

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

**ШЕВЧЕНКО ТЕТЯНА ПЕТРІВНА**

УДК: 578.85/.86: 578.2

**МОЛЕКУЛЯРНА ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ВІРУСІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР  
УКРАЇНИ**

03.00.06 – вірусологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України.

**Науковий консультант:** доктор біологічних наук, професор

**Поліщук Валерій Петрович**

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Щербатенко Іван Степанович,**  
Інститут мікробіології і вірусології  
ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
старший науковий співробітник лабораторії вірусів рослин

доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Матвієнко Наталія Миколаївна,**  
Інститут рибного господарства НААН,  
завідувач відділу іхтіопатології

доктор медичних наук, професор  
**Міроненко Алла Петрівна,**  
ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб  
ім. Л.В. Громашевського НАМН України»,  
завідувач відділу респіраторних та інших вірусних інфекцій

Захист дисертації відбудеться «17» грудня 2019 р. о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 03127, м. Київ, проспект академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, спеціалізована вчена рада Д 26.001.14.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12.

Автореферат розісланий «14» листопада 2019 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради



В.В. Джаган

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Вірусні захворювання є одним з основних обмежуючих факторів у вирощуванні культурних рослин (Hanssen et al., 2010). Питання мінімізації ризиків, які обумовлюються вірусними інфекціями рослин, завжди привертало увагу вчених, оскільки вірусні хвороби не лише є причиною значних втрат врожаю, але й слугують чи не єдиним прикладом захворювань, які не можна вилікувати або ж лікування яких не є рентабельним.

Очевидно, що взаємодія рослин, їх вірусів та факторів довкілля є комплексною і включає інші патогени, комахи-переносники, інші рослини (в тому числі, резервуари), а також абіотичні та антропогенні фактори (Roossinck, 2015).

Епідеміологія інфекційних хвороб у класичному розумінні - це система знань про закономірності епідемічного процесу та методи його вивчення, а також сукупності протиепідемічних заходів для попередження інфекційних хвороб, зниження показників захворюваності та ліквідації окремих інфекцій. Предметом вивчення епідеміології інфекційних хвороб є епідемічний процес, закономірності його розвитку та форми прояву.

Молекулярна епідеміологія - це наука, що вивчає роль потенційних генетичних і середовищних факторів ризику у етіології, поширенні і профілактиці захворювань у популяції з використанням молекулярно-біологічних та біоінформаційних методів (Khoury et al., 1993; Slatter et al., 2008). У фітовірусології цей термін був вперше використаний при вивченні генетичної структури популяції вірусу огіркової мозаїки в Іспанії. Методи генетичного аналізу вперше забезпечили можливість молекулярного типування ізолятів та штамів вірусів (Garcia-Arenal et al., 2000) і набули широкого використання (Moury et al., 2006; Lecoq et al., 2014). Філогенетичні дослідження популяцій вірусів овочевих культур підтвердили наявність кореляції між генетичними властивостями вірусів та їх географічним поширенням і епідеміологічними властивостями, та свідчать на користь подальшої еволюції вірусів рослин в новому локалітеті після потрапляння до країни (Simmons et al., 2008).

Овочеві культури є важливим і комерційно привабливим елементом продукції рослинництва в Україні. Їх посівна площа складає 450 тис. гектарів (менше 2%), але обсяг виробництва сягає близько 9,5 млн. тонн, тобто майже 10% від валового збору всіх сільськогосподарських культур (<https://minagro.gov.ua>). Останніми роками спостерігається стійке щорічне зростання (+6-10%) площ захищеного ґрунту для вирощування овочевих культур (<http://www.ukrstat.gov.ua>).

Кількість вірусів, які інфікують культурні рослини, невпинно зростає через адаптацію нових сільськогосподарських практик, глобальне потепління та поширення векторів, а також глобалізацію, що супроводжується масовим і швидким обміном насіннєвим та посадковим матеріалом між різними регіонами земної кулі. Згідно останнього звіту комітету з таксономії вірусів, на сьогодні відомо більше 1000 вірусів рослин (King et al., 2012), причому більше 300 вірусів уражують овочеві культури (Lecoq, Katis, 2014).

Інтенсифікація виробництва призвела до сильних екологічних зрушень в агроценозах, у тому числі, до змін у видовому та штамовому різноманітті вірусів рослин (Gal-On, 2007; Mishchenko et al., 2019). У свою чергу, це спричинило появу

в Україні нових захворювань вірусної природи та збільшення агресивності вже присутніх видів (Snihur et al., 2019).

Враховуючи важкість наслідків ураження овочевих культур вірусами (зниження врожайності, втрата комерційної якості продукції, швидке виродження сортів), питання захисту від фітовірусів та їх попередження стоїть для України та світу вкрай гостро (Asad, Tomohide, 2007). При цьому слід зазначити, що окрім інших чинників, ступінь прояву та характер симптомів захворювання сильно залежать від того, уражена рослина одним видом/штамом вірусу, чи кількома. Саме тому вивчення взаємодії різних вірусів на рівні організму хазяїна є важливим для попередження багатьох захворювань рослин.

Незважаючи на вищезазначене і на факт того, що в природних умовах та агрокультурі рослини зазвичай контактують з кількома патогенами одночасно, на сьогодні наше розуміння механізмів взаємодії різних вірусів при змішаних інфекціях залишається поверхневим (Gallitelli et al., 2000), а більша частина відомих даних отримана при дослідженні моноінфекцій.

Встановлення штамової та групової приналежності, вивчення генетичних властивостей та філогенетичних взаємозв'язків ізолятів вірусів овочевих культур, які циркулюють в агроценозах (разом з інформацією щодо дії антропогенних, абіотичних та інших біотичних факторів довкілля) (Jones, 2004; Desbiez et al., 2018), необхідні для розробки дієвих заходів для попередження проникнення нових штамів та видів вірусів на територію України та розвитку епідемій, і є запорукою розуміння причин і механізмів виникнення більш вірулентних ізолятів вірусів.

Розуміння динаміки популяцій вірусів овочевих культур повинне враховуватись перед створенням та застосуванням стійких сортів або генетично модифікованих рослин на певній території і є основою для розробки та впровадження заходів контролю вірусних захворювань (Yasaka et al., 2017), зниження біологічного та екологічного ризику, зменшення потенційних втрат врожаю, більш ефективного планування господарчої діяльності, підвищення рентабельності виробництва та реалізації національної продовольчої стратегії та біобезпеки.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана у рамках науково-дослідних тем кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка НДР 01БФ036-01 (№ ДР 0101U005076) «Моніторинг збудників вірусних інфекцій з метою розробки наукових основ екологічно чистих технологій вирощування сільськогосподарських культур», 2001-2005 рр., НДР 06БФ036-04 (№ ДР 0106U005749) «Вивчення екологічних особливостей та біоіндикаторних властивостей різних організмів та їх угруповань в умовах трансформованого середовища для розв'язання проблем біобезпеки України», 2006-2010 рр., НДР 11БФ036-02 (№ ДР 0111U004649) «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій», 2011-2015 рр., НДР 16БФ036-02 (№ ДР 0116U004778) «Молекулярне типування та механізми еволюційної адаптації вірусів культурної і дикорослої флори України», 2016-2018

рр. та під час виконання білатерального проекту ДФФД-БРФФД «Дослідження видового різноманіття та філогенетичних взаємовідносин вірусів, що інфікують овочеві культури в агроценозах України та Білорусії» (2011-2012рр.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було встановити закономірності епідеміології вірусів овочевих культур України з використанням їх молекулярно-біологічних характеристик.

Відповідно до мети, були поставлені такі завдання:

1. Дослідити спектр вірусів, актуальних та шкодочинних для овочевих культур України.
2. Ідентифікувати детектовані віруси за комплексом таксономічно значущих ознак.
3. Провести порівняльний аналіз поширеності моно- та змішаних вірусних інфекцій овочевих культур.
4. Проаналізувати ефективність насінневого шляху передачі відповідних вірусів та його епідеміологічне значення в Україні.
5. Провести молекулярне типування вірусів овочевих культур за їх маркерними генами.
6. Оцінити вірулентність українських ізолятів вірусів овочевих культур за генетичними ознаками та вивчити її кореляцію з біологічними властивостями вірусів.
7. Проаналізувати філогенетичну спорідненість українських ізолятів найбільш шкодочинних та варіабельних вірусів овочевих культур з їх відомими штамми та встановити наявність рекомбінантних ізолятів.
8. Встановити епідеміологічні закономірності поширення вірусів овочевих культур в Україні.
9. На підставі результатів досліджень розробити концептуальний підхід до ефективного та рентабельного контролю вірусних інфекцій овочевих культур в Україні.

*Об'єкт дослідження* – віруси, що інфікують основні овочеві культури в Україні.

*Предмет дослідження* - молекулярні властивості, джерела та шляхи розповсюдження вірусів овочевих культур в Україні.

*Методи дослідження.* У роботі використаний спектр методів, який включав візуальну діагностику вірусних захворювань, імуноферментний аналіз у різних модифікаціях, трансмісійну електронну мікроскопію, виділення тотальної РНК з рослинного матеріалу, очистку кДНК, електрофорез нуклеїнових кислот, полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), методи очистки кДНК, секвенування кДНК за Сенгером, філогенетичний аналіз, методи пошуку рекомбінантів та методи статистичної обробки даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше в Україні описані віруси м'якої мозаїки перцю (РММoV) та мозаїки турнепсу (TuMV), встановлені їх рослини-хазяї та вивчені способи передачі вірусів, зокрема CMV, ToMV, які є небезпечними для широкого кола культурних рослин. Встановлений спектр вірусів, які з урахуванням екологічних умов та біологічних властивостей є актуальними та шкодочинними для овочевих культур України. Вперше

підтверджено значне поширення змішаних вірусних інфекцій та встановлено типові групи вірусів, що їх викликають в Україні. Підтверджено, що насіння овочевих культур є одним із важливих та часто недооцінених джерел вірусів в екосистемах, а насінневий спосіб передачі є актуальним для багатьох вірусів овочевих культур і потребує відповідного контролю. Вперше в Україні виявлено штам вірусу жовтої мозаїки цукіні (ZYMV), який передається насінням з ефективністю у 2,6%. Отже, встановлено нове джерело ZYMV та спосіб його передачі при циркуляції на території України. Підтверджено кореляцію біологічних властивостей українських ізолятів вірусів (ToMV, TuMV, CMV та ін.) з їх генетичними ознаками у контексті вірулентності щодо овочевих культур. Вивчено філогенетичну спорідненість українських ізолятів найбільш шкодочинних вірусів овочевих культур з їх відомими штамми, встановлено наявність рекомбінантних ізолятів WMV2 та TuMV. За результатами аналізу послідовності повного геному українського ізоляту TuMV встановлено, що ізолят UKR9 не був описаний раніше і є нетиповим для Європи рекомбінантом двох різних генетичних груп World-B та Asian-BR. Показано, що виявлені ізоляти ToMV не належить до високошкодочинних штамів, які можуть долати стійкість сортів до даного вірусу.

Вперше доведено можливість значного поширення вірусів овочевих культур в міських екосистемах, де супутні культурні та дикорослі рослини є резервуарами для збереження популяцій вірусу та його передачі. Встановлено епідеміологічні закономірності поширення вірусів овочевих культур в Україні. Розроблено концептуально новий підхід до контролю актуальних вірусних інфекцій комерційно важливих овочевих культур України. Отримані результати є науковим підґрунтям для вдосконалення системи епідеміологічного та вірусологічного нагляду за вірусними хворобами овочевих культур України.

**Практичне значення одержаних результатів.** За результатами молекулярного типування депозитовано до генбанку (GenBank, NCBI) повногеномну та 33 часткові послідовності українських ізолятів вірусів овочевих культур, що складає більше 25% всіх сиквенованих вірусів рослин з України. Вільний доступ до генетичної інформації українських ізолятів вірусів рослин дає змогу їх використовувати для порівняльного аналізу, побудови прогностичних еволюційних та епідеміологічних моделей, розробки методів діагностики та схем контролю вірусних захворювань. Виділені ізоляти фітовірусів депозитовані до колекції вірусів кафедри вірусології і використовуються для подальшого порівняння їх властивостей з властивостями нововиділених ізолятів вірусів та залучені як тест-об'єкти для вивчення вірусів рослин у навчальному процесі. Практичні положення дисертаційної роботи було використано в учбовому процесі ННЦ «Інститут біології та медицини», а саме для проведення спецкурсів зі студентами кафедри вірусології: «Фітовіруси», «Еволюція вірусів», «Прикладна вірусологія». Також актуальним є використання даних результатів при проведенні лабораторних робіт та навчальних практик. Отримані результати можуть бути використані для вдосконалення методів молекулярної діагностики вірусів овочевих культур. Розроблено методичні рекомендації для діагностики та контролю вірусних захворювань перцю та томату в умовах України.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійним та оригінальним науковим дослідженням, виконаним на базі кафедри вірусології. Постановка задач, опрацювання літературних наукових джерел, розробка експериментальних схем та отримання експериментальних даних, аналіз та узагальнення результатів, їх статистична обробка, формулювання висновків дисертації зроблені автором особисто. Відбір дослідних зразків рослин овочевих культур здійснювався за участі співробітників кафедри вірусології.

Матеріали та положення кандидатської дисертації автора не використовувалися в докторській дисертації. Всі дані, отримані у співавторстві, відображені у спільних публікаціях. Автор висловлює щире подяку науковому консультанту д.б.н., професору Поліщуку В.П. за участь у плануванні експериментів та обговоренні результатів попередніх досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень і положення дисертації роботи доповідались та обговорювались на таких конференціях: 70th Anniversary of Plant Protection Institute and Annual Balkan Week of Plant Health, May 28-31, 2006 (Kostinbrod, Bulgaria), Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів і молодих учених «Біологічне різноманіття екосистем і сучасна стратегія захисту рослин», 4-6 червня, 2007 р. (Харків), V Міжнародна конференція «Біоресурси і віруси», 10-13 вересня, 2007 р. (Київ), International Conference «Responses of Plants to Environmental Stresses», May 12-18, 2008 (Elena, Bulgaria), 16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых „Биология - наука XXI века” (Пушино, 2012), Конференція „Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві”, 25-27 вересня 2012 р. (Чернігів), VII Міжнародна конференція „Біоресурси та віруси”, 10-13 вересня 2013 р. (Київ), XIII З’їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 2013 р. (Ялта); VIII International Scientific Agriculture Symposium “AGROSYM 2017”, October 5-8, 2017 (Jahorina, Bosnia and Herzegovina), 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity, July 03-06, 2018 (Kyiv).

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 49 наукових праць, серед яких 30 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених МОН України, та міжнародних фахових журналах (9 статей у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS), одна монографія у співавторстві, 2 навчально-методичних посібника, два авторських свідоцтва та 14 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій і з’їздів.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація містить вступ; огляд літератури; розділ матеріалів та методів дослідження; розділи, у яких висвітлено результати досліджень, їхнє обговорення та узагальнення; висновки та список використаних літературних джерел, який складається з 354 найменувань; додатку. Загальний обсяг дисертаційної роботи 324 сторінки (без додатку), дисертація містить 62 рисунка та 23 таблиці.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури** складається з трьох розділів, в яких висвітлені питання різноманіття видового складу вірусів, що інфікують овочеві культури в світі, морфологію віріонів, фізико-хімічні та біологічні властивості вірусів. Наведені сучасні відомості стосовно молекулярно-генетичних особливостей цих вірусів та охарактеризовано їх епідеміологічні аспекти. Огляд літератури обґрунтовує доцільність виконання роботи.

**Матеріали та методи дослідження.** Об'єктами досліджень були віруси, які інфікують рослини овочевих культур. Рослинні зразки відбирали шляхом візуального обстеження рослин на наявність типових вірусоподібних симптомів (мозаїки, некрозів, хлорозів, деформації листкової пластинки та плодів, та ін.). Для досліджень використовували листки середнього або верхнього ярусу та плоди рослин.

Електронномікроскопічні дослідження проводились з використанням просвічуючого електронного мікроскопу JEOL (JEM-1400) Центру колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Ідентифікацію вірусів за допомогою імуноферментного аналізу проводили з використанням власних та комерційних тест-систем (LOEWE, Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника, та антивидових антитіл (АТ), використовували антикролячі АТ, кон'юговані лужною фосфатазою (Dianova, Німеччина). Результати реєстрували на автоматичному ІФА-аналізаторі Thermo Labsystems Opsis MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм. За позитивний результат приймався показник  $E_{405}$ , що втричі перевищував показник негативного контролю. Для порівняння результатів використовували середній показник (середньоарифметичне) (Лакин, 1980).

Для виділення тотальної РНК зі зразків інфікованих рослин використовували кіти для виділення РНК фірм Invitrogen (США), Promega (США), Qiagen (Великобританія), Omega (США)

Для детекції вірусів методом ЗТ-ПЛР використовували кіт one-step-RT-PCR (Qiagen, Великобританія) та RevertAid RT Reverse Transcription Kit з Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США). Постановку реакції проводили за рекомендацією виробника. Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі з використанням стандартних маркерів Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas, Латвія).

Для сиквенування продукти етапу ампліфікації очищували з агарозного гелю за допомогою набору реагентів «mi-Gel Extraction Kit» (Thermo, США).

Сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з використанням Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, США). Пошук та вибірку необхідних послідовностей проводили за допомогою BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Матрицю даних для філогенетичного аналізу формували з отриманих нами сиквенсів, а також послідовностей, імпортованих з GenBank

Для філогенетичного аналізу застосовували програмні пакети MEGA. Вирівнювання послідовностей здійснювали за допомогою програми Clustal W (Thompson et al., 1994). Для побудови філогенетичних дерев користувалися методами максимальної правдоподібності (ML) (Huelsenbeck, 1997) та зв'язування найближчих сусідів (NJ) (Saitou, Nei, 1987) з використанням оптимальних моделей (найчастіше – моделі Джукса-Кантора, яка є найбільш оптимальною для таких досліджень) (Lie, Goldman, 1998). Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп-тест з 1000 реплікаціями (Felsenstein, 1985). Для асемблювання та багаторазового вирівнювання послідовностей генів вірусів застосовували програмний пакет BioEdit v.7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Для рекомбінаційного аналізу використовувався програмний пакет RDP4 та вбудовані в нього алгоритми RDP, GENECONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA та SISCAN (Martin et al., 2010, Martin, Rybicki, 2000, Sawyer, 1999, Salminen et al., 1995, Smith, 1992, Posada, Crandall, 2001, Gibbs et al., 2000). Достовірними вважалися такі рекомбінаційні події, які були підтверджені принаймні 3 алгоритмами.

Розрахунки математично-статистичних показників отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel з врахуванням t критерію Ст'юдента та за допомогою вбудованих алгоритмів відповідних програмних пакетів.

Роботу виконано у відповідності до Хельсінкської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28-а сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятої у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаної Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 IV "Про захист тварин від жорстокого поводження".

### **Результати досліджень та їх обговорення**

**Ідентифікація вірусів у зразках рослин овочевих культур.** Відбір зразків овочевих рослин з вірусоподібними симптомами проводився у агроценозах 13 областей України та Автономної Республіки Крим протягом вегетаційних сезонів 2003-2018 років (рис.1). Зразки рослин відбирали у період між цвітінням і плодоношенням.

При цьому спостерігались наступні симптоми: зморшкуватість, деформацію та пожовтіння листкових пластинок; жовту чи світло-зелену мозаїку листкових пластинок; темно-зелені плями різного розміру на листі, нарости на плодах, їх пожовтіння, плямистість та деформацію.

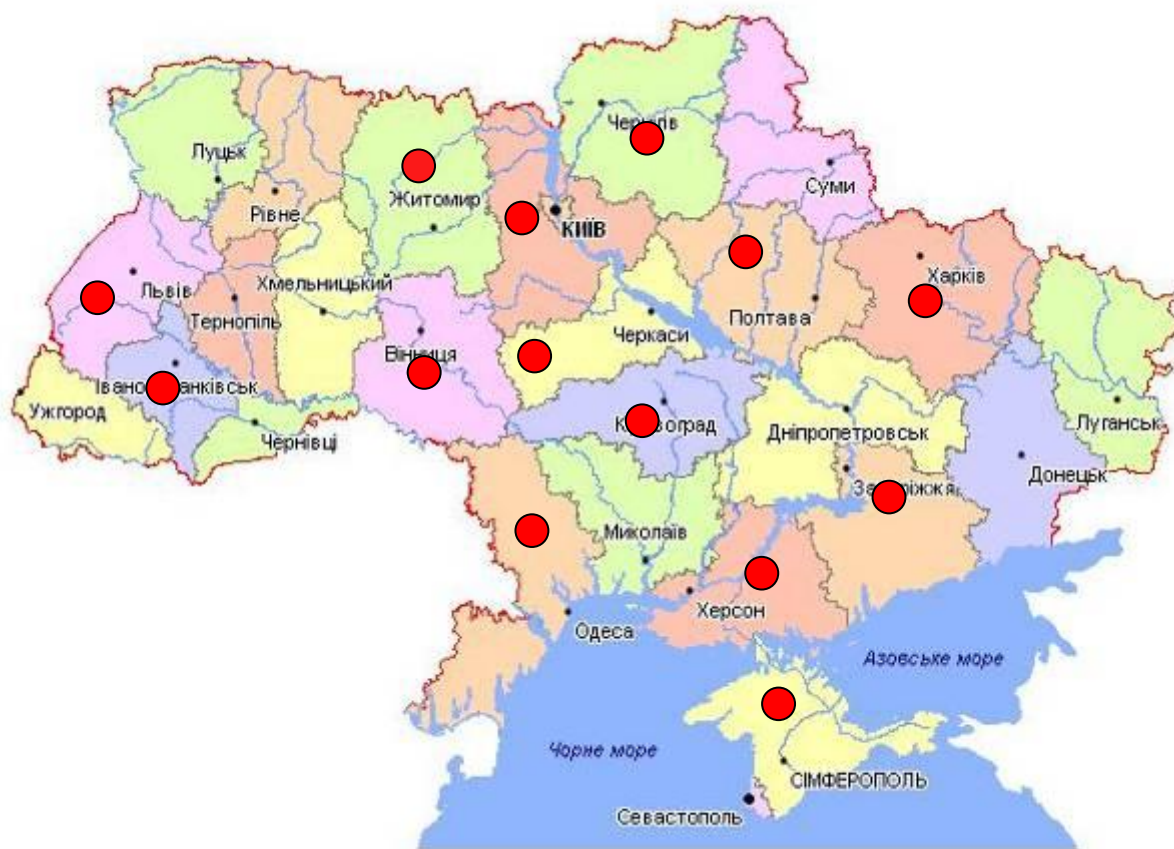


Рис.1. Карта регіонів відбору зразків рослин овочевих культур

Характеристика прояву симптомів на рослинах не дозволяє визначити таксономічну приналежність збудника. Отож, подальші дослідження були спрямовані на встановлення видів вірусів, використовуючи методи імуноферментного аналізу. Зразки рослин аналізували на наявність антигенів наступних вірусів: CMV, ToMV, TMV, TRV, ToRV, PMMV, WMV2, ZYMV, CGMMV, PVY, PVX та TuMV за допомогою власних вірусоспецифічних поліклональних антитіл та тест-систем виробництва Loewe (Німеччина).

У результаті детекції вірусів серед представників родини *Cucurbitaceae* встановлена наявність 4-х вірусів, а саме CMV, WMV2, ZYMV та CGMMV (рис.2), серед представників родини *Solanaceae* встановлена наявність 6-ти вірусів, таких як CMV, ToMV, TMV, TRV, PMMV, PVY та PVX (рис.3), а серед представників родини *Brassicaceae* - 2-х вірусів: CMV та TuMV (рис.4).

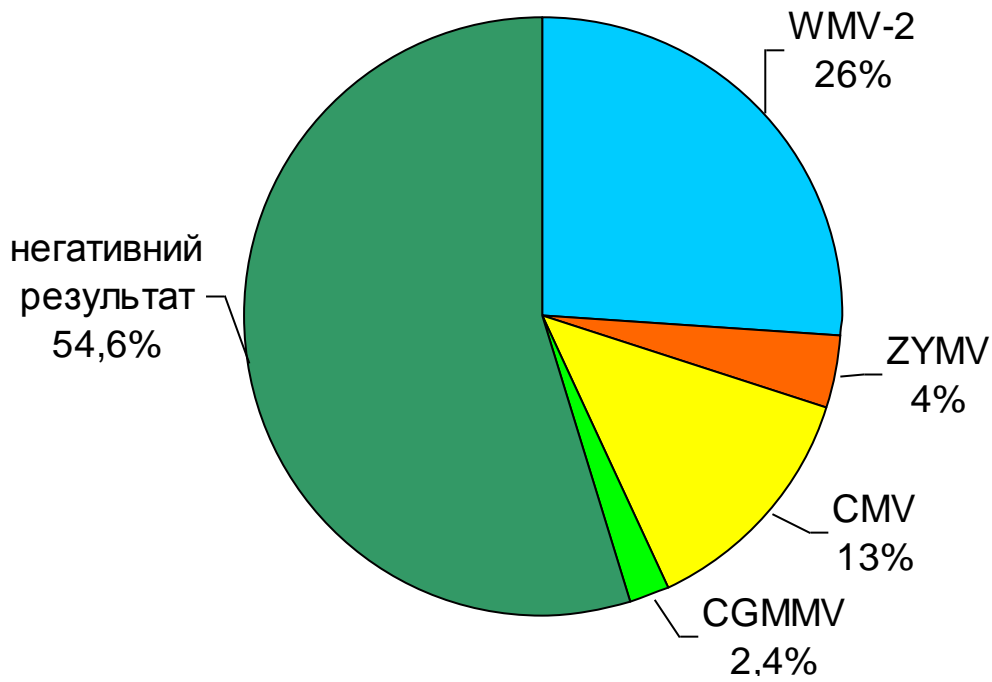


Рис.2. Узагальнені результати детекції вірусів серед представників родини *Cucurbitaceae*

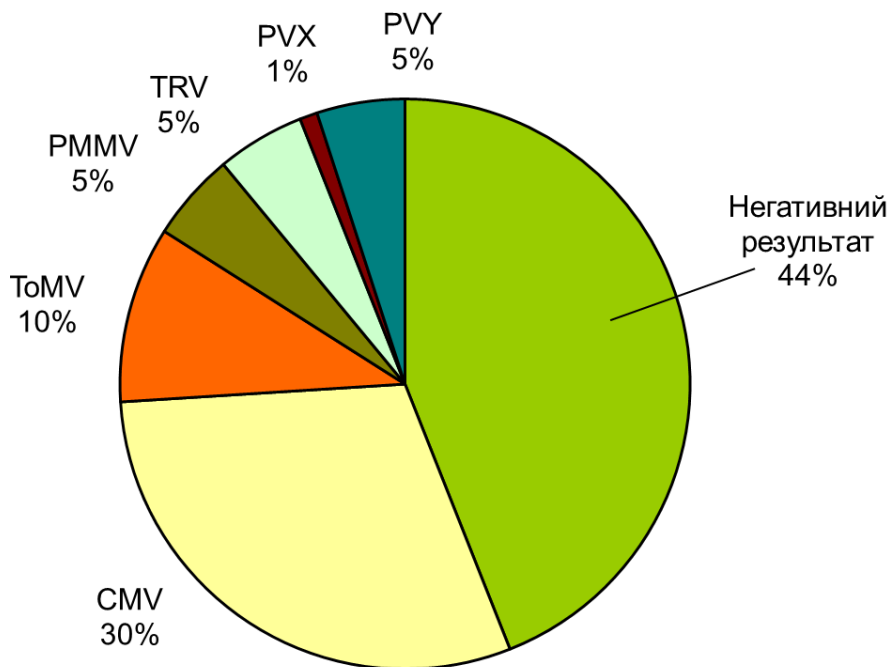


Рис.3. Узагальнені результати детекції вірусів серед представників родини *Solanaceae*

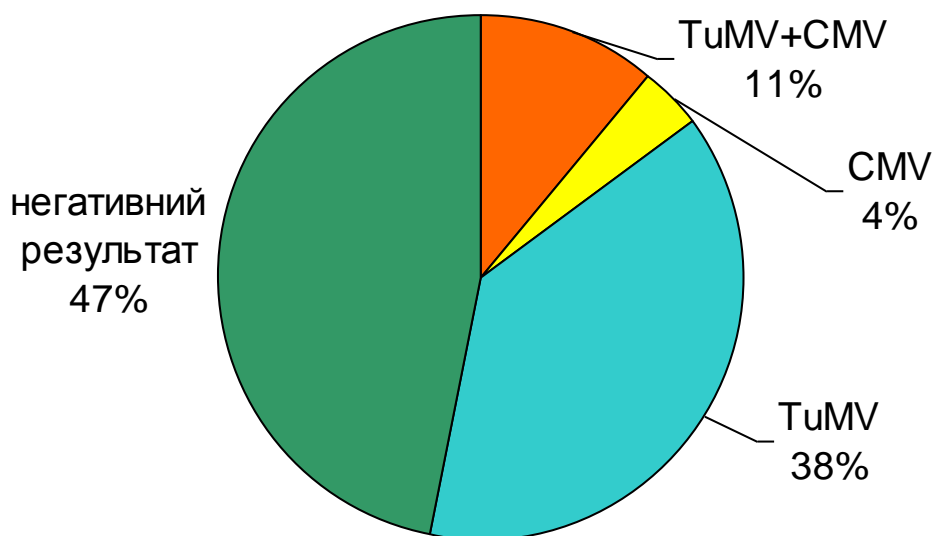


Рис.4. Узагальнені результати детекції вірусів серед представників родини *Brassicaceae*

Встановлено, що різні місця відбору зразків рослин родини *Brassicaceae* характеризувалися різним рівнем частоти інфекції TuMV. У випадку промислових полів та приватних господарств середнє значення частоти інфекції TuMV становило 39%, тоді як у міських екосистемах середнє значення частоти інфекції TuMV сягало 55%, що свідчить про ефективність агроприйомів при вирощування сільськогосподарських культур та збереження популяції вірусу у неконтрольованих міських екосистемах.

Таким чином, у зразках рослин з вірусоподібними симптомами методом ІФА детектовані антигени десяти вірусів різних таксономічних груп: WMV2, ZYMV, CMV, CGMMV, PVY, PVX, PMMoV, TRV, ToMV і TuMV. Частота виявлення вірусів варіювала у межах 1-30%. PMMoV та CGMMV рідко зустрічалися на овочевих культурах України в умовах відкритого ґрунту.

**Змішані вірусні інфекції овочевих культур.** У природі, в тому числі і при розвитку патологічних процесів рослин, часто зустрічаються багатокомпонентні системи вірусів. Характер взаємозв'язку цих вірусів у розвитку патологічних реакцій у рослині-хазяї вивчений недостатньо.

Зокрема, CMV зустрічався як у моноінфекції, так і у вигляді змішаної інфекції з WMV2 та ZYMV.

Електронномікроскопічні дослідження підтвердили наявність обох типів вірусних частинок: сферичних віріонів CMV з діаметром 29 нм і нитковидних віріонів WMV2 довжиною 730 нм, що співпадає з літературними даними (ICTV, 2012) (рис.5).

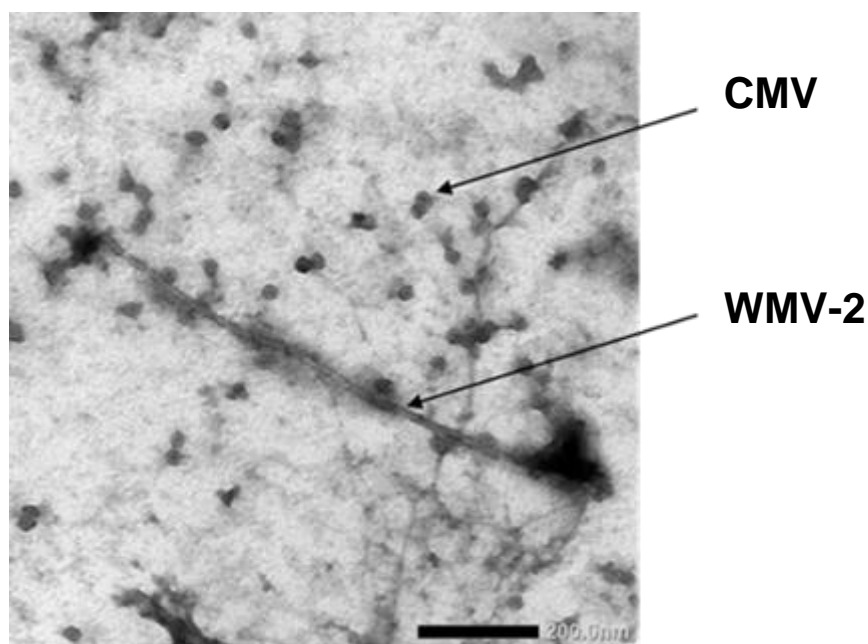


Рис.5. Електронномікроскопічне зображення зразку із змішаною інфекцією CMV і WMV2 (лінійка - 200 нм)

На рослинах із змішаною інфекцією CMV і WMV2 спостерігалась темно-зелена мозаїка, потемніння вздовж жилок, суворі деформації листків та плодів.

Загалом, при змішаних інфекціях CMV і WMV2 вірусоподібні симптоми мали більш суворий візуальний прояв (рис.6).



Рис.6. Симптоми суворі деформації листків та плодів *Cucurbita pepo* за змішаної інфекції CMV і WMV2

Також були знайдені рослини, одночасно уражені трьома вірусами (CMV, WMV2 і ZYMV). Частота трапляння зразків рослин з таким типом інфекції становила 5%. На динях та гарбузах спостерігали темно-зелену мозаїку, деформацію листкової пластинки, пухирчастість, деякі з них не утворювали плодів.

Отже, CMV зустрічається у коінфекції з вірусом жовтої мозаїки цукіні та вірусом мозаїки кавуна-2, викликаючи при цьому сильніший прояв симптомів, а також на рослинах родини *Brassicaceae* з TuMV. ToMV зустрічається у коінфекції з Y-вірусом картоплі та CMV на рослинах родини *Solanaceae* (рис.7).

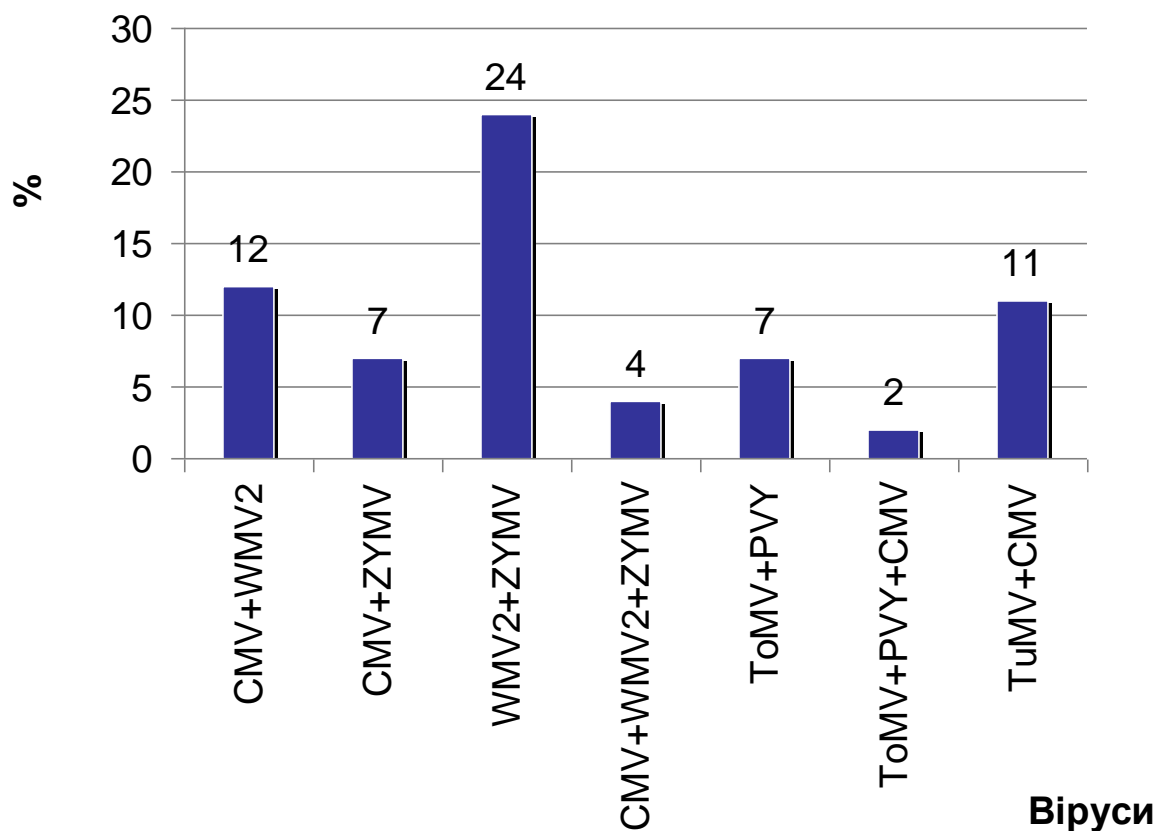


Рис.7. Різноманіття та частота виявлення вірусів овочевих культур

Частота виявлення вірусів у моноінфекції варіювала у межах 1-30%, а у змішаній інфекції – 2-24% для різних вірусів, що визначається їх епідеміологічними властивостями, видом рослин-хазяїнів, а також умовами вирощування культури. Підтверджено, що змішані вірусні інфекції супроводжуються більш суворими візуальними симптомами хвороби. Встановлені типові групи вірусів, що викликають змішані інфекції овочевих культур.

**Насіння як одне з джерел вірусів овочевих культур в Україні.** Багато вірусів рослин здатні передаватись за допомогою насіння, забезпечуючи собі таким чином розповсюдження на далекі відстані. Під час виконання роботи зразки насіння овочевих культур аналізувалися на наявність наступних 7 вірусів, що мають здатність передаватись насінням як всередині насінини так і на її поверхні: CMV, ToMV, PMMV, TRV, ZYMV та CGMMV (рис.8-9).

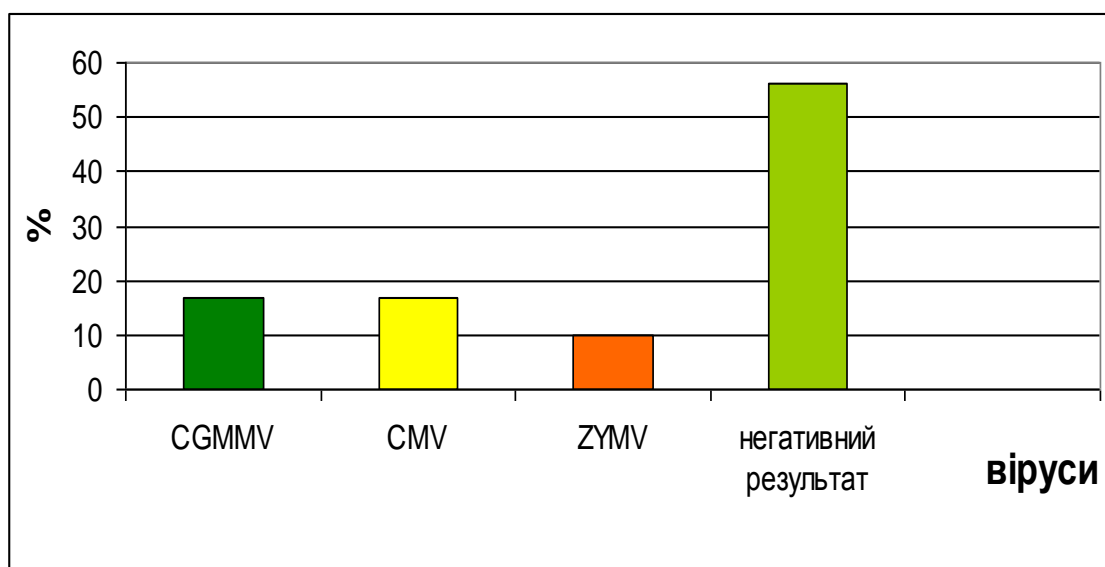


Рис.8. Узагальнені результати тестування комерційного насіння рослин родини *Cucurbitaceae* на наявність вірусних антигенів

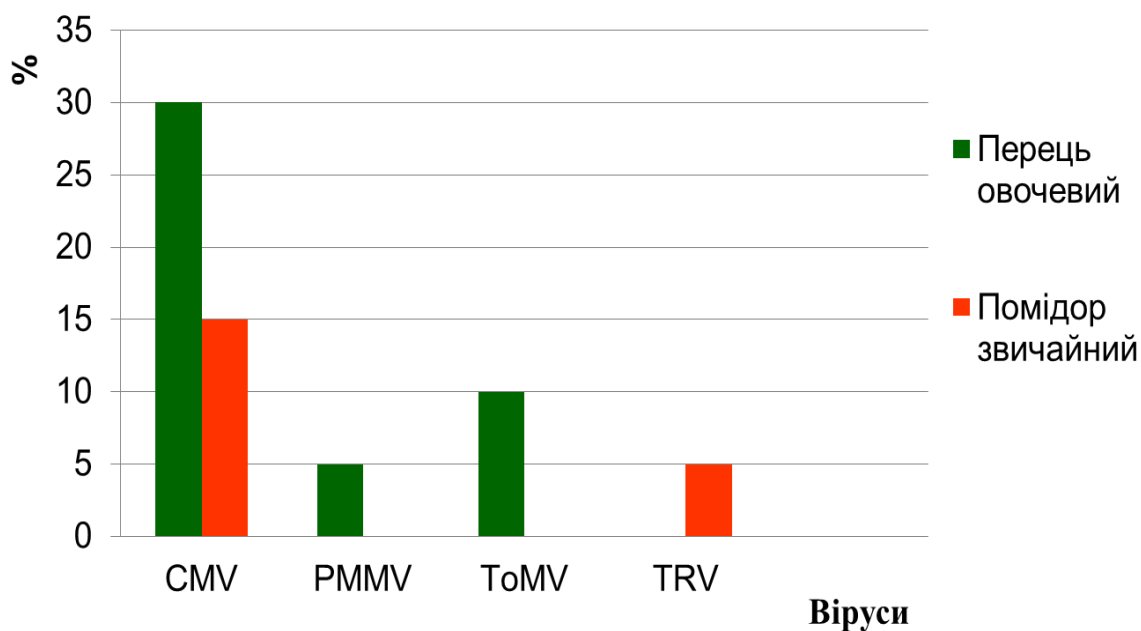


Рис.9. Узагальнені результати тестування комерційного насіння рослин родини *Solanaceae* на наявність вірусних антигенів

Аналізуючи отримані результати, було встановлено, що насіння овочевих культур є одним із важливих джерел вірусів в екосистемах.

В умовах України насіннєвий спосіб передачі є актуальним для CGMMV, ToMV та CMV, і потребує відповідного контролю. Особливо небезпечною є передача насінням вірусів із широким колом рослин-хазяїв, а саме CMV та ToMV.

Передача ZYMV за допомогою насіння залишається дискусійним питанням, адже в залежності від виду рослини-хазяїна та методу дослідження різні групи вчених виявляли різний відсоток передачі даного вірусу або взагалі спростовували його передачу насінням.

Вперше в Україні виявлено здатність ZYMV передаватися за допомогою насіння кабачка. Частота передачі ізоляту ZYMV-14P за допомогою насіння становить 2,6%. За літературними даними, частота передачі вірусу варіює в межах 0 до 18.9% (Coutts et al., 2011; Simmons et al., 2013).

Проведено електронну мікроскопію вірусного препарату, отриманого з рослини, ураженої ZYMV-14P, та виявлено ниткоподібні часточки довжиною 750 нм (рис.10).

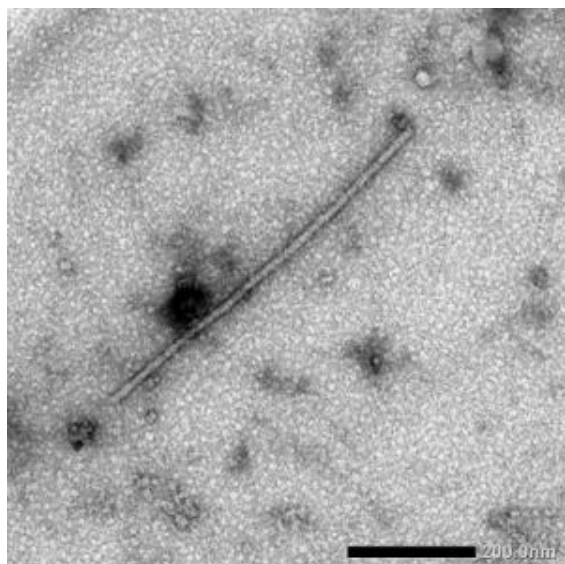


Рис.10. Електронномікроскопічне зображення вірусного ізоляту ZYMV-14P (лінійка - 200 нм)

Отже, результати наших досліджень поповнили знання про передачу ZYMV насінням та ефективність такої передачі, в епідеміологічному плані встановлено нове джерело ZYMV при циркуляції на території України.

### **Молекулярно-епідеміологічні особливості вірусних інфекцій овочевих культур в Україні**

**Аналіз філогенетичних особливостей Watermelon mosaic virus 2.** В агроценозах України вірусні збудники мозаїчного захворювання овочевих культур є чи не найголовнішою причиною значних втрат урожаю. На представниках родини *Cucurbitaceae*, до яких належать огірки, кабачки, гарбузи, цукіні, кавуни та дині, останні 12 років активно циркулює WMV2, що належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae*. Слід відмітити, що для вивчення генетичної різноманітності потівірусів, найбільш часто використовують ген, що кодує капсидний білок. З огляду на це, ступінь дивергенції між штамми і ізолятами WMV2 аналізували саме за його нуклеотидною послідовністю. Було використано специфічні праймери до ділянки РНК, яка кодує капсидний білок референтного французького штаму WMV-Fr.

Дані праймери ампліфікують фрагмент довжиною 825 п.о., який відповідає гену капсидного білка вірусу. У роботі були використані ізоляти, виділені з різних хазяїв, з різних регіонів та у різні роки на території України.

Для встановлення філогенетичних зв'язків було побудоване філогенетичне дерево методом найближчих сусідів за допомогою моделі Джукса-Кантора у програмі MEGA 6, яке дозволило угрупувати досліджувані штамми і ізоляти WMV2 у три окремі кластери G1, G2 та G3 (Рис.11).

На філогенетичному дереві українські ізоляти були згруповані із ізолятами із кластера G1. На відміну від представників другого кластера, штамми і ізоляти першого кластера було ізольовано з рослин родини гарбузових, що і пояснює їх згрупованість на філогенетичному дереві у окремий кластер.

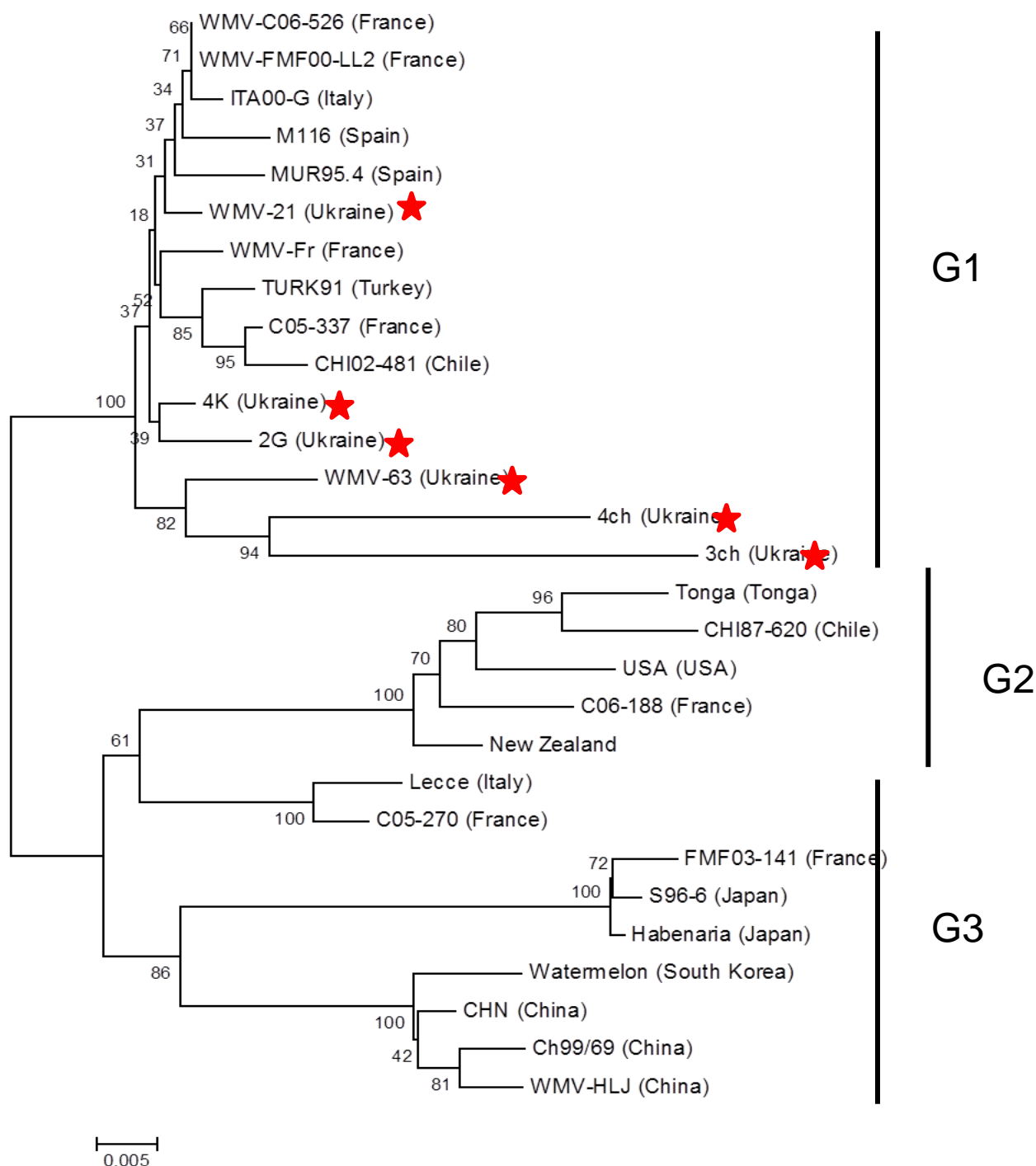


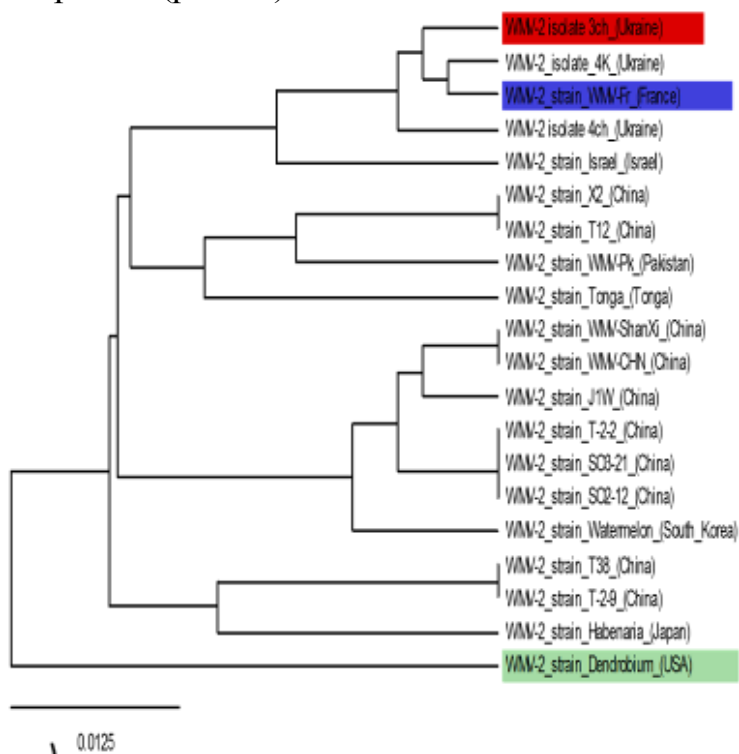
Рис.11. Філогенетичні відносини ізолятів WMV2. Дерево побудоване за геном капсидного білка методом NJ. Українські ізоляти виділені зірочками.

До цього кластера належать nereкомбінантні штами, розповсюджені на території Європи. Українські ізоляти є найбільш подібними до ізолятів із Європи (Франція, Італія, Іспанія). Ізоляти WMV-3ch та WMV-4ch утворювали гілку, відокремлену від інших представників кластеру G1 значною генетичною відстанню.

Подібність між українськими ізолятами варіювала у діапазоні 95-99%. Значна подібність спостерігалася між ізолятами WMV-21w, WMV-63w, WMV-4K та WMV-2G (вище 98%). Дещо нижча подібність спостерігалась між вищезгаданими ізолятами та ізолятами із Черкаської області (WMV-3ch, WMV-

4ch). Подібність між ізолятами WMV-3ch та WMV-4ch становила 94%. Відображене угруповання не корелює з географічним походженням ізолятів, оскільки WMV-4K виділений з АР Крим, WMV-2G – з Полтавської області, а WMV-3ch, WMV-4ch – з Черкаської області. Даний розподіл може бути пов'язаний як з різним походженням ізолятів WMV-3ch, WMV-4ch, так і з наявністю рекомбінацій у даній ділянці геному вищезгаданих ізолятів.

Хоча кластер G1 зазвичай не містить рекомбінантів, надалі було проведено рекомбінаційний аналіз українських ізолятів WMV2, який виявив нову рекомбінаційну подію між українським ізолятом WMV-3ch та штамом WMV-Fr із Франції (рис.12).



Method	P-value
3Seq	<b>6,295·10<sup>-6</sup></b>
Chimaera	<b>5,259·10<sup>-9</sup></b>
GENECONV	2,897·10 <sup>-4</sup>
MaxChi	<b>2,205·10<sup>-7</sup></b>
RDP	4,173·10 <sup>-2</sup>
SIScan	<b>2,062·10<sup>-11</sup></b>

Рис.12. Філогенетичні відносини та рекомбінаційний аналіз українських ізолятів WMV2-3ch. Дерево UPGMA побудоване з використанням ділянки батьківської послідовності; статистична достовірність

Таким чином, результати нуклеотидного секвенсу гену капсидного білка українських ізолятів вказують на високу подібність їх між собою і з уже відомими штамми і ізолятами WMV2. Подібність у відсотках між українськими ізолятами та штамми і ізолятами з Генбанку становила 90,7- 99%. Найвища подібність українських ізолятів за геном капсидного білка спостерігалася, переважно, з європейськими ізолятами з Іспанії, Італії та Франції. Таким чином, подібність чи навпаки, відмінність у нуклеотидній послідовності ізолятів, пов'язані саме з їх географічним розташуванням, що є одним із детермінуючих факторів штаммоутворення. Виявлення рекомбінаційної події між українським ізолятом WMV-3ch та штамом WMV-Fr із Франції свідчить про гетерогенність популяції WMV2 в Україні.

**Аналіз філогенетичних особливостей Zucchini yellow mosaic virus.** Для встановлення філогенетичних зв'язків нуклеотидні послідовності порівнювали з послідовностями NIb/CP штамів та ізолятів ZYMV, які доступні для аналізу в GenBank. Штами та ізоляти, що були відібрані для філогенетичного аналізу, мають різну географічну та групову приналежність (рис.13).

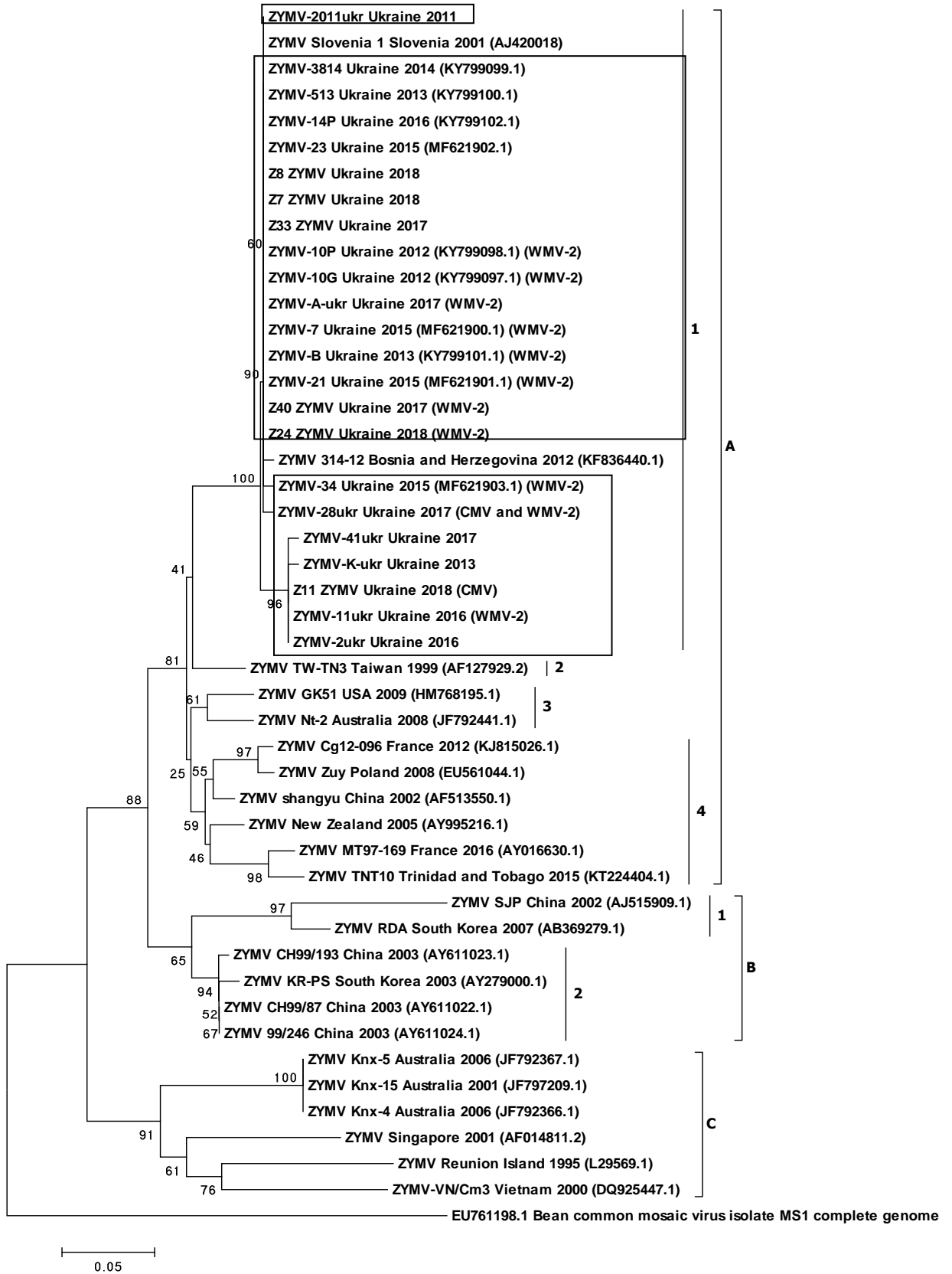


Рис.13. Філогенетичні відносини ізолятів ZYMV. Дерево побудоване за ділянкою геному Nib/CP за допомогою методу NJ. Українські ізоляти виділені прямокутниками

При порівнянні українських ізолятів з ізолятами з різних країн було встановлено, що ідентичність між усіма наведеними ізолятами становить від 68 до 100%, а подібність між українськими ізолятами та світовими, взятими для аналізу, становить 71-100%. Найвища ідентичність українських ізолятів спостерігалася до ізолятів із центральної та східної Європи: Чехія (DQ144062.1), Австрія (AJ420014.1), Боснія та Герцеговина (KF836440.1) та Словенія (AJ420018). Українські ізоляти були менш подібні до ізолятів з країн Азії та Австралії. За результатами аналізу ділянки геному N1b/CP українських ізолятів було встановлено, що всі українські ізоляти є високоподібними (від 98 до 100%), що свідчить про їх приналежність до одного штаму.

На філогенетичному дереві чітко виокремлені три основних кластери, які відповідають трьом філогенетичним групам ZYMV: А, В та С. Українські ізоляти угруповані до підкластера 1 кластера А, як і ізоляти зі східної та центральної Європи. Окрім українських ізолятів, ця підгрупа також включає ізоляти з Чехії, Австрії, Боснії та Герцоговини та Словенії (рис.13).

Ізолят ZYMV-14P, здатний до передачі насінням, також належить до підкластера А1, який включає ізоляти, поширені в усьому світі. Рекомбінаційних подій серед українських ізолятів ZYMV виявлено не було.

**Аналіз філогенетичних особливостей *Cucumber mosaic virus*.** Для генетичної характеристики популяцій CMV та встановлення групової і штамової приналежності циркулюючих ізолятів було отримано і проаналізовано нуклеотидні послідовності ділянки генів капсидного білку, транспортного білку та білку 2b ізолятів CMV, виявлених у різних областях України і на різних хазяях.

Дані ізоляти були виділені із зразків рослин родин *Cucurbitaceae* (*Cucumis sativum* L., *Cucurbita pepo* L.) та *Solanaceae* (*Lycopersicon esculentum* L.) у Львівській, Черкаській та Полтавській областях. Наявність вірусу в даних зразках попередньо була підтверджена в ІФА.

За ступенем гомології нуклеотидних послідовностей капсидного білку українські ізоляти CMV були розподілені на 2 групи ІА і ІВ, з внутрішньогруповою подібністю вище 99%. Подібність нуклеотидних послідовностей капсидного білку представників різних груп становила приблизно 93-94%.

На філогенетичному дереві чітко виокремлені два кластери, які відповідають групам І і ІІ ізолятів CMV. Українські ізоляти були угруповані лише до кластера групи І, але при цьому були розділені між різними субкластерами, які відповідають підгрупам ІА і ІВ (рис.14).

При порівнянні українських ізолятів, які належать до підгрупи ІА, подібність нуклеотидних послідовностей становила 99-99,5%.

Серед українських ізолятів підгрупи ІВ найвища подібність нуклеотидних послідовностей спостерігалась між CMV-Ukr-sq13, CMV-28 та CMV-8 – 100%. Для інших ізолятів цієї підгрупи виявлені одиничні нуклеотидні заміни. Зокрема, в положенні 351 ізолятів CMV-Ukr-tom2, CMV-36 і CMV-14/09 наявний С, а у ізолятів CMV-Ukr-sq13 та CMV-8 – Т. З-поміж проаналізованих ізолятів переважають штами з тиміном у цьому положенні, цитозин наявний лише у представника групи ІА штаму CMV-legume (Японія).

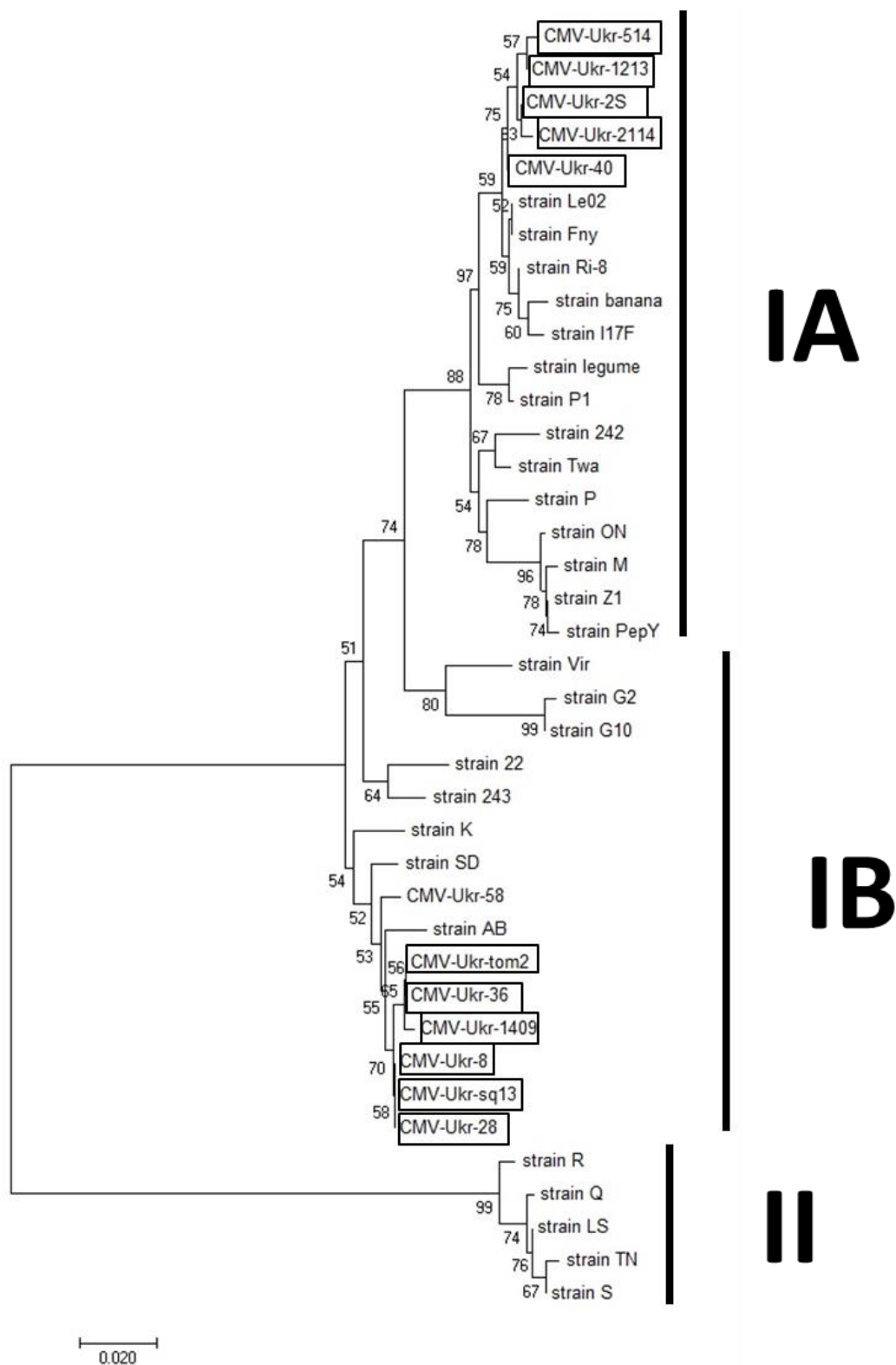


Рис.14. Філогенетичні відносини ізолятів CMV. Дерево побудоване за геном капсидного білка методом NJ. Українські ізоляти виділені прямокутниками

У положенні 713 ізоляту CMV-14/19 спостерігалась унікальна заміна А→Т, не виявлена у інших штамів і ізолятів. У ізолятів CMV-Ukr-tom2 і CMV-14/09 в положенні 685 наявний А, в той же час у інших українських ізолятів цієї групи – G. У інших штамів цієї групи в цьому положенні виявлені обидва нуклеотиди,

зокрема у близькоспоріднених до українських ізолятів штамів CMV-ABI, CMV-SD та CMV-K в цьому положенні розташований A, а у штамів CMV-Vir, CMV-16, CMV-T35 – G.

Також було проведено порівняння амінокислотних послідовностей українських ізолятів. Відмінності амінокислотних послідовностей як у представників однієї групи, так і у представників різних груп виявлені не були, тобто всі визначені нуклеотидні заміни були синонімічними. На основі вищесказаного можна зробити висновок, що популяція CMV на території України включає представників підгруп IA та IB, при чому у виявлених нами ізолятів обох підгруп спостерігається високий ступінь генетичної однорідності.

Крім того, були визначені часткові нуклеотидні послідовності генів капсидного білка, транспортного білка та білка 2b трьох ізолятів CMV-28, CMV-36 і CMV-58, виділених з різних областей.

При порівнянні українських ізолятів було встановлено, що подібність нуклеотидних послідовностей білка 2b ізолятів CMV-28 та CMV-58 становить 99,6%, хоча інші ділянки геному характеризуються нижчою подібністю. Для ізолятів CMV-36 і CMV-58 спостерігалася протилежна картина: висока подібність генів CP і MP (99% і 99,2% відповідно) і 95% для гену 2b.

У послідовностях гену білка 2b були виявлені унікальні амінокислотні заміни. Замість серину у ізолятів CMV-28 і CMV-58 у 42 положенні виявлений ізолейцин. У ізолята CMV-36 у 62 положенні міститься лейцин, на відміну від серину у інших ізолятів.

Було перевірено, чи можуть бути пов'язані такі унікальні амінокислотні заміни з рослиною-хазяїном, адже ізоляти CMV-28 і CMV-58 виділені з *Cucurbita pepo* L. Проте при філогенетичному аналізі ізолятів, виділених з різних хазяїв, нами не було виявлено статистично достовірної кореляції (рис.15).

Для побудови даного філогенетичного дерева було обрано всі штами та ізоляти підгрупи IB з відомим джерелом виділення. У якості аутгрупи було використано штам CMV-TN (AB176847), що належить до групи II CMV.

Таким чином, CMV у агроценозах України представлений геногрупами IA і IB, що належать до групи I CMV. Геногрупа IB більш чисельна і об'єднує ізоляти CMV-Ukr-28, CMV-Ukr-36, CMV-Ukr-58, а до геногрупи IA віднесений один ізолят CMV-Ukr-2114. Нуклеотидні послідовності українських ізолятів в межах кожної з геногруп характеризуються високою подібністю між собою та з іншими відомими штамми CMV. Що стосується українських ізолятів, то найвища подібність за нуклеотидними послідовностями генів CP і MP показана для ізолятів CMV-Ukr-36 і CMV-Ukr-58: 99% і 99,2%, відповідно. Подібність за нуклеотидною послідовністю гену 2b для вищевказаних ізолятів була дещо меншою і становила 95%. Імовірною причиною цього є реасортація. На противагу цьому, найвища подібність за нуклеотидною послідовністю гену 2b спостерігалася для ізолятів CMV-Ukr-28 та CMV-Ukr-58 і становила 99,6%, хоча інші ділянки геному цих ізолятів (CP, MP) були значно менш подібні. Таку ситуацію можна пояснити специфікою рослини-хазяїна, з якої був виділений ізолят. Так, ізоляти CMV-Ukr-28 та CMV-Ukr-58 були виділені з рослин *Cucurbita pepo*, а CMV-Ukr-36 – з *Cucumis sativus*.

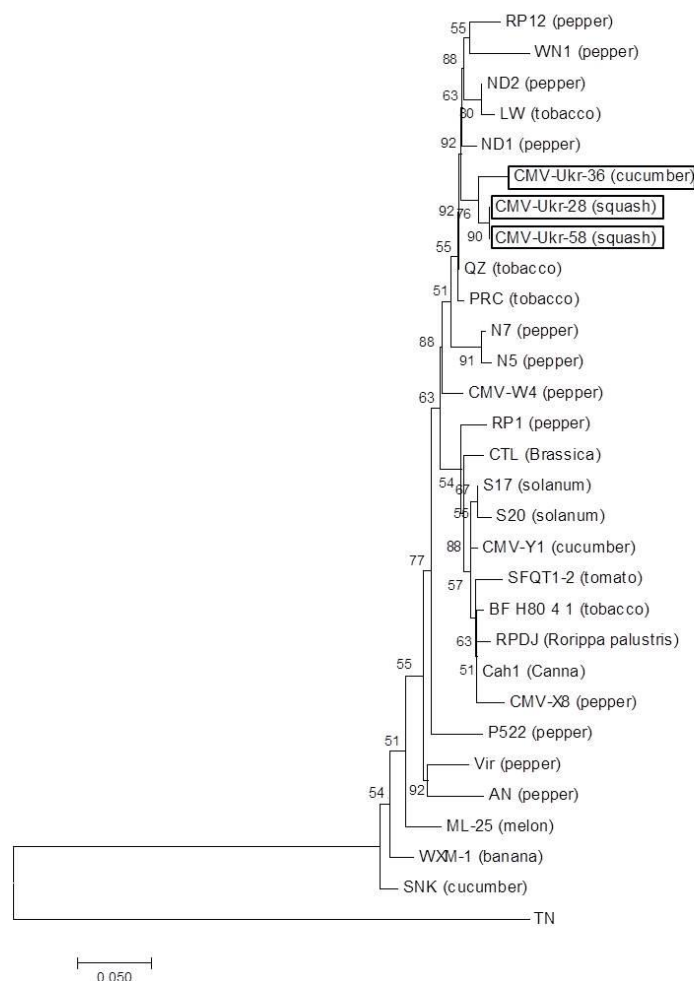


Рис.15. Філогенетичні відносини штамів та ізолятів CMV, виділених з різних рослин-хазяїв. Дерево побудоване за геном капсидного білка методом NJ Українські ізоляти виділені прямокутниками

Отже встановлено, що CMV на території України представлений ізолятами підгрупи IA, які зустрічаються в низці інших європейських країн, та підгрупи IB, які рідше виявляються у даному регіоні.

Виявлено унікальні заміни у амінокислотних послідовностях білка 2b ізолятів CMV-28 і CMV-58, які не пов'язані з рослиною-хазяїном.

**Аналіз філогенетичних особливостей Tomato mosaic virus.** Молекулярну характеристику ізолятів вірусу мозаїки томату проводили шляхом порівняння сиквенованих нуклеотидних послідовностей капсидного білка українських ізолятів ukr-3, ToMV-ukr-5 і ToMV-ukr-10 між собою та з такими ж відомих штамів і ізолятів ToMV. Послідовності штамів та ізолятів ToMV були отримані з Генбанку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Штами та ізоляти з Генбанку відбирали таким чином, щоб охопити, по можливості, всі країни та всі види рослин, на яких був виявлений вірус мозаїки томатів. Побудова філогенетичного дерева дозволила об'єднати досліджувані штами і ізоляти ToMV у два окремі кластери. До першого найчисельнішого кластера угруповані майже всі досліджувані штами та ізоляти вірусу, а до другого – лише два представники вірусу мозаїки томату – ізолят T1 та ізолят Нам.Том.19, подібність яких до українських ізолятів становила 79,4%.

Обидва ці ізоляти були виділені з рослин томату: T1 – в Китаї, а Нам.Том.19 - в Ірані (рис.16).

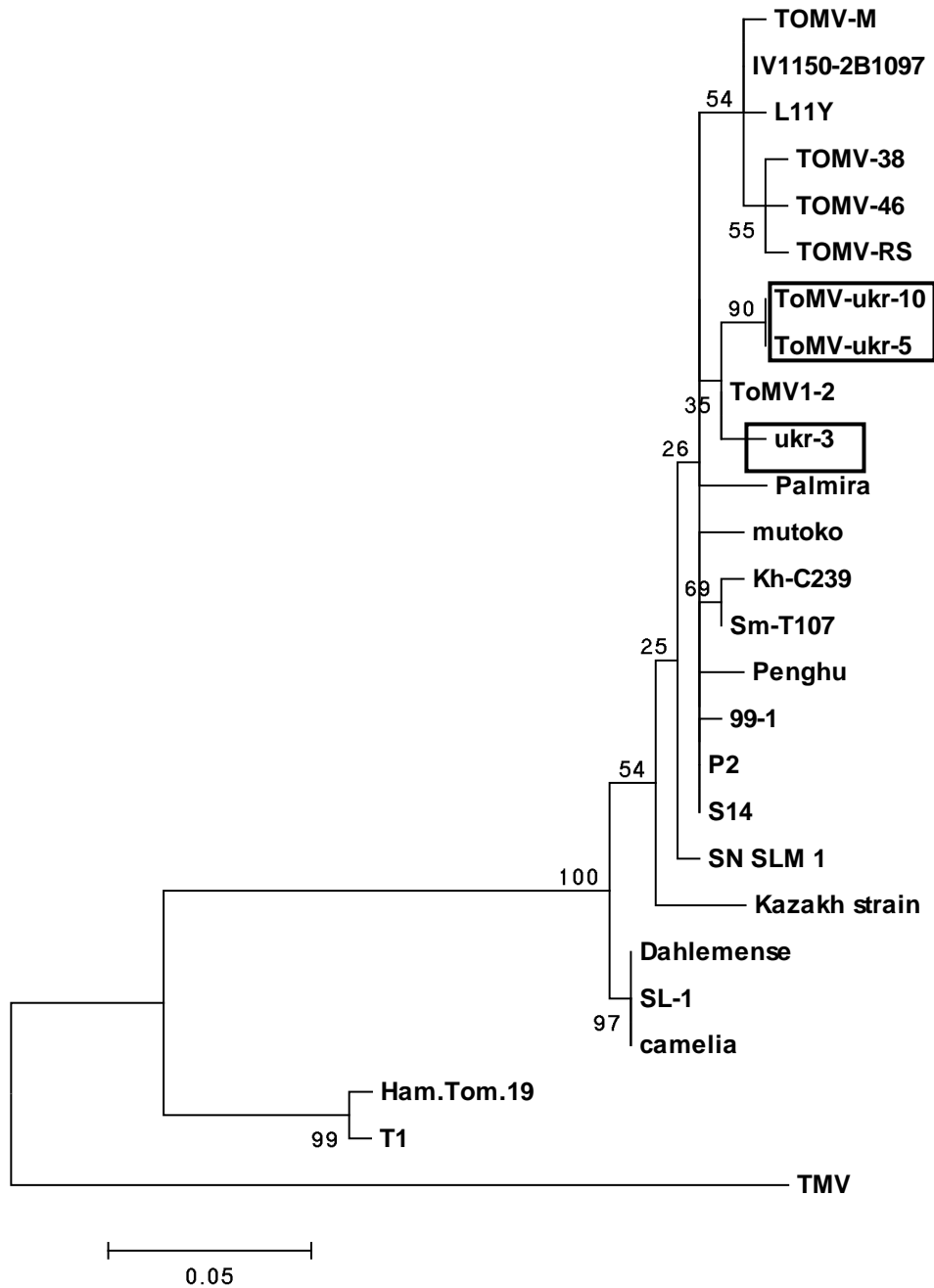


Рис.16. Філогенетичні відносини ізолятів ToMV. Дерево побудоване за геном капсидного білка методом NJ. Українські ізоляти виділені прямокутниками. В якості кореня використано китайський ізолят Вїїє-2 (HE818414) вірусу тютюнової мозаїки

Досліджувані українські ізоляти ukr 3, ToMV-ukr-5 та ToMV-ukr-10 були подібними на 100% та угруповані до першого кластеру. Окрім трьох українських ізолятів, сюди увійшли ще 18 досліджуваних штамів та ізолятів, подібність яких до українських ізолятів становила від 96 до 98,9%.

За результатами філогенетичного аналізу, українські ізоляти ukr-3, ToMV-ukr-5 та ToMV-ukr-10, виділені з рослин томату, характеризувалися дуже високою (більше 98,4%) подібністю зі штамми та ізолятами вірусу мозаїки томату, виділеного з рослин не лише томатів, але і пепіно, і навіть декоративних рослин, що належать до різних родин. Важливим є факт, що українські ізоляти є високоподібними до бразильського ізоляту *Neurocallis*, виділеного з декоративної рослини лілійника родини Ксанторієвих, та китайського ізоляту G2, виділеного з рослини *Gomphrena globosa* родини Амарантових. Також слід згадати про ізоляти вірусу, виділені з рослин томату з найвіддаленіших географічних регіонів: єгипетський ізолят AN4, австралійський ізолят Queensland, південно-корейські ізоляти ToMV-tom та Ls-K, іспанський ізолят S14 та штам FERA\_160205 з Великобританії.

Дещо нижча подібність (97,2- 97,8%) українських ізолятів продемонстрована для вже дослідженого українського ізоляту ukr-3, виділеного нами раніше з насіння томату, томатних ізолятів Palmira з Колумбії, mutoko з Зімбабве, Sm-T107 з Ірану та штамом ToMV-M з Малайзії. Поряд з цим, прослідковувалась їх висока спорідненість з японським штамом з тютюну (L11Y), індійським (SN SLM 1) та тайванським (Penghu) ізолятами з пасльону, і навіть іранським ізолятом з огірків. Цікаво, що українські ізоляти були близькоспорідненими зі штамом IV1150-2B1097, який був виділений з талої льодовикової води у Гренландії, а також з ізолятом 99-1, виділеним з рослини жасміну у Сполучених Штатах Америки.

Аналізуючи отримані результати, можна стверджувати про дуже високу подібність українських ізолятів з відомими штамми і ізолятами вірусу мозаїки томатів. Причому висока (більше 96%) подібність українських ізолятів ToMV прослідковується незалежно від джерела виділення вірусу, виду рослини-хазяїна, чи їх географічного поширення. Вищезазначене вказує на убіквітарність вірусу та його епідеміологічну небезпеку.

У результаті проведеного філогенетичного аналізу та порівняння українських ізолятів ukr3, ToMV-ukr5, ToMV-ukr10 з охарактеризованими штамми ToMV встановлено, що виділені ізоляти споріднені зі штамми ToMV-1-2, ToMV-G26 і ToMV-G6. Показано, що виявлені ізоляти не належать до високошкодочинних штамів, які можуть долати стійкість сортів до даного вірусу.

**Аналіз філогенетичних особливостей Pepper mild mottle mosaic virus.** На сьогодні відомо 13 штамів вірусу слабкої крапчатості перцю, які були ідентифіковані у різних країнах та на різних рослинах (рис.17).

Філогенетичний аналіз кДНК гену капсидного білка українських ізолятів РММoV з рослин перцю овочевого та помідору звичайного виявив їх приналежність до кластерів штамів з Бразилії, Іспанії, Єгипту та Японії, та показав високу подібність між собою за геном капсидного білка незалежно від рослини-хазяя.

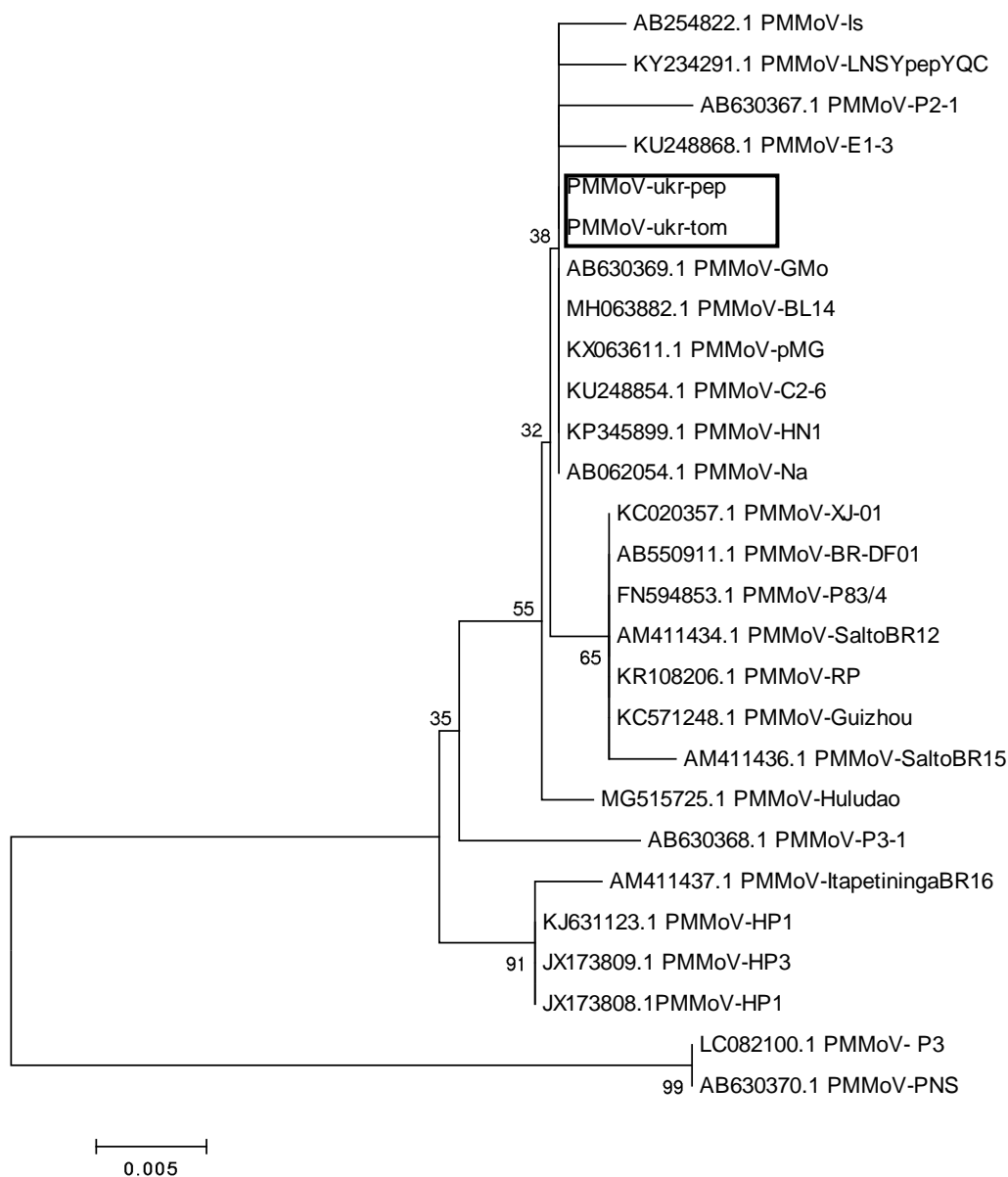


Рис.17. Філогенетичні відносини ізолятів PMMoV. Дерево побудоване за геном капсидного білка методом NJ. Українські ізоляти виділені прямокутниками

При порівнянні виділених з рослин перцю та томату ізолятів PMMoV за геном капсидного білка встановлено, що їх подібність становить більше 99%. Як відомо, якщо подібність нуклеотидних послідовностей вірусів становить 95% і більше, то вони вважаються ізолятами одного штаму, а якщо менше 90% - то це різні штами одного вірусу. Таким чином, українські ізоляти PMMoV належать до одного і того ж штаму.

**Аналіз філогенетичних особливостей Turnip mosaic virus.** Незважаючи на географічне розташування України та широке культивування різних хрестоцвітних культур протягом століть, TuMV ніколи не був виявлений в нашій країні на культурних рослинах незахищеного ґрунту. Ізолят TuMV UKR9 був відібраний зі зразка рослини *B. oleracea* var. *capitata* (капусти), яка була неінфікована CMV, мала чіткі симптоми набухання жилок листків та характеризувалася високим титром TuMV в ІФА. Надалі ізолят UKR9 був обраний для детального вивчення його біологічних властивостей із

використанням спектру типових рослин-індикаторів з родин *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* та *Asteraceae*. Ізолят UKR9 викликав системну реакцію на різних рослинах родів *Brassica* (капусті, китайській капусті, кольрабі, гірчиці, рапсі, турнепсі та ін.) та *Raphanus* (китайському та японському редисі). Таким чином, за біологічними властивостями ізолят UKR9 належить до патотипу BR. Надалі вперше в Україні було проведено сиквенування повного геному вірусу рослини (ізоляту TuMV UKR9), розмір якого склав 9833 нт. У сиквенованій послідовності були знайдені всі мотиви, відомі для генів потівірусів, та визначені відповідні кодовані білки (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb та CP).

Рекомбінантна природа українського ізоляту UKR9 вірусу мозаїки турнепсу та його походження від різних генетичних груп ізолятів були підтверджені різними алгоритмами RDP4 (зі значеннями  $P$  менше  $1 \times 10^{-6}$ ): RDP ( $3.68 \times 10^{-21}$ ), BOOTSCAN ( $2.83 \times 10^{-21}$ ), MAHCHE ( $3.12 \times 10^{-11}$ ), CHIMAERA ( $2.14 \times 10^{-13}$ ) та SISCAN ( $6.42 \times 10^{-14}$ ), а алгоритм GENECONV показав вірогідне рекомбінантне походження ізоляту UKR9 ( $3.76 \times 10^{-2}$ ). Ці результати були надалі підтверджені оригінальним програмним забезпеченням SISCAN версії 2, яке показало, що ізолят UKR9 є вірогідним рекомбінантом, дозволило ідентифікувати його сайт рекомбінації та генетичні послідовності, які є його вірогідними батьківськими формами. Послідовність ізоляту UKR9 характеризувалася значною подібністю з послідовністю ізоляту Rn98 у регіоні від N-кінця гену *P1* до N-кінця гену *HC-Pro* (нуклеотиди 1–1374 у повнорозмірній послідовності – від 5'-кінця геному вірусу до сайту рекомбінації). Однак, від С-кінця гену *HC-Pro* і до С-кінця гену *CP* (нуклеотиди 1375–9833 у повнорозмірній послідовності – від сайту рекомбінації до 3'-кінця геному) ізолят UKR9 характеризувався найвищою подібністю до ізоляту TUR9 (рис.18).

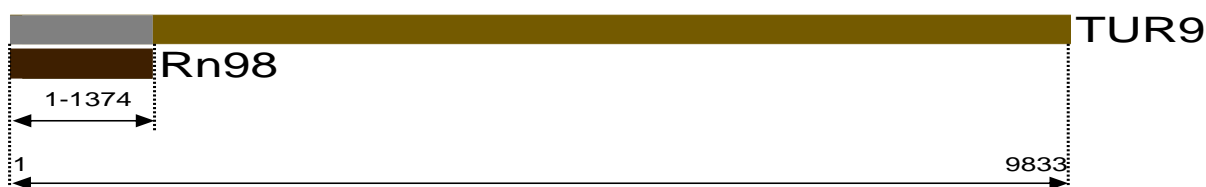


Рис.18. Схема рекомбінації в еволюції ізоляту TuMV UKR9

Представлені результати є доказом того, що ізолят UKR9 є принаймні одиничним рекомбінантом (має один сайт рекомбінації) та таким рекомбінантом, що походить від різних генетичних груп вірусу – групи World-B (ізолят Rn98 - мінорний батьківський ізолят) та групи Asian-BR (ізолят TUR9 - головний батьківський ізолят) (рис.19).

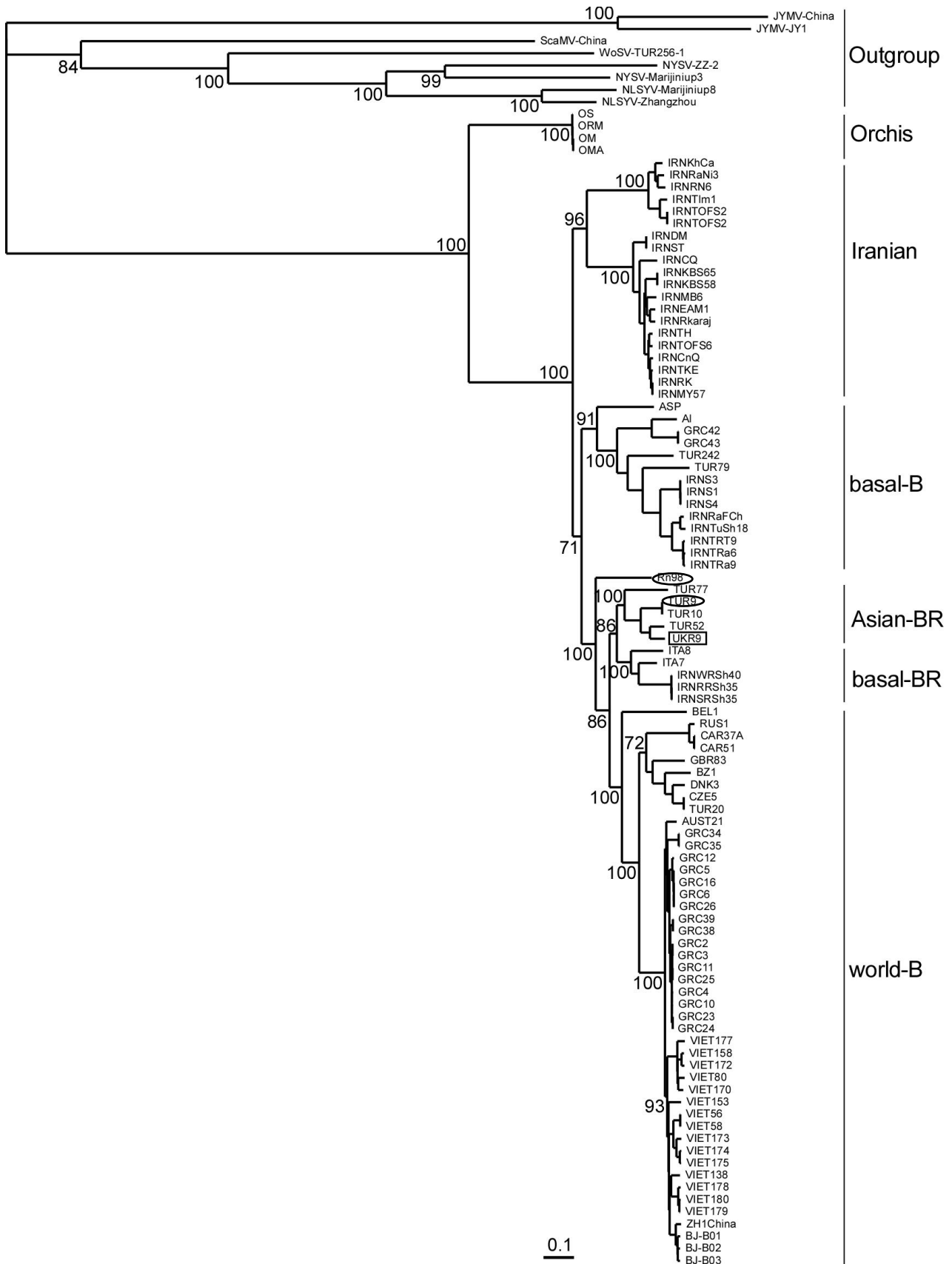


Рис.19. Філогенетичні відносини різних ізолятів вірусу мозаїки турнепсу (за виключенням рекомбінантних ізолятів, окрім батьківського ізоляту Rn98). Дерево побудоване методом ML, бутстреп = 1000, український ізолят UKR9 показаний у рамці, батьківські ізоляти TUR9 та Rn98 – у овалах.

Як видно з рис.19, більшість послідовностей на дереві розподілені у чотири відомі геногрупи: Basal-B, Basal-BR, Asian-BR та World-B. Такий розподіл характеризувався високими значеннями бутстреп-підтримки.

Як і очікувалося, на філогенетичному дереві ізолят UKR9 угруповувався с головним батьківським ізолятом TUR9 – нерекомбінантним ізолятом з геногрупи Asian-BR. Подібно до попередніх досліджень, на філогенетичному дереві ізолят TUR9 був розташований поряд з іншими представниками цієї геногрупи (ізолятами HRD та CH6), але утворив окрему гілку с новим українським ізолятом UKR9. Мінорний батьківський ізолят Rn98 (рекомбінант між представниками різних геногруп World-B та Basal-B) розташовувався поблизу ізолятів батьківської групи World-B (рис.19).

Узагальнюючи отримані дані можна сформулювати концептуальні підходи до контролю вірусних інфекцій овочевих культур в Україні (рис.20).

## Концепція контролю вірусних інфекцій овочевих культур України



Рис.20. Базисні положення концепції контролю вірусних інфекцій овочевих культур України

Розроблений концептуально новий підхід до контролю актуальних вірусних інфекцій комерційно важливих овочевих культур України, який базується на експериментально встановлених біологічних закономірностях, і враховує видовий спектр актуальних для України вірусів, кореляцію їх генетичних ознак з вірулентністю щодо овочевих культур, спосіб передачі вірусів насінням (особливо

для вірусів із широким колом рослин-хазяїв) та особливості збереження популяцій вірусів овочевих культур, які становлять небезпеку в епідеміологічному аспекті.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені нові підходи до вирішення актуальної науково-біологічної проблеми, а саме - розроблена концепція контролю вірусних інфекцій овочевих культур, що базується на встановлених молекулярно-біологічних властивостях вірусів та епідеміологічних закономірностях розвитку і поширення вірусних інфекцій.

1. Вперше встановлений спектр вірусів, що є представниками родин *Virgaviridae* (PMMoV, ToMV, CGMMV, TRV), *Bromoviridae* (CMV), *Potyviridae* (PVY, ZYMV, WMV-2, TuMV) та *Alphaflexiviridae* (PVX), які з урахуванням екологічних умов та біологічних властивостей є актуальними та шкодочинними для овочевих культур України та Європи. Вперше в Україні описані віруси PMMoV та TuMV, встановлені їх рослини-хазяї та вивчені способи передачі вірусів, які є небезпечними для широкого кола рослин агроценозів.
2. Вперше показано поширення змішаних вірусних інфекцій, які супроводжуються більш суворими візуальними симптомами захворювання і втратами комерційної продукції, та встановлені типові групи вірусів, що їх викликають в Україні: ZYMV/WMV-2, CMV/ZYMV/WMV-2, CMV/ToMV/PVY та TuMV/CMV. Частота виявлення вірусів у моноінфекції варіює у межах 1-30%, а у змішаній інфекції – 2-34% для різних вірусів, що визначається їх епідеміологічними властивостями, видом рослин-хазяїв, а також умовами вирощування культури.
3. Вперше в Україні встановлено нове джерело ZYMV та підтверджено здатність вірусу передаватися насінням з ефективністю у 2,6%. Обґрунтовано, що насіння овочевих культур є одним із важливих та недооцінених джерел вірусів в екосистемах. Встановлено, що в екологічних умовах України насінневий шлях передачі є актуальним, потребує відповідного контролю для ряду вірусів (CGMMV, ZYMV, ToMV та CMV) і становить особливу небезпеку для вірусів із широким колом рослин-хазяїв, а саме CMV та ToMV.
4. Продемонстрована консервативність генетичних послідовностей більшості вивчених вірусів. Підтверджена домінуюча роль точкових мутацій, синонімічних амінокислотних замін та стабілізуючого добору в еволюції вірусних популяцій в Україні.
5. Встановлена генетична однорідність українських популяцій вірусів WMV-2, ZYMV, PMMoV та ToMV, і подібність їх ізолятів до відомих штамів цих вірусів. Виявлені унікальні амінокислотні заміни білка 2b у українських ізолятів CMV і продемонстровано, що популяція цього вірусу в Україні є більш гетерогенною, ніж у інших європейських країнах і представлена різними генетичними групами.

6. Вперше встановлено, що філогенетична спорідненість українських ізолятів вірусів овочевих культур не залежить від географічного походження та рослини-хазяя, що має епідеміологічне значення, свідчить про інтенсивну циркуляцію вірусів в Україні і може бути використане для оптимізації діагностичних тест-систем.
7. Вперше знайдені нові рекомбінантні ізоляти шкочинних вірусів WMV-2 та TuMV, що свідчить про активні еволюційні процеси та обмін генетичним матеріалом вірусів в Україні. За результатами аналізу послідовності повного геному встановлено, що український ізолят TuMV UKR9 є нетиповим для Європи рекомбінантом двох різних генетичних груп і має один рекомбінаційний сайт у гені *HC-Pro*, який не був описаний раніше. Показано, що рекомбінантний український ізолят TuMV UKR9 здатний системно інфікувати рослини двох основних родів хрестоцвітих *Brassica* та *Raphanus*, і становить потенційну небезпеку в епідеміологічному аспекті.
8. Підтверджено кореляцію генетичних ознак українських ізолятів вірусів з їх вірулентністю щодо овочевих культур. Встановлено, що українські ізоляти ZYMV, WMV-2, PMMoV не належать до високовірулентних штамів. За комплексом біологічних та молекулярно-епідеміологічних ознак встановлено, що ToMV, TuMV та CMV потенційно є найбільш небезпечними вірусами, які загрожують вирощуванню овочевих культур в Україні.
9. Вперше доведено значне поширення TuMV в міських екосистемах, де супутні культурні та дикорослі рослини є резервуарами для збереження популяції вірусу та його передачі механічно та літаючими векторами. Показано, що даний фактор має виключно важливе значення для епідеміології TuMV в Україні, не зважаючи на ефективність класичних заходів контролю вірусних захворювань.
10. Розроблений концептуальний підхід до ефективного та рентабельного контролю вірусних інфекцій овочевих культур України з урахуванням епідеміологічних властивостей вірусів, їх епідеміологічного потенціалу (способами передачі і збереження у довкіллі, вірулентністю та ін.), типом сприйнятливої культури та умовами її вирощування, і включає контроль насінневого матеріалу на вірусосойство; тестування супутніх дикорослих рослин, які можуть виступати резервуарами вірусів з широким спектром рослин-хазяїнів в екосистемах; та тестування культурних рослин для видалення інфікованих рослин.

## Список наукових праць, опублікованих за темою дисертації

### *Монографія*

1. Ахатов А.К., Ганнибал Ф.Ю., Мешков Ю.И., Джалилов Ф.С., Чижов В.Н., Игнатов А.Н., Полищук В.П., **Шевченко Т.П.**, Борисов Б.А., Стройков Ю.М., Белошапкина О.О. Болезни и вредители овощных культур и картофеля. М.:Товарищество научных изданий КМК. 2013. 463 с. (*Особистий внесок здобувача: написання підрозділів, присвячених вірусним хворобам овочевих культур*).

### **Посібники:**

1. Бойко А.Л., Поліщук В.П., Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.** Вірусні хвороби перцю солодкого в Україні: діагностика та методи боротьби. *Методичні рекомендації*. К.:ЦОП «Глобус». 2012. 20. (Особистий внесок здобувача: обговорення результатів із співавторами, написання методичних рекомендацій).
2. Бойко А.Л., Поліщук В.П., Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.** Вірусні хвороби томатів в Україні: діагностика та методи боротьби. *Методичні рекомендації*. К.:ЦОП«Глобус». 2012. 24с. (Особистий внесок здобувача: обговорення результатів із співавторами, написання методичних рекомендацій).

### **Авторські свідоцтва:**

1. Будзанівська І.Г., Шевченко О.В., Міщенко Л.Т., Снігур Г.О., **Шевченко Т.П.**, Дуніч А.А., Руднева Т.О., Бисов А.С. Свідоцтво №76810 про реєстрацію авторського права на літературний письмовий твір наукового характеру «Філогенетичний аналіз та встановлення механізмів еволюційної адаптації у системі «вірус-рослина» з використанням молекулярно-генетичних та біоінформаційних підходів», Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. 13.02.2018 р. (Заявка №77482 від 20.12.2017 р., Київський національний університет імені Тараса Шевченка). (Особистий внесок здобувача: написання розділів стосовно філогенетичного аналізу вірусів овочевих культур).
2. Будзанівська І.Г., Шевченко О.В., Міщенко Л.Т., Молчанець О.В., **Шевченко Т.П.**, Дуніч А.А., Іутинська О.А., Бисов А.С. Свідоцтво №76811 про реєстрацію авторського права на літературний письмовий твір наукового характеру «Молекулярне типування шкодочинних вірусів комерційно важливих культур і дикорослих рослин та оцінка їх епідемічного потенціалу у різних екологічних умовах», Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. 13.02.2018 р. (Заявка №77483 від 20.12.2017 р., Київський національний університет імені Тараса Шевченка). (Особистий внесок здобувача: написання розділів стосовно епідеміології вірусів овочевих культур).

### **Статті у наукових фахових виданнях України:**

1. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, А.Л. Бойко. Властивості вірусу жовтої мозаїки цукіні, ізольованого з рослин родини Cucurbitaceae *Агроєкологічний журнал*. 2008. Спеціальний випуск. С. 205–207. (Особистий внесок здобувача: планування схеми експерименту, аналіз кінетичних кривих, обговорення результатів із співавторами, написання статті)
2. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Бисов А.С., Поліщук В.П. Поширення вірусних захворювань рослин родини Cucurbitaceae на території України. *Агроєкологічний журнал*. 2008. № 2. С.62–66. (Особистий внесок здобувача: планування схеми експерименту, аналіз кінетичних кривих, обговорення результатів із співавторами, написання статті)
3. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Нацевич В.О., Поліщук В.П., Бойко А.Л. Контроль насінневої вірусної інфекції у рослин родини Cucurbitaceae та її профілактики. *Агроєкологічний журнал*. 2011. №2. С. 85-88. (Особистий внесок

здобувача: розробка моделі дослідження, створення схеми експериментів, узагальнення результатів, участь у написанні статті)

4. Цвігун В.О., Шамрайчук В.О., Руднєва Т.О., **Шевченко Т.П.**, Бисов А.С., Поліщук В.П. Насіннева вірусна інфекція рослин родини Solanaceae. *Агроекологічний журнал*. 2012. №3. С. 131-133 (Особистий внесок: розробка моделі дослідження, створення схеми експериментів, узагальнення результатів, участь у написанні статті).

5. Руднєва Т.О., **Шевченко Т.П.**, Цвігун В.О., Шамрайчук В.О., Бисов А.С., Поліщук В.П. Віруси перцю солодкого у агроценозах України та насінневому матеріалі. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2012. №4 (20). С.29-35. (Особистий внесок здобувача: відбір зразків, участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).

6. Tsvygun V., Shamraichuk V., Bysov A., Rudnieva T., **Shevchenko T.**, Polischuk V. Vabishchevich V., Blotskaya Zh.. Novel viral pathogens of vegetable crops in Ukraine and Belarus. *Bulletin of Taras Shevchenko' Kyiv National University. Biology*. 2012. №. 62. P. 54-56. (Особистий внесок здобувача: розробка моделі дослідження, створення схеми експериментів, узагальнення результатів, участь у написанні статті).

7. Руднєва Т.О., **Шевченко Т.П.**, Цвігун В.О., Поліщук В.П. Моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської та Полтавської областей. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2013. №4 (24). С.55-62. (Особистий внесок здобувача: відбір зразків, участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).

8. Shamraichuk V., **Shevchenko T.**, Bysov A., AlDalayn Emad, Budzanivska I. Novel Tobatovirus isolated from vegetable crops in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2013. V.3 (65). P. 66 – 68. (Особистий внесок здобувача: ідея та планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, участь у підготовці статті до друку).

9. Руднєва Т. О., **Шевченко Т. П.**, Цвігун В. О., Будзанівська І. Г., Поліщук В. П. Філогенетична спорідненість українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2014. №4 (28). С.15-25 (Особистий внесок здобувача: розробка моделі дослідження, створення схеми експериментів, узагальнення результатів, участь у написанні статті).

10. Al Dalain E., Bysov A., Shevchenko O., **Shevchenko T.**, Polischuk V. Several viral diseases of Lycopersicon esculentum circulating in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2014. V.68(3). P.96-98. (Особистий внесок здобувача: ідея та планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, участь у підготовці статті до друку).

11. Алдалаін Е., **Шевченко Т.П.**, Поліщук В.П., Міщенко Л.Т. Ефективність діагностики вірусних хвороб томатів. *Вісник аграрної науки*. 2015. №6. С.29-32. (Особистий внесок здобувача: участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).

12. AlDalain E., Bondar O.S., Tymchyshyn O.V., **Shevchenko T.P.**, Budzanivska I.G., Polishchuk V.P. Phylogenetic analysis of tomato mosaic virus isolated from seeds of *Lycopersicon esculentum*. *Наукові доповіді "НУБІП"* [http://nd.nubip.edu.ua/2015\_2/12e.pdf]. 2015. T.2(51). С.1-7. (Особистий внесок здобувача: ідея та планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, участь у підготовці статті до друку).
13. Альдалаін Е., Бондар О.С., Богуславець О.О., **Шевченко Т.П.**, Поліщук В.П. Вірусна контамінація насіння овочевих культур в Україні. *Карантин і захист рослин*. 2015. Т.224. С.5-9. (Особистий внесок здобувача: ідея та планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, участь у підготовці статті до друку).
14. **Shevchenko T.**, Tymchyshyn O., Kosenko I., Budzanivska I., Polishchuk V. Potyviruses infecting vegetable crops in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2016. V.2 (72). P.48-52. (Особистий внесок здобувача: ідея та планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, участь у підготовці статті до друку).
15. Tymchyshyn O., Kosenko Yu., **Shevchenko T.**, Shevchenko O. Phylogenetic analysis of seed-transmitted isolate of Zucchini yellow mosaic virus. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2017. V.2(74). P.46-50. (Особистий внесок здобувача: розробка моделі дослідження, створення схеми експериментів, узагальнення результатів, участь у написанні статті).
16. Руднева Т., **Шевченко Т.**, Шевченко О., Будзанівська І. Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка в агроценозах України. *Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер: Біологія*. 2018. 2 (76):71-79. (Особистий внесок здобувача: участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).
17. Пожилов І., Руднева Т., **Шевченко Т.**, Шевченко О., Цвігун В. Філогенетичний аналіз гена капсидного білка ізолятів вірусу мозаїки томату, що циркулюють в Україні. *Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер: Біологія*. 2019. 1 (77):71-79. (Особистий внесок здобувача: участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).

### **Статті у наукових фахових виданнях України,**

#### **які входять до міжнародних наукометричних баз даних:**

1. Руднева Т.О., Будзанівська І.Г., Рижкова А.Є., Шевченко Т.П., Дем'яненко Ф.П., Поліщук В.П. Характеристика ізолятів вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка, виділених з різних регіонів України. *Мікробіологічний журнал*. 2005. Т.67. №6. с.96-103. PMID16493891 [http://pubget.com/paper / 16493891](http://pubget.com/paper/16493891)(Scopus). (Особистий внесок здобувача: участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).
2. **Shevchenko T.P.**, Tymchyshyn O.V., AlDalain E., Bysov A.S., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. The first evidence of subgroup IB isolates of Cucumber mosaic virus in Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2015. V.31, N.1. P.57-62. (Scopus) (Особистий внесок здобувача : ідея та планування експерименту,

проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, участь у підготовці статті до друку).

3. Tsvigun V.O., Rudneva T.O., **Shevchenko T.P.**, Budzanivska I.G., Polishchuk V.P. Strain attribution of Ukrainian isolates of Zucchini yellow mosaic virus and their occurrence in Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2016. V.32. N.3. P.235-241. (Scopus)

4. **Shevchenko T.P.**, Tymchyshyn O.V., Kosenko I.A., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of Cucumber mosaic virus based on the partial sequences of three genes. *Biopolymers and Cell*. 2018. V.34(1). P.32-40 (Scopus). (Особистий внесок: ідея та планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, участь у підготовці статті до друку).

#### **Статті в іноземних виданнях:**

1. Boltovets P. M., Snopok B. A., Boyko V. R., **Shevchenko T.P.**, Dyachenko N. S., Shirshov Yu. M. Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies. *J Virol Methods*. 121(1):101-6 (2004) PMID 15350739. <http://pubget.com/paper/15350739> (Scopus) (Особистий внесок здобувача: планування експерименту, здійснення частини експериментів, написання статті)

2. Shevchenko, A.V., Budzanivska, I.G., **Shevchenko, T.P.**, Polischuk, V.P., Spaar, D. Plant virus infection development as affected by heavy metal stress *Archives of Phytopathology and Plant Protection* Volume 2004.37 (2). P.139-146 (Scopus) (Особистий внесок здобувача: участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).

3. Rudneva T.O., Shevchenko T.P., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polischuk V.P. Virus diseases of Cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine. *Plant Science*. 2006, N43 – p.508-510. (Особистий внесок здобувача: участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).

4. Budzanivska I. G., Rudneva T. O., **Shevchenko T.P.**, Boubriak I., Polischuk V. P. Investigation of Ukrainian isolates of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2007. №56. P.376-380. (Scopus) (Особистий внесок здобувача: відбір зразків, участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті).

5. Polischuk V.P., Budzanivska I.G., **Shevchenko, T.**, Oliynik S.V. Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007. V.59. pp.409-417. (Scopus) (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних та аналіз отриманих результатів, написання статті).

6. Budzanivska I.G., **Shevchenko T.P.**, Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of RNA viruses of plants. *Acta Microbiologica Bulgarica*. 2016. V.32, N.3. P.10-19. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних та аналіз отриманих результатів, написання статті).

7. Shevchenko O., Tymchyshyn O., **Shevchenko T.** Traditional cultivation practices may efficiently prevent the virus spread in susceptible crops: a case study of Turnip mosaic virus in Ukraine . *AGROFOR International Journal*. 2017. V.2, N3. P.84-91. (Особистий внесок здобувача: розробка концепції статті, опрацювання даних літератури та власних наукових досліджень, аналіз даних, участь у підготовці статті до друку).
8. Shevchenko O., Yasaka R., Tymchyshyn O., **Shevchenko T.**, Ohshima K. First evidence of the occurrence of Turnip mosaic virus in Ukraine and molecular characterization of its isolate. *Journal of Phytopathology*. 2018. V.166.N6. P 429-437(Scopus). (Особистий внесок здобувача: планування експерименту, здійснення частини експериментів, написання статті).

#### **Статті в інших виданнях:**

1. Polischuk V.P., Shevchenko O.V., Budzanivska I.G., **Shevchenko T.P.** Abiotic environmental factors: effects on epidemiology of plant virus infections.. *Virus Diseases and Crop Biosecurity (NATO Series)*. pp.121-132. In: Cooper J.I. et al –Springer, 2006. (Особистий внесок здобувача: планування експерименту, здійснення частини експериментів, написання статті).

#### **Тези наукових доповідей:**

1. Руднева Т.А., Будзанівська І.Г., Шевченко Т.П., Полицук В.П. Новый штамм вируса зеленой крапчатой мозаики огурца на территории Украины. Стратегия и тактика защиты растений. *Сборник научных трудов*. Выпуск 30, часть1. М., 2006. С. 303–306.
2. Rudneva T.O., **Shevchenko T.P.**, Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polischuk V.P. Virus diseases of cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine . 70-th Anniversary of plant protection institute and annual Balkan week of plant health. *Book of abstracts*. May 28–31, 2006. Kostinbrod. 2006. – P. 14.
3. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Полицук В.П. Вірусні хвороби овочевих культур закритого ґрунту на території України. Біоресурси та віруси: V Міжнародна конференція, 10-13 вересня 2007 р.: збірник тез. – К., 2007. – С. 189.
4. Rudnieva T. Viruses infecting vegetable crops in Ukraine / T. Rudnieva, **T. Shevchenko**, V. Polischuk // Conference: Responses of Plants to Environmental Stresses: Programme and Abstracts May 12–18, 2008, – Elena, 2008. – P. 67–68.
5. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.** Шляхи передачі вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка у тепличних господарствах України. XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 25-30 травня, 2009, Ужгород, Україна. – С.463.
6. Новые вирусные инфекции овощных культур на территории Украины / В.О. Шамрайчук, В.О. Цвигун, Т.А. Руднева, А.С. Бысов, **Т.П. Шевченко** // Биология наука XXI века: 16 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых 2012р.: собрание тезисов. – К., 2012. – С. 50-51
7. **Shevchenko T.P.**, Budzanivska I.G., Rudnieva T.O., AlDalaynEmad, Bysov A.S., Polischuk V.P. Viruses of vegetable crops Circulating in Ukraine // XIII з'їзд

Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 1-6 жовтня, 2013, Ялта, Україна. – С.439

8. V. Shamraichuk, T. Rudnieva, AlDalaynEmad, A. Bysov, **T. Shevchenko**. Distribution of tobamoviruses among plants of Solanaceae family // VII International conference «Bioresources and viruses», 10-13 of September 2013, Kyiv, Ukraine. – P. 96.

9. **Shevchenko T.** Potyviruses infecting vegetable crops in Ukraine // VIII International conference «Bioresources and viruses», 12-14 of September 2016, Kyiv, Ukraine. – P. 18-19.

10. Tymchyshyn, O., **Shevchenko, T.**, Budzanivska, I., and Polishchuk, V. Viruses Infecting Cucurbits In Ukraine And Their Phylogenetic Analysis // 13th *International Plant Virus Epidemiology Symposium* 6-10 June 2016 Avignon, France.-P.148.

11. **Shevchenko T.**, Tymchyshyn O., Kosenko I., Pichurina T., Shevchenko O., Budzanivska I. Genetic diversity of most harmful viral pathogens of vegetable crops in Ukraine // XV З'їзд товариства мікробіологів України, 11-15 вересня 2017 р.: збірник тез. – С.305.

12. Tymchyshyn O., Kosenko I., **Shevchenko T.** Biological and molecular chracterization of Ukrainian isolates of Zucchini yellow mosaic virus // VIII International Scientific Agriculture Symposium “AGROSIM 2017”, Jahorina. 5-8 October 2017, Bosnia and Herzegovina P742.

13. **Shevchenko T.**, Rudneva T., Tsvigun V. , Shevchenko O., Budzanivska I. Biodiversity of Plant Viruses Endangering Vegetable Crops in Ukraine // The 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity 03-06 July 2018, Kiev, Ukraine – P. 337

14. Фомічов А.Д., Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Шевченко О.В., Будзанівська І.Г. Вірус зеленої крапчастої мозаки огірка у агроценозах України // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві, 24-25 жовтня, 2018. - Чернігів.- С.20-23.

## АНОТАЦІЯ

**Шевченко Т.П. Молекулярна епідеміологія вірусів овочевих культур України.** –Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2019.

Встановлені закономірності епідеміології вірусів овочевих культур в Україні на основі їх молекулярних та біологічних характеристик. Описані нові джерела, способи передачі та чутливі хазяї вірусів.

Визначений спектр шкочинних вірусів, які є представниками родин *Virgaviridae* (PMMoV, ToMV, CGMMV, TRV), *Bromoviridae* (CMV), *Potyviridae* (PVY, ZYMV, WMV-2, TuMV) та *Alphaflexiviridae* (PVX), ідентифіковані нові для України віруси рослин. Підтверджено значне поширення змішаних вірусних інфекцій та встановлено типові групи вірусів, що їх викликають в Україні: ZYMV/WMV-2, CMV/ZYMV/WMV-2, CMV/ToMV/PVY та TuMV/CMV.

Показано, що насінневий спосіб передачі потребує відповідного контролю для вірусів із широким колом рослин-хазяїв, а саме CMV та ToMV. Встановлено кореляцію генетичних ознак українських ізолятів вірусів з їх вірулентністю щодо овочевих культур. Продемонстровано можливість поширення та збереження популяцій вірусів овочевих культур в міських екосистемах.

Вивчені філогенетичні властивості українських ізолятів важливих вірусів овочевих культур. Знайдені нові рекомбінантні ізоляти шкочинних вірусів WMV-2 та TuMV, які становлять небезпеку в епідеміологічному аспекті. Розроблений концептуально новий підхід до контролю актуальних вірусних інфекцій комерційно важливих овочевих культур України.

**Ключові слова:** віруси рослин, рекомбінанти, філогенетичний аналіз, овочеві культури, молекулярна епідеміологія

## АННОТАЦІЯ

**Шевченко Т.П. Молекулярная эпидемиология вирусов овощных культур Украины. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2019.

Установлены закономерности эпидемиологии вирусов овощных культур в Украине на основе их молекулярно-биологических характеристик. Описаны новые источники, способы передачи и восприимчивые хозяева вирусов. Определён спектр вредоносных вирусов, являющихся представителями семейств *Virgaviridae* (PMMoV, ToMV, CGMMV, TRV), *Bromoviridae* (CMV), *Potyviridae* (PVY, ZYMV, WMV-2, TuMV) и *Alphaflexiviridae* (PVX), идентифицированы новые для Украины вирусы растений. Подтверждено значительное распространение смешанных вирусных инфекций и установлены типичные группы вирусов, вызывающих их в Украине: ZYMV/WMV-2, CMV/ZYMV/WMV-2, CMV/ToMV/PVY и TuMV/CMV. Показано, что семенной способ передачи требует соответствующего контроля вирусов с широким спектром растений-хозяев, а именно CMV и ToMV. Установлена корреляция генетических свойств украинских изолятов вирусов с их вирулентностью относительно овощных культур. Продемонстрирована возможность распространения и сохранения популяций вирусов овощных культур в урбанизированных экосистемах.

Изучены филогенетические свойства украинских изолятов вирусов овощных культур. Найдены новые рекомбинантные изоляты вредоносных вирусов WMV-2 и TuMV, представляющие опасность в эпидемиологическом аспекте. Разработан концептуально новый подход к контролю актуальных вирусных инфекций коммерчески важных овощных культур Украины.

**Ключевые слова:** вирусы растений, рекомбинанты, филогенетический анализ, овощные культуры, молекулярная эпидемиология

## SUMMARY

**Shevchenko T.P. Molecular epidemiology of viruses infecting vegetable crops in Ukraine.** – Manuscript.

The thesis for a Dr. Sci. degree in biological sciences in speciality 03.00.06 – virology. –Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

Epidemiological patterns for viruses infecting vegetable crops based on their molecular and biological properties were discovered. New virus sources, routes of transmission and susceptible hosts were described for artificial ecosystems. Molecular typing and evaluation of epidemic potential were carried out for the established spectrum of harmful viruses endangering commercial production of vegetable crops in Ukraine comprising viruses belonging to the families *Virgaviridae* (PMMoV, ToMV, CGMMV, TRV), *Bromoviridae* (CMV), *Potyviridae* (PVY, ZYMV, WMV-2, TuMV) and *Alphaflexiviridae* (PVX). PMMoV, PepMoV and TuMV were described in Ukraine for the first time.

Significant portion of mixed virus infection was shown which were typically induced in Ukraine by the following virus groups: ZYMV/WMV-2, CMV/ZYMV/WMV-2, CMV/ToMV/PVY and TuMV/CMV. It was established that seeds of vegetable crops was one of the important and often neglected source of viruses in the ecosystems. For Ukraine, seed transmission was confirmed as an important way of spread of many viruses (CGMMV, ZYMV, ToMV and CMV) requiring special control for pathogens with wide host range (CMV and ToMV).

Biological properties of Ukrainian virus isolates (ToMV, TuMV, CMV, etc.) were confirmed to correlate with their respective genetic characteristics in the context of virulence toward vegetable crops. Ukrainian populations of WMV-2, ZYMV, PMMoV and ToMV were mainly genetically homogenous with high (>90%) degree of identity to known isolates and strains of respective viruses. Unique amino acid substitutions in the 2b protein were found for Ukrainian isolates of CMV suggesting higher level of genetic heterogeneity of its population in Ukraine. It was demonstrated that phylogenetic relationships of Ukrainian isolates of viruses infecting vegetable crops were not dependent on geographical origin of the isolates or their host plant.

Novel recombinants of harmful viruses WMV-2 and TuMV were found suggesting intense exchange of viral genetic material and evolutionary processes in Ukraine and posing epidemiological risks. Analysis of the full-genome sequence of Ukrainian TuMV isolate showed that isolate UKR9 has not been described before and was an atypical European recombinant combining traits of two different genetic groups World-B and Asian-BR.

Following the molecular typing of viruses, a full genomic and 33 partial genetic sequences of Ukrainian isolates of viruses infecting vegetable crops were deposited to the Genbank (NCBI) constituting over 25% of all plant viral sequences published from Ukraine.

Urban ecosystems together with their concomitant wild-growing and cultural flora were demonstrated as important factors maintaining populations of viruses infecting vegetable crops.

Based on the complex of biological and molecular epidemiological features it was construed that ToMV, TuMV and CMV were potentially the most harmful viruses endangering cultivation of vegetables in Ukraine.

The concept for reliable and cost-effective control of viruses infecting vegetable crops in Ukraine was elaborated basing on epidemiological properties of viruses, type of susceptible crop(s) and the environment.

**Key words:** plant viruses, recombinants, phylogenetic analysis, vegetable crops, molecular epidemiology.





Підписано до друку 12.11.2019 р. Зам. № 1169.  
Формат 60x90 1/16. Папір офсетний. Друк – цифровий.  
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 1,9.  
Друк ЦП «КОМПРИНТ». Свідоцтво ДК №4131 від 04.08.2011 р.  
м. Київ, вул. Предславинська, 28  
095-941-84-99, 067-209-54-30  
email: komprint@ukr.net