

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол №__ засідання кафедри

від «__» _____ 2023 р.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ АЛЕКСІ-,
КАРЛА- ТА ПОТІВІРУСІВ У РОСЛИН РОДУ ALLIUM В УКРАЇНІ**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Тагера Кирила Володимировича
Науковий керівник від кафедри
д.б.н, доц. Шевченко Т.П

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ «Інституту біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом під керівництвом к.б.н. Снігур Г.О.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

LYSV – Leek yellow stripe virus (Вірус жовтої смугастості порею);

OYDV – Onion yellow dwarf virus (Вірус жовтої карликовості цибулі);

IYSV – Iris yellow spot virus (Вірус жовтої плямистості ірису);

SLV – Shallot latent virus (Латентний вірус шалоту);

GCLV – Garlic common latent virus (Звичайний латентний вірус часнику);

СТАВ – Cetyltrimethylammonium bromide (цетилтриметиламоніум бромід);

ЕДТА – Етилендіамінтетраоцтова кислота;

ELISA – Enzyme-linked immunoassay (Імуноферментний аналіз);

ISEM – Immunosorbent electron microscopy (імуносорбентна електронна мікроскопія).

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Видовий склад вірусів рослин роду <i>Allium</i>	6
1.1. Рід <i>Allexivirus</i>	6
1.2. Рід <i>Carlavirus</i>	12
1.3. Рід <i>Potyvirus</i>	15
1.4. Рід <i>Orthospovirus</i>	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	24
2.1. Використані речовини, матеріали та інструменти	24
2.2. Метод імуноферментного аналізу	25
2.3. Метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією	26
2.4. Метод електрофорезу нуклеїнових кислот	28
2.5. Метод філогенетичного аналізу	28
2.6. Методи статистичного опрацювання отриманих даних	30
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень	31
3.1. Ідентифікація збудників вірусних хвороб рослин роду <i>Allium</i> за допомогою імуноферментного аналізу	31
3.2. Ідентифікація вірусів у зразках рослин роду <i>Allium</i> методом ЗТ-ПЛР	35
3.3. Результати філогенетичного аналізу алексі-, карла- та потівірусів у рослин роду <i>Allium</i> в Україні	36
ВИСНОВКИ	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

ВСТУП

Більшість сортів часнику, культивованого по всьому світу, вразливі до різних видів вірусів, що викликають хвороби з мозаїчними або смугастими симптомами [1]. Вірусні хвороби часнику (*Allium sativum*) поширені у всьому світі [2, 3] і спричиняють великі втрати врожаю та погіршують його якість [4-7]. Тому важливим є контроль над поширенням цих хвороб, встановлення видового різноманіття вірусів, що їх викликають та їх молекулярних характеристик. Але контроль ускладнює вегетативний спосіб розмноження сільськогосподарського часника, бо в такому випадку віруси накопичуються у цибулинках і продовжують існувати у наступних поколіннях цього часнику [6, 8]. Іншою проблемою є змішана вірусна етіологія майже кожної хвороби, що сильно ускладнює визначення вірусу [9]. Отже, до появи сучасних методів ідентифікації вірусів, більшу частину видів неможливо було ідентифікувати і безліч видів узагальнювали під назвами *Garlic latent virus* та *Garlic mosaic virus*.

Від початку спалаху хвороби жовтої карликовості в цибулі в США на початку двадцятого століття [10, 11], вірусні хвороби економічно важливих видів роду *Allium* вивчаються у багатьох куточках світу. Першими описані були віруси *Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow dwarf virus*, що належать до роду *Potyvirus* та *Shallot latent virus* (*Carlavirus*) [12, 13]. Далі охарактеризовані були представники роду *Allexivirus*: *Garlic virus X*, *Garlic virus E*, *Garlic virus A*, *Garlic virus B*, *Garlic virus C*, *Garlic virus D* [14-18]. У той же час описаний був описаний інший вид роду *Carlavirus* – *Garlic common latent virus* [19].

Тому, метою роботи було провести ідентифікацію та філогенетичний аналіз алексі-, карла- та потівірусів у рослин роду *Allium* в Україні. Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- провести відбір зразків часнику та цибулі, що мають типові симптоми вірусних інфекцій.
- провести ідентифікацію вірусів за допомогою серологічних та молекулярних методів.
- встановити філогенетичні зв'язки між виділеними вірусними ізолятами та ізолятами з інших країн.

РОЗДІЛ 1

ВИДОВИЙ СКЛАД ВІРУСІВ РОСЛИН РОДУ *ALLIUM*

1.1. Рід *Allexivirus*

Рід *Allexivirus* належить до родини *Alphaflexiviridae*, порядку *Tymovirales*, класу *Alsuviricetes*, типу *Kitrinoviricota*, царства *Orthornavirae*, домену *Riboviria* [20].

Віруси роду *Allexivirus*, що уражують часник, представлені видами: *Garlic virus A* (GVA), *Garlic virus B* (GVB), *Garlic virus C* (GVC), *Garlic virus D* (GVD), *Garlic virus E* (GVE), *Garlic virus X* (GVX), *Shallot virus X* (ShVX), *Garlic mite-borne filamentous virus* (GMbFV) [14-16, 18, 20-22].

Алексівіруси мають вузьке коло господарів і як правило уражують лише рослини роду *Allium*: часник, цибуля та цибуля-порей. Зазвичай вони викликають безсимптомні латентні інфекції, іноді, викликаючи помірну хлоротичну смугастість або мозаїку (рис 1.1.) [20, 23-26]. У тканинах можуть утворювати гранулярні включення та невеликі скупчення вірусних частинок (рис. 1.2.) [27].

Внесок у втрати врожаю від алексівірусів ще не повністю досліджений, але показано, що *Garlic virus A* викликав зменшення ваги цибулин на 14-32% і діаметру на 11-6%, *Garlic virus C* викликав зменшення ваги на 15% та діаметру на 5% [4], *Garlic virus D* викликав зменшення ваги на 12,3% і діаметру на 6,7% [24]. Окрім цього, алексівіруси часто знаходяться у змішаних інфекціях з представниками інших родів, що вражають часник. Доведено збільшення втрат врожаю, якщо уражена іншим вірусом рослина, мала попередньо вірус роду *Allexivirus* [28].

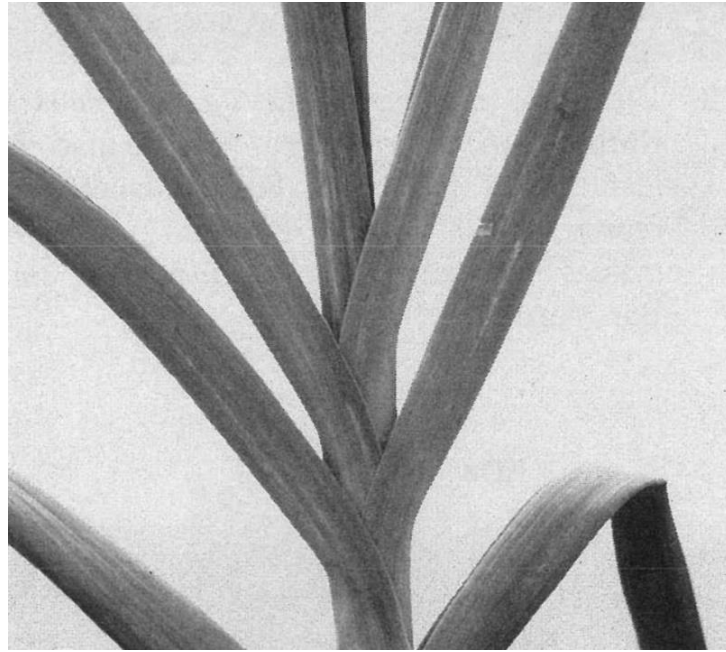


Рис. 1.1. Симптоми (мозаїка) представника роду *Allexivirus* на часнику [23]

Віруси переносяться кліщами виду *Aceria tulipae*, однак можливе штучна механічна передача через рослинний сік у лабораторних умовах [25-27, 29-30, 32].

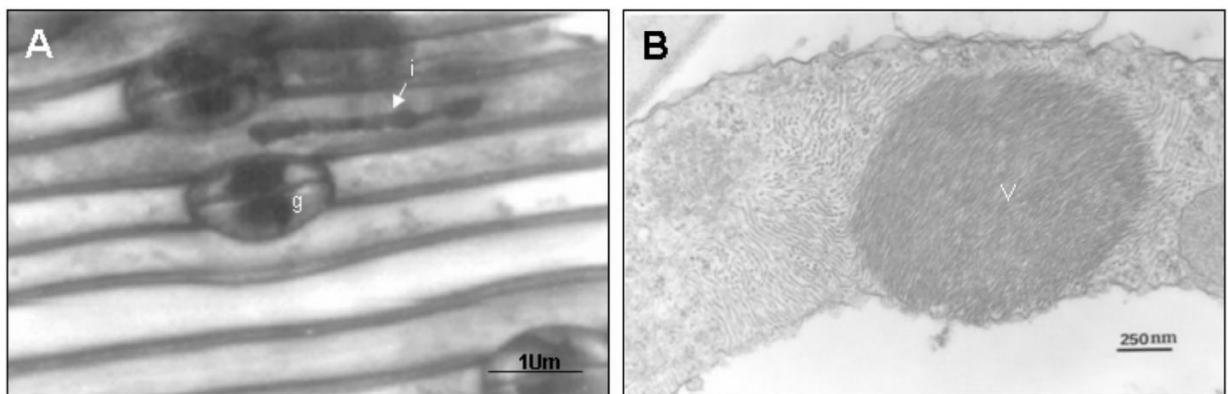


Рис. 1.2. Включення віріонів роду *Allexivirus* (A, i) та вірусні частинки агреговані в епідермальних клітинах (B, v); лінійка відображає 1 мкм (A) та 250 нм (B) [27]

Віріони – нитковидні гнучкі, довжиною приблизно 700-800 нм та 12 нм у діаметрі (рис 1.3., 1.4., 1.5.), мають спіральний тип симетрії. Геном представлений лінійною одноланцюговою молекулою (+) РНК з 3'-полі А хвостом, довжиною близько 9 кб [14, 19, 20, 23-27, 31].

Молекулярна маса капсидного білка представників роду *Alleixvirus* складає приблизно 26-28 кДа: 27.6 кДа (*Garlic virus A*), 26.7 кДа (*Garlic virus B*), 27.9 кДа (*Garlic virus C*), 27.4 кДа (*Garlic virus D*), 27.7 кДа (*Garlic virus E*) і 26.9 кДа (*Garlic virus X*) [34].

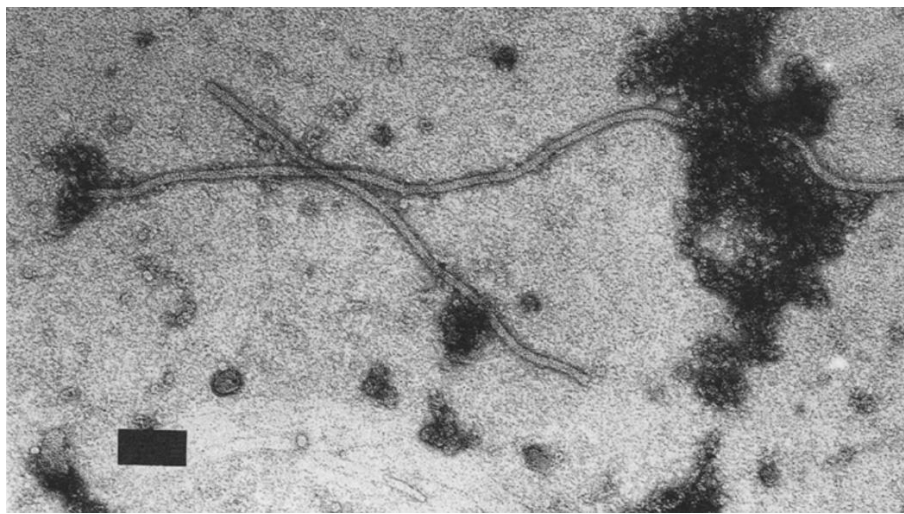


Рис. 1.3. Електронна мікрофотографія віріонів *Alleixvirus*; лінійка відображає 100 нм [26]

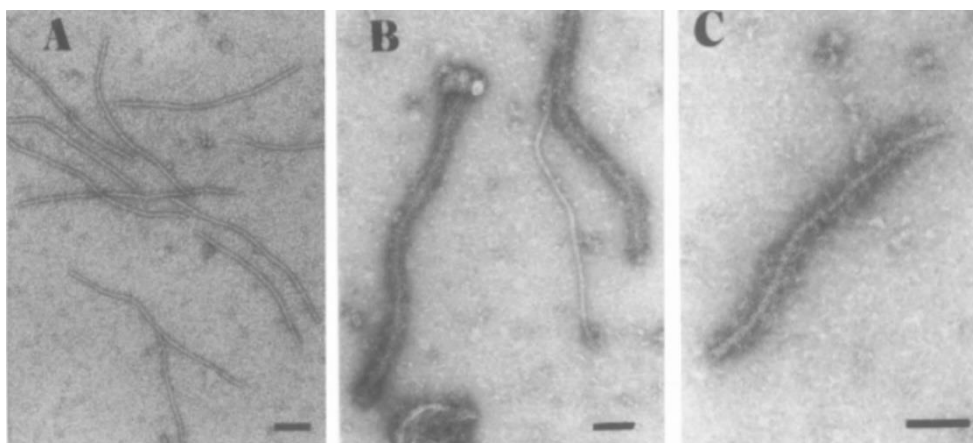


Рис. 1.4. Електронні мікрофотографії віріонів *Garlic virus A* (A), *Garlic mite-borne filamentous virus* (B), *Garlic virus C* (C); лінійка відображає 100 нм [33]

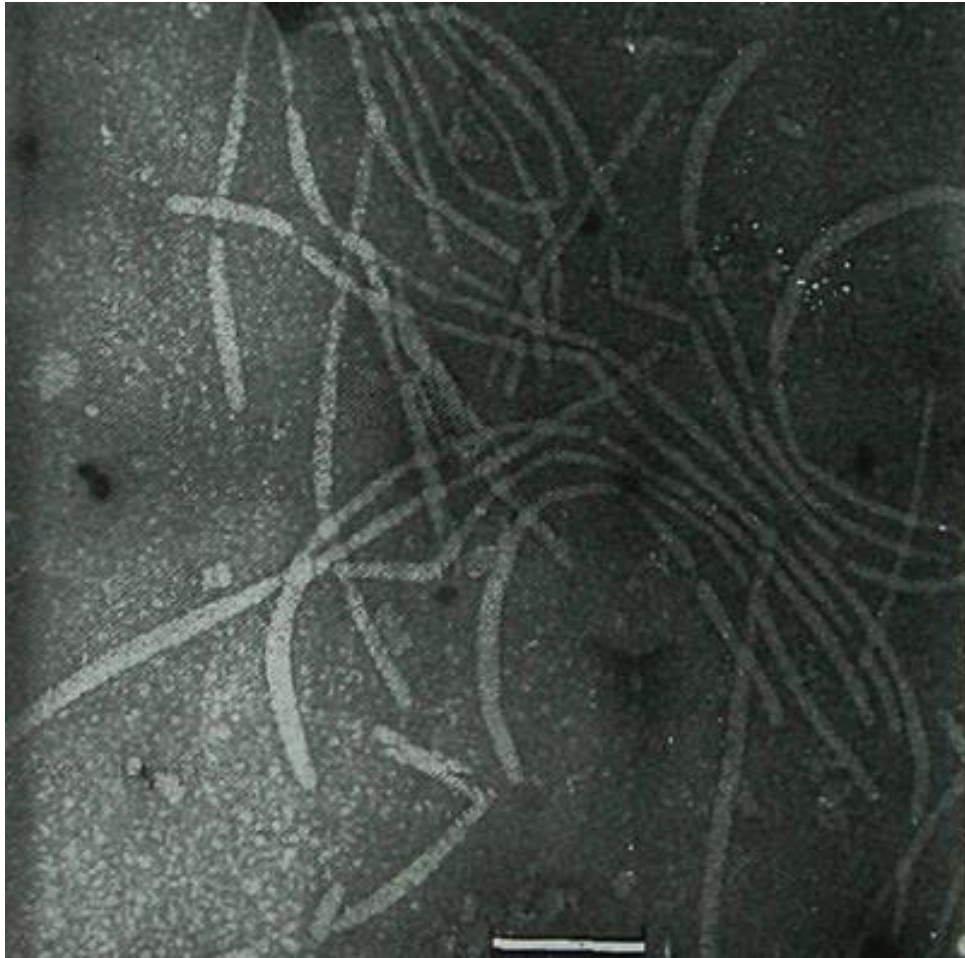


Рис. 1.5. Віріони Shallot virus X; лінійка відображає 200 нм [31]

Для *Garlic virus C* була досліджена стійкість при певних умовах: в неочищених екстрактах з листя часнику зберігає інфекційність після розведення до 10^{-3} , при 10^{-4} – її втрачає; зберігає після обробки температурою $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ під час 10 хв, при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ – втрачає; зберігає після інкубації при $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом трьох днів, протягом п'яти – втрачає [23].

Рід *Allexivirus* вирізняється своєю унікальною геномною організацією, збереженими нуклеотидними послідовностями та діапазоном господарів. Аллексівіруси мають монопартичний РНК-геном довжиною від 8,3 до 9,0 кілобаз (кб). Геном містить п'ять-шість відкритих рамок зчитування (ORF), що кодують вірусні білки, що беруть участь у реплікації, переміщенні та

інкапсуляції, а також білок оболонки. 5' і 3' нетрансльовані області (UTR) геному алексівірусу відіграють важливу роль у реплікації вірусу, трансляції та стабільності [3].

У даний час Міжнародний комітет з таксономії вірусів (ICTV) визнає дев'ять видів в межах роду *Allexivirus*. Ці види [3]:

Вірус часнику А (GarV-A)

Вірус часнику В (GarV-B)

Вірус часнику С (GarV-C)

Вірус часнику D (GarV-D)

Вірус часнику E (GarV-E)

Вірус часнику X (GarV-X)

Вірус шалот X (ShV-X)

Вірус люцерни S

Вірус арахісу пінтої

ORF у геномі алексівірусу кодують такі вірусні білки: білки, пов'язані з реплікацією: ORF1 кодує великий поліпротеїн із кількома функціональними доменами, включаючи РНК-залежну РНК-полімеразу (RdRp), геліказу та метилтрансферазу. Ці домени відіграють важливу роль у реплікації вірусу, транскрипції та блокуванні РНК.

Гени потрійного блоку генів (ТGB): ORF 2, 3 і 4 кодують три білки ТGB (ТGB1, ТGB2 і ТGB3), які сприяють переміщенню вірусу в рослині-хазяїні. Ці білки утворюють рибонуклеопротеїнові комплекси та взаємодіють з факторами хазяїна, щоб забезпечити переміщення вірусу від клітини до клітини та на великі відстані [5].

Ген білка оболонки (СР): ORF5 кодує білок оболонки, який відповідає за інкапсуляцію вірусної РНК у віріони. СР відіграє важливу роль у

стабільності вірусу, передачі векторами та уникненні імунної відповіді господаря.

Механізми реплікації: Алексівіруси реплікуються у цитоплазмі рослини-господаря, використовуючи клітинний механізм господаря.[6] Вірусна РНК спочатку транлюється для отримання пов'язаного з реплікацією поліпротеїну, який потім розщеплюється на функціональні домени. Домен RdRp синтезує комплементарний негативно-смысловий ланцюг РНК, який служить шаблоном для виробництва нових позитивно-смыслових вірусних геномів РНК. Ці нещодавно синтезовані геноми або використовуються для трансляції, або інкапсулюються білком оболонки для утворення нових віріонів.

Алексівіруси мають консервативні нуклеотидні послідовності у своїх геномах, які можна використовувати для розробки специфічних праймерів і зондів для молекулярного виявлення та ідентифікації. Наприклад, гени RdRp і СР часто є мішенню для аналізів на основі ПЛР і секвенування для класифікації та диференціації видів алексівірусів.

Розуміння молекулярних особливостей роду *Allexivirus* має важливе значення для вивчення їх взаємодії з рослинами-господарями та навколишнім середовищем, визначення потенційних мішеней для антивірусних стратегій і розробки точних діагностичних засобів для їх виявлення та ідентифікації.

У той час як більшість алексівірусів в основному інфікують такі види *Allium*, як часник, цибуля та шалот, але деякі види були ідентифіковані і в інших родинях рослин. Спектр хазяїв видів *Allexivirus* варіюється, причому деякі віруси є дуже специфічними для хазяїна, тоді як інші можуть інфікувати ширший спектр видів рослин [4]. Класифікація та таксономія роду *Allexivirus* постійно розвиваються, оскільки відкриваються нові види вірусів,

а прогрес у молекулярних методах дозволяє точніше характеризувати ці віруси.

Розуміння класифікації та таксономії роду *Allexivirus* має вирішальне значення для вивчення їх молекулярних і біологічних особливостей, вивчення їх взаємодії з рослинами-господарями та розробки цільових стратегій їх виявлення та контролю. Крім того, знання різноманітності та еволюційних зв'язків між алексивірусами може допомогти дослідникам передбачити появу нових вірусних штамів і інформувати про розвиток стійких до хвороб сортів рослин.

1.2. Під *Carlavirus*

Під *Carlavirus* належить до підродини *Quinvirinae*, родини *Betaflexiviridae*, порядку *Tymovirales*, класу *Alsuviricetes*, типу *Kitrinoviricota*, царства *Orthornavirae*, домену *Riboviria* [20].

Віруси роду *Carlavirus*, що уражують часник, представлені видами: *Garlic common latent virus* (GCLV) та *Shallot latent virus* (ShLV) [19, 20]. Ці віруси не викликають серйозних симптомів, однак у складі змішаної інфекції з вірусами роду *Potyvirus* можуть спричиняти набагато гірші наслідки (рис. 1.6.) [19, 35-39, 40]. Також уражують інших представників роду *Allium*: цибулю, цибулю-порей та шалот [19]. Віруси передаються за допомогою попелиць виду *Myzus ascalonicus*, неперситентним шляхом, і не передаються через насіння [13].

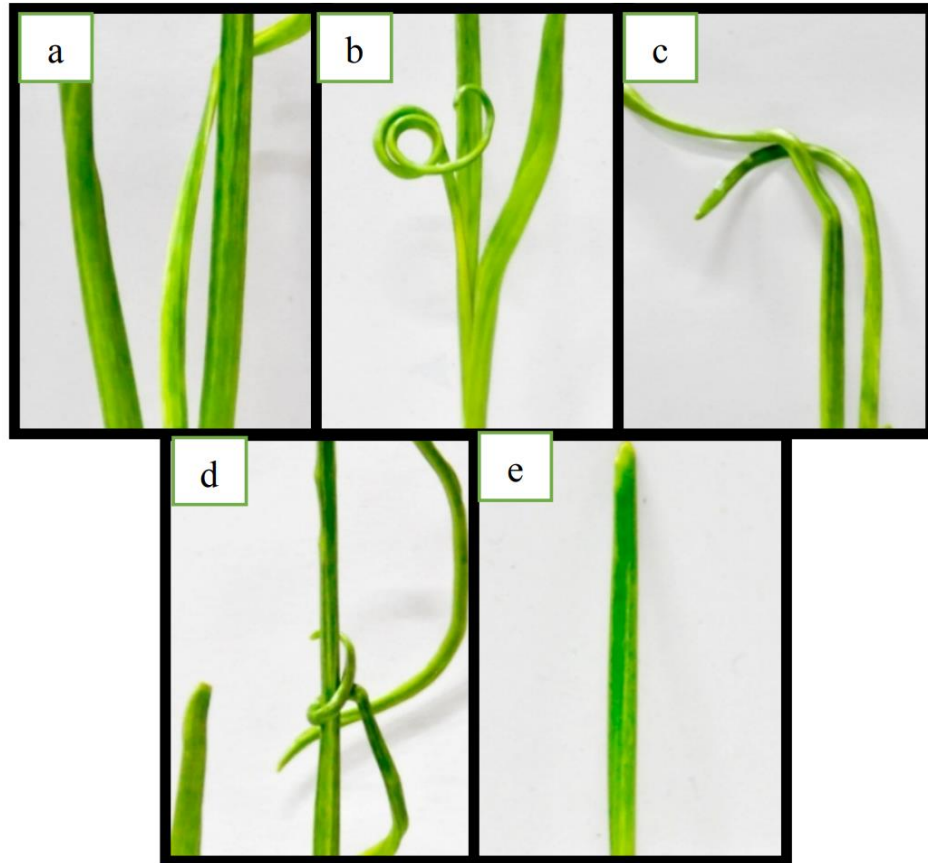


Рис. 1.6. Симптоми змішаної інфекції *Carlavirus*: мозаїка (а), зморщення (b), закручення (в), звивання (d), смугастість (е) [41]

Віріони – гнучкі ниткоподібні, довжиною 600-700 нм (рис. 1.7., 1.8.) і 12-15 нм у діаметрі, мають спіральний тип симетрії з кроком 3,4 нм [13, 20, 29, 35, 41, 42]. Геном представлений лінійною одноланцюговою молекулою РНК(+) довжиною близько 8,6 кб з кепом на 5'-кінці та полі-А хвостом на 3'-кінці [19, 20, 43].

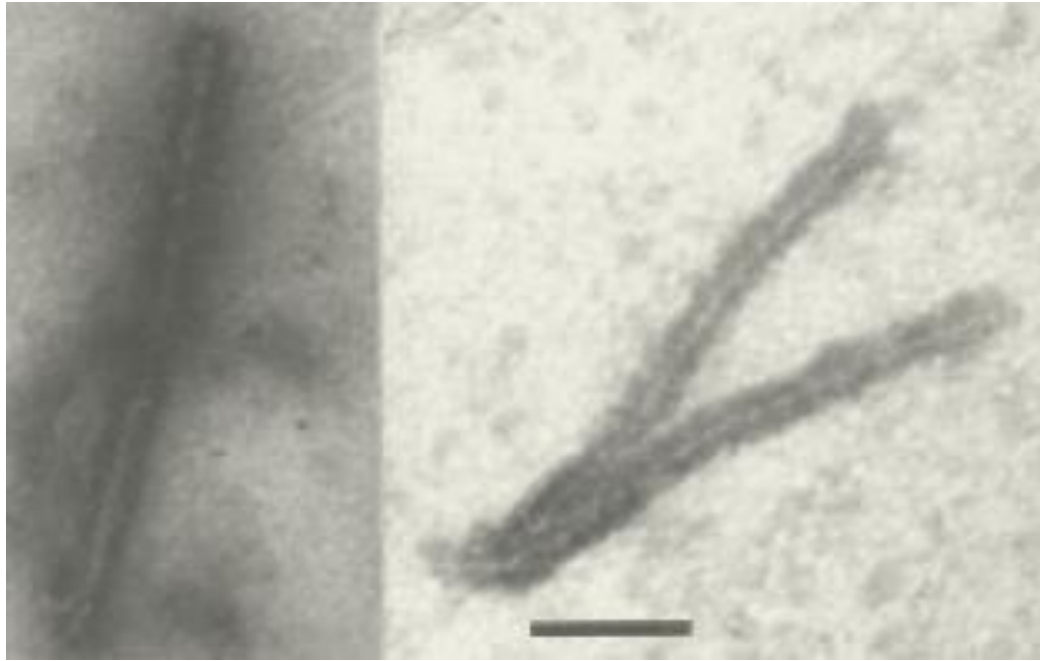


Рис. 1.7. Віріони Garlic common latent virus (зліва) та Shallot latent virus (справа); лінійка відображає 165 нм [35]

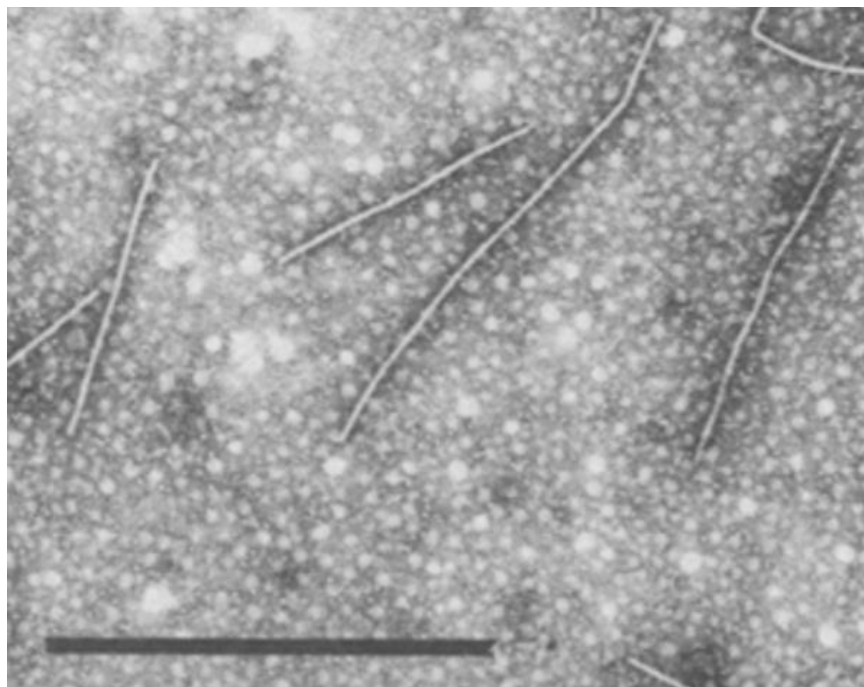


Рис. 1.8. Віріони Shallot latent virus в цибулі-порей; лінійка відображає 1 мкм [13]

Молекулярна маса капсидного білка *Shallot latent virus* – 30 кДа, *Garlic common latent virus* – 35 кДа [40].

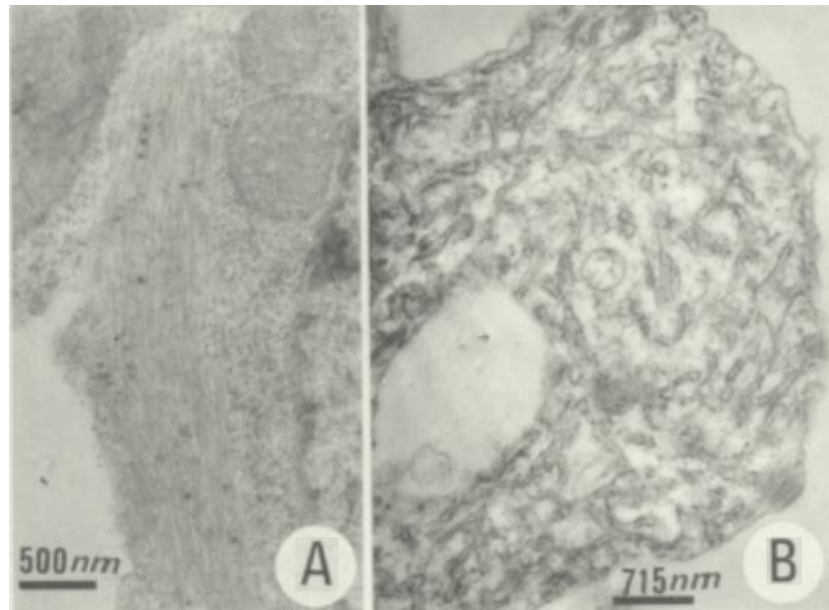


Рис. 1.9. Агреговані віріони (А) та включення утворені представниками роду *Carlavirus* (В) [35]

Garlic common latent virus у тканинах може індукувати утворювання включень з гіпетрофованого ендоплазматичного ретикулюму, у цистернах якого розкидані віріони, та включення з невеликих скупчень вірусних частинок (рис. 1.9.) [35].

1.3. Рід *Potyvirus*

Рід *Potyvirus* належить до родини *Potyviridae*, порядку *Patatavirales*, класу *Stelpaviricetes*, типу *Pisuviricota*, царства *Orthornavirae*, домену *Riboviria* [20].

Віруси роду *Potyvirus*, що уражують часник, представлені видами: *Leek yellow stripe virus* (LYSV) та *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) [44-46]. Цибуля та шалот – резистентні, але не імунні до LYSV, *Alium fistulosum* – імунний [12]. OYDV, окрім часника, вражає цибулю, але не цибулю-порей [45]

Віріони потівірусів – нитчасті гнучкі, довжиною 700-833 нм та діаметром 11-13 нм (рис. 1.10., 1.11.), мають спіральний тип симетрії з кроком близько 3,4 нм [12, 20, 47-50]. Геном представлений лінійною одноланцюговою (+) РНК з полі-А хвостом на 3'-кінці, та довжиною близько 10 кб [51, 52].



Рис. 1.10. Віріони *Potyvirus* у цибулі-порей; лінійка показує 250 нм [50]

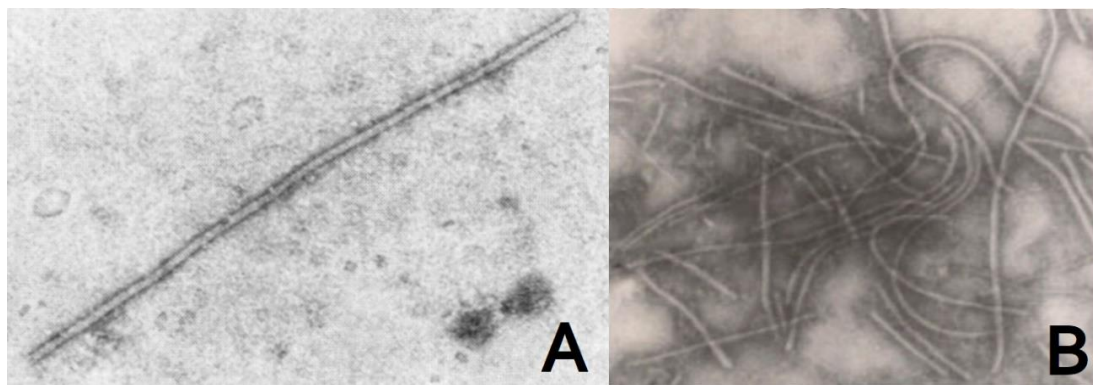


Рис. 1.11. Віріони Onion yellow dwarf virus у часнику (А, х96400; В, х60000) [1, 47]

Типові симптоми вірусів роду *Potyvirus* на часнику – жовта смугастість, яка, у випадку з Onion yellow dwarf virus, на пізніх стадіях супроводжується затримками росту, закрученням і зморщенням (рис. 1.12., 1.13., 1.14.) [5, 12, 44, 45, 47, 53].

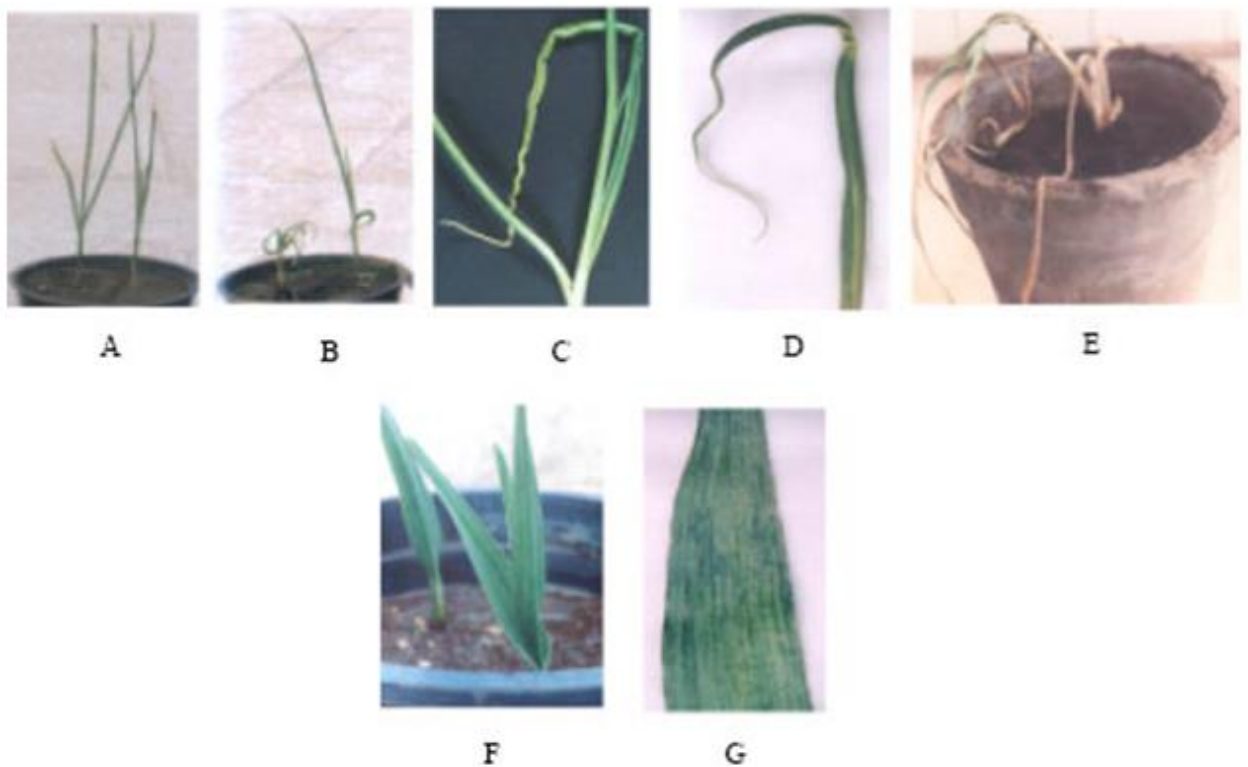


Рис. 1.12. Симптоми *Onion yellow dwarf virus* на часнику (В-Е); розвиток симптомів порівняно з контролем (А, F, G) [47]

Leek yellow stripe virus поза змішаних інфекцій спричиняє менші наслідки: зниження периметру (на 9%) та ваги (на 17-28%) цибулин. При цьому у змішаних інфекціях наслідки інфекції гірші: зменшення ваги на 36-50% та периметру на 13% [5, 9, 54]. *Onion yellow dwarf virus* викликає аналогічні, але сильніші симптоми; зниження ваги цибулин – 30-48%, але при

змішаній з LYSV інфекції зниження в середньому на 10% більше [5]. Також, були дослідженні інші характеристики, на які впливає OYDV. Кількісні характеристики: маса цибулини (21,5%), висота рослини (3,3%), висота цибулини (5,0%) і ширина (10,9%), маса зубчика (25,9%), а також якісні: суха речовина (2,6%) і вихід сухої речовини (24,0 %) [55].

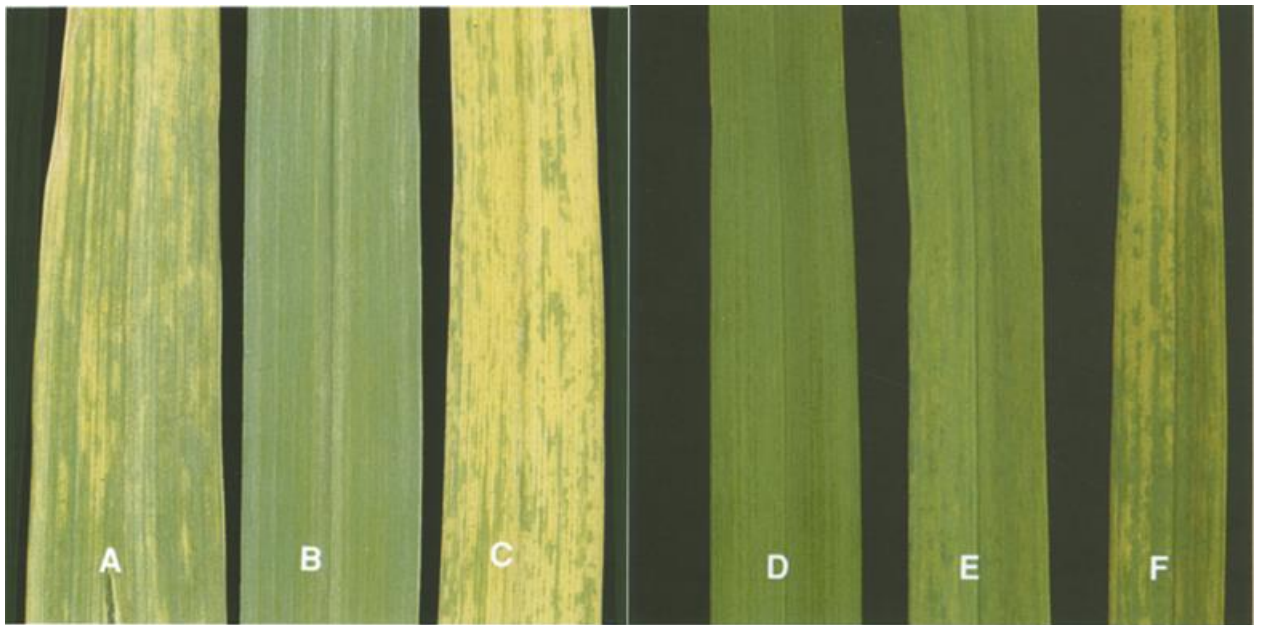


Рис. 1.13. Симптоми *Leek yellow stripe virus* (A), *Onion yellow dwarf virus* (C, F) та змішаної інфекції LYSV та OYDV (E) на часнику; контролі (B, D) [45]



Рис. 1.14. Симптоми *Onion yellow dwarf virus* на часнику [53]

Віруси роду Potyvirus, що уражують часник, неперсистентно переносяться попелицями видів *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *R. miadis*, *Schizaphis graminum*, *Aphis gossypii*, *A. nerii*, *A. fabae*, *A. craccivora*, *Uroleucon sonchi*, *Hyperomyzus carduellinus*, *Acyrtosiphon pisum*, *Dactynotus sonchi* [5, 12, 48, 49, 56-58]. Не передаються через насіння [12].

У клітинах потівіруси індукують утворення циліндричних включень у клітинах мезофілу: “scrolls”, “pinwheels” та коротко вигнуті ламіновані агрегати (рис. 1.15., 1.16.) [1, 5, 48, 59].

Маса капсидного білка *Leek yellow stripe virus* становить близько 35 кДа, *Onion yellow dwarf virus* – 30 кДа [5, 12, 48, 58].

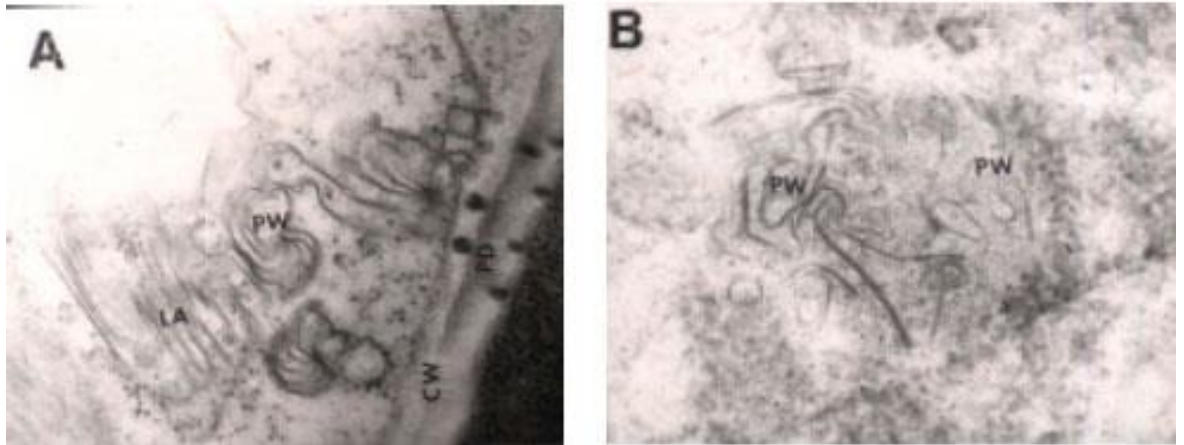


Рис. 1.15. Циліндричні вклучення індуковані Onion yellow dwarf virus: “pinwheels” (PW) і ламіновані агрегати (LA); CW – клітинна стінка, PD – плазмодесми; (A, x 30,000; B, x 25,000) [47]

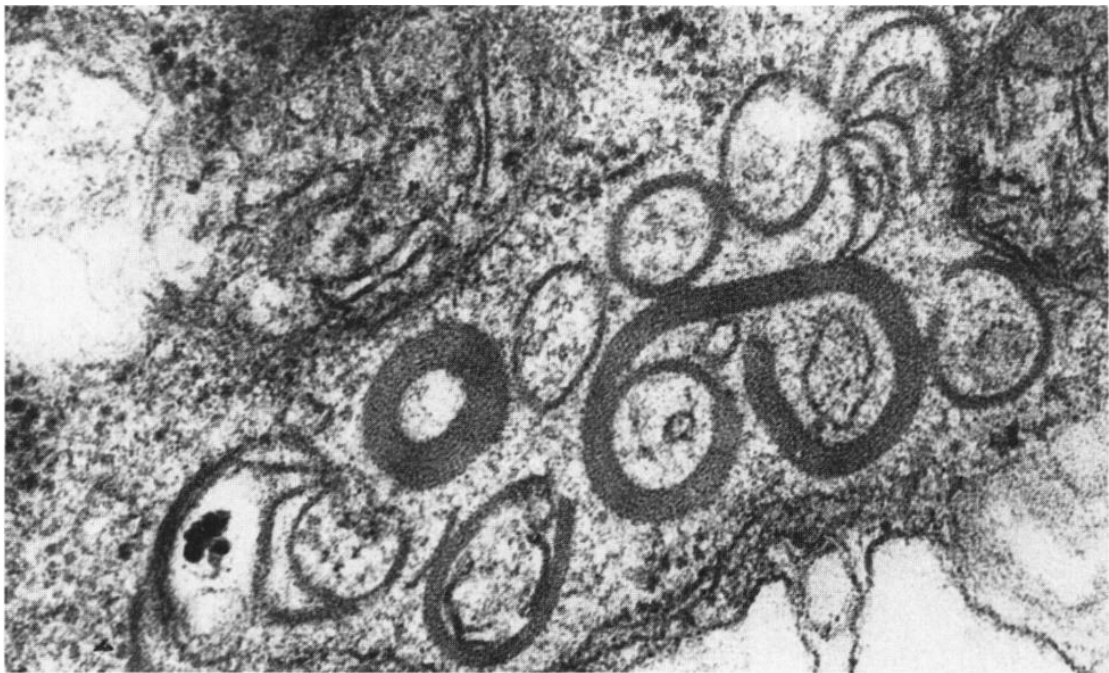


Рис. 1.16. “Pinwheels” індуковані *Leek yellow stripe virus* у листках цибулі-порей (x40000) [1]

Точка температурної інактивації для LYSV – 50-60°C, зберігає інфекційність при розведенні – 10^2 - 10^3 , тривалість життя *in vitro* – 3-4 дні. Для OYDV точка температурної інактивації – 60-65°C, зберігає інфекційність при розведенні – 10^3 - 10^4 , тривалість життя *in vitro* – 2-3 дні [12].

1.4. Під *Orthotospovirus*

Під *Orthotospovirus* належить до родини *Tospoviridae*, порядку *Bunyavirales*, класу *Ellioviricetes*, підтипу *Polyploviricotina*, типу *Negamaviricota*, царства *Orthornavirae*, домену *Riboviria* [20].

Віруси роду *Orthotospovirus*, що уражують часник, представлені видами: *Iris yellow spot orthotospovirus* (IYSO) та *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWO) [60, 61]. Типові симптоми – плями солом'яного кольору, хлорози та смугастість на листках [61-63].

IYSO має широкий спектр природних хазяїв: ірис, цибуля, цибуля-порей, шалот, *Eustoma russellianum*, *E. grandiflorum*, *Alstroemeria sp.*, *amaryllis (Hippeastrum hybridum)*, *Amaranthus retroflexus*, *Portulaca oleracea*, *Pelargonium hortorum*, *Rosa sp.*, *Scindapsus sp.* [64]. TSWO вражає ще більшу кількість рослин, що відносяться як до однодольних, так і однодольних [68, 69].

Віруси роду *Orthotospovirus* передаються трипсами (*Thysanoptera : Thripidae*) пропагативним циркулятивним способом. Головним переносником *Iris yellow spot orthotospovirus* є *Thrips tabaci* [60, 62, 67]. Не передаються через насіння або цибулини інфікованих рослин [62].

Вірус – складний, віріони – плеоморфні, 80-120 нм у діаметрі (рис. 1.17.) [20].

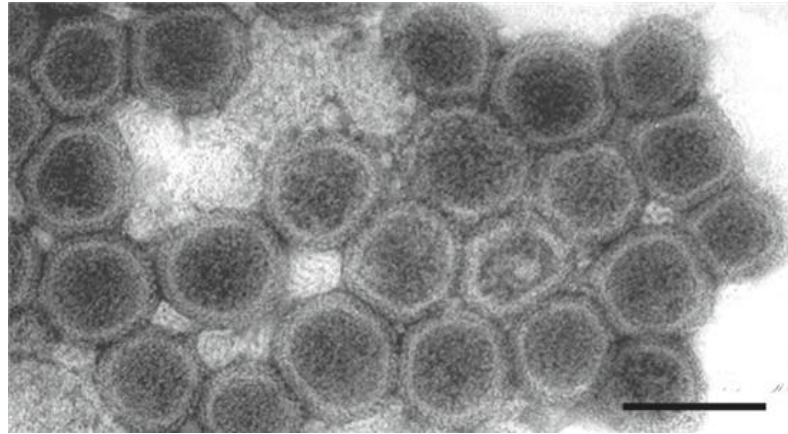


Рис. 1.17. Віріони *Tomato spotted wilt orthotospovirus*; лінійка відображає 100 нм [20]

Геном – трипартидний, що складається з одноланцюгових лінійних РНК-молекул: S (негативно сенсова), М і S (амбісенсові) [20, 68-70]. Молекулярна маса капсидного білка *Iris yellow spot orthotospovirus* – 30 кДа, *Tomato spotted wilt orthotospovirus* – 29 кДа [71].

Таким чином значний спектр близькоспоріднених вірусів та широкий діапазон їх поширення (рис. 1.18) вимагають надійних методів діагностики та боротьби.

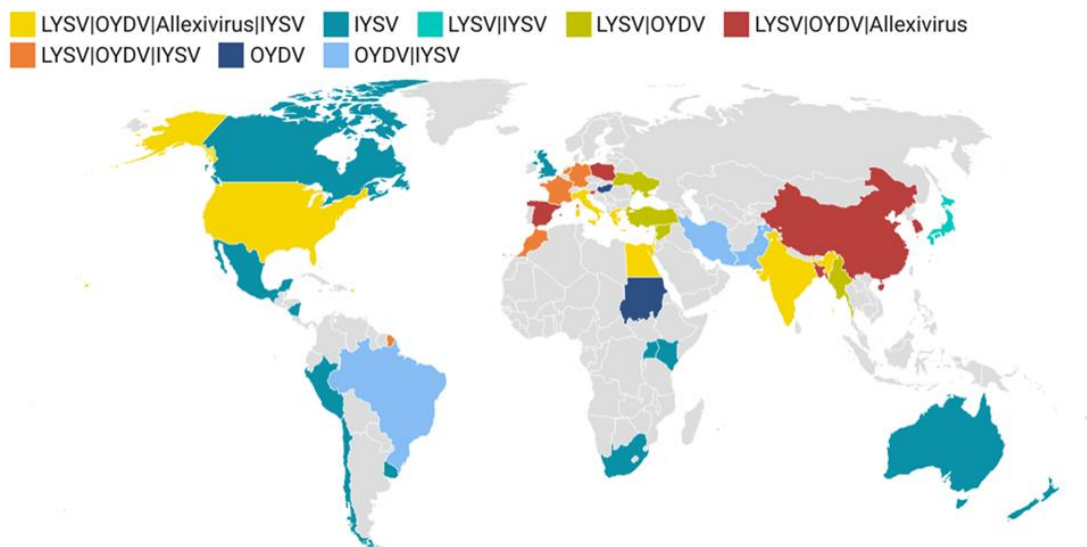


Рис. 1.18. Поширення вірусів роду *Allium*

Вивчення молекулярних і біологічних особливостей цих вірусів має вирішальне значення для розуміння їх взаємодії з рослинами-господарями, розробки ефективних стратегій їх виявлення, контролю та управління, а також для мінімізації впливу цих вірусів на врожайність і якість сільськогосподарських культур.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Використані речовини, матеріали та інструменти

Для аналізу були використані зразки часнику, цибулі та інших видів рослин роду *Allium* з Вінницької, Київської, Черкаської, Запорізької, Полтавської областей.

Ідентифікацію вірусів за допомогою імуноферментного аналізу проводили з використанням власних та комерційних тест-систем (DSMZ, Німеччина; LOEWE, Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника. Результати реєстрували на автоматичному ІФА-аналізаторі Thermo Labsystems Opsis MR (США) із програмними забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм. За позитивний результат приймався показник E405, що втричі перевищував показник негативного контролю. Для порівняння результатів використовували середній показник (середнє арифметичне).

Для виділення тотальної РНК використовувався комерційний набір для виділення РНК «GeneJET Plant RNA Purification Kit» від ThermoFisher Scientific (США), який працює за принципом зв'язування нуклеїнової кислоти з мембраною на основі кремнезему в присутності високої концентрації хаотропних солей. Зразки для виділення були гомогенізовані у рідкому азоті. Виділення проводили згідно з рекомендаціями виробника.

Для детекції вірусів методом двокрокової ЗТ-ПЛР використовували RevertAid RT Reverse Transcription Kit з Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США). Постановку реакції проводили за рекомендацією виробника. Аналіз продуктів здійснювали за допомогою електрофорезу в 1.5% агарозному гелі, з використанням стандартних

маркерів Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas, Латвія).

Для виділення продукту ПЛР з агарозного гелю використовували «GeneJET Gel Extraction Kit» від Thermofisher Scientific (США). Виділення проводили згідно з рекомендаціями виробника.

Очищені амплікони секвенували за допомогою технології циклічного секвенування на аналізаторі ДНК Applied Biosystems ABI 3730X1 (Applied Biosystems, Фостер Сіті, Каліфорнія, США) з використанням набору Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США).

2.2. Метод імуноферментного аналізу

Імуноферментний аналіз (ІФА) проводили керуючись рекомендаціями від виробників [70, 71]. Для цього приготували: буфер для нанесення антитіл (0,08 г Na_2CO_3 , 0,147 г NaHCO_3 , доведений до 50 мл дистильованою водою; рН = 9,6), буфер відмивки (0,8 г NaCl , 0,02 г KH_2PO_4 , 0,28 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0,02 г KCl , 0,2 Tween-20, доведений до 100 мл дистильованою водою; рН = 7,3), буфер для нанесення зразків (160 мг NaCl , 4 мг KH_2PO_4 , 56 мг $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 4 мг KCl , 40 мкл Tween-20, 400 мг PVP, 40 мг сухого молока, доведений до 20 мл дистильованою водою; рН = 7,4), субстратний буфер (97 мл диетаноламіну, 0,2 г $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, доведений до потрібного об'єму; рН = 9,8). Антитіла першого порядку розводили в буфері для нанесення антитіл: 1:200 для OYDV, 1:1000 для SLV, GCLV, LYSV, GVB, і вносили у лунки по 100 мкл. Інкубували 4 год при 37 °С. Далі, відмивали буфером відмивки і внесли гомогенізований антиген (100 мкл/лунка), розведений у буфері зразку 1:10. Інкубували на ніч при 4 °С.

Потім, відмивали 3 рази буфером відмивки і нанесли антитіла другого порядку, кон'юговані з лужною фосфатазою (100 мкл/лунка), розведені 1:200

буфером для нанесення зразків і інкубували 3 години при 37 °С.

Далі, відмивали 3 рази по 5 хв буфером відмивки і 1 раз фосфатним буфером. Після цього, приготували розчин субстратного буферу з динатрієвою сіллю 4-нітрофенілфосфату (1 мг : 1 мл), який потім нанесли у лунки (100 мкл/лунка).

Як позитивний контроль використовувалися розчини антигенів; як негативний – сік здорової рослини та буфер зразка.

2.3. Метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції були використані праймери до LYSV, OYDV, SLV, GCLV та GVB (табл. 2.1.), розроблені на основі послідовностей ділянок генів капсидного білку [74а, 74б, 74в].

Таблиця 2.1.

Праймери [74а, 74б, 74в]

Вірус	Орієнтація	Послідовність від 5' до 3'	Розмір амплікону, bp
LYSV	F	ACAAGTAAGAAACAGAAGGACAGC	409
	R	GAGGTTCCATTTTCAATGCACCAC	
OYDV	F	GCGGGGGAAGGAGAAGATGCAG	730
	R	CCGCAGCTGTGTGTCTTCCG	
SLV	F	GAGCGAAAGTAGATTCAACAAAC	592
	R	CCTTATCAGACCCTCAAGTGGT	

Продовження таблиці 2.1.

GCLV	F	ATG TCA GTG AGT GAA ACA GAG G	960
------	---	-------------------------------	-----

	R	CTA GTC TGC ATT GTT GGA TCC	
GVB	F	TGACGGGCAAACAGCAGAATAA	576
	R	ATATAGCTTAGCGGGTCCTTC	

Полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) проводили за рекомендаціями виробника [75, 76]. Для проведення реакції зворотної транскрипції змішувалися 3 мкл РНК разом з праймерами і 7,5 мкл води, очищеної від РНКаз. Далі, ця суміш інкубувалася протягом 5 хв при 65 °С, після чого епендорфи різко були покладені на лід. Потім, до суміші додавалися буфер реакції (4 мкл), 10 мМ суміш дНТФ (2 мкл) і зворотна транскриптаза (1 мкл). Суміш перемішували і центрифугували при 5000 об/хв 10 с і інкубували при 42 °С 60 хв. Отримана кДНК була використана для проведення полімеразної ланцюгової реакції.

При проведенні полімеразної ланцюгової реакції додавалися: 2 мкл кДНК, по 1.25 мкл праймерів, 12,5 мкл суміші для проведення реакції з набору і 8 мкл води, очищеної від РНКаз і ДНКаз. Далі, суміш інкубували у термоциклері за схемою (табл. 2.2.) [74а, 74б, 74в].

Таблиця 2.2.

Схема температурного режиму ПЛР [74а, 74б, 74в]

Вірус	1 цикл	30 циклів			1 цикл
	3 хв	1 хв	30 с	1 хв	10 хв
LYSV	95 °С	95 °С	57 °С	72 °С	72 °С
OYDV	95 °С	95 °С	60 °С	72 °С	72 °С
GCLV	95 °С	95 °С	55 °С	72 °С	72 °С
Вірус	1 цикл	30 циклів			1 цикл

	3 хв	1 хв	30 с	1 хв	10 хв
SLV	95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C
GVB	95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C

2.4. Метод електрофорезу нуклеїнових кислот

Для електрофорезу нуклеїнових кислот використовували 1,5% агарозний гель, для приготування якого змішували 20 мл трис-боратного буфера (5,4 г Tris, 2,75 г борної к-ти, 0,375 г EDTA, 500 мл H₂O) з 0,3 г агарози. Суміш ретельно перемішували та кип'ятили в мікрохвильовій печі, після чого додавали 10 мкл бромистого етидію і залили в заздалегідь виставлену плашку з гребінкою, що формує лунки. Через 10-15 хв гель повністю полімеризується.

Далі, гель поміщають у апарат для проведення електрофорезу. У лунки вносять по 5-10 мкл ДНК, перемішану з 1 мкл буферу зразку, а в одну з лунок вносять 5 мкл маркерів. Режим електрофорезу – 20 хв при 120 В [77, 78]. Після цього, гель аналізують за допомогою ультрафіолету з використанням транслюмінатора.

2.5. Метод філогенетичного аналізу

Філогенетичний аналіз був проведений з використанням нуклеотидних послідовностей капсидного білка досліджуваних вірусів з різних країн світу з бази Genbank «NCBI Virus» (табл. 3.3.).

Таблиця 2.3.

Послідовності використані при побудові філогенетичних дерев [79]

LYSV	AB194622, HQ873750, MG242624, GQ475418, MN059494, HQ873755, KF597284, MN059549, OL944622, MZ076675, AB194627, MN070130, AY999711, MZ076678, MN070122, KR075504, MN070124, MN070132, KP258216, AY390255, ON565071, MG242625, HQ918255, GU373816, MN059449, MZ076682, KF597283, MT232838, MN059539, AB194634, MK336977, AB194638, MN059550, JN127339, AF538950, MN059545, MN059466, MT731492, AB194640, DQ925452, AB551622, KP168261, MZ203474, MZ203475, OL312049, MZ004943, MG571549
OYDV	GQ475393, MN059638, KF632715, KF632715, MN059631, MK336981, MN059628, KF862691, GQ475386, HQ873781, GQ475382, GQ475380, HQ873790, OL312048, MZ203471, DQ925455, MN059563, JN127342, AB000843, MZ203479, MW729705, KP862052, EU045558, MN059594, HM473189, AJ292224, FJ65739, ON565070, JN127343, MH161444, MT358349, KF862685, GQ475358, GQ475360, MT731494, MN059562, MT731495, MN059596, KF623541, KF623531, KF623540, AJ311370
GCLV	HQ873859, HQ873860, MN059118, MT358345, MT731496, MN059110, AF538951, OL505418, KF862692, KF862693, MN059122, MN059125, JQ899445, MN102094, JQ818257, JQ818258, JQ818255, DQ520092, KJ8013045, MH686303, MT358346, MN070135, KF010516, MN059129, MK689358
SLV	MH686306, MN059227, GU355922, MN059181, JX429966, HQ258896, MN059213, MN059214, MN059221, MF776527, AB004802, MF776513, MF776521, MN059248, JX513405, AB004565, MK331810, MK390365, JX513404, MN059180, MF776509, OK558769, MF776524, MF776510, AB004457, AB004544, MK930364, MH389248, MF776517, MN059138
GVB	MN167134, MN167135, MN059388, KX889781, MT279193, KF555653, KX889775, MN167136, MN167137, MN059367, MF363012, MT731501, LC731732, MN996259, MN059343, MZ131630, MW925710, MN059326,

<p>MN059261, JQ899444, KF632716, JX997951, MN059302, KX889755, KX889756, MT731490, MN059277, MN059317, GVU1, MN059305, JX997952, JX429970, KX889774, KX889766, MW013546, KX889770, MN059176, MN175537, MN175538, JN019813, NC_025789, LC731731, MZ131637, MN059404, OP572274, JX429969, JQ807994, MT731499, MK503771, MN059406, KX889825, MT731498, NC_001800, MN059425, KX889823, MN059402, KX889827</p>

Вирівнювання послідовностей проводилося за алгоритмом MAFFT (версія 7.520) [1]. Редагування, аналіз вирівнювання та визначення оптимальної моделі нуклеотидних замінів проводилося в програмі MEGA XI [2]. Побудова дерева проводилася методом Neighbor Joining в програмі MEGA XI [2]. Прогалини у послідовностях розглядалися як відсутні дані. Топологія дерева була перевірена за допомогою бутстреп аналізу на основі 10000 реплік. Графічне редагування дерев проводилося в програмі MEGA XI [2].

2.6. Методи статистичного опрацювання отриманих даних

Для аналізу даних використовувалися формули середнього арифметичного:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{n} (x_1 + \dots + x_n).$$

та стандартного відхилення генеральної сукупності:

$$SD_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

де σ – величина стандартного відхилення генеральної сукупності, та n – об'єм вибірки [89].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Ідентифікація збудників вірусних хвороб рослин роду *Allium* за допомогою імуноферментного аналізу

У цьому дослідженні проведено комплексну ідентифікацію та філогенетичний аналіз алексивірусів, карлавірусів і потівірусів видів *Allium*, що зустрічаються в Україні. Попереднє дослідження та відбір зразків було проведено на основі візуальної діагностики рослин часнику та цибулі. Типові симптоми жовтої мозаїки спостерігалися на відібраних зразках, що вказує на можливу вірусну інфекцію (рис 3.1-3.2).



Рис. 3.1. Симптоми жовтої мозаїки на досліджуваних зразках часнику



Рис. 3.2. Симптоми жовтої мозаїки на досліджуваних зразках цибулі.

Симптоматичні зразки далі використовувалися для проведення імуноферментного аналізу з подальшою ПЛР-ампліфікацією та секвенуванням вірус-позитивних зразків. Отримані часткові нуклеотидні послідовності білків капсиду потім використовували для філогенетичного аналізу.

Імуноферментний аналіз проводили методом DAS-ELISA на 46 зразках рослин, що належать до роду *Allium*, тестуючи на наявність *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Shallot latent virus* (SLV), *Garlic common latent virus* (GCLV) і *Garlic virus B* (GVB). З перевірених зразків 23 виявилися позитивними на LYSV, 5 на OYDV, 23 на GCLV, 15 на SLV і 11 на GVB (рис. 3.3.).

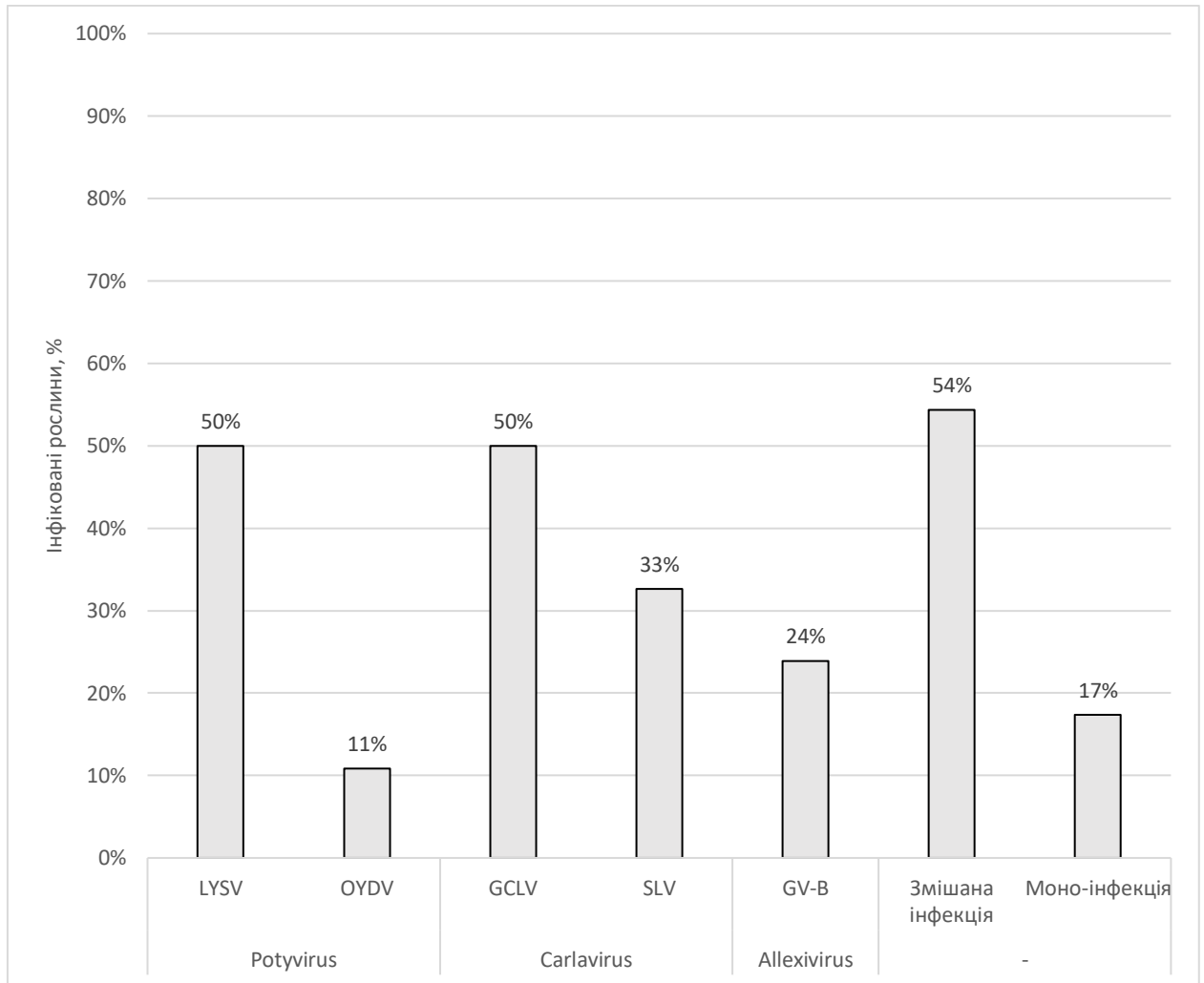


Рис. 3.3. Результати ІФА DAS-ELISA зразків з Вінницької, Київської, Черкаської, Запорізької, Полтавської областей.

Серед протестованих зразків, часник, як правило, має вищий загальний рівень зараження, інфікований вірусами LYSV, GCLV, SLV та GVB. На відміну від цього, зразки цибулі були менш інфіковані, причому OYDV був найпоширенішим вірусом (табл. 3.1.).

Таблиця 3.1.

Розподіл вірусів по видам рослин

	LYSV	OYDV	GCLV	SLV	GVB	Змішана
Часник	18	0	20	12	11	21
Цибуля	2	4	0	0	0	1
Інші	3	1	3	3	0	3

Змішані вірусні інфекції частіше зустрічалися у зразках часнику, при цьому деякі зразки були інфіковані чотирма різними вірусами. З усіх інфікованих зразків часників – 84% мали змішану інфекцію, тоді як цибулі – лише 20%. Можливою причиною такого розподілу є вегетативний спосіб розмноження сільськогосподарських сортів часнику, що призводить до накопичення вірусів, що призводить до більш серйозних втрат урожаю порівняно з моно-інфекціями.

Ці результати підкреслюють різний розподіл LYSV, OYDV, SLV, GCLV та GVB серед різних видів *Allium*, що зустрічаються в Україні. Розуміння поширеності цих вірусів у кожному виді *Allium* може допомогти розробити цілеспрямовані стратегії боротьби з хворобами та покращити загальний стан рослин *Allium*. Для розробки ефективних заходів контролю та мінімізації втрат врожаю необхідні подальші дослідження діапазону господарів, передачі та впливу цих вірусів на види *Allium*.

Хоча розмір вибірки недостатньо великий, щоб зробити остаточні висновки щодо поширення цих вірусів у більшості регіонів України, наявність цих вірусів у досліджених зразках підкреслює важливість постійного моніторингу та боротьби з вірусними хворобами на посівах луку. Необхідні подальші дослідження з більшим розміром вибірки та ширшим

географічним охопленням, щоб краще зрозуміти розподіл, поширеність та фактори впливу цих вірусів у видів *Allium* в Україні.

3.2. Ідентифікація вірусів у зразках рослин роду *Allium* методом ЗТ-ПЛР

Після імуноферментного аналізу вірусопозитивні зразки були використані для ПЛР-ампліфікації та подальшого секвенування для отримання часткових послідовностей білків капсидів LYSV, OYDV, SLV, GCLV і GVB. ПЛР-ампліфікацію проводили з використанням вірусоспецифічних праймерів, а отримані амплікони візуалізували за допомогою гель-електрофорезу (рис. 3.3.). Потім ампліфіковані фрагменти секвенували, а отримані послідовності використовували для подальшого філогенетичного аналізу.

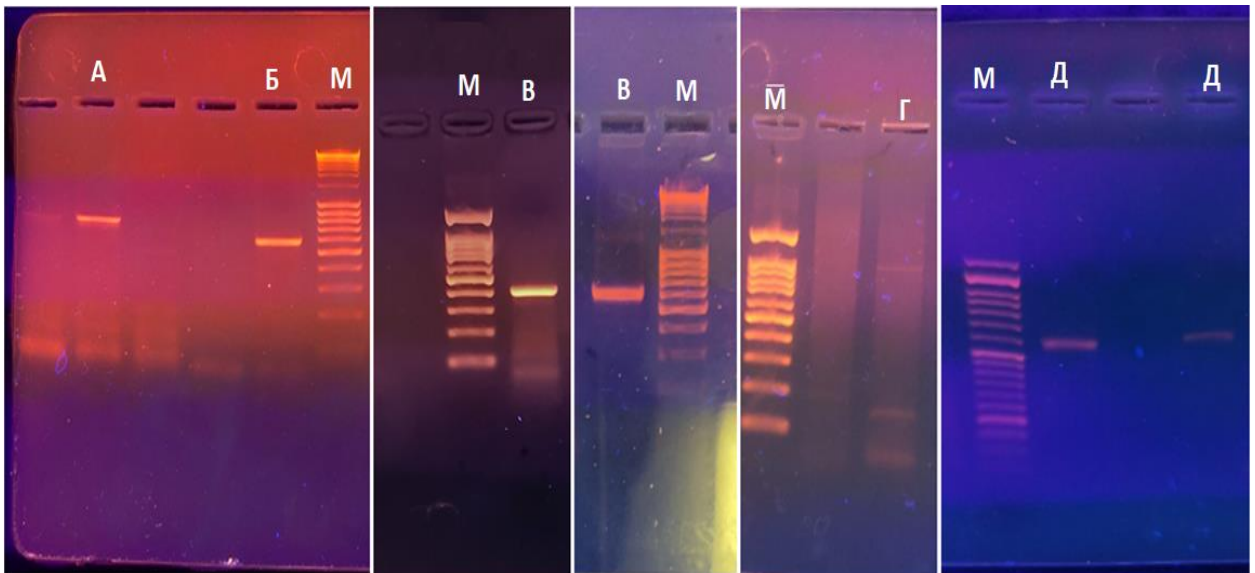


Рис. 3.3. Результати ЗТ-ПЛР дослідних зразків; А – OYDV (730 bp), Б – SLV (592bp), В – LYSV(409 bp), Г – GCLV (960bp), Д – GV-B (576 bp); маркери (М): 100 пар основ

Незважаючи на те, що для кожного вірусу було отримано лише 1-2

послідовності, вони дають цінну інформацію для розуміння генетичного різноманіття та еволюції досліджуваних вірусів видів *Allium*, що зустрічаються в Україні. Послідовності будуть передані в GenBank, що зробить їх загальнодоступними для порівняльного аналізу та сприятиме подальшим дослідженням цих вірусів.

3.3. Результати філогенетичного аналізу алексі-, карла- та потівірусів у рослин роду *Allium* в Україні

Для кращого розуміння генетичних зв'язків та еволюційної історії досліджуваних вірусів було проведено філогенетичний аналіз з використанням часткових послідовностей білка капсиду, отриманих у цьому дослідженні (табл. 3.2.), та додаткових послідовностей, отриманих із GenBank.

Таблиця 3.2.

Перелік дослідних ізолятів вірусів

Ізолят	Вірус	Рослина	Область
LYSV_B	LYSV	Часник	Вінницька
GCLV_B	GCLV	Часник	Вінницька
LYSV_112	LYSV	Часник	Полтавська
GVU1	GVB	Часник	Полтавська
OYDV_31	OYDV	Цибуля	Вінницька
OYDV_32	OYDV	Цибуля	Вінницька
SLV112	SLV	Цибуля	Вінницька

Філогенетичний аналіз був проведений з використанням послідовності сиквенованої з продукту ПЛР виділеної з часнику з Вінницької області РНК та інших послідовностей капсидного білку LYSV. Аналіз вирівняних

амінокислотних послідовностей показує велику ступінь варіабельності у N-кінцевій ділянці білка, що підтверджується літературними даними і є загальноорудовою рисою капсидного білка представників роду *Potyvirus* (рис. 4.4.) [3]. Серед ізолятів обраних для філогенетичного аналізу число ідентичності амінокислотних послідовностей варіювало від 64% до 100% ($M \pm \sigma = 77.76 \pm 7.11$), число подібності ж варіювало від 72% до 100% ($M \pm \sigma = 83.02 \pm 6.30$).

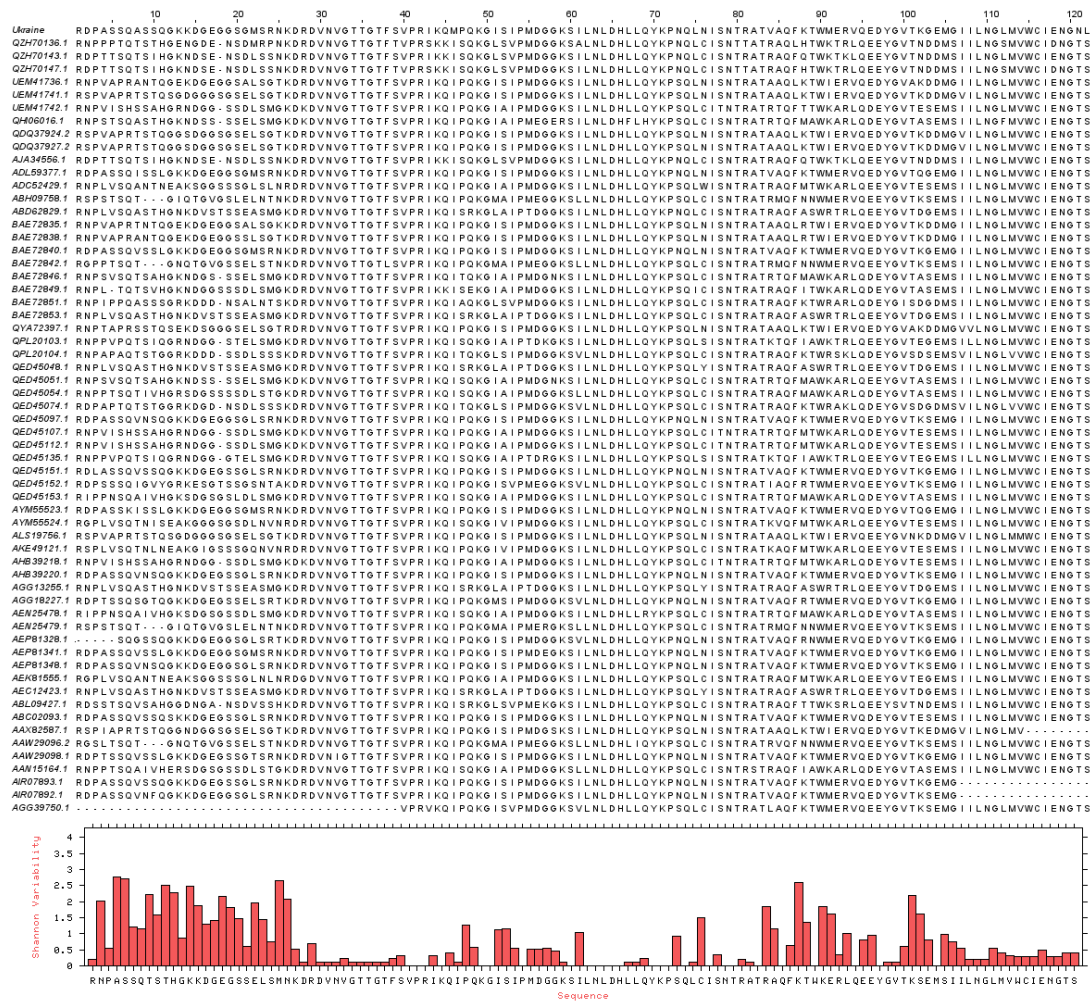


Рис. 3.4. Множинне вирівнювання та аналіз варіабельності амінокислотних послідовностей капсидного білка LYSV

При проведенні філогенетичного аналізу можна виділити 9 груп, які мають підтримку бутстрепа вище 50% (рис. 3.5.). Зокрема, група №3 складається лише з ізолятів виділених з цибулі і порею, що частково

суперечить деяким літературним даним щодо обмеженості передачі вірусів роду *Potyvirus* з одного виду рослин роду *Allium* на інший [3, 10]. Аналогічно, у другій групі, яка є філогенетично спорідненою з третьою групою і має підтримку в 82%, є один представник виділений з порею. До цієї групи входить також і цільова послідовність. Ідентичність та подібність ізолятів з другої групи варіює в межах 87-100% ($M \pm \sigma = 94.20 \pm 2.77$) та 89-100% ($M \pm \sigma = 95.53 \pm 2.37$). Також, у другій групі є ізолят виділений з порею, що вказує на можливість передачі вірусів з цієї групи також на порей.

Географічні закономірності серед різних груп простежуються дуже слабо. У кожній групі знаходиться хоча б один ізолят з Китаю, що можна пояснити його домінантною роллю у світовій торгівлі часнику і цибулі та виробництві насіння та повітряних цибулин для посіву [2, 61]. Географічно відмінною є лише група №9, яка складається лише з азіатських ізолятів і має серед господарів не тільки часник та порей, а й амаріліс та ліліум.

Отже, за результатами ІФА та ЗТ-ПЛР було встановлено склад змішаних інфекцій відібраних зразків часнику. Було виявлено, що зразки містять антигени та РНК одразу декількох вірусів родів *Potyvirus*, *Carlavirus* та *Allexivurs*. Це вказує на велику ступінь поширеності цих вірусів серед рослин часнику в Україні. Головним фактором широкої поширеності вірусів часнику є виключно вегетативне розмноження сільськогосподарських сортів часнику. Таким чином, виявлені під час роботи віруси накопичувалися поколіннями.

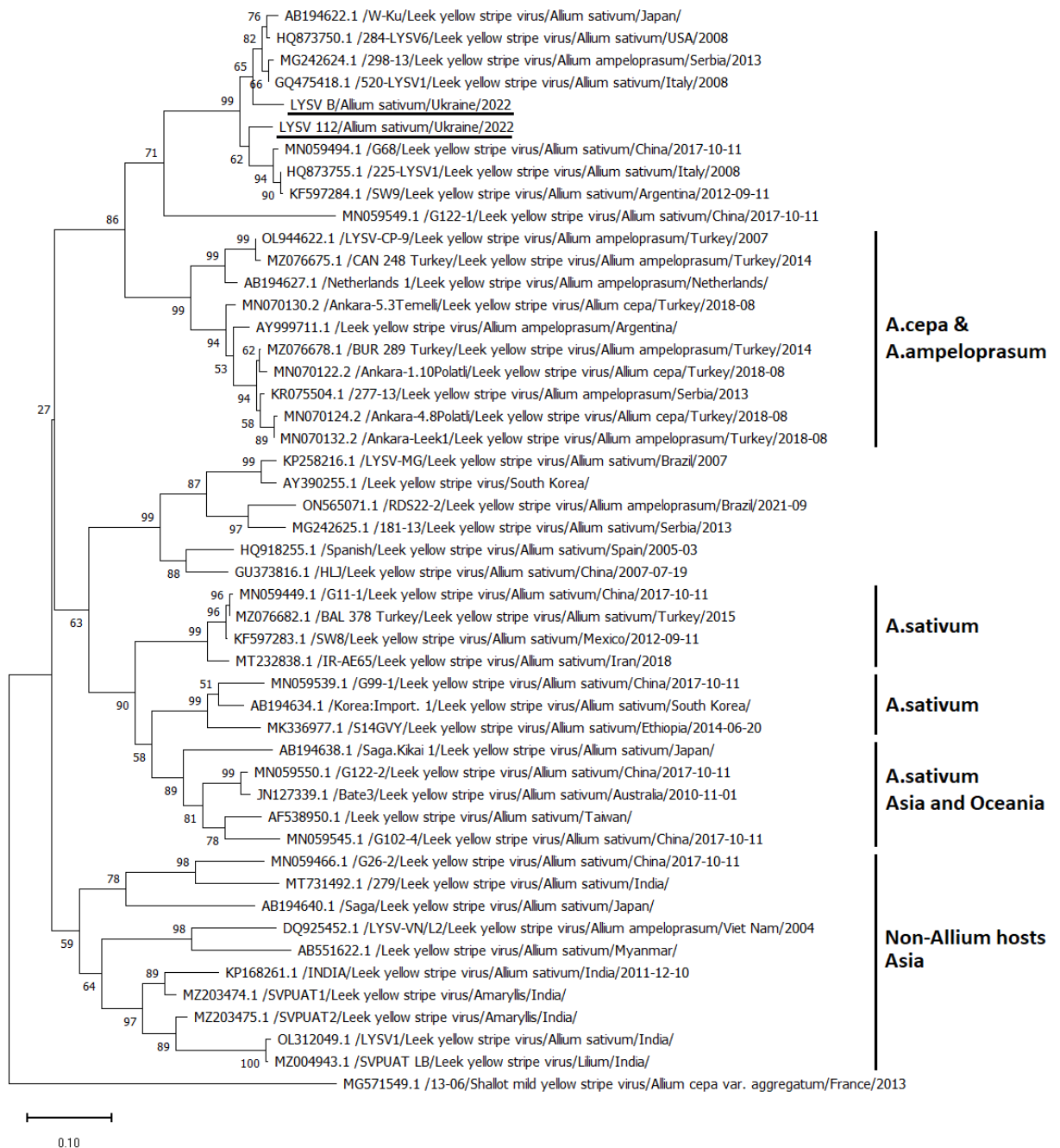


Рис. 3.5. Філогенетичний аналіз нуклеотидної послідовності гену капсидного білка LYSV, виконаний методом Neighbor joining (10000 бутстреп реплік)

Філогенетичні дослідження показує, що ізоляти з усього світу не є об'єднаними на основі їх географічного розташування. Розвиток світової

торгівлі і особливості розмноження сільськогосподарських сортів часнику призвели до широкого поширення штамів LYSV по усьому світу, внаслідок чого робити висновки щодо походження окремо взятого ізоляту є неможливим. Однак, можливо виокремити певні клади з високим ступенем підтримки, які є обмеженими певними видами рослин-господарів вірусу. Наприклад, виокремлюється група ізолятів, які були виділеними тільки з цибулі та цибулі-порей. Але, одна з обмежених часником клад містить ізолят з цибулі-порей, отже, робити висновок про виключну обмеженість штамів LYSV одним видом рослини-господаря неможливо.

Стосовно іншого вірусу, то українські ізоляти OYDV утворюють окрему кладу, що свідчить про можливу наявність українського штаму або варіанту OYDV. Українські ізоляти більш тісно пов'язані з ізолятами з *Allium sera* з Судану та Італії, ніж з іншими ізолятами з *Allium sativum* (рис. 3.6.).

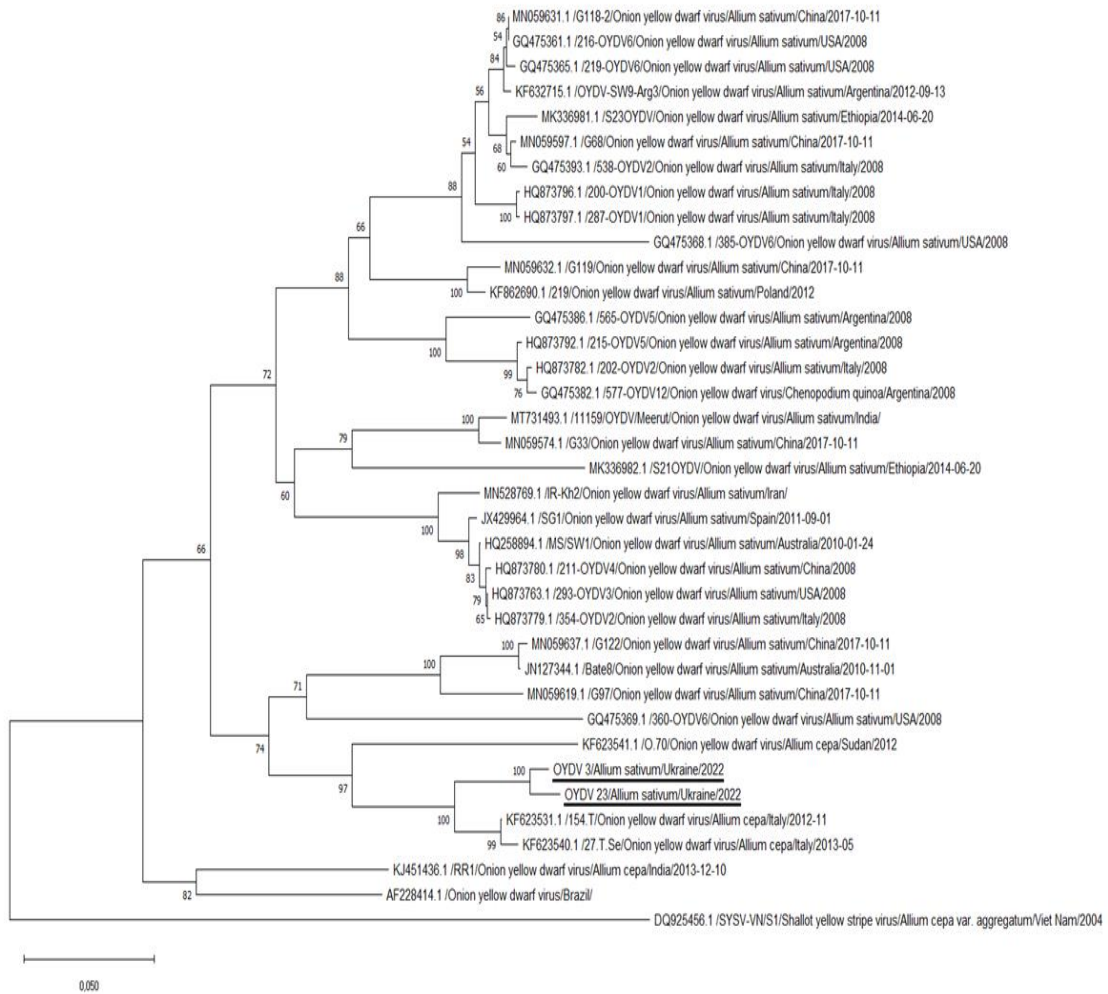


Рис. 3.6. Філогенетичний аналіз послідовності капсидного білка OYDV, виконаний методом Neighbor joining (10000 бутстреп реплік)

Вперше проведений філогенетичний аналіз Garlic virus A (рис. 3.7) та Garlic common latent virus (рис. 3.8), які були виділені на території України

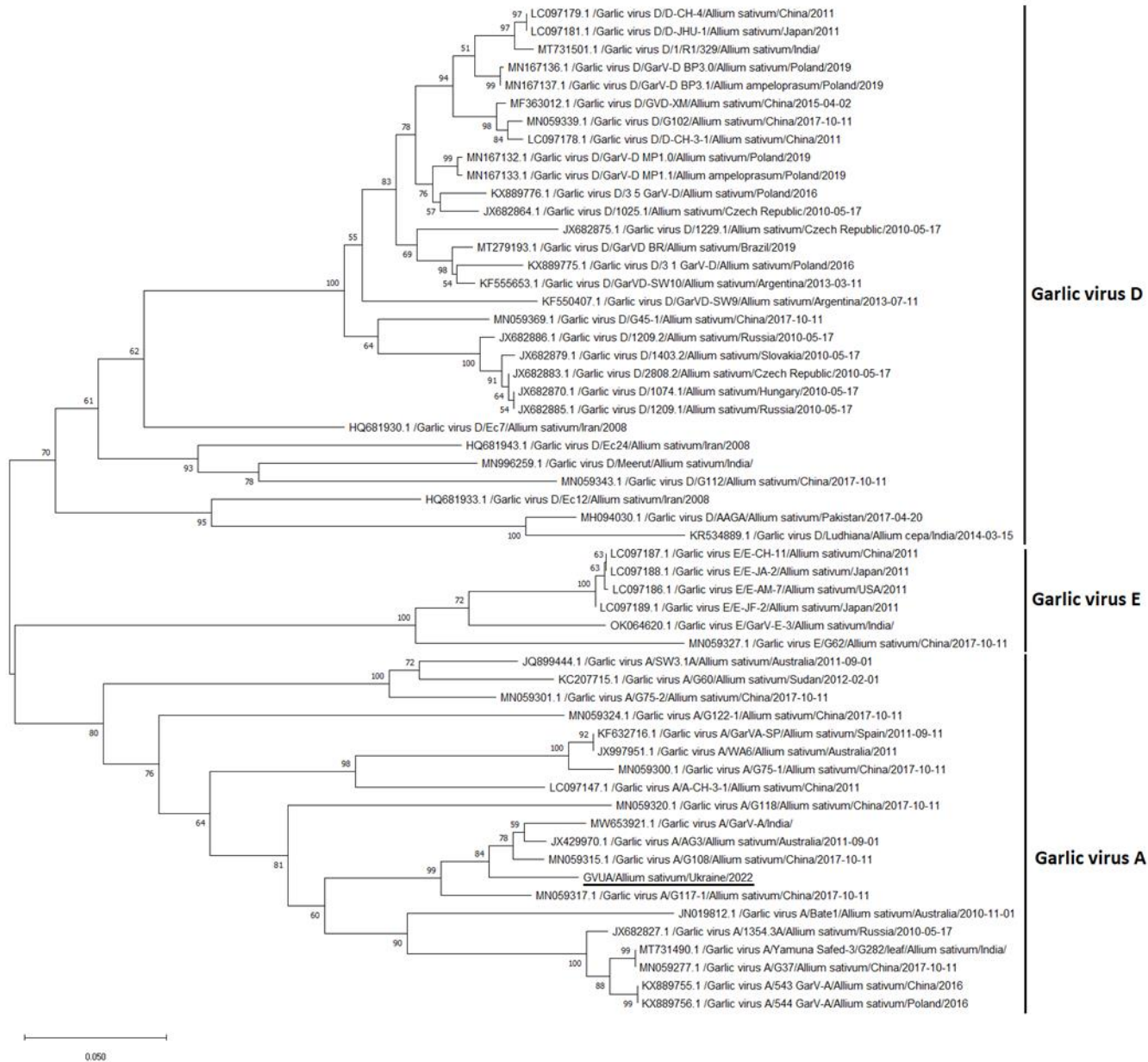


Рис. 3.7. Філогенетичний аналізу послідовності капсидного білка Garlic virus A, D та E, виконаний методом Neighbor joining (10000 бутстреп реплік)

Алексивірусні інфекції можуть мати значний вплив на врожайність і якість сільськогосподарських культур з наслідками для

сільськогосподарського виробництва та продовольчої безпеки. Вплив алексивірусних інфекцій на культури може відрізнятися залежно від конкретного вірусу, виду рослин-господарів та умов навколишнього середовища. Деякі поширені ефекти алексивірусних інфекцій на врожайність і якість врожаю включають:

Зниження врожайності: алексивірусні інфекції можуть спричинити затримку росту, уповільнення росту рослин і зниження виробництва біомаси, що призводить до зниження врожайності. Крім того, віруси можуть перешкоджати нормальному розвитку та дозріванню органів рослин, таких як листя, стебла, квіти та плоди, що ще більше сприяє зниженню врожаю.

Погана якість плодів і бульб: Алексивірусні інфекції можуть вплинути на якість плодів і бульб, викликаючи деформації, зміну кольору або некротичні ураження [33]. Ці симптоми можуть призвести до того, що продукція стане непридатною для продажу, що призведе до економічних втрат для фермерів.

Змінений поживний вміст: у деяких випадках алексивірусні інфекції можуть змінити поживний вміст заражених культур, впливаючи на рівні основних поживних речовин, таких як вітаміни, мінерали та білки. Це може вплинути на харчову цінність продукту та, у свою чергу, вплинути на здоров'я людей і тварин [34].

Підвищена сприйнятливість до вторинних інфекцій: інфіковані алексивірусом рослини можуть бути більш сприйнятливі до вторинних інфекцій іншими патогенами, такими як гриби, бактерії або інші віруси [35]. Ці вторинні інфекції можуть посилити симптоми хвороби, ще більше знижуючи врожайність і якість.

Вплив на виробництво та проростання насіння: алексівірусні інфекції можуть негативно вплинути на виробництво насіння, спричиняючи стерильність, зменшення зав'язування насіння або утворення нежиттєздатного насіння. У деяких випадках заражене насіння може мати знижену схожість, що може вплинути на формування майбутнього врожаю.

Зниження фотосинтезу та дихання: алексівірусні інфекції можуть перешкоджати основним процесам рослин, таким як фотосинтез і дихання, що призводить до зниження виробництва енергії та росту рослин. Це може призвести до погіршення врожаю та зниження врожаю.

Вплив на популяції переносників і передачу хвороб: алексівірусні інфекції можуть впливати на динаміку популяцій переносників попелиці, впливаючи на їхнє розмноження, харчову поведінку або виживання. Зміни в популяціях переносників можуть, у свою чергу, впливати на динаміку передачі вірусів і сприяти поширенню хвороби.

Щоб пом'якшити вплив алексівірусних інфекцій на врожайність і якість культур, вкрай важливо розробити та впровадити ефективні стратегії боротьби з хворобами. Ці стратегії можуть включати вирощування стійких сортів рослин, використання сертифікованого вільного від вірусів садивного матеріалу, впровадження практик інтегрованої боротьби зі шкідниками (ІРМ) для контролю популяції переносників та застосування цільових хімічних або біологічних засобів контролю.

Профілактика та боротьба з алексівірусними інфекціями мають вирішальне значення для підтримки здорових посівів і мінімізації економічних втрат у сільському господарстві. Для профілактики та боротьби з алексівірусом можна застосувати кілька підходів, зокрема:

Вирощування стійких сортів: розведення та культивування сортів рослин зі стійкістю або толерантністю до алексівірусних інфекцій може допомогти зменшити захворюваність і тяжкість захворювання. Цього можна досягти традиційними методами селекції, селекцією за допомогою маркерів або генною інженерією.

Використання сертифікованого вільного від вірусів садивного матеріалу: гарантія того, що садивний матеріал, такий як насіння, саджанці або живці, сертифікований як вільний від вірусів, може допомогти запобігти занесенню та поширенню алексівірусних інфекцій у полі.

Боротьба з переносниками: Контроль популяцій переносників попелиці має важливе значення для мінімізації поширення алексівірусних інфекцій. Стратегії інтегрованої боротьби зі шкідниками (IPM), включаючи засоби біологічного контролю (наприклад, хижі комахи, паразитоїди), сорти рослин, стійкі до комах, і розумне використання інсектицидів, можуть допомогти тримати популяції переносників під контролем.

Сівозміна та санітарія. Запровадження сівозміни та підтримання хорошої санітарії на полях може допомогти зменшити накопичення вірусного інокулята та популяції переносників. Це включає видалення та знищення зараженого рослинного матеріалу, боротьбу з бур'янами, які можуть містити вірус, і посів культур, які не є господарями, або менш сприйнятливих культур у сівозміні.

Фізичні бар'єри: встановлення фізичних бар'єрів, таких як сітка для захисту від комах або світловідбиваюча мульча, може допомогти захистити культури від переносників попелиці та зменшити ризик передачі алексівірусу.

Моніторинг і раннє виявлення: регулярний моніторинг посівів на наявність симптомів алексівірусу та використання відповідних діагностичних методів

для раннього виявлення можуть допомогти ідентифікувати заражені рослини до того, як хвороба пошириться. Раннє виявлення дозволяє швидко видалити та знищити заражені рослини, зменшуючи можливість подальшої передачі.

Час і схема посіву: коригування часу та шаблонів посіву, щоб уникнути періодів високої активності попелиці або порушити життєвий цикл переносника, може допомогти зменшити ризик передачі алексівірусу.

Біологічний контроль: використання природних ворогів переносників попелиць, таких як хижі комахи (наприклад, жуки-щирики, щитівки) або паразитичні оси, може допомогти контролювати популяції переносників і зменшити передачу алексівірусу.

Хімічний контроль: якщо необхідно, цілеспрямоване застосування інсектицидів або противірусних сполук може допомогти контролювати популяції переносників попелиць або безпосередньо пригнічувати розмноження вірусу. Однак хімічний контроль слід використовувати розумно та разом з іншими стратегіями ІРМ, щоб мінімізувати ризик розвитку резистентності.

Застосування комбінації цих підходів може допомогти запобігти та контролювати інфекції, спричинені алексівірусом, зрештою зменшивши їхній вплив на врожайність та якість сільськогосподарських культур. Комплексний і інтегрований підхід, адаптований до конкретних потреб кожної сільськогосподарської системи, є важливим для ефективної боротьби з алексівірусом та іншими вірусними захворюваннями рослин.



Рис. 3.8. Філогенетичний аналіз послідовності капсидного білка GCLV, виконаний методом Neighbor joining (10000 бутстреп реплік).

Встановлено, що українські ізоляти GCLV більш тісно пов'язані з ізолятом з *Allium* сера з Туреччини, ніж з іншими ізолятами з *Allium sativum*.

Таким чином, була досліджена низка зразків з різних областей України, що мали симптоми вірусної інфекції, і, використовуючи спектр методів, була підтверджена наявність у них небезпечних вірусів роду *Allium*, які за літературними джерелами є надзвичайно небезпечними для посівів і завдають великих збитків виробникам [3].

Підсумовуючи, рід *Carlavirus* є серйозною проблемою для сільського господарства, оскільки інфекції можуть призвести до зниження врожайності та якості. Розуміння молекулярних і біологічних особливостей алексівірусів має важливе значення для розробки ефективних стратегій профілактики, виявлення та контролю. Останні досягнення в молекулярній біології, геноміці та біотехнології надають цінні інструменти для аналізу складних взаємодій між алексівірусами, їх рослинами-господарями та переносниками попелиці.

Підходи до селекції та генної інженерії пропонують багатообіцяючі можливості для розробки сортів рослин, стійких до алексівірусів або толерантних, що може допомогти пом'якшити вплив цих інфекцій на сільське господарство. Поєднання традиційної селекції з сучасними біотехнологічними методами, такими як селекція за допомогою маркерів, редагування геному та синтетична біологія, може прискорити розвиток культур із покращеною стійкістю до алексівірусних інфекцій.

Комплексний і інтегрований підхід, адаптований до конкретних потреб кожної сільськогосподарської системи, має важливе значення для ефективної боротьби з алексівірусом та іншими вірусними хворобами рослин. Усуваючи прогалини в знаннях і використовуючи передові дослідницькі інструменти, науковці, селекціонери та зацікавлені сторони галузі можуть працювати разом над розробкою інноваційних рішень, які підвищать стійкість культур до алексівірусних інфекцій, що в кінцевому підсумку сприятиме глобальній продовольчій безпеці та сталому сільському господарству.

Підсумовуючи отримані дані, поширеність та різноманітність *Potyvirus*, *Carlavirus* та *Allexivirus* у роду *Allium* українських агроценозів свідчить про динамічний вірусний ландшафт у цих екосистемах. Виявлення як моно-, так і змішаних інфекцій висвітлює складні взаємодії між цими вірусами та їх

господарськими рослинами. Сильні філогенетичні зв'язки між українськими та світовими ізолятами вірусів відображають більшу картину еволюції та розподілу вірусів, при цьому спостерігається потенційний тренд на адаптацію до господаря. Ці перспективи підкреслюють необхідність постійного нагляду, вдосконалення молекулярних методів виявлення та подальших досліджень у динаміці вірус-господар, щоб забезпечити сталий аграрний сектор та надійне продовольство в Україні.

ВИСНОВКИ

1. В агроценозах України серед представників роду *Allium* встановлена наявність вірусів родів *Potyvirus*, *Carlavirus* та *Allexivirus*.
2. За результатами імуноферментного аналізу та ЗТ-ПЛР було ідентифіковано як моно- так і змішану інфекцію спричинену представниками родів *Potyvirus*, *Carlavirus* та *Allexivirus*. Найбільш розповсюдженими серед симптоматичних рослин виявились представники родів *Potyvirus* та *Carlavirus*.
3. За результатами філогенетичного аналізу українські ізоляти OYDV утворюють окрему кладу, що свідчить про можливу наявність українського штаму або варіанту OYDV.
4. Філогенетичний аналіз ізолятів LYSV встановив, що вони формують окрему субкладу разом з ізолятами з Китаю та Аргентини та є частиною віддаленої кледи
5. Українські ізоляти досліджуваних вірусів, виділених представників роду *Allium*, більш тісно пов'язані з ізолятами *Allium* *sepa*, ніж *Allium sativum*, що свідчить про можливу перевагу або адаптацію вірусів до колишніх видів господарів. Нарешті, генетичний аналіз українських ізолятів підкреслює потребу в точних і специфічних молекулярних інструментах для їх виявлення та характеристики.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rabinowitch, H. D. (2018). *Onions and Allied Crops: Volume II: Botany, Physiology, and Genetics*. Boca Raton: CRC press.
2. Bos, L. (1982). Viruses and virus diseases of *Allium* species. In *IV Conference on recent Advances in Vegetable Virus Research 127*, pp. 11-30.
3. Wylie, S. J., Li, H., Saqib, M., & Jones, M. G. (2014). The global trade in fresh produce and the vagility of plant viruses: a case study in garlic. *PloS one*, 9(8).
4. Cafrune, E. E., Perotto, M. C., & Conci, V. C. (2006). Effect of two Allexivirus isolates on garlic yield. *Plant disease*, 90(7), pp. 898-904.
5. Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., & Delecolle, B. (1998). Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss
6. Takaichi, M., Nagakubo, T., & Oeda, K. (2001). Mixed virus infections of garlic determined by a multivalent polyclonal antiserum and virus effects on disease symptoms. *Plant disease*, 85(1), pp. 71-75.
7. Sumi, S. I., Tsuneyoshi, T., & Furutani, H. (1993). Novel rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization. *Journal of General Virology*, 74(9), pp. 1879-1885.
8. Chen, J., & Adams, M. J. (2001). Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Archives of virology*, 146(10), pp. 1841-1853.
9. Sumi, S., Matsumi, T., & Tsuneyoshi, T. (1999). Complete nucleotide sequences of garlic viruses A and C, members of the newly ratified genus Allexivirus. *Archives of virology*, 144(9), pp. 1819-1826.
10. Tsuneyoshi, T., & Sumi, S. I. (1996). Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. *Phytopathology*, 86(3), pp. 253-259.

11. Song, S. I., Song, J. T., Chang, M. U., Lee, J. S., & Do Choi, Y. (1997). Identification of one of the major viruses infecting garlic plants, garlic virus X. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 7(6).
12. Van Dijk, P. (1993). Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99(5-6), pp. 233-257.
13. International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). Database [online] Available at: <https://talk.ictvonline.org/> [Accessed 29 May 2020].
14. Genbank (2020). Database [online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> [Accessed 29 May 2020].
15. Kanyuka, K. V., Vishnichenko, V. K., Levay, K. E., Kondrikov, D. Y., Ryabov, E. V., & Zavriev, S. K. (1992). Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. *Journal of General Virology*, 73(10), pp. 2553-2560.
16. Yamashira, K., Sakai, J., & Hanada, K. (1996). Characterization of a new virus from garlic (*Allium sativum* L.), garlic mite-borne mosaic virus. *Japanese Journal of Phytopathology*, 62(5), pp. 483-489.
17. Celli, M. G., Perotto, M. C., Buraschi, D., & Conci, V. C. (2015). Biological and molecular characterization of garlic virus D and its effects on yields of garlic. In *VII International Symposium on Edible Alliaceae 1143*, pp. 193-200.
18. Lu, Y. W., Chen, J., Zheng, H. Y., Adams, M. J., & Chen, J. P. (2008). Serological Relationships Among the Over-expressed Coat Proteins of Allexiviruses. *Journal of phytopathology*, 156(4), pp. 251-255.
19. Van Dijk, P., Verbeek, M., & Bos, I. (1991). Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species, and their classification into two new rymoviruses in the family Potyviridae. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 97(6), pp. 381-399.

20. Kang, S. G., Koo, B. J., Lee, E. T., & Chang, M. U. (2007). Allexivirus transmitted by eriophyid mites in garlic plants. *Journal of microbiology and biotechnology*, *17*(11), pp. 1833.
21. Perotto, M. C., Cafrune, E. E., & Conci, V. C. (2010). The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with Allexiviruses. *European Journal of Plant Pathology*, *126*(4), pp. 489-495.
22. Barg, E., Lesemann, D. E., Vetten, H. J., & Green, S. K. (1994). Viruses of Alliums and their distribution in different Allium crops and geographical regions. In *I International Symposium on Edible Alliaceae 433*, pp. 607-616.
23. Dąbrowska, E., Lewandowski, M., Koczkodaj, S., & Paduch-Cichal, E. (2020). Transmission of Garlic virus B, Garlic virus C, Garlic virus D and Garlic virus X by *Aceria tulipae* (Keifer) in leek. *European Journal of Plant Pathology*, pp. 1-8.
24. Vishnichenko, V. K., Konareva, T. N., & Zavriev, S. K. (1993). A new filamentous virus in shallot. *Plant pathology*, *42*(1), pp. 121-126.
25. Lunello, P., Bravo-Almonacid, F., Kobayashi, K., Helguera, M., Nome, S. F., Mentaberry, A., & Conci, V. C. (2000). Distribution of Garlic virus A in different garlic production regions of Argentina. *Journal of Plant pathology*, pp. 17-21.
26. van Dijk, P., & van der Vlugt, R. A. (1994). New mite-borne virus isolates from rakkyo, shallot and wild leek species. *European Journal of Plant Pathology*, *100*(3-4), pp. 269-277.
27. Koo, B. J., Kang, S. C., & Chang, M. U. (2002). Survey of garlic virus disease and phylogenetic characterization of garlic viruses of the genus Allexivirus isolated in Korea. *The Plant Pathology Journal*, *18*(5), pp. 237-243.
28. Bellardi, M. G., Marani, F., Betti, L., & Rabiti, A. L. (1995). Detection of garlic common latent virus (GCLV) in *Allium sativum* L. in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, *34*(1), pp. 58-61.

29. Sako, I. (1989). Occurrence of garlic latent virus in *Allium* species. *Plant Prot*, 43, pp. 389–392
30. Klukáčková, J., Navrátil, M., & Duchoslav, M. (2007). Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114(3), pp. 97-100.
31. Takaichi, M., Yamamoto, M., Nagakubo, T., & Oeda, K. (1998). Four garlic viruses identified by reverse transcription-polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan. *Plant Disease*, 82(6), pp. 694-698.
32. Pauzi, Y. S., Lestari, S. M., & Hidayat, S. H. (2018, October). Variations of garlic common latent virus and shallot latent virus concentration on shallot and garlic. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (IOP Publishing.)*, 197 (1).
33. Barg, E., Lesemann, D. E., Vetten, H. J., & Green, S. K. (1993). Identification, partial characterization, and distribution of viruses infecting *Allium* crops in South and Southeast Asia. In *International Symposium on Alliums for the Tropics 358*, pp. 251-258.
34. Wijayasekara, D., & Ali, A. (2019). First Report of Garlic Common Latent Virus Infecting Garlic in Oklahoma. *Plant Disease*, 103(5), pp. 1049-1049.
35. Wylie, S. J., Luo, H., Li, H., & Jones, M. G. (2012). Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Archives of virology*, 157(2), pp. 271-284.
36. Walkey, D. G. A., Webb, M. J. W., Bolland, C. J., & Miller, A. (1987). Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *Journal of horticultural science*, 62(2), pp. 211-220.
37. Van Dijk, P. (1993). Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99(2), pp. 1-48.

38. Graichen, K., & Leistner, H. U. (1987). Onion yellow dwarf virus causes garlic mosaic. *Archiv fuer Phytopathologie und Pflanzenschutz (German DR)*.
39. Mahmoud, S. Y., Abo-El Maaty, S. A., El-Borollosy, A. M., & Abdel-Ghaffar, M. H. (2008). Identification of Onion yellow dwarf potyvirus as one of the major viruses infecting garlic in Egypt. *International Journal of Virology*, 4(1), pp. 1-13.
40. Lunello, P., Ducasse, D. A., Helguera, M., Nome, S. F., & Conci, V. C. (2002). An Argentinean isolate of Leek yellow stripe virus from leek can be transmitted to garlic. *Journal of Plant Pathology*, pp. 11-17.
41. Matthieu, J. L., & Verhoyen, M. (1981). La striure chlorotique du poireau: epidemiologie et incidence de la maladie. *Parasitica*, 37(2), pp. 59-70.
42. Mohamed, N. A., & Young, B. R. (1980). Leek yellow stripe virus in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 23(1), pp. 129-131.
43. Chen, J., Chen, J. P., & Adams, M. J. (2002). Characterisation of some carla- and potyviruses from bulb crops in China. *Archives of Virology*, 147(2), pp. 419-428.
44. Chen, J., Adams, M. J., Zheng, H. Y., & Chen, J. P. (2003). Sequence analysis demonstrates that Onion yellow dwarf virus isolates from China contain a P3 region much larger than other potyviruses. *Archives of virology*, 148(6), pp. 1165-1173.
45. Soliman, A. M., Mahmoud, S. Y., & Dawood, R. A. (2012). Molecular characterization of Onion yellow dwarf virus (garlic isolate) with production of virus-free plantlets. *International journal of virology*, 8(1), pp. 61-70.
46. Lunello, P., Di Rienzo, J., & Conci, V. C. (2007). Yield loss in garlic caused by Leek yellow stripe virus Argentinean isolate. *Plant disease*, 91(2), pp. 153-158.
47. Bagi, F., Stojsin, V., Budakov, D., Salma, M. A. E., & Varga, J. G. (2012). Effect of onion yellow dwarf virus (OYDV) on yield components of fall garlic

- (*Allium sativum* L.) in Serbia. *African Journal of Agricultural Research*, 7(15), pp. 2386-2390.
48. El-Wahab, A. A. (2009). Aphid-transmission efficiency of two main viruses on garlic in Egypt, Onion yellow dwarf virus (OYDV-G) and Leek yellow stripe virus (LYSV-G). *J Plant Pathol*, 2(1), pp. 40-42.
 49. Pawan, K., Poonam, D., & Rakesh, M. (2011). Characterization, transmission and host range of Onion yellow dwarf virus. *Plant Disease Research*, 26(2).
 50. NODA, C., & INOUE, N. (1989). Leek yellow stripe virus isolated from an ornamental *Allium* plant in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 55(2), pp. 208-215.
 51. Ullman, D. E., Cho, J. J., Mau, R. F., Hunter, W. B., Westcot, D. M., & Custer, D. M. (1992). Thrips-tomato spotted wilt virus interactions: morphological, behavioral and cellular components influencing thrips transmission. In *Advances in disease vector research*, pp. 195-240.
 52. Stanković, I., Bulajić, A., Vučurović, A., Ristić, D., Milojević, K., Nikolić, D., & Krstić, B. (2012). First report of Tomato spotted wilt virus infecting onion and garlic in Serbia. *Plant disease*, 96(6), pp. 918-918.
 53. Kritzman, A., Lampel, M., Raccah, B., & Gera, A. (2001). Distribution and transmission of Iris yellow spot virus. *Plant Disease*, 85(8), pp. 838-842.
 54. Gawande, S. J., Khar, A., & Lawande, K. E. (2010). First report of Iris yellow spot virus on garlic in India. *Plant disease*, 94(8), pp. 1066-1066.
 55. Gent, D. H., du Toit, L. J., Fichtner, S. F., Mohan, S. K., Pappu, H. R., & Schwartz, H. F. (2006). Iris yellow spot virus: an emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease*, 90(12), pp. 1468-1480.
 56. Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C., & Marchoux, G. (2003). An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology*, pp. 227-264.

57. Whitfield, A. E., Ullman, D. E., & German, T. L. (2005). Tospovirus-thrips interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, pp. 459-489.
58. De Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., Van Poelwijk, F., Peters, D., & Goldbach, R. (1991). Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 72(9), pp. 2207-2216.
59. De Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D., & Goldbach, R. (1990). The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *Journal of General Virology*, 71(5), pp. 1001-1007.
60. Kormelink, R., De Haan, P., Meurs, C., Peters, D., & Goldbach, R. (1992). The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal of General Virology*, 73(11), pp. 2795-2804.
61. Cortês, I., Livieratos, I. C., Derks, A., Peters, D., & Kormelink, R. (1998). Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology*, 88(12), pp. 1276-1282.
62. DSMZ. DAS-ELISA [online] Available at: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/plant-viruses-and-antisera/culture-technology> [Accessed 17 May 2022].
63. Wang, L., & Stegemann, J. P. (2010). Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*, 31(7), 1612-1618.
64. Thomson, D., & Dietzgen, R. G. (1995). Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *Journal of Virological Methods*, 54(2-3), 85-95.
65. Parrano, L., Afunian, M., Pagliaccia, D., Douhan, G., & Vidalakis, G. (2012). Characterization of viruses associated with garlic plants propagated from different reproductive tissues from Italy and other geographic regions. *Phytopathologia Mediterranea*, 549-565.

66. Thermo Scientific (2013). Product Information Thermo Scientific RevertAid RT Kit. [online] Available at: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012955_RevertAid_RT_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUmV2ZXJ0QWlkIFJUIEtPdCA1MDAgcnhucw== [Accessed 29 May 2020].
67. Thermo Scientific (2016). Product Information Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix (2X). [online] Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012704_DreamTaq_Green_PCR_MasterMix_K1081_UG.pdf [Accessed 29 May 2020].
68. Thermo Scientific (2012). Protocol for Non-denaturing Agarose Gel Electrophoresis. [online] Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012739_Nondenaturing_Agarose_Gel_Electrophoresis_UG.pdf [Accessed 29 May 2020].
69. Thermo Scientific (2012) General Recommendations for DNA Electrophoresis. [online] Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012614_Gen_Recommend_DNA_Electrophoresis_UG.pdf [Accessed 29 May 2020].
70. Bao, B. J. A. A. D. (2015). Y. Blinkova O. NCBI viral Genomes resource. *Nucleic Acids Res*, 43, D571-D577.
71. Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., & Gascuel, O. (2019). NGPhylogeny. fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic acids research*, 47(W1), W260-W265.

72. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
73. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.
74. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
75. Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., ... & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*.
76. Rech P. (2022). SIAS: Sequence identities and similarities. 2008. Available at: <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html> [Accessed 25 May 2022]
77. Garcia-Boronat, M., Diez-Rivero, C. M., Reinherz, E. L., & Reche, P. A. (2008). PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic acids research*, 36(suppl_2), W35-W41.
78. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32(1), 268-274.
79. Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research*, 49(W1), W293-W296.
80. Лакин, Г. Ф. (1990). Биометрия. Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: