**Цвігун Вікторія Олександрівна, аспірант кафедри вірусо&shy;логії ННЦ &laquo;Інститут біології та медицини&raquo; Київського націо&shy;нального університету імені Тараса Шевченка: &laquo;Різноманіття вірусів рослин родини Cucurbitaceae на території України&raquo; (03.00.06 - вірусологія). Спецрада Д 26.001.14 у Київсько&shy;му національному університеті імені Тараса Шевченка**

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**Кваліфікаційна наукова**

**праця на правах рукопису**

**Цвігун Вікторія Олександрівна**

**УДК 578.85/.86**

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**РІЗНОМАНІТТЯ ВІРУСІВ РОСЛИН РОДИНИ CUCURBITACEAE**

**НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ**

**03.00.06 – вірусологія**

**природничі науки**

**Подається на здобуття наукового ступеня**

**кандидата біологічних наук (доктора філософії)**

**Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,**

**результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело**

**В.О. Цвігун**

**(підпис, ініціали та прізвище здобувача)**

**Науковий керівник Поліщук Валерій Петрович доктор біологічних наук,**

**професор**

**КИЇВ – 2017**

**ЗМІСТ**

**ВСТУП ………………………………………………………………………………10**

**РОЗДІЛ 1 Характеристика деяких вірусів, що уражують рослини родини**

**Cucurbitaceae ………………………………………………………………………...15**

**РОЗДІЛ 2 Загальна характеристика Cucumber mosaiс virus ……………………..19**

**РОЗДІЛ 3 Загальна характеристика Zucchini yellow mosaic virus …………...….28**

**РОЗДІЛ 4 Загальна характеристика Watermelon mosaiс virus 2 …….…………...30**

**РОЗДІЛ 5 Генетична варіабельність Cucumber mosaiс virus, Watermelon mosaiс**

**virus 2 та Zucchini yellow mosaic virus …………………………………………..…34**

**РОЗДІЛ 6 Об'єкти, матеріали та методи досліджень …………………………….39**

**6.1. Віруси ……………………………………………………………….…………...39**

**6.2. Рослини ……………………………………………………………….…………39**

**6.3. Матеріали та реактиви, використані у роботі ……………………….………..39**

**6.4. Методи досліджень …………………………………………………….……….40**

**6.4.1. Відбір зразків ……………………………………………………….………...40**

**6.4.2. Біологічне тестування ……………………………………………….…….....40**

**6.4.3. Електронна мікроскопія ……………………………………………….……..41**

**6.4.4. Імуноферментний аналіз в модифікації “сендвіч” ………………….……42**

**6.4.5. Метод непрямого імуноферментного аналізу ……………………………...44**

**6.4.6. Виділення Cucumber mosaiс virus …………………………………………...45**

**6.4.7.Виділення Watermelon mosaiс virus 2 та Zucchini yellow mosaic virus**

**…………………………………………………………………………….…….…….45**

**6.4.8. Вимірювання концентрації вірусних препаратів …………………...............46**

**6.4.9. Електрофорез білків в поліакриламідному гелі за Леммлі ……………..….46**

**6.4.10. Отримання поліклональної кролячої антивірусної сироватки до СMV …49**

**6.4.11.Отримання поліклональної кролячої антивірусної сироватки до WMV 2.49**

**6.4.12.Виділення тотальної РНК за допомогою кіта RNeasy Plant Minikit (Qiagen,**

**Великобританія) ……………………………………………………………………..50**

**6.4.13. Полімеразна ланцюгова реакція ……………………………………………51**

**6.4.14. Електрофорез нуклеїновових кислот ………………………………………53**

**8**

**6.4.15. Сиквенування нуклеїнової кислоти ………………………………………..54**

**6.4.16. Побудова філогенетичних дерев за допомогою програми MEGA ……....55**

**6.4.17. Статистична обробка результатів ……………….…………………………55**

**РОЗДІЛ 7 Вірусні хвороби рослин родини Cucurbitaceae, що циркулюють на**

**території України ……………………………………………………………………57**

**РОЗДІЛ 8 Біологічні властивості ZYMV, WMV 2 та CMV ………………….….67**

**РОЗДІЛ 9 Фізико-хімічна та серологічна характеристика ізолятів ZYMV, WMV**

**2 та CMV ……………………………………………………………………………..72**

**РОЗДІЛ 10 Філогенетичний аналіз генів капсидних білків Українських ізолятів**

**………………………………………………………………………………………...76**

**10.1. Філогенетичний аналіз ділянки геному капсидного білка Watermelon mosaiс**

**virus 2 ……………………………………………………………………………......76**

**10.2. Філогенетичний аналіз ділянки геному капсидного білка Zucchini yellow**

**mosaic virus …………………………………………………………………………..82**

**10.3. Філогенетичний аналіз гена капсидного білка Cucumber mosaiс virus.........88**

**РОЗДІЛ 11 Вірусна контамінація насіння рослин родини Cucurbitaceae ……...98**

**УЗАГАЛЬНЕННЯ ………………………………………………………………..104**

**ВИСНОВКИ ……………………………………………………………………….111**

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ………………………………………113**

**9**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

**АГ – антиген**

**АС – антисироватка**

**АТ – антитіло**

**ZYMV – Zucchini yellow mosaic virus**

**ВЗКМО – вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка**

**ВКПТ – вірус кільцевої плямистості тютюну**

**ВМГ – вірус мозаїки гарбуза**

**WMV 2 – Watermelon mosaiс virus 2**

**ВМДО – вірус мозаїки дикого огірка**

**CMV – Cucumber mosaiс virus**

**ВНТ – вірус некрозу тютюну**

**ВНПБ – вірус некротичної плямистості бальзаміну**

**ВПО – вірус пожовтіння огірка, що передається попелицями**

**ВТМ – вірус тютюнової мозаїки**

**ЗТ-ПЛР – зворотньотранскрипційна полімеразна ланцюгова реакція**

**кДНК – комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота**

**ІФА – імуноферментний аналіз**

**МЕ – меркапто етанол**

**ПЛР – полімеразноланцюгова реакція**

**РНК – рибонуклеїнова кислота**

**BSA – albumin bovine fraction v (бичачий сироватковий альбумін)**

**CP – coat protein**

**EDTA– ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt**

**Mr- молекулярна маса**

**MP – movement protein (білок руху)**

**ORF – open reading frame**

**РBS – phosphate buffer solution**

**SDS – sodium dodecyl sulphate**

**10**

**ВСТУП**

**На сьогодні одними із найбільш розповсюджених патогенів є фітовіруси,**

**які здатні завдавати значних збитків рослинам різних таксономічних груп. Серед**

**цих збудників хвороб особливу небезпеку викликають віруси, які уражують**

**рослини родини Cucurbitaceae у різних кліматичних регіонах світу, де**

**інтенсивно займаються вирощуванням сільськогосподарської продукції [1]. У**

**регіонах світу на рослинах родини Cucurbitaceae найбільш детектуються**

**збудники вірусної природи, а саме: Cucumber mosaiс virus (CMV), Watermelon**

**mosaiс virus 2 (WMV-2) та Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) [2]. В Україні**

**дослідження вірусних захворювань рослин родини Cucurbitaceae проводились у**

**60 – 80 роки і показали наявність лише WMV-2 і CMV, переважно в**

**промислових агроценозах [3]. Ринковий обмін насінневим матеріалом, зміни в**

**популяціях комах-переносників, а також виникнення нових змішаних інфекцій**

**сприяють зміні патогенності вірусів. Пітвердженням цього є повідомлення про**

**появу високо вірулентних штамів та ізолятів вірусів, що уражують дані**

**культури. Вражені вірусами рослини стають сприйнятливими до факторів**

**навколишнього середовища, а також до збудників грибних і бактеріальних**

**хвороб. За останні 30-40 років спектр вірусів, що уражують представників**

**родини Cucurbitaceae на території України, розширився [4]. Необхідність**

**вивчення Cucumber mosaiс virus, Watermelon mosaiс virus 2 та Zucchini yellow**

**mosaic virus зумовлена тим, що ці збудники рослинних хвороб завдають значних**

**збитків сільському господарству України. Зважаючи на те, що держава**

**займається постачанням власної продукції в інші країни світу, постає важливе**

**завдання для науковців створення нових, екологічно безпечних методів захисту**

**сільськогосподарських угідь від хвороб. Найбільш дієвими заходами**

**протистояння вірусним хворобам є вчасна діагностика та проведення**

**профілактичних заходів по виділенню рослин-резерваторів інфекцій,**

**запровадження стійких сортів та отримання безвірусного посадкового матеріалу.**

**Вивчення генетичної мінливості вірусів рослин допоможе ширше зрозуміти**

**еволюційні зв′язки, їх вірулентність, відтворити можливі шляхи поширення та**

**11**

**спрогнозувати ймовірність виникнення нових ізолятів та патогенних штамів. Ці**

**дослідження безсумнівно мають як теоретичне, так і практичне значення,**

**оскільки з їх допомогою стає можливим створення власних сучасних**

**діагностикумів як от тест-систем чи використання їх для створення стійких**

**сортів.**

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

**Дисертаційна робота виконувалася у межах наукового-дослідної роботи кафедри**

**вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного**

**університету імені Тараса Шевченка за темою «Збереження біорізноманіття та**

**комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з**

**використанням біоінформаційних технологій» (номер держреєстрації:**

**0111U004649).**

**Мета та завдання дослідження. Мета роботи – ідентифікація та**

**дослідження вірусів рослин родини Cucurbitaceae на території України.**

**Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:**

**1. Проаналізувати вірусні хвороби рослин родини Cucurbitaceae в Україні.**

**2. Провести ідентифікацію та виділити вірусні ізоляти з інфікованих**

**рослин родини Cucurbitaceae.**

**3. Дослідити біологічні властивості вірусних ізолятів, виділених з рослин**

**родини Cucurbitaceae.**

**4. Отримати поліклональні кролячі антивірусні сироватки до WMV-2 та**

**CMV.**

**5. Провести ампліфікацію та сиквенування найбільш варіабельної ділянки**

**геномів ізолятів вірусів ZYMV, WMV-2 та CMV виділених із рослин**

**родини Cucurbitaceae.**

**6. Проаналізувати філогенетичні зв'язки отриманих ділянок геномів**

**ізолятів ZYMV, WMV-2 та CMV.**

**12**

**7. Провести тестування насіння рослин родини Cucurbitaceae на наявність**

**вірусних антигенів.**

**8. Дослідити антифітовірусну дію препарату Деконекс-50 ФФ, відносно**

**CMV.**

**Об‘єкт дослідження – віруси, які інфікують рослини родини**

**Cucurbitaceae, а саме Cucumber mosaiс virus (CMV), Watermelon mosaiс virus 2**

**(WMV-2) та Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV).**

**Предмет дослідження – молекулярно-біологічна характеристика вірусів,**

**що інфікують рослини родини Cucurbitaceae на території України.**

**Методи дослідження: Для виконання поставлених завдань застосовували**

**наступні методи: візуальне обстеження насаджень, біологічне тестування,**

**імуноферментний аналіз, електронну мікроскопію, електрофорез білків та**

**нуклеїнових кислот, виділення РНК, полімеразну ланцюгову реакцію,**

**сиквенування ділянок нуклеїнової кислоти та філогенетичний аналіз.**

**Наукова новизна одержаних результатів. Вперше вивчено молекулярну**

**характеристику найбільш шкодочинних вірусів, які уражують рослини родини**

**Cucurbitaceae на території України. Проведено філогенетичний аналіз вірусів**

**рослин родини Cucurbitaceae, які є актуальними для економіки України. Вперше**

**проведено філогенетичний аналіз кДНК гена капсидного білка українських**

**ізолятів WMV-2, ZYMV та CMV. Українські ізоляти WMV-2 2g і 4k, які**

**виявилися спорідненими з ізолятами Франції, Іспанії, Туреччини, Чилі, Ірану.**

**Українські ізоляти ZYMV представлені у першій підгрупі групи А та є**

**споріднені з ізолятами із Австрії, Словенії, Сербії, Угорщини, Словаччини та**

**Венесуели. Українські ізоляти CМV представлені лише у кластері групи І**

**підгрупи ІА і ІВ. Найбільш спорідненими до українських ізолятів виявилися**

**штами Т35 і Т19 з Китаю, штам I17F з Франції та banana з Ізраїлю.**

**13**

**Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати**

**досліджень можуть бути використані українськими вченими як підґрунтя для**

**зниження та розповсюдження вірусів, для отримання здорового посадкового**

**матеріалу, пошуку стійких сортів насіння, а також передбачати появу нових**

**штамів та ізолятів. Українські ізоляти ZYMV, WMV-2 та CМV поповнили**

**колекцію вірусів кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини»**

**Київського національного університету імені Тараса Шевченка і застосовуються**

**для порівняння їх властивостей з нововиділеними ізолятами, а також як тестоб'єкти вірусів рослин у навчальному процесі. Отримано поліклональні**

**антисироватки до WMV-2 та CМV, що дає нам можливість створення власних**

**тест-систем для діагностики цих вірусів. Було встановлено антифітовірусну дію**

**препарату Деконекс-50 ФФ щодо CМV. Результати роботи можуть бути**

**впровадженні для покращення методики діагностики вірусів родини**

**Cucurbitaceae в Україні.**

**Особистий вклад здобувача. Дисертаційна робота є науковою працею, що**

**виконана самостійно автором, в якій висвітлено власні ідеї та розробки**

**здобувача, що дозволили вирішити поставлені завдання. Дисертантом**

**опрацьовано і узагальнено дані джерел літератури за темою дисертації, підібрано**

**методики, проведено польові та лабораторні дослідження, узагальнено й**

**систематизовано одержані результати, статистично їх проаналізовано,**

**сформовано висновки. Підготовка публікацій отриманих результатів роботи**

**здійснювалася за участю наукового керівника роботи д.б.н. проф. В.П.**

**Поліщука. Дослідження біологічних властивостей та імуноферментний аналіз**

**здійснено самостійно автором, філогенетичний аналіз проведено за участю**

**консультативної допомоги – д.б.н. проф. І.Г. Будзанівської.**

**Апробація результатів десертації. Основні результати досліджень і**

**положення дисертації роботи доповідались та обговорювалися на таких**

**конференціях: VΙΙΙ Міжнародній конференції „Молодість і поступ біології” м.**

**Львів, 3-6 квітня 2012р.; 16 Международной Пущинской школе-конференции**

**молодых учених „Биология наука XXI века”, (Пущино, 2012); конференції**

**14**

**„Вірусологія: минуле, сьогодення, майбутнє” м. Київ, 12 квітня 2012р.; IX**

**Міжнародній науковій конференції студентів та аспіратів „Молодість і поступ**

**біології” м. Львів, 16-19 квітня 2013р; конференції „Мікробіологія в сучасному**

**сільськогосподарському виробництві” м. Чернігів, 25-27 вересня 2012р.; VII**

**Міжнародній конференції „Біоресурси та віруси” м. Київ, 10-13 вересня 2013 р**

**Публікації. Результати досліджень представлені в 15 опублікованих**

**працях, із них 9 статей в профільних вітчизняних виданнях і 6 тез в матеріалах**

**конгресів, з'їздів і конференцій. Права співавторів не порушені.**

**Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із**

**вступу, 11 розділів, висновків, списку використаної літератури, який охоплює**

**148 найменувань. Робота викладена на 127 сторінках машинописного тексту.**

**Фактичний матеріал дисертаційної роботи викладений у вигляді 30 рисунках і 9**

**Таблицях**

ВИСНОВКИ

Удисертаційнійроботіздійсненоаналізвірусниххвороброслинродини

вУкраїніБуловиділенотаідентифіковановірусизінфікованих

рослинродиниОтриманополіклональнуантисироваткудотаМЗдійсненоаналізнасіннярослинродининавірусну

контамінаціюПроведенофілогенетичнийаналізділянокгеномів

тавиділенихнатериторіїУкраїниОтриманірезультатипредставленіу

наступнихвисновках

Захарактернимисимптомамизвикористаннямбіологічноготестування

електронноїмікроскопіїтаімуноферментногоаналізудоведенонаявність

трьохактуальнихдляЄвропивірусівщоуражуютьрослинродини

асамепредставниківвірусівродуі

родутавдосліджуванихобластяхУкраїни

Українськіізолятитавиділенізрослинродини

вУкраїнізасвоїмибіологічнимивластивостямиє

тотожнимиїхтиповимпредставникам

ЗвідібранихзразківрослинродиниотриманокДНКгена

капсидногобілкаукраїнськихізолятів––і––

розміромпоУрезультатіпроведеногофілогенетичногоаналізута

порівняння––і––звідомимиізолятамиі

штамамиізбуловстановленощовиділеніпатогениспорідненіз

ізолятамизФранціїІспаніїТуречиниЧиліІрану

ФілогенетичнийаналізкДНКділянкирозміромпо

встановивщоукраїнськіізолятипредставленіупершійпідгрупігрупиАі

єспорідненимизізолятиізАвстріїСловеніїСербіїУгорщини

СловаччинитаВенесуели

Українськіізолятизрослинродинипредставленілише

укластерігрупиІпідгрупиІАіІВНайбільшспорідненимидоукраїнських



ізолятіввиявилисяштамиТіТзКитаюштамзФранціїта

зІзраїлю

Результатианалізунасіннєвогоматеріалурослинродиниза

допомогоюІФАпоказалищосередасортиментуперевіреного

насіннярослинродинивиявилосяконтамінованимвірусами

Спостерігаласянаявністьантигенівта

ДослідженняДеконексуФФпоказалощообробканасіння

препаратомуконцентраціяхтазумовлювалазниженнявмісту

віруснихантигенівнатавідповідноОтжедосліджений

препаратможебутирекомендованийдлязнезараженняконтамінованого

насінняогірківтадляпрофілактичноїобробкинасінняінших

овочевихкультур