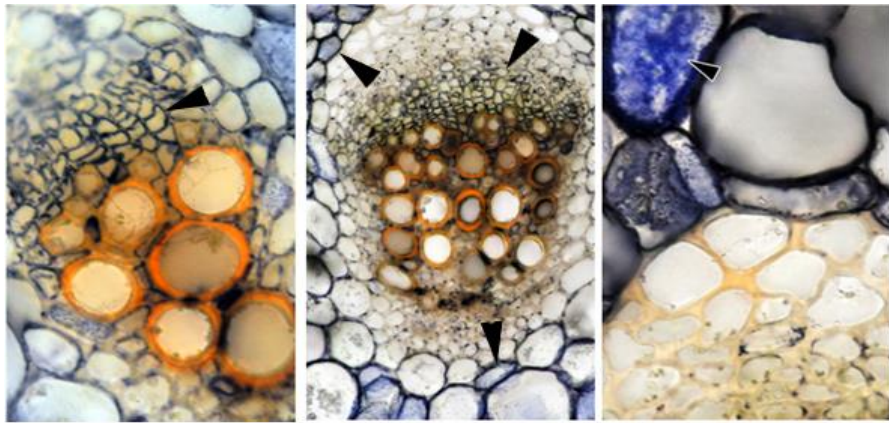
Листкові пластинки рослин-індикаторів *B. vulgaris var. Saccharifera* L.:
А – мозаїка на поверхні листової пластинки (21 доба після інокуляції);
Б – контроль (без симптомів ураження).



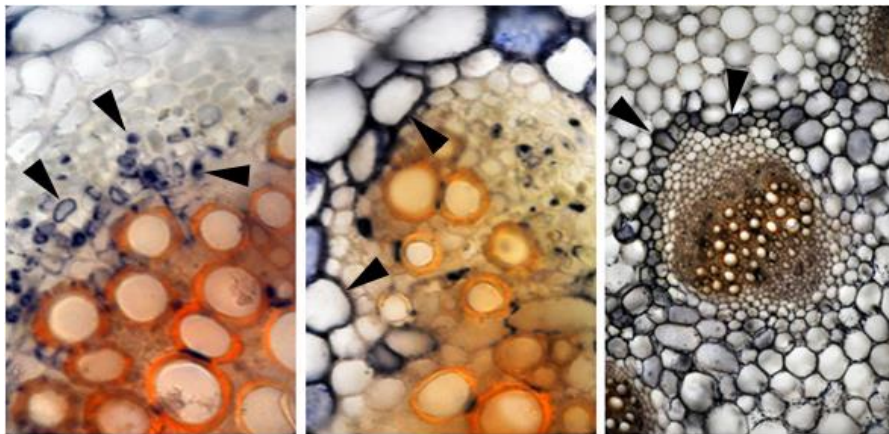
Листкові пластинки рослин-індикаторів:
А – *Gomphrend globosa* L., некрози на поверхні листової пластинки (14 доба після інокуляції);
Б – *G. globosa*, контроль (без симптомів ураження).

ВПЛИВ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НА АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ В ТКАНИНАХ РОСЛИН ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

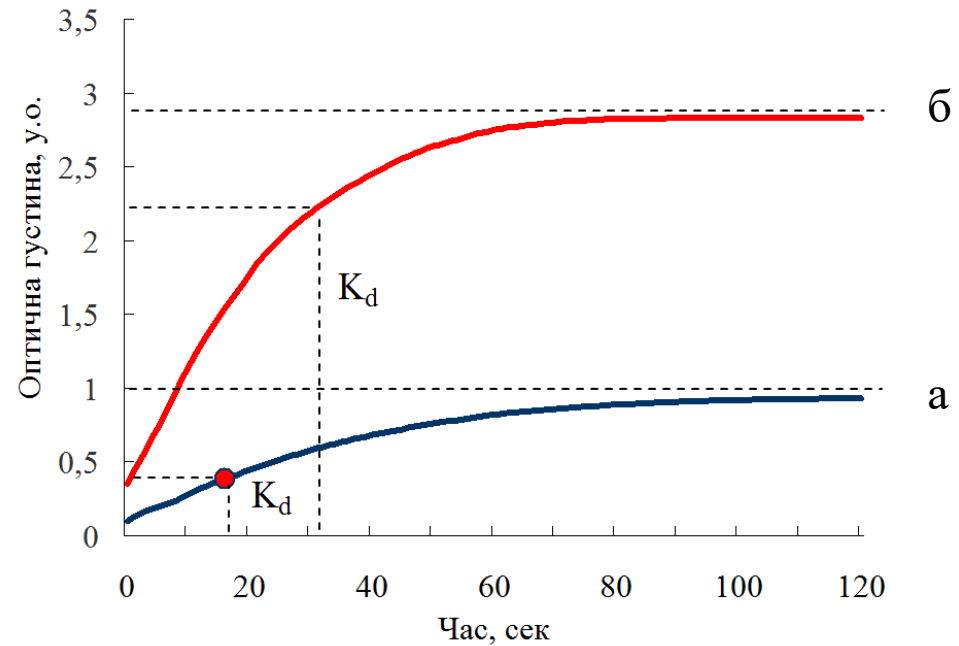
Локалізація пероксидази в тканинах провідних пучків і паренхімі середніх жилок листків цукрових буряків



Неінфікована рослина

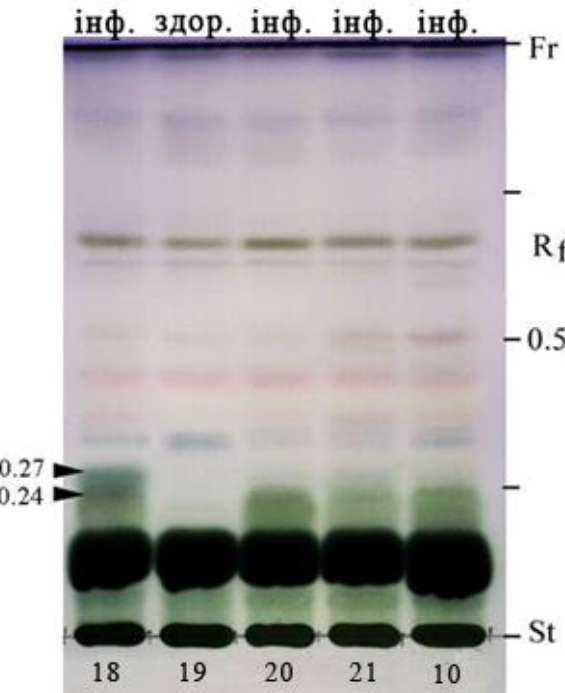


Інфікована рослина

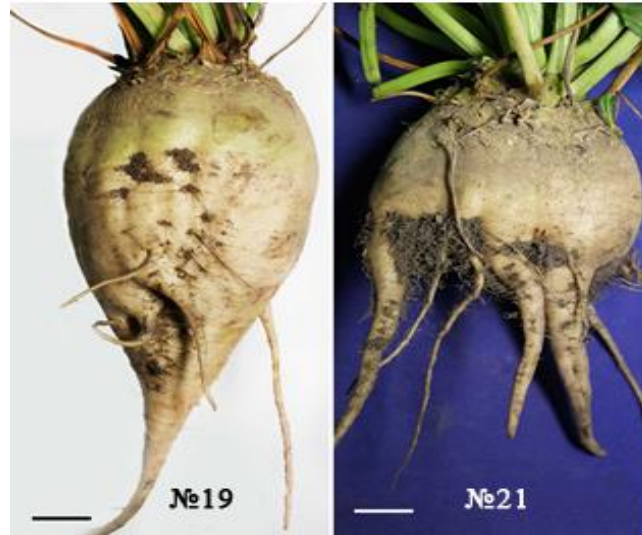


Кінетика ферментативного каталізу вільних та слабкозв'язаних з клітинними стінками пероксидаз: а – неінфікованої, б – інфікованої ВПІЖБ рослини; K_d – час, в який швидкість реакції складає половину від максимальної.

ПРОВЕДЕННЯ ХРОМАТОГРАФІЇ ТЕРПЕНОЇДІВ І ТРИТЕРПЕНОВИХ САПОНІНІВ У ТКАНИНАХ КОРЕНЕПЛОДІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВІРУСІВ НА РОСЛИНИ БУРЯКІВ

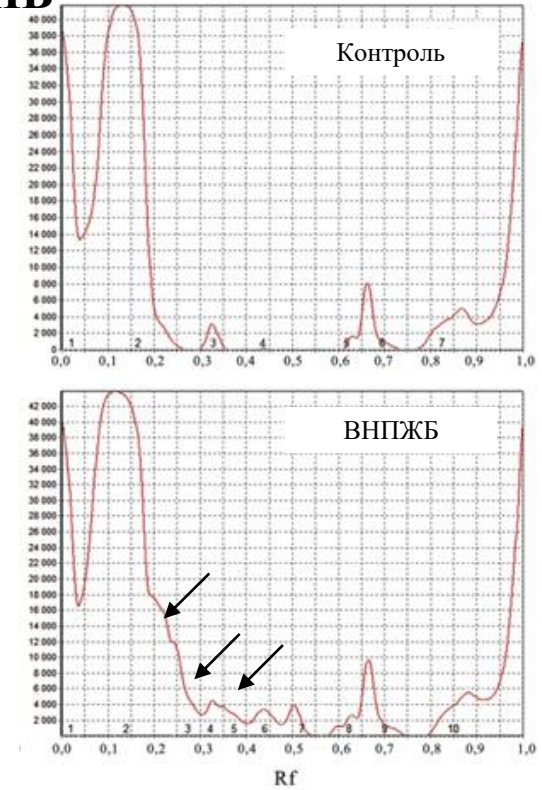


Високоєфективна тонкошарова хроматографія етанольних екстрактів коренеплодів цукрових буряків



коренеплід неінфікованої рослини

коренеплід інфікованої рослини



Фотоденситограма терпеноїдів і тритерпенових сапонінів, що містяться в коренеплодах цукрових буряків

Зразки	Площа піків за показниками Rf, $S \times 10^5$													
	0,12	0,17	0,20	0,24	0,27	0,33	0,36	0,39	0,44	0,50	0,63	0,66	0,88	Σ
№ 19 (Контроль)	24,8	-	-	-	-	0,46	-	-	0,02	-	0,16	1,29	2,08	28,86
№ 10 (ВНПЖБ)	31,8	-	-	1,9	-	0,75	0,88	-	0,92	0,70	0,35	1,82	2,26	41,40

ЕТАПИ ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДІАГНОСТИКИ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Відбір зразків рослин в агроценозах

Екстракція сумарної РНК

Отримання комплементарної ДНК

Полімеразна ланцюгова реакція

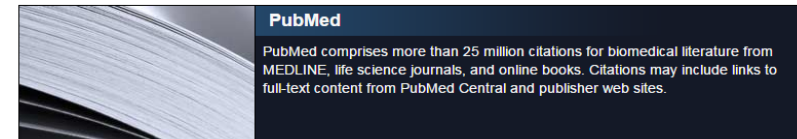
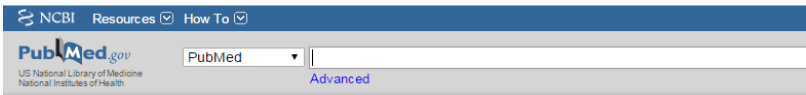
Електрофоретичне розділення молекул
ДНК

Візуалізація продуктів ампліфікації в УФ
променях

Розробка праймерів

Оптимізація параметрів
проведення ПЛР:
- за температурою
відпалу праймерів
- за концентрацією іонів
Магнію

БІОІНФОРМАТИВНИЙ АНАЛІЗ КУЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ВНПЖБ



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:100

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus strain AG9 CP gene, complete cds	1048	1048	100%	0.0	100%	KR825247.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus strain S8 segment RNA 2 read-through coat protein, coat protein, t	1048	1048	100%	0.0	100%	EU330452.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus strain E12 segment RNA 2 read-through coat protein, coat protein, t	1042	1042	100%	0.0	99%	EU330451.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus isolate 1EU coat protein (CP) gene, complete cds	1042	1042	100%	0.0	99%	AY696070.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus isolate A coat protein (CP) mRNA, complete cds	1042	1042	100%	0.0	99%	AY920465.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus P75 gene for capsid protein and P21 gene for coat protein, genom	1042	1042	100%	0.0	99%	AJ634735.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus isolate IV-8 coat protein gene, complete cds	1038	1038	100%	0.0	99%	AY771346.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus CP gene for coat protein, complete cds, isolate: HUM1	1037	1037	100%	0.0	99%	AB563021.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus CP gene for coat protein, complete cds, isolate: SLN1	1037	1037	100%	0.0	99%	AB563019.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus CP gene for coat protein, complete cds, isolate: I81	1037	1037	100%	0.0	99%	AB563010.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus CP gene for coat protein, complete cds, isolate: USM	1037	1037	100%	0.0	99%	AB563030.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beet necrotic yellow vein virus CP gene for coat protein, complete cds, isolate: IF3	1037	1037	100%	0.0	99%	AB563001.1

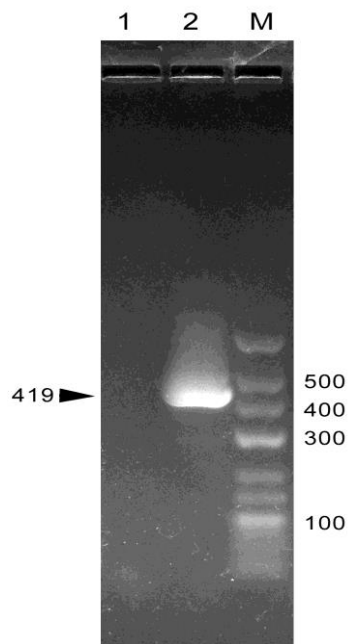
ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAaGTTTATGACCGATC
 GATGGGCcCGTGTTCGGACGTCGTGAGTGTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAA
 GGCTGCGAATCTATCTATAATTAAACTGCTTTGGCAGGATTAGGCTCGGGTTGgaCTGACAAT
 AATCCTTTTGTGTcCCGATGACCCGTTTTCCACAGACACTAACTATGTAcGGTGCaCTTGTGT
 TATATGTTAATCTGTctGACCCAGAATTTGCGTTGATAATGACTAAGgTAAgTACTTTAACTGA
 TTCAGGGTTAGCAGATAAtGCATCTGCTAATGTgCGTAGAGATGTGGTGTcGGaATAAAGCc
 GAATCATCCGGTAAACTGCTGGcACTAATGAGAAtTCTGCTTAcACGCTTAcCGTtAGTCTTG
 CTGGTTTgGCTCAAGCTCTTAGGCTTGAGGAATTAATGTGGACTCGGGATAAgTTTGAGGACCG
 GTTgAAaTTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCCAGTCCACCCGGACAATAG

Результат вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена P21, що кодує БО ВНПЖБ.

Консервативні (заглавні літери) та поліморфні (прописні літери) ділянки генома ВНПЖБ.

Міжнародний генетичний банк даних

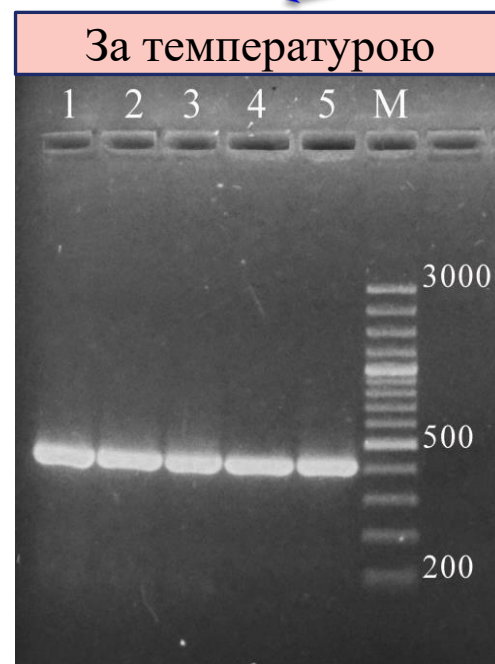
ВІДПРАЦЮВАННЯ МЕТОДУ ПЛР



Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу ураженого зразка цукрового буряку визначення ВНПЖБ.

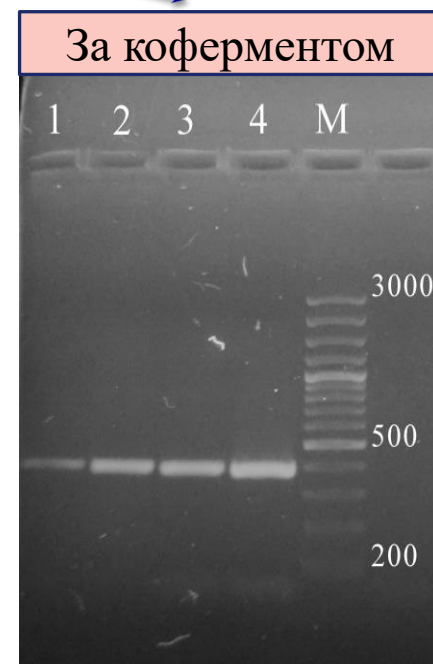
1 – негативний контроль,
2 – зразок,
М – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів).

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ ПРОВЕДЕННЯ ПЛР



Електрофореграма позитивного зразку ВНПЖБ з температурами відпалу праймерів.

1 – 54 °С, 2 – 56 °С,
3 – 58 °С, 4 – 60 °С,
5 – 62 °С,
М – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів).



Електрофореграма позитивного зразку ВНПЖБ з різними концентраціями іонів магнію:

1 – 1,3 мМ, 2 – 1,8 мМ,
3 – 2,0 мМ, 4 – 2,5 мМ.
М – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів).

ІДЕНТИФІКАЦІЯ СЕГМЕНТІВ РНК УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ ВНПЖБ

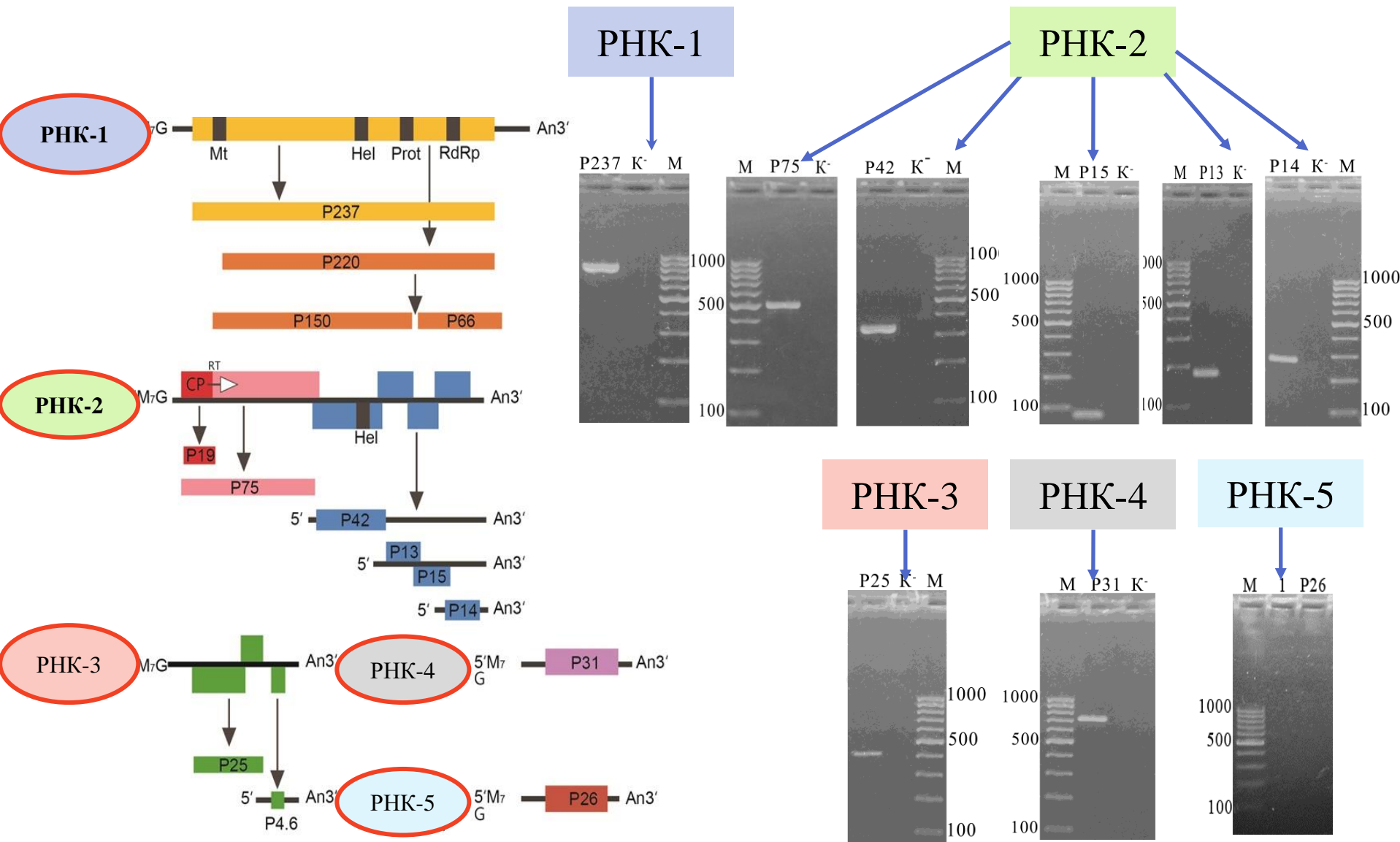
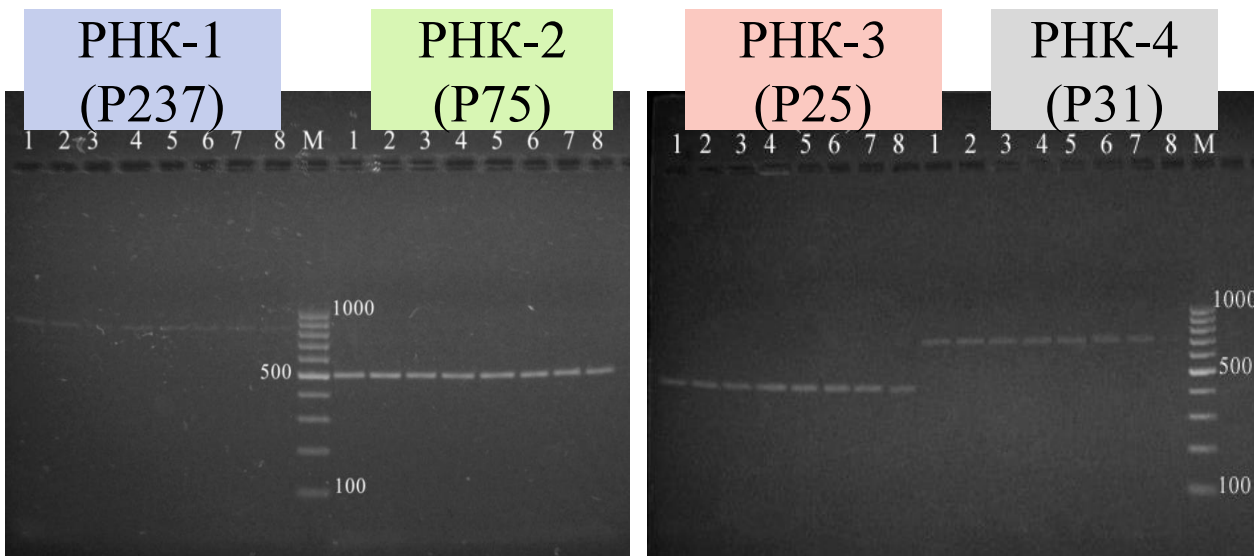


Схема організації геному ВНПЖБ і процесу трансляції

Електрофореграми ідентифікації сегментів РНК ВНПЖБ

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ ПРОВЕДЕННЯ ПЛР. ПРАКТИЧНІ НАВИЧКИ ПРОВЕДЕННЯ ПЛР АНАЛІЗУ. ПІДБІР РІЗНИХ РЕЖИМІВ.

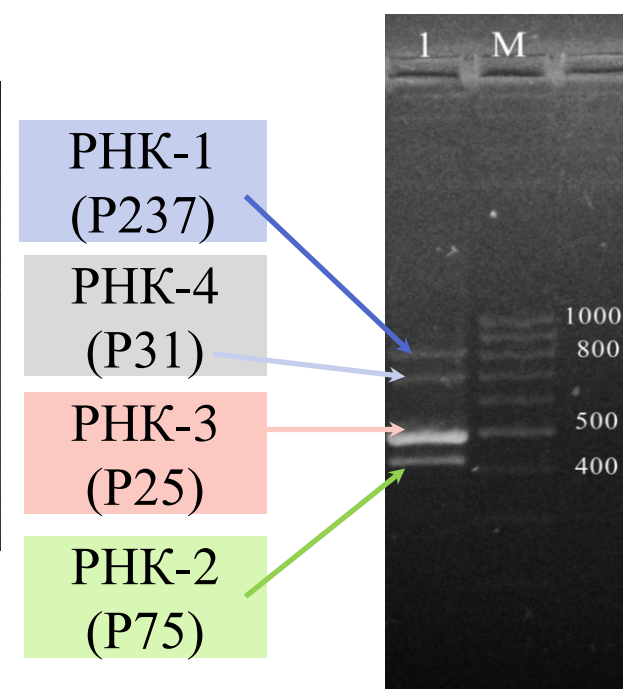


Електрофореграми оптимізації температури відпалу праймерів для ідентифікації сегментів

РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4:

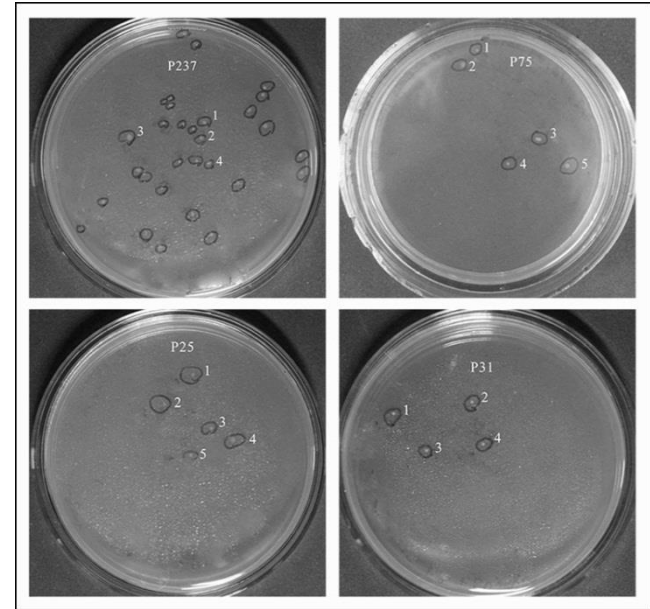
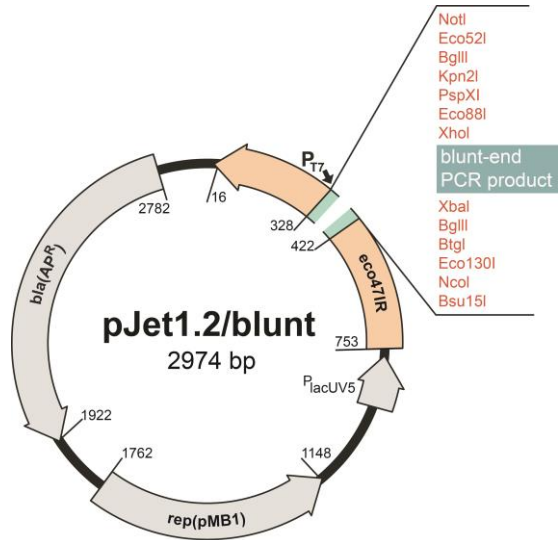
1 – 50 °С, 2 – 52 °С, 3 – 54 °С, 4 – 56 °С,
5 – 58 °С, 6 – 60 °С, 7 – 62 °С, 8 – 64 °С,

М – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів).



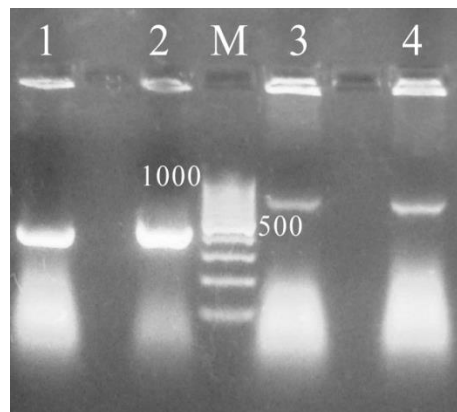
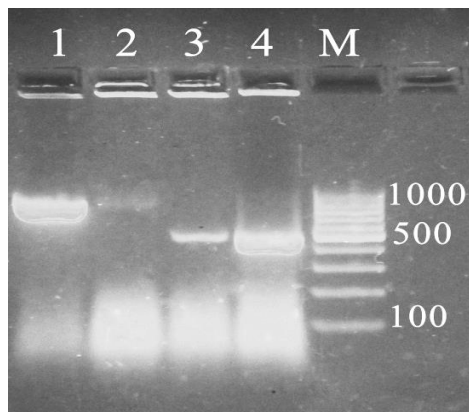
Електрофореграма сегментів РНК ВІПЖБ методом мультиплексного ПЛР-аналізу.

ПРОВЕДЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ТА ОТРИМАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛОНІВ



Будова вектора pJet1.2/blunt та унікальні сайти рестрикції. Показано місце клонування отриманих продуктів ампліфікації послідовностей генів ВНПЖБ.

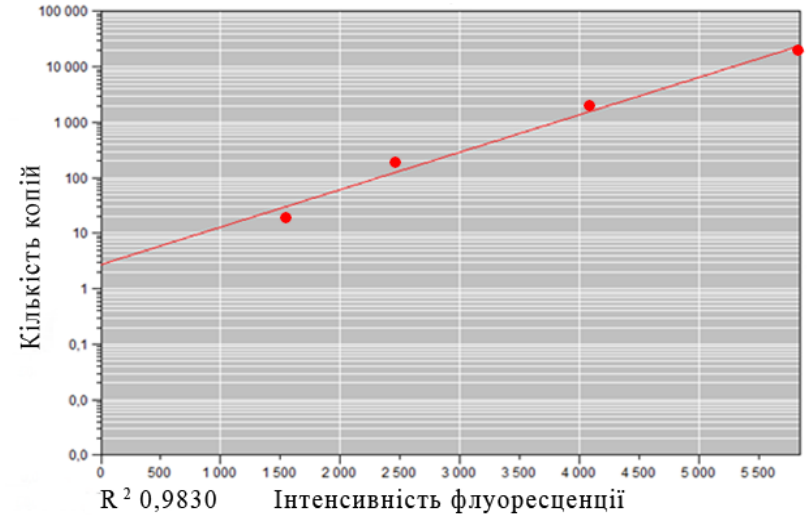
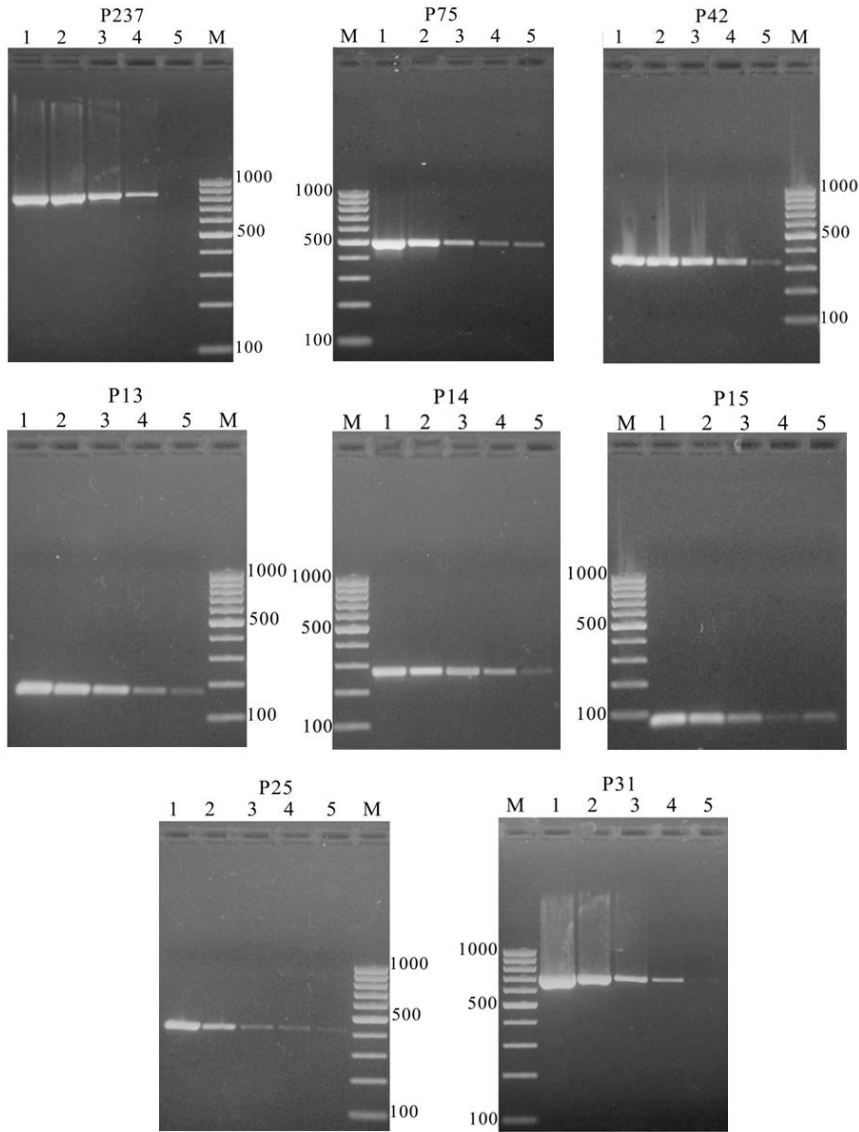
Бактеріальні клони в селективному LB середовищі, трансформовані вектором, що містить вставки ПЛР-фрагментів ВНПЖБ кожного с сегментів РНК.



Електрофореграми продуктів ПЛР-аналізу клонів:

номер треку відповідає номеру колонії бактерії, М – маркер молекулярної ваги.

СТВОРЕННЯ ПЛАЗМІДНИХ СТАНДАРТІВ



Калібрувальний графік залежності інтенсивності флуоресценції від логарифму початкової концентрації ДНК стандартів.

Електрофореграми ампліфікації серії розведень плазмід з клонованими фрагментами відповідних генів ВНПЖБ.

РОБОТА 3 ГЕНЕТИЧНИМИ БАЗАМИ ДАНИХ

Назва	Послідовність	Температура відпалу	Довжина амплікону
CP-F	5'-cgccgtccagaagaagatag-3'	55 – 60 °C	620 п. н.
CP-R	5'-cacccgagcagcagcta-3'		

Beet necrotic yellow vein virus strain KI7 replicase gene, partial cds

GenBank: KR825246.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS KR825246 803 bp RNA linear VRL 12-JUL-2015
 DEFINITION Beet necrotic yellow vein virus strain KI7 replicase gene, partial cds.
 ACCESSION KR825246
 VERSION KR825246.1 GI:871044559
 KEYWORDS .
 SOURCE Beet necrotic yellow vein virus
 ORGANISM [Beet necrotic yellow vein virus](#)
 Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; *Benyviridae*; *Benyvirus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 803)
 AUTHORS Grinchuk,K.V., Antipov,I.A. and Parii,M.F.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-MAY-2015) Agrobiotechnology, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Heroiv Oborony 13, Kiev 03041, Ukraine
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..803
 /organism="Beet necrotic yellow vein virus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /strain="KI7"
 /host="beet"
 /db_xref="taxon:31721"
 /segment="RNA1"
 /country="Ukraine"

```

1 atgtcgggtg aaggtagata tatgacatgg aaggatatgt cacataataa gtttatgacc
61 gatcgatggg cccgtgtttc ggacgtcgtg agtgttatta aacaatcgca tgctatggac
121 ttgtccaagg ctgcgaatct atctataaatt aaaactgctt tggcaggatt aggctcgggt
181 tggactgaca ataatccttt tgtgtccccg atgaccggtt ttccacagac actaactatg
241 tacggtgac ttgtgttata tgtaactctg tccgaccag aatttgcgtt gataatgact
301 aagtaagta ctttaactga ttcagggtta gcagataatg catctgctaa tgtgcgtaga
361 gatgtggtgt cgggaaataa agccgaatca tccggtaaaa ctgctggcac taatgagaat
421 tctgcttata cgcttaccgt tagtcttctg ggtttggctc aagctcctag gcttgaggaa
481 ttaatgtgga ctccgggataa gtttgaggac cggttgaagt taccatggac acctgttcaa
541 ggtagaacca gtccaccggg acaatag
  
```

Beet necrotic yellow vein virus strain AG9 CP gene, complete cds

GenBank: KR825247.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

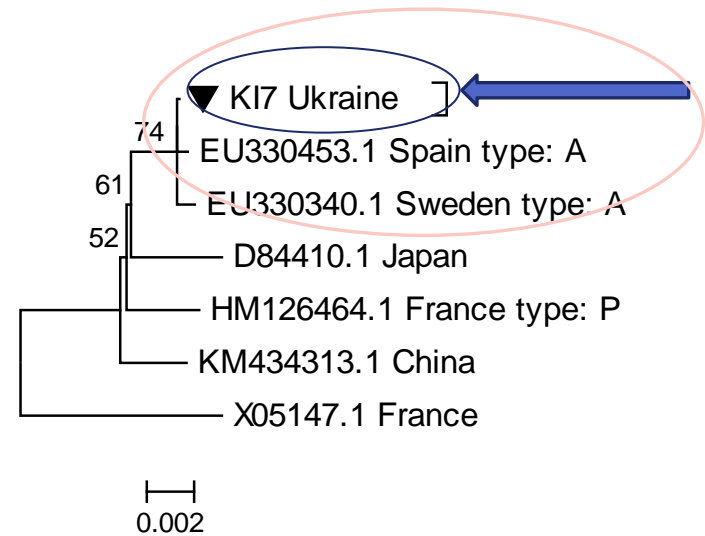
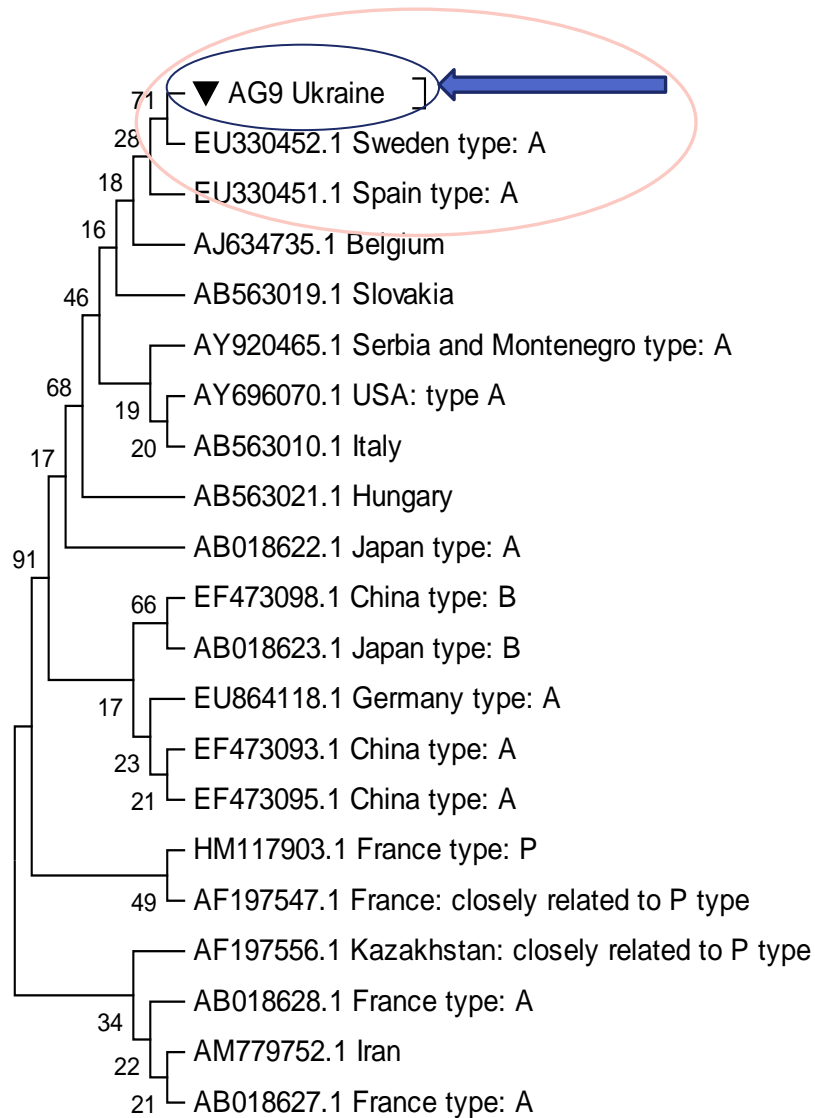
LOCUS KR825247 567 bp RNA linear VRL 12-JUL-2015
 DEFINITION Beet necrotic yellow vein virus strain AG9 CP gene, complete cds.
 ACCESSION KR825247
 VERSION KR825247.1 GI:871044582
 KEYWORDS .
 SOURCE Beet necrotic yellow vein virus
 ORGANISM [Beet necrotic yellow vein virus](#)
 Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; *Benyviridae*; *Benyvirus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 567)
 AUTHORS Grinchuk,K.V., Antipov,I.A. and Parii,M.F.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-MAY-2015) Agrobiotechnology, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Heroiv Oborony 13, Kiev 03041, Ukraine
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..567
 /organism="Beet necrotic yellow vein virus"
 /mol_type="genomic RNA"
 /strain="AG9"
 /host="beet"
 /db_xref="taxon:31721"

```

1 agcggaaatca gtggcaagaa ttacaggttc aacaggctcg gtacttattt cgaaaagtga
61 gaaattctcc gtcacgaca caagatagtg ttgcacgata gggtgctcag ctatttgttt
121 ctgattgttt ggtgccaaac gtagctgata cttttctgc ttccaattt tggcgaatta
181 tggacaaaagc tatgcatgac atggtcacia aaaattatca aggacaaatg gaagaggagt
241 ttacgcgtaa tgctaaatta tatcgttttc agttgaagga tattgaaaaa cttttgaagg
301 acccagagac tgatttggca aaggctggtc aaggatattt ggcatggtct aaggaggcac
361 atgttaagtt tatggttctt ttagagttt taaatgattt gttattgaag tcgttaaaact
421 ctaatgttgt ttacgataac acaatgtctg agaccgaatt tgttgaaaaa ataaatgccg
481 ccatgaatat agtaccggat agtgctataa accgggttat cgatgctgct gcttgcgatt
541 ctgggcaagg ggtttttacc caattgatag aaagacatat ttagctgctt ttggccattt
601 ctgacttctt tttgatttgg tatttctcat ttctgtgaga atatgttatg cagtccagat
661 atgtcagagc acatagtctt tatgttaaga ctatgtgaga acccgacctt ttgcttgata
721 acaccatttt aatgggtgct atgttaaatg ctatgcttgc tgggaccgga ccattttgta
781 tggccatgaa gggcagatgat ggt
  
```

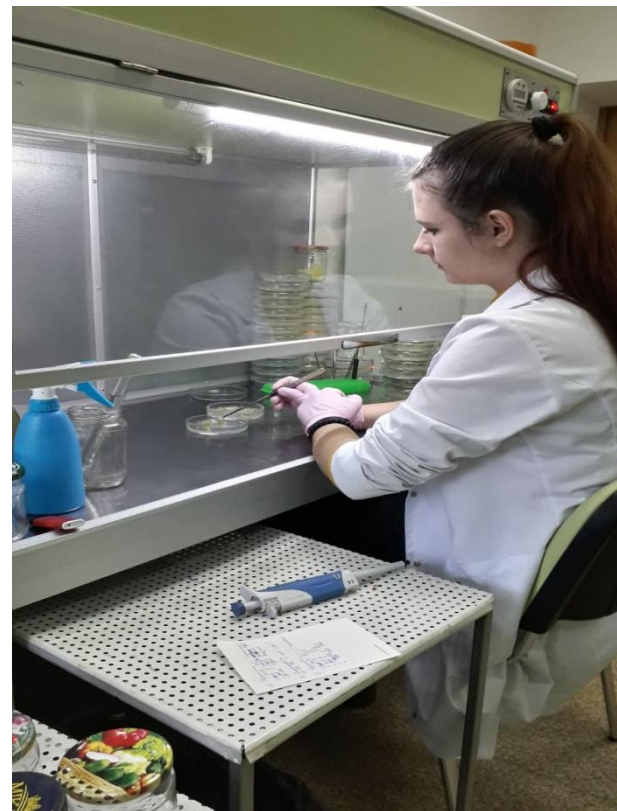
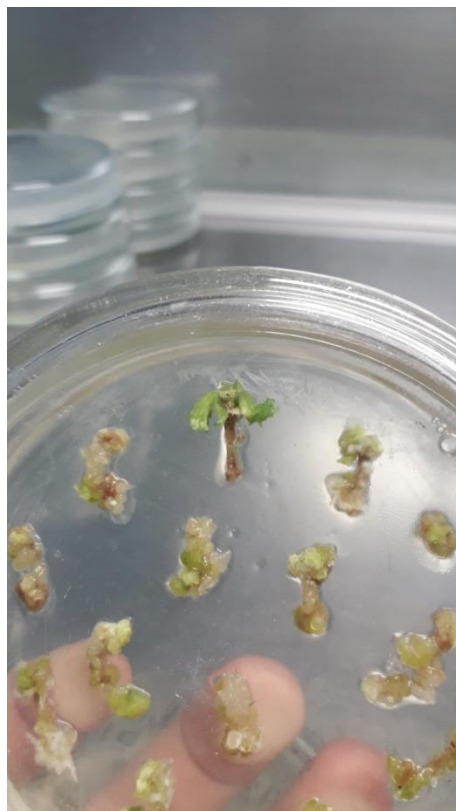
НАБУТТЯ НАВИЧОК РОБОТИ З БІОІНФОРМАТИВНИМИ БАЗАМИ ДАНИХ



Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей фрагменту РНК-1 українського ізоляту ВВПЖБ та відомих ізолятів ВВПЖБ.

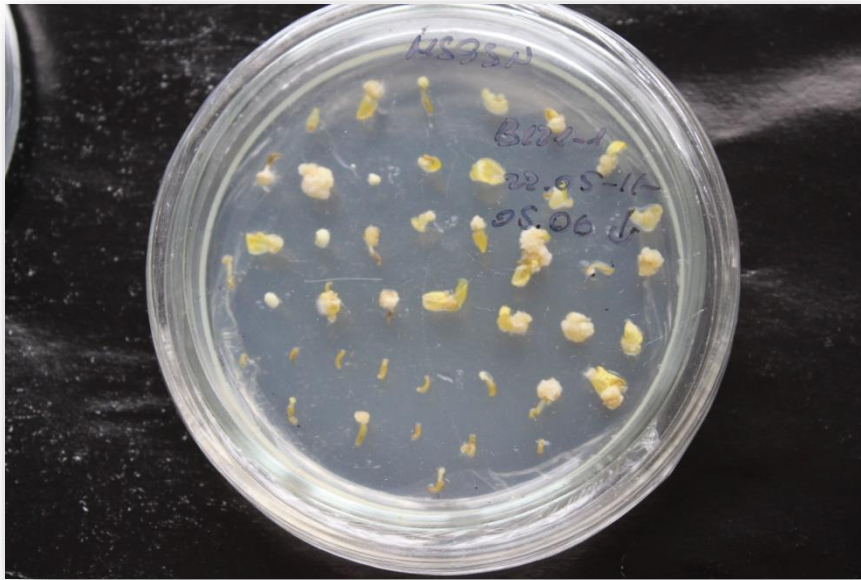
Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей гену БО українського ізоляту ВВПЖБ та відомих ізолятів ВВПЖБ.

Біотехнологічні методи оздоровлення рослин від фітопатогенів та отримання клонів рослин з бажаними ознаками

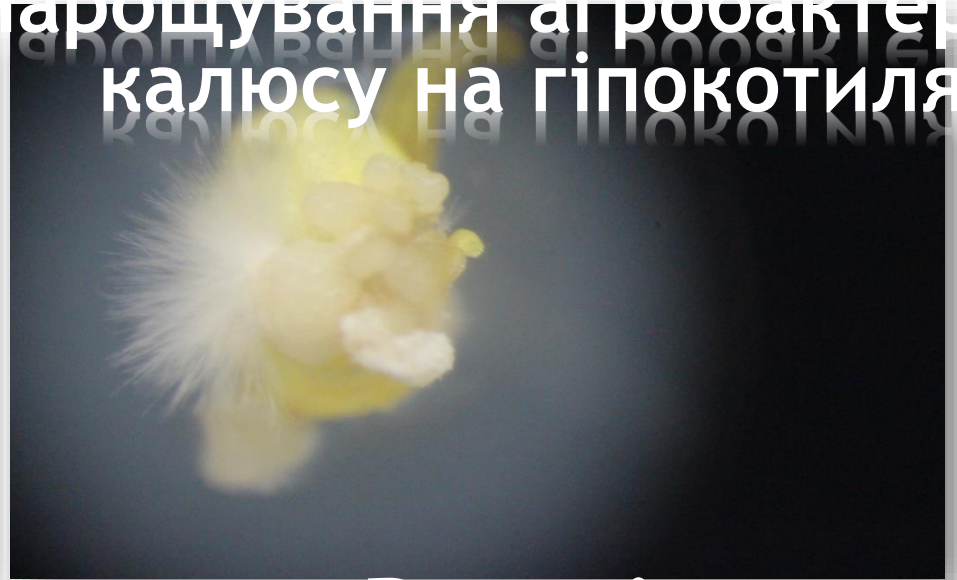


Отримання соматичних ембріодів ріпаку

озимого з пиляків



Нарощування агробактер калюсу на гіпокотилі




Нарощування агробактерії та отримання калюсу

на Brassica



СТУДЕНТИ ЗА ЧАС РОБОТИ В ГУРТКУ:

- * - набувають практичних навичок по проведенню полімеразної ланцюгової реакції;
- * - набувають практичних навичок з імуноферментними методами роботи та хроматографічними;
- * - ознайомлюються з біоінформативними методами дослідження вірусних геномів;
- * - оволодівають практичними методами створення генетичних конструкцій;
- * - практикують біотехнологічні методи створення генетично модифікованих рослин, використовуючи частини вірусних геномів (культура тканин,  отримання соматичних ембріоїдів, а також власне процес генетичної трансформації – agrobacterium-опосередкована трансформація, прямі методи трансформації - електропорація);

* ДЯКУЮ ЗА УВАГУ

