МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Дипломна магістерська робота

на тему: «Біоінформатичний аналіз вірусів мальви»

Виконала: студент 2 курсу, групи МгБТ-21
спеціальності 162 Біотехнології
та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
високомолекулярних сполук
Ірина ГРИГОРУК
Керівник: к.б.н., Ігор ГРЕЦЬКИЙ
Рецензент: к.б.н., Ольга ШИДЛОВСЬКА

Київ 2022

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра	біотехнології, шкіри та хутра
Спеціальність	162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма	Біотехнологія високомолекулярних сполук

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
біотехнології, шкіри та хутра

_____ Олена МОКРОУСОВА

*«___»*_____2022 року

ЗАВДАННЯ

НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

Григорук Ірини Юріївни

1. Тема роботи: **Біоінформатичний аналіз вірусів мальви**
   Науковий керівник роботи Грецький Ігор Олександрович, к.б.н.
   затверджені наказом закладу вищої освіти
   від «28» вересня 2022 року № 180-уч.

2. Строк подання студентом роботи _____

3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо аналізу вірусів мальви, результати філогенетичного аналізу; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

4. Зміст дипломної роботи (перелік питань, які потрібно розробити): вступ, огляд літератури, матеріали та методи, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки

5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Ім’я, прізвище та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 2	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 3	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Висновки	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		

6. Дата видачі завдання 12.09.2022 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконанння етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Огляд літератури		
3	Розділ 2 Матеріали та методи		
4	Розділ 3 Есперіментальна частина		
5	Висновки		
6	Оформлення дипломної магістерської роботи (чистовий варіант)		
7	Здача дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування		
8	Перевірка дипломної магістерської роботи на наявність ознак плагіату		
9	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____ Ірина ГРИГОРУК

Науковий керівник роботи _____ Ігор ГРЕЦЬКИЙ

Директор НМЦУПФ _____ Олена ГРИГОРЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Григорук І.Ю. Біоінформатичний аналіз вірусів мальви – Рукопис.

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162 – Біотехнологія та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2022 рік.

Дипломну магістерську роботу присвячено аналізу молекулярно-генетичних і біоінформатичних методів дослідження вірусів мальви за для оцінки їх біотехнологічного потенціалу за допомогою генетичної ідентифікації.

Описані біоінформатичні методи дослідження вірусів мальви для вивчення мікроеволюційного процессу шляхом порівняльного аналізу геному. Використані у роботі алгоритми та методи аналізу вірусів мальви дозволили припустити, що алгоритми побудови філогенетичних дерев ефективні для диференціації мікроорганізмів відповідно до їх родової приналежності.

Ключові слова: мальва, *Malva neglecta*, *Malva crispa*, *Malva sylvestris*, філогенетичний аналіз, дендрограми.

ANNOTATION

Hryhoruk I.Yu. Bioinformatic analysis of malva viruses - Manuscript.

Master's thesis in specialty 162 - Biotechnology and Bioengineering. - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2022.

The master's thesis is devoted to the analysis of molecular genetic and bioinformatic methods of researching mallow viruses for the assessment of their biotechnological potential using genetic identification.

Bioinformatics methods of studying mallow viruses for the study of the microevolutionary process by comparative genome analysis are described. Algorithms and methods of analysis of mallow viruses used in the work allowed us to assume that algorithms for building phylogenetic trees are effective for differentiating microorganisms according to their genus affiliation.

Key words: mallow, *Malva neglecta*, *Malva crispa*, *Malva sylvestris*, phylogenetic analysis, dendrograms.

ЗМІСТ

ВСТУП 6

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 10

1.1 Загальні відомості про рід Мальвових 10

1.1.1 Морфологія 10

1.1.2 Застосування мальви 12

1.1.3 Характеристика представників роду Мальвових 13

1.1.4 Перспективи застосування мальви 14

1.2 Характеристика вірусів, що уражують мальву 15

1.2.1 Citrus yellow vein clearing virus (CSYV00) 15

1.2.2 Watermelon mosaic virus (WMV) 17

1.2.3 Pepino mosaic virus (PEPMV0) 18

1.2.4 Tomato torrado virus (TOTV00) 19

1.2.5 Malva mosaic virus (MalMV) 20

1.2.6 Cucumber mosaic virus (CMV) 20

1.3 Генотип мальви 22

1.4 Методи біоінформатичного аналізу 24

1.4.1 Вирівнювання біологічних послідовностей 24

1.4.2. Метод точкового графіку 26

Висновки до розділу 1. 28

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 31

2.1 Об'єкт дослідження 31

2.2. Бази даних нуклеотидних послідовностей. 31

2.3. Аналіз нуклеотидних послідовностей та філогенетичний аналіз. 31

2.4 Філогенічний аналіз 34

2.5 Гомологічний аналіз. 35

2.6 Статистичний аналіз 36

Висновки до розділу 2 38

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА 39

3.1 Аналіз послідовності та організації геному 39

3.2 Аналіз консервативних промоторних елементів РНК 41

Висновок до розділу 3: 46

ВИСНОВКИ 47

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 48

ДОДАТКИ…….56

ВСТУП

Актуальність даної роботи полягає в аналізі Мальви (сімейство *Malvaceae*), яка є придатним резервуарами для шкідників рослин і патогенів. Мальва вважається популярною садовою рослиною і користується високим попитом серед дачників та ландшафтних дизайнерів. Популярність квітки обумовлена його високою декоративністю, стійкістю до хвороб та простотою у догляді.

Мальва (від лат. *Malva*) це трав'яниста рослина, належить до сімейства Мальвових (від лат. *Malvaceae*), рід налічує понад 25 видів. У дикій природі квітка росте в помірних, субтропічних та тропічних зонах Європи, Америки та Азії, може бути однорічною, дворічною та багаторічною рослиною. Стебло висотою від 30 до 120 см буває голим або злегка опушеним, листя має округло-серцеподібну форму і складається з 5-7 лопатей. Квітки за своєю формою нагадують дзвіночки і можуть досягати 8-12 см у діаметрі [1].

Залежно від виду мальви вони можуть бути білими, рожевими, фіолетовими, пурпурними, жовтими, червоними і навіть чорними, розташовуватися в пазухах по 1-5 штук і лише зрідка формувати кисті. Цвісти мальва починає в середині червня і закінчує наприкінці серпня.

Коріння у рослини досить довге і добре розгалужене. Насіннєва коробочка округлої і злегка плоскої форми складається з п'яти чашолистків. Насіння нагадує диски неправильної форми і має подвійне зубчасте обрамлення. Їх діаметр коливається від 5 до 7 мм і залежить від різновиду та сорту мальви [2].

У медицині використовують траву, зрізану під час цвітіння. Сировину зрізають на початку цвітіння на висоті 15-30 см (на межі відмирання листя). Ріжуть на шматочки та сушать при температурі 40-50 С. Квітки збирають, коли ще не розпустилися, але вже інтенсивно пофарбовані.

Трава містить полісахариди (9-12%), каротин (12%), алкалоїди, флавоноїди, дубильні речовини, жирні кислоти (мальвові та стеркулові). У листі вміст полісахаридів може досягати 20%, крім того, присутні вітамін С та каротиноїди.

У квітках містяться фарбувальні антоціани мальвін та мальвідин, які є цінними харчовими барвниками, що змінюють своє забарвлення залежно від кислотності середовища. Насіння містить до 18% жирної олії.

У Стародавній Греції мальву застосовували на лікування з VII-VIII століть до н.е. Вона належить до групи найстаріших корисних рослин у Європі. Піфагорійці використовували мальву як лікарську рослину при захворюваннях кишечника та опіках. В античні часи мальва застосовувалася при гінекологічних захворюваннях, а також відвар використовували при отруєння як протиотруту.

Крім всього перерахованого, мукополісахариди, до яких відносяться полісахариди мальви лісової, мають імуностимулюючу і фагоцитарну активність. За деякими даними, мають гіпоглікемічну дію (знижують вміст цукру в крові) [3].

У кулінарії мальва використовується як салатна культура, як гарнір і для приготування супів. При варінні листя набуває слизової консистенції і горіхового присмаку. Використовується як дієтичний продукт при захворюваннях ШКТ, має сильну антиоксидантну дію. Насіння має сирний смак і може додаватися як приправа [4]

Мета дослідження - провести молекулярно-філогенетичний аналіз вірусів мальви з використанням баз даних та методів біоінформатичного аналізу.

Ключові слова: віруси мальви.

Виходячи з мети роботи, були поставлені такі *завдання дослідження*:

1. дослідити сучасний стан досліджень вірусів мальви;
2. побудувати дендрограми подібності між вірусами мальви;
3. провести молекулярно-філогенетичний аналіз вірусів мальви.

Об'єкт дослідження - генетична ідентифікація представників вірусів мальви.

Предмет дослідження – молекулярно-філогенетичний аналіз між вірусами мальви.

Методи дослідження. біоінформаційні, статистичні.

Наукова новизна.

У роботі узагальнено результати молекулярно-філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей вірусів мальви..

Практичне значення.

Запропоновано процедуру диференціації досліджуваних вірусів мальви. Побудувано дендрограми методами максимальної парсимонії та об'єднання найближчих сусідів.

Апробація. Основні результати роботи представлено на конференціях:

1. Міжнародна науково-практична конференції *"Перспективи розвитку науки, освіти і технологій в контексті євроінтеграції"*, м. Полтава, 18 серпня 2022 р.
2. XIII Всеукраїнська науково-практична конференція *«Біологічні дослідження – 2022»,* м. Житомир, 10–11жовтня 2022 р.
3. 1st International Scientific Conference «Academics and Science Reviews Materials» (November 10-11, 2022). Helsinki, Finland, 2022.

Публікації:

1. Григорук І. Віруси, що уражують мальву //Міжнародна науково-практична конференція *"Наука, освіта, технології і суспільство: тенденції, виклики, перспективи"*, м. Житомир, 12 листопада 2022 р.

2. Irina Hryhoruk Analysis of mallow viruses // Proceedings of the 1st International Scientific Conference «Academics and Science Reviews

Materials» (November 10-11, 2022). Helsinki, Finland, 2022. Pp. 130-134. DOI: 10.5281/zenodo.7315918

3. Irina Hryhoruk Analysis of mallow viruses// *Integration of scientific and modern ideas into practice.* Proceedings of the VIII International Scientific and Practical Conference. Stockholm, Sweden. 2022. Pp. 68-73. DOI: 10.46299/ISG.2022.2.8

Структура і обсяг. Дипломна магістерська робота складається зі вступу, трьох розділів, 10 рисунків, 4 таблиць, 5 формул, чотирьох висновків, списку з 73 використаних джерел та додатків.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальні відомості про рід Мальвових

Мальва дуже світлолюбна, тому для неї вибирають відкриті сонячні місця, але якщо вона буде рости в півтіні, це не стане великою перешкодою для її зростання та розвитку. Дуже важливо, щоб мальва була захищена від протягів та сильного вітру, що легко ламає довгі стебла рослини. Ґрунт на ділянці повинен бути добре дренованим, глибоко обробленим і помірно зволоженим. Посухи мальва не боїться, але на сирих ґрунтах може загинути. Не підходять рослині бідні, важкі та надто сухі ґрунти [5].

1.1.1 Морфологія

Мальва - однорічні, рідше двох- і багаторічні трав'янисті рослини, з лежачим, висхідним або прямим стеблом висотою 30-120 см.

Листки - черешкові, округло-серцеподібні, з п'ятьма - сімома лопатями, або надрізані, опушені.

Квіти по одному - п'яти в пазухах листя; у дуже небагатьох видів суцвіття - кисті.

Коріння довге, розгалужене.

Плід – схизокарпій - тип сухого плода, що є модифікованою коробочкою. При дозріванні розпадається на окремі замкнені однонасінні або багатонасінні гнізда – мерикарпії – або на однонасінні половинки гнізд – карцерули [6].

Склад:

Поліфеноли (приблизно 380-390 мг/г);

Флавоноїди (приблизно 200 мг/г);

Ферулова кислота;

Гідрогенізовані антоціани;

Аскорбінова кислота (1-1,12 мг/г);

Кислі полі-, оліго- та дисахариди: фруктоза, глюкоза, метацитоза (D+), рафіноза, трегалоза + глюкуронова та галактуронова кислоти;

Фенолкарбонова кислота: галова кислота;

Секві-ді- і монотерпени;

Катехін;

Хлорофіл;

Мальвон-А [7]

Основні властивості:

Екстракт мальви має доведені антиоксидантні властивості; In vitro стабілізує та захищає від перекисного окислення ліпідів клітинних мембран.

Фенольні компоненти екстракту мальви виявляють свою антиоксидантну активність завдяки механізму захоплення вільних радикалів [8].

Екстракт мальви, який використовується в засобах для очищення та миття шкіри, має доведені властивості проти акне [9], мембраностабілізуючі властивості, антиоксидантні; протизапальну дію, протинабрякову, фотопротекторну, обволікаючу [10].

Використання в косметиці:

Мальву можна назвати універсальним екстрактом, який підходить для будь-якого типу шкіри. Екстракт мальви буде актуальним як для молодої, жирної шкіри з акне, так і для зрілої в складі комплексної антивікової програми.

Велика кількість різноманітних цукрів, глюкуронової та галактуронової кислот – надають екстракту додаткові зволожуючі властивості та створюють приємні тактильні відчуття при використанні косметики:

-косметика для чутливої шкіри;

-відбілюючі креми і сироватки; корекція постакне і вікової пігментації;

-косметичні засоби в період відновлення після будь-яких травматичних втручань – пілінгу, дермабразії та ін.;

-засоби для догляду за шкірою після сонячних ванн;

-засоби після гоління і піліації, заспокоюючі шкіру;

-косметика для зневодненої шкіри;

-засоби для лікування сувнітиної шкіри;

-лінія засобів для молодої, схильної до акне шкіри;

-шампуні, кондиціонери, спреї для волосся

Виробники промислової косметики також використовують екстракт мальви.

Він часто є складовим компонентом косметики класу «люкс» - наприклад, Dior декларує мальву у своїй зволожуючій і відновлюючій серії, La Prarie – використовує її в серії кремів для очей, Guerlain – у серії Orchidee imperial.

І входить до складу органічної косметики. Lavera, Phyto, Dermalogica вводять його в найрізноманітніші косметичні засоби.

1.1.2 Застосування мальви

В харчовій промисловості - медоносна рослина, використовується також як харчовий барвник для вина, напоїв, харчових виробів. Молоде листя мальви може бути заміною салату. Бутони і квіти також можна використовувати в салатах. Дрібні плоди, які ростуть на рослинах можна їсти сирими [11].

Господарське значення мальви: це культура, що дає 50% світового виробництва волокна, для виготовлення мотузок, канатів, мішковини, брезента, риболовних сіток, паперу, оліфи, лаку, фарбників для тканини.

В медицині з трави мальви лісової виробляють препарати, які мають бронхолітичну, обволікаючу, протизапальну, легку проносну дію. Настій трави призначають при захворюваннях верхніх дихальних шляхів, насамперед сухому кашлі. Цю рослину можна застосовувати дуже тривалий

час. Настій мальви застосовують при запаленнях шлункового тракту, колітах, ентеритах, ентероколітах. При захворюваннях порожнини рота та горла використовують у вигляді полоскань. Зовнішньо застосовують для компресів при фурункулах, ранах, що погано гояться, екземі і дерматозах, а при геморої у вигляді сидячих ванн. При захворюваннях селезінки рекомендуються ванни із трави мальви, чорнобильника, вівса, квіток ромашки. Також мальву застосовують для припарок при укусах бджіл [12].

1.1.3 Характеристика представників роду Мальвових

Мальва непомічена (від лат. *Malva neglecta*), в дикій природі росте в Північній Америці та Євразії, віддає перевагу грунту з високим вмістом азоту. Рослина відноситься до однорічників і відрізняється невибагливістю до умов утримання. Його часто можна побачити вздовж доріг як бур'ян, а також у садах та на вигонах. Квітка є досить низькорослою і не зростає вище 40 см.

Прямостояче стебло добре гілкується, листя округлої форми мають по 5-7 лопатей і посаджені на довгих черешках. Листя опушене з нижнього боку, прилистки мають яйцеподібну форму. Квіти розташовані в пазухах листя, цвітіння продовжується з травня до початку вересня [13].

Мальва кучерява (від лат. *Malva crispa L.*) і мальва мутовчата (від лат. *Malva verticillata L*), є однорічними лікарськими, кормовими і декоративними рослинами, досягають висоти від 40 до 120 см.

Під час цвітіння, яке триває з липня до перших заморозків, рослина покривається дрібними біло-рожевими квітками, зібраними в пучки листових пазух. Плоди визрівають у вересні та нагадують калачики. Листя мальви кучерявої мають злегка солодкуватий смак, через що використовуються для приготування салатів і йдуть на корм худобі.

Мальва низька (від лат. *Malva pusilla*) –це одно-або дворічна трав'яниста рослина, що досягає 15-50 см у висоту. Квітка має прямі тонкі стебла, що

піднімаються або стеляться, тонкий корінь стрижневого типу і п'яти-, рідше семилопате листя на довгих черешках. Квітки розташовуються по 3-4 штуки.

Мальва лісова (від лат. *Malva sylvestris*) є однорічною рослиною і виростає до 120 см. Вид відрізняється високою посухостійкістю і добре переносить холоди. Квітка росте у лісах Криму, Кавказу, Західної Європи, Північної Африки та Північно-Західної Індії. Рослина має гіллясте опушене стебло, листя на довгих черешках з городчато-зубчастими краями та красиві квітки світло-рожевого забарвлення [14].

1.1.4 Перспективи застосування мальви

Розширення асортименту культур, що вирощуються, є важливим елементом сучасного лікарського рослинництва. Пошук та інтродукція нових високопродуктивних, добре адаптованих до складних умов вирощування цілющих рослин дозволяють збільшити ефективність виробництва завдяки їх використанню, забезпечити повніше задоволення потреб охорони здоров'я у лікарській рослинній сировині, а також знизити екологічний тиск на навколишнє середовище [15 - 18].

Сучасна медицина широко використовує полісахариди, біологічно активні речовини рослинного походження, що володіють цілим рядом важливих фармакологічних властивостей - чітко вираженою протикашльовою та протизапальною, пом'якшувальною та обволікаючою дією, бронхолітичною активністю [19 - 22].

Препарати на основі полісахаридів широко застосовуються при лікуванні застудних та шлунково-кишкових захворювань. У літературі є також відомості про протипухлинну активність та радіопротекторні якості полісахаридів [23 - 26]. За кордоном мальва лісова входить у фармакопеї вісімнадцяти країн світу, включаючи Німеччину, Францію, Угорщину та ін [27,28].

Настій трави мальви може бути використаний при лікуванні захворювань дихальних шляхів та травного тракту. Крім того, у літературі рекомендується застосування настою квіток або листя при запальних процесах, сухому кашлі та захриплості голосу, а також зовнішньо у вигляді полоскань при ангінах та пом'якшувальних ванн при пухлинах, опіках та ранах. Відомо застосування препаратів мальви в педіатрії [29 - 31].

1.2 Характеристика вірусів, що уражують мальву

Збудниками захворювань є бактерії, гриби, віруси та комахи. Поширенню грибкових інфекцій сприяє навколишнє середовище з підвищеною вологістю. Через часті перепадт температури хвороби швидко пошкоджують всі частини рослин. Для вирішення проблеми важливо вчасно поставити точний діагноз.

Найбільш небезпечними вважаються вірусні захворювання. Вони швидко поширюються на сусідні квіти і від них складно вилікувати рослину. Уражена мальва швидко втрачає декоративність.

Вірусні захворювання призводять до зміни форми та знебарвлення листків. На рослині з'являються освітлені ділянки, плями і смуги різної інтенсивності. Листя деформується, а його ріст призупиняється. Переносниками захворювання можуть бути тля і трипси. Уражені рослини потрібно видалити, щоб уникнути зараження інших.

1.2.1 Citrus yellow vein clearing virus (CSYV00)

Citrus yellow vein clearing virus (CYVCV) є збудником хвороби citrus yellow vein clearing (CYVC), хвороби цитрусових, яка може призвести до значних економічних втрат для промисловості. CYVCV може завдати серйозної шкоди більшості видів цитрусових і може різко знизити товарність фруктів [32].

CVYCV передається попелицями, включаючи *Aphis spiraecola Patch*, *Aphis craccivora Koch* та білокрилку *Dialeurodes citri*. Не було показано, що

CYVCV передається через забруднене насіння, але вірус можна виявити в тканині насіння. Найпомітнішим механізмом поширення CYVCV на великі відстані є щеплення інфікованої бруньки. CYVCV – це одноланцюговий позитивний вірус рибонуклеїнової кислоти, який переважно міститься у флоемі.

CYVC вперше був виявлений в 1988 році на лимонних і кислих апельсинових деревах в Пакистані. У 1997 році симптоми CYVC спостерігалися на інших сортах лимонів, лаймів та кислих апельсинів у кількох регіонах Індії. У 2000 році захворювання тоді спостерігали в Туреччині. У 2009 році дерева з симптомами CYVC були виявлені в Юньнані, Китай, які згодом поширилися в багатьох інших китайських регіонах вирощування цитрусових [33].

Вираженість симптомів залежить від сорту цитрусових, штаму вірусу та умов навколишнього середовища, особливо температури. Листя молодих лимонних і кислих апельсинових дерев мають просочений водою вигляд і жовті, прозорі прожилки на передній стороні, а також зморшкуваті та викривлені листя. Деякі симптоми заражених дерев більш різноманітні, з неправильними кільчастими плямами на листках і мозаїчними візерунками на цитрусових. Симптоми лимонних або кислих апельсинових дерев, заражених CYVCV, менш виражені влітку. CYVCV також може протікати безсимптомно для деяких сортів цитрусових. У важких умовах заражені вірусом дерева відмирають, а плоди деформуються, що призводить до зниження якості.

CYVCV може інфікувати більшість видів цитрусових, сортів і гібридів, зокрема лимона та кислого апельсина. CYVCV може передаватися деяким нецитрусовим господарям, включаючи трав’янисті рослини, в тому числі і мальви, де він може викликати хлороз, мозаїчні візерунки листя та загальний некроз. Крім того, CYVCV був виявлений у деяких видів бур’янів, але інфіковані рослини переважно протікають безсимптомно [34].

1.2.2 Watermelon mosaic virus (WMV)

Watermelon mosaic virus (WMV; рід *Potyvirus*) є одним з найбільш поширених вірусів, що вражають культури гарбузи. Про симптоми хлорозу та мозаїки повідомлялося на листках женьшеню (*Panax ginseng*) з Південної Кореї, і було встановлено, що вони викликані WMV. У червні 2013 року під час обстеження вірусних захворювань на полях на фермах з женьшеню в Кьонсан-Пукдо, Корея, WMV було виявлено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зворотної транскрипції на 43 з 44 зразків, включаючи женьшень, мальву кластерну (*Malva verticillata*), і кабачок (*Cucurbita moschata*) з використанням специфічного для WMV набору праймерів. Одну з двох кластерних мальв, зібраних у місті Єонджу, які мали позитивні тести на WMV та жовті і мозаїчні симптоми на листі, використовували для передачі соку з фосфатним буфером до чотирьох різних рослин-хазяїв, включаючи *C. pepo, C. moschata, Chenopodium quinoa*, і *C. amaranticolor*. Крім того, рослини женьшеню та кабачків (*C. moschata*), зібрані з тієї самої території та позитивні на WMV, використовувалися для механічної інокуляції вірусу на той самий набір індикаторних рослин. Системні симптоми спостерігалися на листках *C. pepo* та *C. moschata* протягом 2 тижнів після інокуляції тканиною із системно інфікованих листків мальви та гарбуза (*C. moschata*) відповідно; однак індикаторні рослини-господарі, заражені інфікованим листям женьшеню, не виявляли жодних симптомів. Зараження рослин було підтверджено екстрагуванням нуклеїнової кислоти з використанням праймерів та подальшим секвенуванням. Результати показали, що симптоматичні рослини-індикатори мали позитивні тести на наявність WMV. Щоб визначити можливість змішаного зараження іншими вірусами, зразки кластерної мальви були також проаналізовані на вірус огіркової мозаїки, вірус буряка західного жовтого кольору, вірус очищення жилок мальви та вірус мозаїки ріпи, які, як відомо,

вражають рослини мальвових, але всі були негативними. Отже, кластерна мальва може бути потенційним господарем для передачі WMV до гарбуза [35].

1.2.3 Pepino mosaic virus (PEPMV0)

Pepino mosaic virus (PepMV) є одним з найбільш небезпечних вірусних захворювань томата закритого грунту у всьому світі.

Ниткоподібний вірус, виділений з *Malva neglecta* (мальва звичайна) був досліджений визначенням повної нуклеотидної послідовності. Білки, кодовані вірусом, мають спільну гомологію з групою роду *Potexvirus* родини *Flexiviridae*. Філогенетичний аналіз виявив тісний зв'язок з вірусом мозаїки нарциса (NMV), вірусом зеленої цибулі X (ScaVX), з вірусом альстромерії X (AlsVX) і вірусом мозаїки пепіно (PepMV).

Найбільш типовими симптомами, що викликає PepMV, є мраморність плодів томата, що приносить величезний збиток і значно знижує товарні якості. Іншими типовими симптомами PepMV є кропивовидність верхівок, хлороз, жовта плямистість, мозаїчність листків та коричневість чашечки.

Крім цього PepMV може посилювати симптоми фізіологічних порушень, включаючи знебарвлення (нерівномірне дозрівання) і розтріскування плодів, а також пухирчастість.

PepMV не тільки призводить до погіршення якості, але також може викликати значні втрати продукції. Дослідження в теплицях і опитування агровиробників вказують на те, що в середньому втрати якості коливаються в межах 4-15 %, а втрати продукції 4-12 %.

Вірус має високу вірулентність і в основному передається механічним шляхм, наприклад через інструменти, руки, одяг, контакт інфікованих рослин, зі здоровими або в розсадниках при пересадці молодих рослин.

В даний час немає ніяких корегуючих засобів боротьби з захворюванням. Залишається лише прикладати зусилля для реалізації профілактичних заходів

проти PepMV, здійснює надлежащі санітарні заходи у поєднанні із стратегією імунізації [36].

1.2.4 Tomato torrado virus (TOTV00)

Збудник, що спричиняє хворобу Торрадо, був ідентифікований у 2007 році як РНК-вірус рослин, подібний до пікорнавірусу, і отримав назву *Tomato torrado virus*. Відкриття ToTV спонукало до створення нового роду *Torradovirus* в родині Secoviridae (порядок Picornavirales). ToTV має багато спільного з іншими *Secoviridae*, включаючи подібну структуру віріонів та організацію геному.

Вперше хвороба Торрадо була зареєстрована навесні 2001 року, вона вразила захищені посіви томатів у регіоні Мурсія на південному сході Іспанії. Спочатку хвороба була обмежена невеликою географічною територією, але пізніше повідомлялося про спалахи в інших країнах Європи (Італія, Франція, Іспанія, Угорщина та Польща), а також у Центральній Америці та Австралії. ToTV ліквідували лише в Угорщині та Польщі, де були знищені всі заражені рослини томатів. В решті Європи епідемії ToTV можна охарактеризувати як тимчасові. Тим не менш, ToTV включено до списку попереджень Європейської організації із захисту рослин через комерційну важливість томатів та невизначений економічний вплив хвороби Торрадо [37].

Симптоми хвороби Торрадо у томатів починаються з появи хлоротичних плям біля основи листочків, які згодом переростають у некротичні плями та/або помітні отвори. Плоди також можуть мати некротичні ураження та розтріскування, що робить їх непридатними для продажу.

Томат є природним господарем для ToTV, але в експериментальних умовах вірус може також системно вражати баклажан (*S. melongena*) і перець (*Capsisum annuum*), які також є економічно цінними культурами. Деякі бур'яни та інші експериментальні господарі також можуть бути заражені ToTV, зокрема

Amaranthus spp., Atriplex spp., Chenopodium ambrosioides, Chenopodium spp., Halogetum sativus, Malva spp., N. benthamiana, N. clevelandii, N. glauca, N. glutinosa, N. occidentalis, N. rustica, N. tabacum cv, N. tabacum cv. Xanthi, Physalis floridana, Polygonum spp., Senebiera didyma, S. nigrum і *Spergularia spp*. Що стосується PepMV, ці потенційні альтернативні господарі можуть діяти як резервуари та/або джерела інфекції ToTV під час епідемій [38].

1.2.5 Malva mosaic virus (MalMV)

Вірус мозаїки мальви — патогенний рослинний вірус родини *Alphaflexiviridae*. Він був виявлений у 2008 році і вражає мальву звичайну (*Malva neglecta*). Його геном має довжину близько 6800 нуклеотидів і містить п’ять основних відкритих рамок зчитування [39].

Інфікування MalMV у рослин *Malva neglecta* було вперше виявлено в Канаді. Уражені вірусом рослини мають симптоми мозаїчності. Вірус передається через механічну інокуляцію, але не через переносників [40].

1.2.6 Cucumber mosaic virus (CMV)

Історично, вірус огіркової мозаїки (CMV) був вперше детально описаний у 1916 році на огірках (одночасно Дуліттлом і Джагером) та інших огіркових, але зараз відомо, що він зустрічається у всьому світі як у помірному, так і в тропічному кліматі, вражаючи багато сільськогосподарських та садових культур. Розвиток генетичної стійкості до CMV у багатьох овочів зробив цінний внесок у лікування цієї важливої вірусної хвороби.

CMV вражає 1200 видів у більш ніж 100 родинах рослин і може завдати значних економічних втрат багатьом овочевим і садовим культурам. CMV викликає системну інфекцію у більшості рослин-господарів, але може залишатися безсимптомним у деяких культур, таких як люцерна. Симптоми

огіркової мозаїки можуть сильно відрізнятися в залежності від зараженої культури та віку рослини, коли відбувається зараження.

Через широкий спектр господарів численні бур'яни можуть служити резервуаром для CMV і сприяти поширенню вірусу на посівах на початку сезону. Багаторічні, дворічні та озимі однорічні бур'яни, що містять CMV у коренях, бульбах і підземних органах протягом усієї зими, включають молочай звичайний (*Asclepias syriaca*), роголю жовту (*Barbarea vulgaris*), крес болотний (*Rorippa islandica*), жовтий льон, мальву та *Linaria vulgaris*. Важливо відзначити, що інфіковані бур'яни часто протікають безсимптомно.

Господарі культури можуть також служити значним джерелом CMV для інших культур. Хорошим прикладом цього є те, як багаторічна люцерна може служити резервуаром CMV для подальшого зараження квасолі. Хоча люцерна безсимптомна, вона є резервуаром CMV.

Насіння як джерело ЦМВ було зареєстровано у звичайних і 19 інших видів рослин. Інші сімейства рослин з насіннєвим CMV (включаючи сільськогосподарські рослини) - це *Amaranthaceae* (син. *Chenopodiaceae*) (шпинат), *Brassicaceae, Fabaceae* (син. *Leguminosae*) (квасоля, нут, вігна, сочевиця, люпин, конюшина). Ця особливість передачі насіння виявилася важливою для щорічного виникнення CMV-інфікованих бобових на комерційних полях, а також для потенційного зараження тепличних культур, що ростуть поруч із рослинами рябини, що ростуть на заповідних територіях поблизу теплиць. Насіннєва характеристика збільшує ймовірність того, що вірус виживе в природі. Більше 80 видів попелиці (*Insecta: Hemiptera: Aphidoidea*), включаючи *Myzus persicae* та *Aphis gossypii*, здатні передавати вірус нестійким способом, що передається стилетами. Нестійкий зв'язок означає, що комаха отримує вірус, утримує його протягом короткого періоду часу (кілька хвилин) і втрачає через харчування. Це означає, що комаха має стати носієм вірусу, щоб передавати його рослинам. У випадку квасолі, найбільш важливими

переносниками попелиці є соєва попелиця (*Aphis glycines)*, жовта конюшина попелиця (*Therioaphis trifolii*) і горохова попелиця (*Acyrthosiphon pisum*) [41].

Ефективність передачі залежить від виду попелиці, штамів вірусів, видів рослин-господарів, умов навколишнього середовища та пори року. Експериментально CMV легко передається механічним шляхом, але ефективність підвищується за рахунок додавання відновника, такого як 10 мМ сульфіту натрію, до буфера під час приготування інокулята [42].

1.3 Генотип мальви

Більшість видів Мальви є поліплоїдами з базовим числом хромосом n = x = 7. Численні види є гексаплоїдами, де число хромосом знаходиться в діапазоні від 40 до 44, а деякі види мають більшу кількість хромосом (наприклад, *M. alcea*, 2n = 78 або 84; *M. verticillate,* 2n = 76, 84, 112, 120, 126; і *M. crispa L.,* 2n = 84, 112, 120). Лише один зареєстрований вид (*M. hispanica*) має 2n = 24 хромосоми, і цей вид можна вважати тетраплоїдним.

Для визначення генотипу застосовують такі методи: проточну цитометрію та метод ISSR ПЛР.

Проточна цитометрія – спосіб дослідження якості та кількості клітин, які по одній проходять через вузький капіляр. Для цього клітини позначаються флюоресцентними молекулами (флуорохромами). Обладнання такого дослідження називається цитометром.

Цитометрія називається «проточною», тому що клітини досліджуються у потоці. Завдяки мікрокапілярній системі клітину можна виділити та вивчити окремо.

Принципи методу проточної цитометрії: клітинну суспензію мітять флуоресцентними барвниками, після чого разом із потоком рідини пропускають через проточну комірку. Клітини змушені «вишиковуватися» один за одним, завдяки чому стає можливим дослідити кожну конкретну.

Після відділення клітина опромінюється лазером, а потім сигнали розсіювання/світіння реєструються на спеціальному апараті.

Розмір клітини визначається за рахунок розсіювання світла під кутом до 10°, розміри ядра і цитоплазми — за рахунок розсіювання під кутом до 90°. Також враховується інтенсивність флуоресцентного світіння. Дивлячись на ці показники, можна визначити, із чого складається клітина.

Переваги проточної цитометрії:

Можливість аналізувати велику кількість клітин за один підхід – аж до 108 шт. у мл.

Висока швидкість роботи, як наслідок – економія часу. Методом проточної цитометрії можна відтворювати до 100 000 подій на секунду.

Можливість визначати субпопуляцію, а також вимірювати параметри тих клітин, які рідко зустрічаються [43, 44].

ПЛР ISSR - метод, суть якого полягає в тому, що в якості ділянок відпалу праймерів використовують мікросателітні локуси, а ампліфікують ділянки, що знаходяться між їх інвертованими повторами. еревага методу полягає в тому, що такий підхід збільшує точність відпалу, відтворюваність ампліфікованих фрагментів і зменшує анонімність ділянок, що ампліфікуються, оскільки про них, принаймні, відомо, що це відносно короткі фрагменти ДНК, укладені між інвертованими повторами мікросателітного локусу. Для проведення ампліфікації потрібна невелика кількість ДНК. Не потрібно попереднього знання нуклеотидної послідовності при дизайні праймерів. Ампліфікуються як структурні, так і некодуючі ділянки геному, однак спектр ампліконів, що отримується, має певні обмеження, пов'язані з умовами ампліфікації. Маркери ISSR-ПЛР на цей час набули широкого поширення на вирішення проблем оцінки генетичних зв'язків між генофондами (переважно рослин), чому сприяли такі властивості методу, як щодо висока точність і відтворюваність, домінантний тип успадкування, високий рівень поліморфізму.

1.4 Методи біоінформатичного аналізу

1.4.1 Вирівнювання біологічних послідовностей

Вирівнюванням (allignment) послідовностей азотистих основ в нуклеїнових кислотах називають визначення взаємної відповідності залишків нуклеїнових основ у кількох послідовностях, при якому зберігається початковий порядок залишків в послідовностях.

Вирівнювання послідовностей – це основний інструмент біоінформатики, його проводять із ціллю встановлення структурних, функціональних і еволюційних звязків між послідовностями [45].

Біологічні макромолекули є результатом молекулярної еволюції. Тому якщо дві такі біомакромолекули мають певного спільного предка, а значить і послідовності мономерів в таких макромолекулах спільну предкову послідовність, то вони, як правило, визначають подібність в поєднаннях мономерів, в структурах і в біологічних функціях.

Наприклад, якщо відкрита нова послідовність з невідомою функцією, але при цьому в базах даних можуть бути знайдені подібні їй послідовності з раніше встановленими структурами та функціями, то результати вирівнювання (порівняння) цієї нової послідовності з уже дослідженими послідовностями можуть стати підставою для передбачення функції або структури цієї нової послідовності [46].

Одна з цілей вирівнювання послідовностей полягає в тому, щоб визначити ступінь подібності двох послідовностей і, якщо вона достатньо висока, зробити правдоподібне заключення про їх гомологічність.

При передачі генетичної інформації від попереднього покоління наступному вона дещо змінюється під час процесу копіювання. Зміни, які відбуваються в процесі розходження від спільного предка, можуть бути трьох типів: заміни, вставки та видалення (випадіння).

Ці зміни можуть накопичуватися від покоління до покоління. Через кілька тисяч поколінь у послідовностях може спостерігатися значне число розхождень. Порівняння двох імовірно гомологічних послідовностей показує ступінь їх розходження, тобто силу еволюційних змін [47].

Вирівнювання послідовностей – це процедура порівняння двох (попарное вирівнювання) або кілька (множинне вирівнювання) послідовностей шляхом пошуку ряду окремих елементів або характерних комбінацій елементів послідовностей, які розташовані у вирівнюваних послідовностях в однаковому порядку.

При вирівнюванні двох послідовностей їх поміщають у два рядки один над одним, записуючи їх за допомогою букв алфавіта.

Ідентичні або подібні "букви" (елементи) цих рядків (послідовностей) зміщують в межах рядка (не змінюючи початкового порядку розташування "знаків") таким чином, щоб вони розташовувались один під одним у відповідних стовпцях.

Неідентичні, або різні знаки або поміщають в одні і ті ж стовпці як неспівпадіння, або вставляють навпроти них во другій послідовності пропуски [48].

Розглянемо для прикладу два рядки:

1) abcde
2) acdef

Вирівнювання виглядає так:

abcde-

a-cdef

Для того щоб знайти оптимальне (найкраще) вирівнювання необхідно визначити критерій якості вирівнювання. Так, для послідовностей нуклеотидів gctgaacg і ctataatc можливі наступні вирівнювання:

1. Неінформативне вирівнювання --------gctgaacg

ctataatc--------

2. Вирівнювання без пропусків gctgaacg

ctataatc

3. Вирівнювання з пропусками gctga-a--cg

--ct-ataatc

4. Ще одне вирівнювання gctg-aa-cg

-ctataatc

Інтуїтивно здається, що є останнє вирівнювання найкраще, оскільки в ньому отримана максимальна кількість співпадінь для нуклеотидів у двох послідовностях і використана мінімальна кількість вставок.

Щоб вирішити, чи є цей варіант кращим з усіх можливих, необхідно мати спосіб систематичної перевірки всіх можливих вирівнювань, мати кількісний критерій ("вага" ("weight") або рахунок ("score"), за яким можна порівняти якість різних вирівнювання і визначити вирівнювань з оптимальним вагою (рахунком).

При цьому від того, яка саме система оцінки обрана для такого порівняння, може залежати результат порівняння, і навіть незначні зміни у схемі оцінки можуть змінити рейтинг вирівнювань через що найкращим стане інше вирівнювання [49].

1.4.2. Метод точкового графіку

Точкова графік (dot plot) – це найпростіше зображення, яке дає уявлення про схожість між двома послідовностями.

Точкова матриця являє собою таблицю або матрицю, в якій рядки відповідають елементам однієї послідовності, а колонки - елементам іншої послідовності. У найпростішому варіанті ячейки точкового графіку залишають порожніми, якщо порівнювані елементи різні, і заповнюються, якщо вони

збігаються. Фрагменти послідовностей, що збігаються, відображаються у вигляді діагоналей, що йдуть з верхнього лівого кута в нижній правий.

Вигляд точкової матриці може наочно показати наявність паліндромних послідовностей в аналізованому рядку [50].

Точкова матриця дозволяє швидко проілюструвати спорідненість між двома послідовностями. Яскраві ознаки подібності чітко виявляються. Іноді точкову матрицю будують у "традиційному" поданні, коли "початок координат" - точка початку послідовностей знаходиться не в лівому верхньому, а в лівому нижньому кутку. Відповідно змінюється і напрямок вертикальної осі.

Виділяють два типи вирівнювання: глобальне та локальне.

Глобальне вирівнювання дає змогу визначити збіги по усій довжині послідовностей [51].

Локальне вирівнювання зосереджується лише на окремих схожих ділянках у деяких частинах послідовностей.

Пошук локальної подоби може дати більш значні та точні результати, ніж оцінка вирівнювання по всій довжині послідовностей. Це пов'язано з тим, що функціонально активні ділянки зазвичай розташовані в межах відносно коротких областей, які залишаються консервативними незалежно від видалень чи мутацій, які відбуваються у інших частинах послідовності.

Головна перевага методу точкового графіку при пошуку вирівнювань послідовностей полягає в тому, що він дозволяє знайти все можливі збіги залишків між двома послідовностями та надає досліднику можливість вибору найцінніших з них. Потім можна визначити послідовності добре вирівняних областей – вже з допомогою інших методів вирівнювання послідовностей (наприклад, динамічного програмування). Вирівнювання, що проводяться за допомогою цих програмам, можна порівняти з вирівнюванням по точковому графіку; таке порівняння покаже, чи збігаються найдовші області і чи розташовані вставки та видалення в найбільш підходящих місцях [52].

Точність визначення областей, що збігаються, може бути підвищена за рахунок відфільтровування випадкових збігів, знайдених у точковому графіку. Фільтрування виконується за допомогою вікна, що дозволяє порівнювати ці дві послідовності одночасно.

Ідентифікацію вирівнювань послідовностей за допомогою методу точкового графіку можна проводити шляхом підрахунку точок на всіх можливих діагоналях матриці (щоб визначити статистично, які діагоналі дають найбільше збігів) та подальшого порівняння рахунків цих збігів з результатами довільного порівняння послідовностей [53, 54].

Аналіз точкового графіку - це, перш за все, метод порівняння двох послідовностей з метою пошуку можливого вирівнювання елементів цих послідовностей. Крім того, до цього методу звертаються для передбачення комплементарних ділянок у складі РНК, які можуть брати участь у формуванні вторинної структури РНК та при пошуку прямих чи зворотних повторень у послідовностях білків та ДНК [55].

Так, наприклад, можуть бути виявлені повторні області, розподілені по всій довжині, як окремих хромосом, так і всього набору хромосом.

Таким чином, метод точкового графіку наочно демонструє будь-які можливі вирівнювання послідовностей у вигляді діагоналей матриці. Аналіз точкового графіку матриці може легко показати присутність вставок або видалень, а також прямих та зворотних повторень, які набагато важче знайти іншими, навіть більш автоматизованими методами [56].

Висновки до розділу 1.

Красиву декоративну мальву однаково високо цінують як садівники, і любителі народної медицини. У дворі ці рослини бездоганно доповнюють квітники, використовуються для декорування парканів та господарських будівель, підходять для оформлення геометричних композицій та створення

повноцінних клумб із різних сортів. У побуті настій мальви славиться своїми вираженими протизапальними, заспокійливими, обволікаючими, пом'якшуючими, загоювальними та загальнозміцнюючими властивостями.

В медицині з трави мальви лісової виробляють препарати, які мають бронхолітичну, обволікаючу, протизапальну, легку проносну дію. Розширення асортименту культур, що вирощуються, є важливим елементом сучасного лікарського рослинництва. Пошук та інтродукція нових високопродуктивних, добре адаптованих до складних умов вирощування цілющих рослин дозволяють збільшити ефективність виробництва завдяки їх використанню, забезпечити повніше задоволення потреб охорони здоров'я у лікарській рослинній сировині, а також знизити екологічний тиск на навколишнє середовище.

Якщо мальва міститься в поганих умовах, їй не вистачає вологи та сонця, вона може почати сохнути та скидати листя. Хвороби мальви можуть розвиватися не тільки через відсутність належного догляду, а й через атаку шкідників, ураження квітки бактеріями, грибками та вірусами.

Найбільш небезпечними вважаються вірусні захворювання. Вони швидко поширюються на сусідні квіти і від них складно вилікувати рослину. Вірусні захворювання призводять до зміни форми та знебарвлення листя. На рослині з'являються освітлені ділянки, плями та смужки різної інтенсивності. Листя ураженої квітки деформується, зростання зупиняється. Переносниками захворювань можуть бути попелиця та трипси.

Дослідження показують, що збудниками захворювань мальв можуть бути не лише специфічні віруси, такі як *Malva Mosaic Virus (MalMV),* а й віруси, які не є типовими для роду Мальвових. До таких вірусів відносяться: *Citrus yellow vein clearing virus (CSYV00)* - вірус, що викликає захворювання цитрусових, *Watermelon mosaic virus (WMV)* - збудник хвороб гарбуових культур, *Pepino mosaic virus (PEPMV0)* - викликає одне з найбільш небезпечних вірусних захворювань томата, *Tomato torrado virus (TOTV00)* - спричиняє хворобу

Торадо, яка уражує томати, *Cucumber mosaic virus (CMV)* - вірус огіркової мозаїки. Ці дані можуть значно полегшити виявлення причин і збудників захворювань мальв.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження слугували представники вірусів мозаїки мальви роду Мальвових.

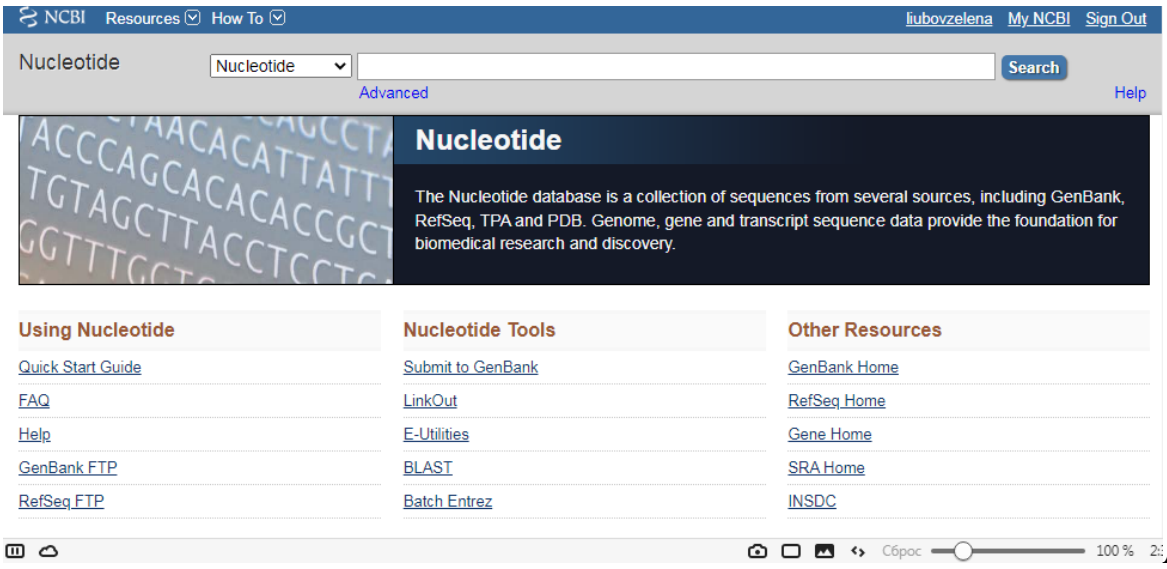
2.2. Бази даних нуклеотидних послідовностей.

Для виконання поставлених задач здійснювали пошук нуклеотидних послідовностей в електронних базах даних GenBank (опції – BioProject PRJNA177353, Nucleotide): https://www.ncbi.nlm.nih.gov (рис. 2.1);

Пошук проводили з використанням відповідних опцій та ключових слів, які містили назву виду / роду та назву консервативної ділянки.

2.3. Аналіз нуклеотидних послідовностей та філогенетичний аналіз.

Конкатенацію сиквенсів здійснювали за допомогою програми FaBox, яка знаходиться у вільному доступі в інтернеті: https://birc.au.dk/~palle/php/fabox/ (рис 2.1).



А

Рис. 2.1. Інтерфейс баз даних нуклеотидних послідовностей GenBank.

Обробку нуклеотидних послідовностей, вирівнювання, аналіз константних, варіабельних, парсимоній-інформативних та синглетонних сайтів проводили з використанням пакету програм MEGA 7 [28].

Множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали за допомогою алгоритму ClustalW. Неоднозначно вирівняні ділянки були виключені з філогенетичного аналізу.

Біологічне значення множинного вирівнювання має еволюційне направлення: воно відображає походження нуклеотидних послідовностей від єдиної предкової послідовності. Якщо ж послідовності не мають спільного походження, то вирівнювання не буде. При вирівнюванні можна виявити консервативні та варіабельні ділянки або й сайти. Консервативність певних ділянок нуклеотидних послідовностей може свідчити про їх функціональну значимість: наприклад, вони можуть бути функціональними доменами білкової структури або ж сайтами зв'язування лігандів.

Послідовність перевіряли та порівнювали з базою даних blastn у Національному центрі біотехнологічної інформації (NCBI) (Altschul та ін., 1997). Вірусні послідовності аналізували та збирали за допомогою програмного забезпечення Contig Assembly Program (CAP) (Huang, 1992). Відкриті рамки зчитування (ORF) були ідентифіковані за допомогою шукача NCBI ORF. Аналіз ідентичності/подібності проводили за допомогою програми GAP з пакету Wisconsin (GCG) версії 10.3, використовуючи штраф за створення прогалини 8 і штраф за розширення прогалини 2 для порівнянь амінокислот (Anon, 2001). Амінокислотні послідовності реплікази, TGB1 і капсидного білка з різних штамів потексвірусу були визначені та введені в множинне вирівнювання, створене за допомогою програмне забезпечення Clustal W і виправлено шляхом остаточного візуального огляду за допомогою програми SeqLab (пакет

Wisconsin, версія 10.3; Accelrys). Філогенетичний аналіз проводився за допомогою MEGA версії 7 з використанням методів відстані та алгоритму сусідства. Топологічна точність дерева була оцінена з використанням 500 початкових повторів. 50 і 30

Структурний аналіз нетрансльованої області (UTR) проводили за допомогою програми mfold версії 3.2 (Zuker, 2003). Кілька вирівнювання та профіль білкових доменів проводили за допомогою бази даних сімейств білків Pfam (версія 18), розташованої в Wellcome Trust Sanger Institute в Кембриджі (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) з використанням параметрів за замовчуванням (Bateman et ін., 2004).

Множинне вирівнювання підкреслило помилку зсуву кадрів у С-термінальній області NMV CP (NC_001441), яка призвела до того, що останні 45 амінокислот цього білка абсолютно не пов’язані з будь-якими іншими потексвірусами. Тому виправлену послідовність NMV використовували для гомологічного/філогенетичного аналізу.

Філогенетичний аналіз проводили з використанням пакету програм MEGA 7. Здійснювали розрахунок:

1. генетичних відстаней між таксономічними групами. Величина генетичної відстані розраховується як частка нуклеотидних відмінностей між кожною парою послідовностей.

2. середнє значення внутрішньородової мінливості.

На основі сиквенсів консервативних ділянок геному, як окремих генів, так і конкатенованих послідовностей, конструювали дендрограми. Для цього залучали два методи:

- метод максимальної парсимонії. Максимальна парсимонія передбачає, що мінімальні зміни призводять до всього різноманіття послідовностей, які мають спільного предка. Тому цей метод називають ще методом мінімальної еволюції. Саме для того, щоб передбачити, які саме сайти або локуси є найбільш

вірогідними місцями дивергенції послідовностей, необхідно множинне вирівнювання. Для побудови дендрограми за допомогою цього методу залучаються лише сайти, в яких локалізовані принаймні два різних типи нуклеотидів, кожен з яких представлений принаймні двічі, тобто парсимоній-інформативні сайти. Метод максимальної парсимонії використовують для аналізу послідовностей з високим рівнем схожості;

- метод об'єднання найближчих сусідів. Цей метод є методом побудови еволюційних дерев на основі величин генетичних відстаней. Метод об'єднання найближчих сусідів став основою реконструкції філогенезу і, ймовірно, є найбільш широко використовуваним алгоритмом на основі генетичних відстаней. Метод застосовують для невеликих вибірок, а результати досліджень показують, що він є достатньо точним, принаймні для випадків, коли припускають, що швидкість еволюційних процесів не є надзвичайно високою або низькою.

А також в обох методах використовували 2-параметричну модель Кімури. 2-параметрична модель Кімури мала наступні опції: враховувались транзиції та трансверсії, темпи змін у сайтах – рівномірні. Показник бутстреп аналізу розраховувався за 1000 репліками.

2.4 Філогенічний аналіз

Послідовність перевіряли та порівнювали з базою даних blastn у Національному центрі біотехнологічної інформації (NCBI) (Altschul та ін., 1997). Вірусні послідовності аналізували та збирали за допомогою програмного забезпечення Contig Assembly Program (CAP) (Huang, 1992). Відкриті рамки зчитування (ORF) були ідентифіковані за допомогою шукача NCBI ORF. Аналіз ідентичності/подібності проводили за допомогою програми GAP з пакету Wisconsin (GCG) версії 10.3, використовуючи штраф за створення прогалини 8 і штраф за розширення прогалини 2 для порівнянь амінокислот (Anon, 2001).

Амінокислотні послідовності реплікази, TGB1 і капсидного білка з різних штамів потексвірусу були визначені та введені в множинне вирівнювання, створене за допомогою програмне забезпечення Clustal W (версія 1.83) і виправлено шляхом остаточного візуального огляду за допомогою програми SeqLab (пакет Wisconsin, версія 10.3; Accelrys). Філогенетичний аналіз проводився за допомогою MEGA версії 7 з використанням методів відстані та алгоритму сусідства. Топологічна точність дерева була оцінена з використанням 500 початкових повторів. 50 і 30.

Структурний аналіз нетрансльованої області (UTR) проводили за допомогою програми mfold версії 3.2 (Zuker, 2003). Кілька вирівнювання та профіль білкових доменів проводили за допомогою бази даних сімейств білків Pfam (версія 18), розташованої в Wellcome Trust Sanger Institute в Кембриджі (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) з використанням параметрів за замовчуванням (Bateman et ін., 2004).

Множинне вирівнювання підкреслило помилку зсуву кадрів у С-термінальній області NMV CP (NC_001441), яка призвела до того, що останні 45 амінокислот цього білка абсолютно не пов’язані з будь-якими іншими потексвірусами. Тому виправлену послідовність NMV використовували для гомологічного/філогенетичного аналізу.

2.5 Гомологічний аналіз.

Послідовності перевіряли та порівнювали з базою даних blastn у Національному центрі біотехнологічної інформації (NCBI). Вірусні послідовності аналізували та збирали за допомогою програмного забезпечення Contig Assembly Program (CAP) (Huang, 1992). Відкриті рамки зчитування (ORF) були ідентифіковані за допомогою шукача NCBI ORF. Аналіз ідентичності/подібності проводили за допомогою програми GAP з пакету Wisconsin (GCG) версії 10.3, використовуючи штраф за створення прогалини 8 і

штраф за розширення прогалини 2 для порівнянь амінокислот (Anon, 2001). Амінокислотні послідовності реплікази, TGB1 і капсидного білка з різних штамів потексвірусу були визначені та введені в створене множинне вирівнювання за допомогою програмного забезпечення Clustal W (версія 1.83) і виправлено шляхом остаточного візуального огляду за допомогою програми SeqLab (пакет Wisconsin версії 10.3; Accelrys). Були філогенетичні аналізи виконується за допомогою MEGA версії 7 з використанням дистанційних методів і алгоритму приєднання сусідів. Топологічна точність дерева була оцінена з використанням 500 початкових повторів. 50 і 30 -неперекладений регіон (UTR) структурний аналіз виконано за допомогою програми mfold версія 3.2 (Zuker, 2003). Кілька вирівнювання та профіль білкових доменів проводили за допомогою бази даних Pfam сімейств білків (версія 18), розташованих у Wellcome Trust Інститут Сангера в Кембриджі (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/), використовуючи параметри за замовчуванням (Bateman et al., 2004).

Множинне вирівнювання підкреслило помилку зсуву кадру в С-термінальній області NMV CP (NC_001441), яка результат того, що останні 45 амінокислот цього білка абсолютно не пов’язані з будь-які інші потексвіруси. Виправлена послідовність NMV була тому використовується для гомологічного/філогенетичного аналізу.

2.6 Статистичний аналіз

Всі дослідження проводили не менш ніж у 3-х повторностях. Отримані дані обробляли статистично загальноприйнятими методами варіаційної статистики, враховуючи 95%-ий рівень достовірності за критерієм Стьюдента. Розрахунки, графіки, гістограми виконані за допомогою комп’ютерної програми Microsoft Excel 2013.

Висновки до розділу 2

Біологічне значення множинного вирівнювання має еволюційне направлення: воно відображає походження нуклеотидних послідовностей від єдиної предкової послідовності. Якщо ж послідовності не мають спільного походження, то вирівнювання не буде. При вирівнюванні можна виявити консервативні та варіабельні ділянки або й сайти. Консервативність певних ділянок нуклеотидних послідовностей може свідчити про їх функціональну значимість: наприклад, вони можуть бути функціональними доменами білкової структури або ж сайтами зв'язування лігандів.

.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

З розвитком молекулярно-генетичних і біоінформатичних методів дослідження геномів мікроорганізмів стало можливим проводити їх ідентифікацію та вивчати мікроеволюційні процеси шляхом порівняльного аналізу консервативних ділянок геному.

Швидкі темпи розвитку молекулярно-біологічних методів і підходів дозволяють накопичувати і створювати великі за обсягом бази даних результатів досліджень цього напрямку. Тому дослідники стикаються з новою проблемою, пов’язаною з необхідністю обробляти та аналізувати значні масиви інформації. Зокрема це стосується баз даних, які містять нуклеотидні послідовності (GenBank, EMBL тощо).

Онлайн-сервіси дозволяють отримувати інформацію з таких баз даних у вигляді анотованого списку нуклеотидних послідовностей, отриманих у відповідь на запит. Запит, як правило, містить ключові слова, наприклад назву гену або організму, номер нуклеотидної послідовності, під яким вона була задепонована та ін. Отримані у результаті запиту дані мають дуже обмежені можливості щодо їх обробки та аналізу. У випадку, коли отриманий список містить декілька записів, у дослідників є можливість переглянути їх та проаналізувати. Однак, частіше, подібний список містить декілька сотень або й тисяч записів, що робить перегляд всіх записів доволі тривалим, а подібну роботу неефективною, нераціональною або й неможливою.

3.1 Аналіз послідовності та організації геному

Проаналізовано клони MaMV, що перекриваються: один містить CP і потрійний генний блок, один для решти реплікази і, нарешті, кілька клонів секвенували для точної оцінки N-кінця, як обговорювалося пізніше. За винятком хвоста poly(A), геномна РНК MaMV має довжину 6858 нуклеотидів (nt) із вмістом GC 45% (номер доступу GenBank DQ660333). Геномна

організація подібна до інших потексвірусів, що включає передбачувану РНК-залежну РНК-полімеразу (RdRp), за якою йдуть три перекриваються гени, що кодують білки TGB, і, нарешті, білок оболонки (рис. 1A). Запропонований кодон ініціації AUG для реплікази розташований у нуклеотидах 81–83, і трансляція з цього сайту призведе до утворення білка з 1571 амінокислоти (аа) з розрахунковою молекулярною масою 177,96 кДа. Репліказа MaMV, отримана з ORF1, складається принаймні з трьох окремих доменів (рис. 2A), N-кінцевого метилтрансферазоподібного домену (аа 31–390), NTP-зв'язуючого/геліказоподібного домену (аа 824–1059) і C-кінцевий домен RdRp2 (аа 1137–1535). Ці домени, як правило, добре збережені та присутні в репліках усіх потексвірусів.

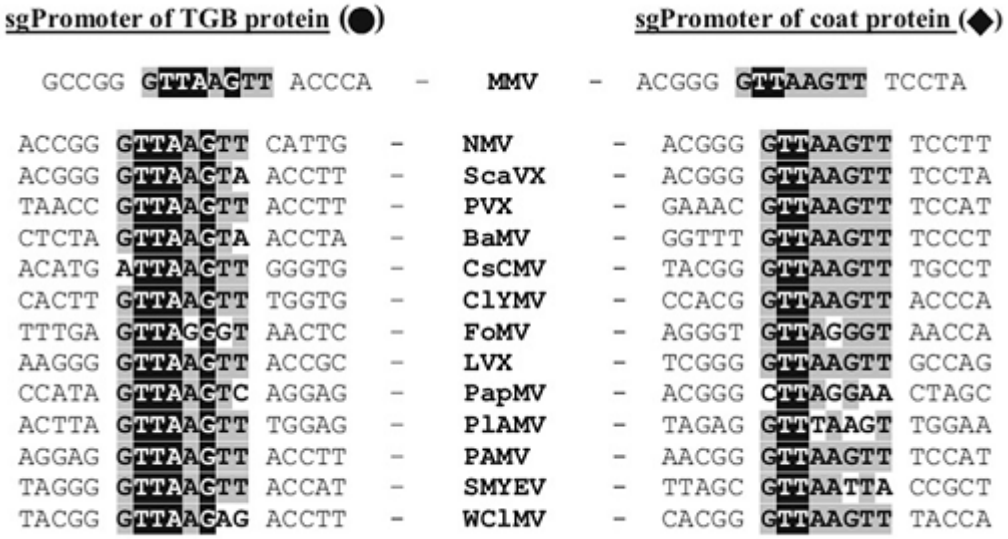


Рис. 1. Вирівнювання послідовності октануклеотидної передбачуваної послідовності g-промотора. Ліва і права панелі представляють консенсусну послідовність sgpromoter TGB (чорне коло) і CP (чорний квадрат), відповідно. Висококонсервативні нуклеотиди в межах консенсусного октануклеотиду виділено чорними або сірими прямокутниками відповідно. Нуклеотид, який відрізняється від консенсусної послідовності, виділено білим кольором.

Цей аналіз також підкреслив наявність спільного домену з білком AlkB, що репарує ДНК. Кілька інших рослинних РНК-вірусів, головним чином з сімейства Flexiviridae, містять подібний мотив у своїй репліказі (Aravind and Koonin, 2001; Bratlie and Drablos, 2005).

Наступні три ORF є перекриваючими генами, що демонструють схожість із TGB інших потексвірусів, які беруть участь у переміщенні вірусів (Beck et al., 1991; Batten et al., 2003; Morozov and Solovyev, 2003). TGB1 (ORF2) — це білок 235 амінокислот із встановленою молекулярною масою 26,3 кДа. Він має дуже високий вміст лейцину і заряджених залишків (13,2% і 21,7% відповідно).

Це найбільш кислий білок TGB1 із сімейства потексвірусів ізоелектрична точка (pI) 4,84. Його послідовність містить типові NTPase/helicase домени, активність яких була продемонстрована для PVX та двох гордейвірусів TGB1p in vitro (Kalinina et al., 2002). Також припускають, що TGB1 може відігравати певну роль у інгібуванні глушіння РНК. Білок TGB2 (ORF3) має довжину 119 амінокислот при розрахунковій молекулярній масі 13 кДа і теоретичному pI 9,42, тоді як ORF4 або TGB3 є коротким білком 84 амінокислоти (9 кДа) з нейтральним pI (рис. 2A).). У PVX ці останні два білки пов’язані з мембранами та клітинними стінками, і їх функції полягають головним чином у модулюванні активності TGB1 (Morozov et al., 1991; Yang et al., 2000; Morozov and Solovyev, 2003). Збережені послідовності та гідрофобні профілі білків MaMV TGB є типовими для білків інших потексвірусних TGB, що свідчить про те, що вони можуть мати подібну активність.

3.2 Аналіз консервативних промоторних елементів РНК

Октануклеотидні субгеномні промоторні послідовності були виявлені в міжгенній області між репліказою та геном TGB1 (nt 4851–4858) і між nt 5982 і 5989 у 30 кінці кодуючої послідовності TGB3 (рис. 2). Обидва промотори мають точну консенсусну послідовність GTTAAGTT, отриману в більшості

потексвірусів (Skryabin et al., 1988; Kim and Hemenway, 1997: Batten et al., 2003). Консенсусні послідовності sg-промотора TGB2/TBG3, зареєстровані для PVX, не так добре визначені, як послідовності TGB1 і CP, і, отже, точна ідентифікація такого домену є більш неоднозначною (Skryabin et al., 1988). Ми не змогли виявити в інфікованих рослинах sgRNA, які відповідають видам, які корелювали б з активними промоторами TGB2/TGB3. Якщо ці види sgRNA існують, цілком ймовірно, що їх кількість поступається sgRNA TGB1 і CP.

50-нетрансльована ділянка (UTR) — це 81 нт домен, багатий AC, який переважно неструктурований, за винятком присутності двох передбачуваних стовбурових петель слабкої стабільності в межах нуклеотидів 26–36 і 48–78 відповідно (дані не показано). Як і у більшості потексвірусів, переважаючим 50-кінцевим мотивом, який спостерігається з РНК, обробленої кислою пірофосфатазою тютюну (TAP) перед переходом до реакції зворотної транскриптази, є консенсусний мотив GAAAA (10 послідовностей із 16) (рис. 2). Однак, коли обробка тютюновою кислотою пірофосфатазою була опущена, переважаючим мотивом був GGAAAA, як спостерігалося в ScaVX, CymMV і AlsVX (10 з 17 послідовностей) (Wong et al., 1997; Kim et al., 1998; Chen et al. , 2002; Фуджі та ін., 2005). В останньому випадку консенсусна послідовність GAAAA спостерігалася лише двічі. Цю розбіжність можна частково пояснити спостереженням, що більшість зворотних транскриптаз мають кінцеву трансферазу та активність перемикання матриці. Було показано, що верхній індекс II при тестуванні in vitro транскрибується РНК, що містить кеп-кінці в буферних умовах, рекомендованих виробником, переважно додасть один додатковий залишок цитозину до 30 кінця кДНК (Schmidt and Mueller, 1999). Ця група також спостерігала, що відстеження dCMP за допомогою зворотної транскриптази в 10 разів ефективніше з блокованими матрицями РНК порівняно з 50-OH РНК. Це спостереження може пояснити наш результат, оскільки залишок цитозину, доданий до 30-кінця кДНК, буде зчитуватися як додатковий

гуанозин на 50-кінці РНК. Цей додатковий залишок G, який спостерігався з необробленою РНК, був би фактично артефактним через описану раніше термінальну трансферазну активність зворотної транскриптази і, отже, не представляв би точно точний мотив, знайдений на 50-кінці геномної РНК. З цих причин ми твердо переконані, що результати, отримані з РНК, обробленою ТАР, точніше відображають природну популяцію MaMV, виявлену в хазяїні.

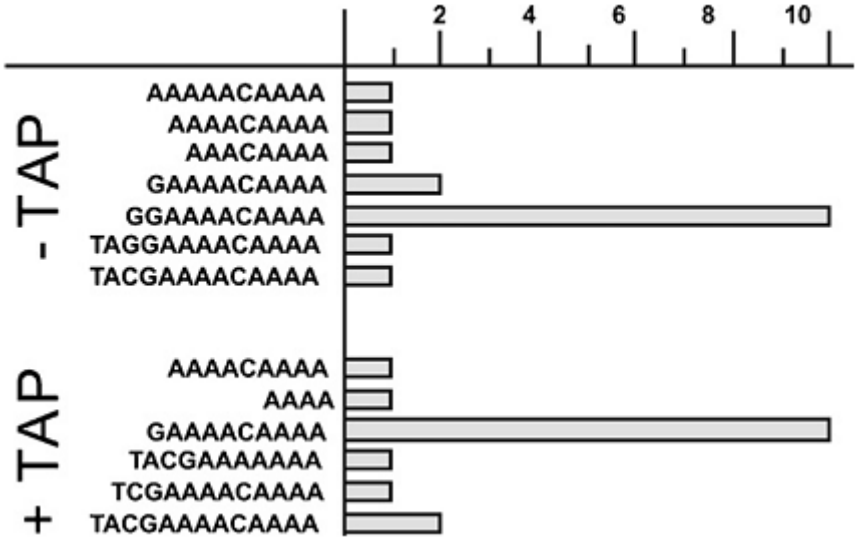


Рис. 2. Аналіз 50-кінцевого мотиву. Послідовність, отримана за допомогою РНК без обробки (-ТАР) і попередньо обробленої (+ТАР) пірофосфатазою тютюнової кислоти перед реакцією зворотної транскриптази, відображається на верхній і нижній панелях відповідно. Смужки вказують на частоту, з якою кожна послідовність була знайдена у всіх секвенованих клонах.

30-UTR має довжину 70 нт і, за прогнозами, згортається у вторинну структуру, подібну до тРНК, подібну до тих, що були ідентифіковані в інших потексвірусах (Thompson and Jelkmann, 2004). Він містить сигнал поліаденілування AAUAAA на 14 нт вище сайту поліаденілювання, а також консервативний гексамер ACUUAA, присутній у всіх потексвірусах, секвенованих на сьогоднішній день (нт 6799–6804). Обидві послідовності

локалізовані в окремій петлі з трьох структур стебла-петлі (SL3 і SL1 відповідно) (рис. 3). Цікаво, що цей аналіз виявив передбачуваний псевдовузол розміром 5 п.н. між нуклеотидами, розташованими в петлі SL1 і SL2. Наскільки нам відомо, це перше повідомлення про такий псевдовузол між цими двома петлями. Подібна структура була раніше описана для PVX, але в цьому випадку область комплементарності була з нуклеотидом субгеномного промотору та ACUUAA консервативною послідовністю SL1 (Kim and Hemenway, 1997). Аналіз 30-кінця інших потексвірусів показав, що подібні псевдовузли можуть бути виявлені в деяких інших вірусах, таких як NMV, CymMV, ScaVX і PepMV (дані не показані). Однак комплементарна послідовність, яка утворює псевдовузол у двох останніх вірусах, має довжину лише 4 нуклеотиди.

Для більш точного вивчення зв’язку між MaMV та іншими потексвірусами було проведено філогенетичний аналіз. Аналіз проводили з використанням найбільш консервативної області амінокислотних послідовностей реплікази та капсиду (рис. 5), а також повної послідовності білків TGB1 (дані не показано). Філогенетичний аналіз підтверджує попереднє спостереження про те, що MaMV, як видається, найбільш тісно пов’язаний з підгрупою потексвірусу, що включає NMV, ScaVX, AlsVX і PepMV, причому останні два є трохи більш філогенетично віддаленими. У кожному аналізованому дереві MaMV, NMV і ScaVX завжди групувалися разом, підтримуючи знову цей тісний зв'язок. Однак низьке початкове значення, що спостерігається в цій підгрупі для реплікази та капсидного білка (66% і 39%, відповідно), не дозволило нам зробити однозначний висновок, який із цих двох вірусів MaMV є найбільш спорідненим. Філогенетичний аналіз, проведений з TGB1, дав аналогічний результат і не дозволив зробити висновок про найближчого родича MaMV.

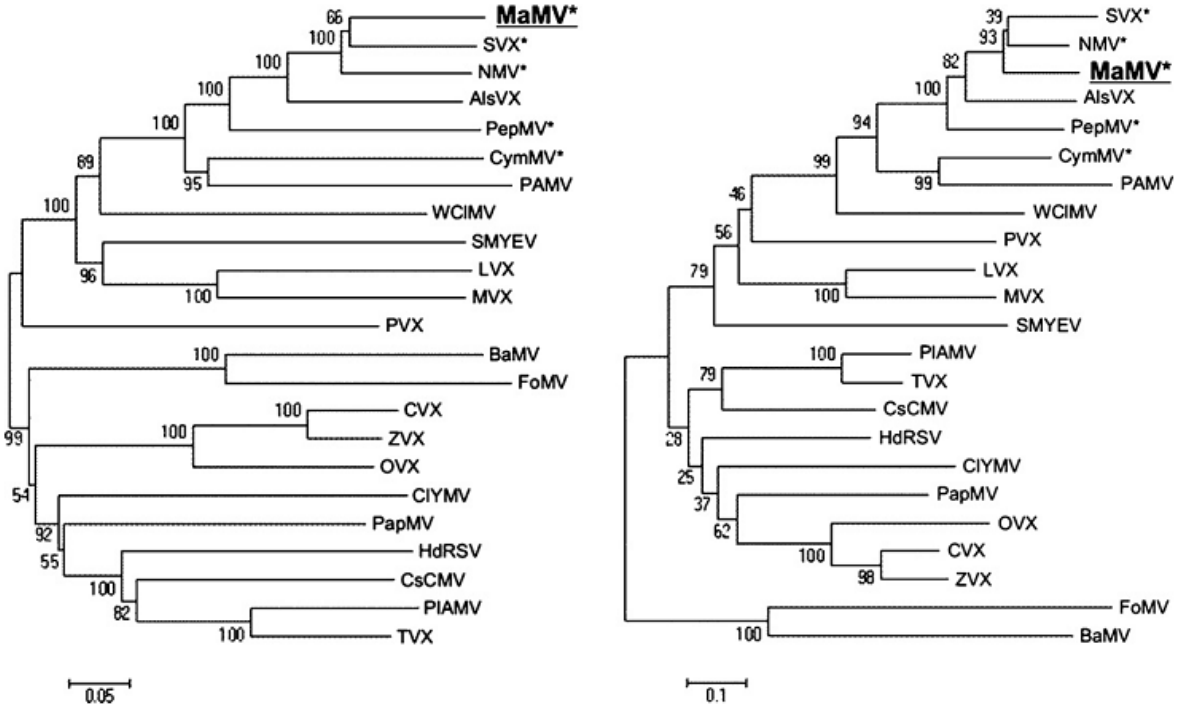


Рис. 4. Філогенетичний аналіз реплікази та капсидного білка MaMV та інших потексвірусів. Філогенетичне дерево реплікази та білка оболонки знаходиться на лівій та правій панелях відповідно. Цифри вказують початкове значення кожної гілки (500 повторень). Подібним є віруси, виділені зірочкою передбачена структура псевдовузла, ідентифікована на 30-кінці нетрансльованої області MaMV.

Висновок до розділу 3:

Використані у роботі алгоритми та методи аналізу вірусів мальви дозволили припустити, що алгоритми побудови філогенетичних дерев ефективні для диференціації мікроорганізмів відповідно до їх родової приналежності.

ВИСНОВКИ

1. На основі аналізу послідовностей генів послідовностей, задепонованих у базах даних GenBank, проведено молекулярно-філогенетичний аналіз вірусів мальви.

2. Дендрограми, побудовані методами максимальної парсимонії та об’єднання найближчих сусідів демонструють однакову топологію, відмінності спостерігаються лише в індексах бутстреп-аналізу

3. Філогенетичний аналіз показав, що всі псевдовузли, виявлені у вірусній послідовності, належать до підгрупи потексвірусів, які тісно пов’язані з MaMV.

4. Використані у роботі алгоритми та методи аналізу вірусів мальви дозволили припустити, що алгоритми побудови філогенетичних дерев ефективні для диференціації мікроорганізмів відповідно до їх родової приналежності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Malva. Словник українських наукових і народних назв судинних рослин. Київ : Наукова думка, 2004. 800 с.

2. Bacchetta G. et al. Seed image analysis provides evidence of taxonomical differentiation within the Lavatera triloba aggregate (Malvaceae*). Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants.* 2011. 206.5 P. 468-472.

3. Celka Z., Szczecińska M., Sawicki J. Genetic relationships between some of Malva species as determined with ISSR and ISJ markers. *Biodiversity Research and Conservation*. 2011. 19.2010. P. 23-32.

4. Geoffrey B. Botanica: ilustrowana, w alfabetycznym układzie, opisuje ponad 10 000 roślin ogrodowych, Niemcy: Könemann, Tandem Verlag GmbH, 2005, 547 p.

5. Fitzgerald M., Heinrich M., Booker A. Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. *Frontiers in pharmacology.* 2020. V. 10. 1480.

6. Celton J. et al. Update on comparative genome mapping between Malus and Pyrus. *BMC research notes.* 2009. 2.1. P. 1-7.

7. Bancroft J.B. et al. The entire nucleotide sequence of foxtail mosaic virus RNA. J. *Gen. Virol.* 1991. 72. P. 2173–2181.

8. Dolja V.V., Boyko V.P., Agranovsky A.A., Koonin E.V. Phylogeny of the capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. *Virology.* 1991. 184, P. 79–86.

9. Jie J. et al. Easy Flower: Flowers Meet Business and Technology. SAGE Business Cases. Tsinghua University School of Economics and Management. 2020. 4.

10. Kim J.E., et al. First report of Watermelon mosaic virus on Malva verticillata in Korea. *Plant Disease.* 2019. 103.2. P.380-395.

11. Razavi S. M. et al. Bioactivity of Malva sylvestris L., a medicinal plant from Iran. 2011. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 64.2 P. 574-579.

12. Lim S.J., Bordenstein S. R. An introduction to phylosymbiosis. *Proceedings of the Royal Society B.* 2020. 287. №. 1922. P. 2019-2090.

13. Pandey V.C., Bajpai O. Phytoremediation: from theory toward practice. *Phytomanagement of polluted sites*. Elsevier, 2019. P. 1-49.

14. Al-Snafi A.E. Medical benefit of Malva neglecta-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2019. V. 9. №. 6. P. 60-67.

15. Denti L. et al. MALVA: genotyping by Mapping-free ALlele detection of known VAriants. *Iscience.* 2019. V.18. P. 20-27.

16. Batten J.S., Yoshinari S., Hemenway C., Potato virus X: a model system for virus replication, movement and gene expression. *Mol. Plant Pathol*. 2003. 4, P. 125–131.

17. Sharifi-Rad J. et al. Malva species: Insights on its chemical composition towards pharmacological applications. *Phytotherapy Research*. 2020. V. 34. №. 3. P. 546-567.

18. Abdelhafez O.H. et al. Metabolomics analysis and biological investigation of three *Malvaceae* plants. *Phytochemical analysis.* 2020. V. 31. №. 2. P. 204-214.

19. Das U., Islam M.S. A review study on different plants in Malvaceae family and their medicinal uses. *American Journal of Biomedical Science and Research*. 2019. V. 3. P. 94-97.

20. Classen B., Blaschek W. High molecular weight acidic polysaccharides from Malva sylvestris and Alcea rosea. *Planta medica.* 1998. V. 64. №. 07. P. 640-644.

21. Mehrotra S., Rawat A.K.S., Shome U. Pharmacognostic Evaluation of the Flower of Alcea rosea L. *Natural Product Sciences*. 1999. V. 5. №. 1. P. 39-47.

22. Samavati V., Manoochehrizade A. Polysaccharide extraction from Malva sylvestris and its anti-oxidant activity. *International journal of biological macromolecules.* 2013. V. 60. P. 427-436.

23. Cheng C., Wang Z. Bacteriostasic activity of anthocyanin of Malva sylvestris. *Journal of Forestry Research.* 2006. V. 17. P. 83-85.

24. Akbar S. et al. Pharmacognostic studies of stem, roots and leaves of Malva parviflora L. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine.* 2014. V.4. №.5. P. 410-415.

25. Azab A. Malva: Food, medicine and chemistry. *European Chemical Bulletin.* 2017. V.6. №.7. P. 295-320.

26. Morin H. et al. High avidity binding of engineered papaya mosaic virus virus-likeparticles to resting spores of Plasmodiophora Brassicae. *J. Biotechnol*. 2007. 128. P. 423–434.

27. Das G. et al. Systematics, phytochemistry, biological activities and health promoting effects of the plants from the subfamily bombacoideae (family Malvaceae). *Plants.* 2021. V. 10. №. 4. P. 651-667.

28. Bao L. et al. Chemical profiling of Malva verticillata L. by UPLC-Q-TOF-MSE and their antioxidant activity in vitro. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2018. 150. №. 420-426.

29. Gasparetto J. et al. Ethnobotanical and scientific aspects of Malva sylvestris L.: a millennial herbal medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012. 64. 2 P. 172-189.

30. Prudente A. S. et al. Pre-clinical anti-inflammatory aspects of a cuisine and medicinal millennial herb: Malva sylvestris L. *Food and chemical toxicology.* 2013. 58. P. 324-331.

31. Тернинко І.І., Онищенко У.Є. Актуальність фармакогностичного вивчення мальви лісової як перспективного джерела нових лікарських засобів. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* 2011. 6. № 1. С. 37-41.

32. Liu C., Liu H., Hurst J., et al. Recent Advances on Citrus yellow vein clearing virus in Citrus. *Horticultural Plant Journal*. 2020. 6(4). P. 216-222.

33. Paul D. A review on biological activities of common Mallow (Malva sylvestris L.). *J. Life Sci* 2016. 4. P. 1-5.

34. Stanckovic I. et al. Viruses of tomato with special emphasis on emerging viruses. *Biljni lekar*. 2017. 45.6 P. 628-646.

35. Côté F. et al. Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of a new potexvirus: Malva Mosaic Virus. *Infection, Genetics and Evolution*. 2008. 8.1. P. 83-93.

36. Bautista Renato, Ronald FL. Preferences and development of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) on plant hosts of tomato spotted wilt tospovirus in Hawaii. *Environmental Entomology*. 1994. 23.6. P. 1501-1507.

37. Tomlinson J.A. et al. Weed plants as sources of cucumber mosaic virus. *Annals of applied biology*. 1970. 66.1. P. 11-16.

38. Palukaitis P.et al. Cucumber mosaic virus. *Advances in virus research*. 1992. 41. P. 281-348.

39. Naggar S.M. Pollen morphology of Egyptian Malvaceae: An assessment of taxonomic value. *Turkish Journal of Botanyю* 2004. 28.1 P. 227-240.

40. Jedrzejczyk I., Rewers M. Identification and genetic diversity analysis of edible and medicinal Malva species using flow cytometry and ISSR molecular markers. *Agronomy*. 2020. 10.5. P. 640- 650.

41. Lesk A.M. Introduction to bioinformatics. Oxford: Oxford University Press, 2002. 255 p.

42. Ignacimuthu S. Basic bioinformatics. New Dehli: Narosa Publishing House, 2006. 206 p.

43. Bioinformatics. A practical guide to the analysis of genes and proteins / Ed. by A.D. Baxevanis, B.F.F Ouellette. New York: Wiley, 2001. 470 p.

44. Griffiths J.F. An introduction to genetic analysis. New York: W. H. Freeman Publishers, 2005. 706 p.

45. . Brown S.M. Bioinformatics. A guide to biocomputing and the Internet. Natick: Eaton Publishing, 2000. 188 p.

46. Edwards D. Bioinformatics. Tools and applications. New York: Springer, 2009. 451 p.

47. Fulekar M.H. Bioinformatics: Applications in life and environmental. Berlin: Springer, 2009. 247 p.

48. Marcus F.B. Bioinformatics and systems biology. Collaborative Research and Resources. Berlin : Springer, 2008. 287 p.

49. Ramsden J. Bioinformatics. An introduction. Berlin : Springer, 2009. 271 p.

50. Selzer P.M. Applied bioinformatics. An introduction. Berlin: Springer, 2008. 287 p.

51. Setubal J. Introduction to computational molecular biology. Boston: Thomson, 1997. 320 p.

52. Stephenson F.H. Calculations for molecular biology and biotechnology. Amsterdam : Elsevier, 2003. 302 p.

ДОДАТКИ

СЕКЦІЯ 5. ЮРИДИЧНІ НАУКИ
SECTION 5. LEGAL SCIENCES 42

Потапчук В. О.
ОДИНИЧНІ ЗЛОЧИНИ І ЇХ ВИДИ 42

СЕКЦІЯ 6. МЕДИЧНІ НАУКИ
SECTION 6. MEDICAL SCIENCES 43

Зайцев В. І., Ілюк І. І., Кушнір С. В., Марчук О. А., Ежнед М. А.
СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА МІСЦЕ ЖУРАВЛИНИ У ЛІКУВАННІ ІНФЕКЦІЙ СЕЧОВИХ ШЛЯХІВ 43

Кравченко Т. Ю., Копійка Г. К., Зарецька В. В.
КОМПЛЕКСНА РЕАБІЛІТАЦІЯ ДІТЕЙ З СИНДРОМОМ ПОДРАЗНЕНОГО КИШЕЧНИКА 45

Тітаренко О. В., Тітаренко О. А., Лісовецька В. С.
ЕТІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ШУМУ У ВУХАХ 46

Суворкіна А. О.
ЗАСТОСУВАННЯ ГІПНОСУГЕСТИВНОЇ ТЕРАПІЇ В КОРЕКЦІЇ ТИНІТУСА 47

Сивий С. М., Рожковська Н. М, Ситнікова В. О.
ВПЛИВ ЕНДОМЕТРІОЗУ НА ПЕРБІГ ВАГІТНОСТІ 49

Тагунова І. К., Богданов К. Г., Андрєєв О. В.
РОЗВИТОК НАУКИ, МЕДИЧНОЇ ОСВІТИ В КОНТЕКСТІ ЄВРОІНТЕГРАЦІЇ 50

СЕКЦІЯ 7. ФАРМАЦЕВТИЧНІ НАУКИ
SECTION 7. PHARMACEUTICAL SCIENCES 52

Гаврищук Л. М., Печенюк В. І.
МОДЕЛЮВАННЯ АНТИТОКСОПЛАЗМОЇДНОЇ АКТИВНОСТІ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК МЕТОДОМ QSAR 52

СЕКЦІЯ 8. БІОЛОГІЧНІ НАУКИ
SECTION 8. BIOLOGICAL SCIENCES 54

Григорук І. Ю.
ВІРУСИ, ЩО УРАЖУЮТЬ МАЛЬВУ 54

Данилів С. І.
МЕДИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ *CALLISIA FRAGRANS* L. 55

Петриченко І. І.
ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ БАКТЕРІЙ В БІОТЕСТУВАННІ 57

На даний момент, при збільшеному імпорті продовольства та збільшенню кількості дрібних вітчизняних виробників сільгосппродукції, цей простий і досить точний метод набуває особливої актуальності.

Для збудження люмінесценції використовують ультрафіолетові промені. При цьому відбувається поглинання короткохвильового ультрафіолетового випромінювання досліджуваною речовиною з подальшим випусканням променів з більшою довжиною хвилі (світіння досліджуваного об'єкта) [4].

Список літератури

1. Girotti, S.; Ferri, E.N.; Fumo, M.G.; Maiolini, E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. Anal. Chim. Acta, 2008, 608, 2-29.

2. Fernández-Piñas, F.; Rodea-Palomares, I.; Leganés, F.; González-Pleiter, M.; Angeles Muñoz-Martín, M. Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2014, 145, 65-135.

3. Xu, T.; Close, D.; Smartt, A.; Ripp, S.; Sayler, G. Detection of organic compounds with whole-cell bioluminescent bioassays. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2014, 144, 111-151

4. Girotti, S.; Ferri, E.N.; Fumo, M.G.; Maiolini, E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. Anal. Chim. Acta, 2008, 608, 2-29.

УДК 634.73:54.06

Якимів І. І.
викладач кафедри фармацевтичного управління,
технології ліків та фармакогнозії,
Івано-Франківський національний медичний університет

ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЖУРАВЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ

Плоди, особливо представників родини *Ericaceae*, належать до найкращих харчових джерел біологічно активних сполук. Вони мають типовий смак і часто володіють антиоксидантними властивостями, і тому становлять великий інтерес для дієтологів і харчових технологів. Рід *Vaccinium* родини *Ericaceae* налічує понад 450 видів у Європі, Північній Америці, Центральній Америці, Центральній та Південно-Східній Африці, Мадагаскарі, Японії та Азії [2]. Чорниця (*Vaccinuim myrtillus*), брусниця (*Vaccinium vitis-idaea*) та журавлина (*Vaccinium macrocarpon, V. oxycoccos*) найбільше відомі і популярні ягоди цього роду.

Багато дослідників зосередили свою увагу на «великій журавлині» або «американській журавлині». (*Vaccinium macrocarpon* Aits), яка є характерною для північно-східної частини США та широко комерційно висаджена в Британській Колумбії, Канаді. Також брусниця або «кам'яна журавлина» (*Vaccinium vitis-idaea*), родом із Північної Америки та Європи, є значно менш відомою культурою. Але дотепер лише незначні дослідження стосувалися європейської журавлини (*Vaccinium oxycoccos* L.), зазвичай відомої як маленька журавлина або болотна журавлина [2].

У порівнянні з великою журавлиною, географічне поширення журавлини європейської значно ширше. Зустрічається в лісових районах Європи, Азії та Північної Америки. Цей чагарник широко промислово культивується в Росії та Естонії, а також Литві [4]. Це є вічнозелений чагарник з повзучими стеблами, що росте на торфі на низько дренованих ділянках. В європейських умовах зазвичай зустрічається на сфагнових болотах у північно-західній частині Європейського континенту аж до Північної Азії та Японії. Журавлина дозріває в кінці серпня до вересня і може зберігатися на рослинах до весни. Ягоди мають рожевий, червоний або темно-червоний колір, сильний кислий смак і можуть бути грушоподібної, яйцеподібної, круглої, овальної, сплюснутої або циліндричної форми.

СЕКЦІЯ 13. БІОТЕХНОЛОГІЯ

А. Р. Баня, І. В. Семенюк, О. В. Карпенко
ФІТОРЕМЕДІАЦІЯ ҐРУНТУ, ЗАБРУДНЕНОГО ДИЗЕЛЬНИМ ПАЛИВОМ, З РОСЛИНАМИ, МІКРОБНИМ ПРЕПАРАТОМ ТА АКТИВАТОРАМИ 200
В. С. Басюк, Ю. В. Максименко
СТВОРЕННЯ БІОМАТЕРІАЛІВ ШЛЯХОМ РОЗШИРЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО КОДУ 202
Є. А. Воронов, О. І. Сідашенко, К. І. Тимчий
ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ РОДУ *LACTOBACILLUS*, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ 204
М. В. Гордієнко, Ю. В. Максименко
ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ У ВИГОТОВЛЕННІ КИСЛОМОЛОЧНОЇ ПРОДУКЦІЇ 206
А. Г. Комісаренко, С. І. Михальська, В. М. Курчій, В. В. Бурлак
ОЦІНКА ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАН У БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ЗА ЗМІНАМИ РІВНЯ ПРОЛІНУ 207
Л. С. Кушнір, Ю. В. Максименко
ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІЙ-ПРОДУЦЕНТІВ НЕЗАМІННИХ АМІНОКИСЛОТ У БІОТЕХНОЛОГІЇ 210
М. О. Маліношевська, О. А. Шидловська
МЕТОДИ СИНТЕЗУ НАНОЧАСТОК СРІБЛА ТА ЦЕРІЮ 213
А. В. Онофрійчук, В. В. Онофрійчук
ЕКОЛОГІЧНІ ТА ЕНЕРГЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВИРОБНИЦТВА БІОГАЗУ ІЗ ВІДХОДІВ ТА ПОБІЧНИХ ПРОДУКТІВ АГРОПРОМИСЛОВОГО КОМПЛЕКСУ 216
І. О. Першко
НАНОМАТЕРІАЛИ НА ОСНОВІ СИНТЕТИЧНИХ ПЕПТИДІВ: ВЛАСТИВОСТІ ТА ШЛЯХИ ЗАСТОСУВАННЯ 218

І. І. Петриченко
БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ РЕЗОНАНСНИЙ ПЕРЕНОС ЕНЕРГІЇ ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ БАКТЕРІЙ 221
С. П. Прилуцький
ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ТЕХНОЛОГІЙ ТРАНСГЕНЕЗУ ЕУКАРІОТІВ У ГЕНЕТИЧНІЙ ІНЖЕНЕРІЇ 222
А. М. Прокопало, Н. С. Щеглова, О. В. Карпенко, В. І. Лубенець
КОМПОЗИЦІЙНІ НАНОЧАСТИНКИ РАМНОЛІПІДІВ ІЗ ТІОЕСТЕРАМИ 224
М. Р. Рогова, В. І. Коваленко, І. М. Волошина
ВИКОРИСТАННЯ НАНОЧАСТОК ОКСИДУ ТИТАНУ ТА ОКСИДУ ЦИНКУ ЯК СОНЦЕЗАХИСНИХ ФІЛЬТРІВ 226
Ю. О. Хмельницька, О. А. Шидловська
ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГУ РНІВ, ВИДІЛЕНОГО З *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* 229
О. Ю. Чорнобров
ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ РОСЛИН *MUSCARI ARMENIACUM* LEICHTLIN EX BAKER IN VITRO 231
I. Petrychenko
BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER FOR *MEASURING BACTERIA* LUMINESCENCE 233

СЕКЦІЯ 14. СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ПАРАЗИТОЛОГІЇ
Д. О. Ананенко, І. О. Погоріла
ЛЯМБЛІОЗ В УКРАЇНІ 235
А. Ю. Філіпова, О. В. Павлюченко
ІНВАЗІЙНІ ХВОРОБИ ЛЮДИНИ ТА ЇХ ПРОФІЛАКТИКА 238
Д. Р. Щербанюк, І. О. Погоріла
РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ІКСОДОВИХ КЛІЩІВ В УКРАЇНІ 240

СЕКЦІЯ 15. ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ ТА ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

9.	Алтухова А.В., Сагіна Ю.В. ДО ПИТАННЯ ПРО КОМП'ЮТЕРНУ ГРАФІКУ ЯК ОСНОВУ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ ДАНИХ	66
10.	Алғазиева А.Д., Ибраева Ж.Е. ПОЛИГРАФИЯЛЫҚ ФОЛЬГАМЕН БЕДЕРЛЕУ САПАСЫНЫҢ ТҮПТЕУ ҚАТЫРМАСЫНЫҢ КӨРСЕТКІШТЕРІНЕ ТӘУЕЛДІЛІГІ	68
11.	Данилюк М.М., Данилюк Я.В. МУЗИЧНО-КУЛЬТУРНІ ТРАДИЦІЇ СЛОБОЖАНЩИНИ ЩОДО ВИХОВАННЯ ТВОРЧОЇ МОЛОДІ	75
12.	Кунц Т.В. МИСТЕЦЬКІ ЖУРНАЛИ НІМЕЧЧИНИ: ОСОБЛИВОСТІ КОНТЕНТУ	78
13.	Новожилова П., Хиневич Р. БІЛИЙ ПРОСТІР У ПРОЕКТУВАННІ РЕКЛАМНИХ ВЕБ-САЙТІВ	81
	BIOLOGY	
14.	Hryhoruk I. ANALYS OF MALVA MOSAIC VIRUS	88
15.	Melnyk A. ВИКОРИСТАННЯ БІНАРНИХ ВЕКТОРІВ У СУЧАСНИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ	90
16.	Petrychenko I., Hretskyi I. CHARACTERISTICS OF BIOTEST FOR ELECTROMAGNETIC RADIATION WITH THE PARTICIPATION OF LUMINESCENT BACTERIA PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM	93
17.	Кириченко І.О. ОСНОВНІ ЗАСАДИ ФОРМУВАННЯ ПОНЯТТЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ В ШКІЛЬНОМУ КУРСІ БІОЛОГІЇ ТА ЕКОЛОГІЇ	95

	CHEMISTRY	
18.	Distanov V., Zaliska T., Klimets A., Kadochkina V. SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF 9-SUBSTITUTED 3,4-PERYLENE DICARBOXYLIC ACID	100
19.	Базалюк Л.В. МОДИФІКАЦІЯ ГУМОВОЇ КРИХТИ ПЕРОКСИДОМ ВОДНЮ	106
	ECONOMY	
20.	Drobotia Y., Zadan A. УПРАВЛІННЯ КРЕДИТНИМ ПОРТФЕЛЕМ БАНКУ В РЕАЛІЯХ ДИДЖИТАЛІЗАЦІЇ	111
21.	Fedko S., Kryukovska O., Gonchar R. ECONOMIC EFFICIENCY FROM LABOR PROTECTION MEASURES AT THE WATER TREATMENT PLANT	114
22.	Miahkykh I. PROBLEMS OF STRATEGIC MANAGEMENT OF COMPETITIVENESS OF POTENTIAL AND COMPETITIVE ADVANTAGES OF THE ENTERPRISE	121
23.	Ulko Y., MANAGEMENT OF LAND (SOIL) RESOURCES BASED ON THE DEVELOPMENT OF PROJECTS ON BIOLOGICALIZATION OF AGRICULTURAL PRODUCTION	123
24.	Ільків Л.А. СОЄВИРОБНИЦТВО В УКРАЇНІ: РИЗИКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ	127
25.	Артемчук Є.А. ВПЛИВ ВІЙНИ РФ ПРОТИ УКРАЇНИ НА ФОНДОВІ РИНКИ ЄВРОПИ	131
26.	Атаманчук З.А., Мацедонська А.С. РОЗВИТОК ЕЛЕКТРОННОЇ КОМЕРЦІЇ У КОНТЕКСТІ СУЧАСНИХ ІНТЕГРАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	135