

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол No \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2024 р.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕКСІВІРУСІВ НА РОСЛИНАХ РОДУ ALLIUM В  
УКРАЇНІ**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю Біологія

Превора Дмитра Олеговича

Науковий керівник від кафедри

д.б.н., доцент Шевченко Т.П.

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

Оцінка захисту роботи

**Київ – 2024 р.**

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	3
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Загальна характеристика вірусів роду <i>allexivirus</i> .....	5
1.1. Систематика та молекулярні особливості роду <i>allexivirus</i> .....	5
1.2. Біологічні особливості <i>allexivirus</i> .....	10
1.3. Теоретичні основи пов'язані з родом <i>allexivirus</i> .....	16
1.4. Вплив на здоров'я рослин та сільське господарство .....	21
1.5. Стратегії виявлення та діагностики алексивірусів: .....	23
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Методи дослідження .....	29
2.1. Імуноферментний аналіз (іфа) .....	29
2.2. Електрофорез в агарозному гелі .....	30
2.3. Метод виділення рнк .....	32
2.4. Зворотня транскрипція з полімер. Реакцією (зт-плр) .....	32
2.5. Метод візуальної діагностики .....	34
2.6. Методи статистичної обробки даних .....	35
<b>РОЗДІЛ 3.</b> Результати досліджень та обговорення .....	36
3.1. Візуальний аналіз вірусоподібних симптомів на рослинах роду <i>allium</i> .....	36
3.2. Ідентифікації вірусів за допомогою іфа .....	38
3.3. Аналіз дослідних зразків молекулярними методами на наявність представників роду <i>allexivirus</i> .....	40
3.4. Філогенетичний аналіз гену капсидного білка <i>garlic virus b</i> .....	41
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	44
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	45

## ВСТУП

Віруси роду *Allexivirus* є одними з ключових патогенів, які вражають рослини роду *Allium*, до яких належать такі важливі сільськогосподарські культури, як цибуля, часник, порей та інші. Інфекції, спричинені цими вірусами, призводять до значного зниження врожайності та якості продукції, що негативно впливає на економічну стабільність аграрного сектору та продовольчу безпеку. В Україні, де вирощування цих культур має давні традиції та важливе значення для місцевих фермерів, проблема ідентифікації та контролю *Allexivirus* є надзвичайно актуальною.

Метою даного дослідження є ідентифікація представників роду *Allexivirus* на рослинах роду *Allium* в Україні серологічними та молекулярними методами

Наукова новизна дослідження полягає у систематичному підході до вивчення вірусів роду *Allexivirus*, застосуванні сучасних молекулярно-біологічних методів для їх ідентифікації, а також аналізу генетичної різноманітності вірусів, що циркулюють на території України. Комплексне дослідження включає також оцінку впливу вірусних інфекцій на різні сорти рослин роду *Allium*, що дозволить розробити рекомендації щодо вибору стійких до вірусів сортів та оптимальних агротехнічних заходів.

Практичне значення роботи полягає у створенні науково обґрунтованої бази для розробки програм фітосанітарного моніторингу та управління вірусними захворюваннями, що сприятиме підвищенню ефективності виробництва та якості продукції рослин роду *Allium* в Україні. Реалізація запропонованих у дослідженні методів і стратегій дозволить аграріям своєчасно виявляти та контролювати поширення *Allexivirus*, що в кінцевому підсумку сприятиме стабільному розвитку сільського господарства.

Таким чином, проведене дослідження спрямоване на вирішення однієї з актуальних проблем сучасного рослинництва та забезпечення сталого розвитку

аграрного сектору України.

## РОЗДІЛ 1

### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ РОДУ ALLEXIVIRUS

#### 1.1. Систематика та молекулярні особливості роду *Allexivirus*

Рід *Allexivirus* — це група одноланцюгових вірусів позитивної РНК, які належать до родини *Alphaflexiviridae*. Віруси цієї родини характеризуються своїми гнучкими ниткоподібними віріонами, які зазвичай мають довжину 470-800 нм і діаметр 12-13 нм (рис. 1.1.) [1]. Родина *Alphaflexiviridae* є однією з п'яти сімейств, які складають порядок *Tymovirales*, який включає віруси з подібною організацією геному, стратегіями реплікації та взаємодією з хазяїном [2].

Рід *Allexivirus* вирізняється своєю унікальною геномною організацією, збереженими нуклеотидними послідовностями та діапазоном господарів. Аллексивіруси мають моночастинний 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 аллексивірусу відіграють важливу роль у реплікації вірусу, трансляції та стабільності [3].

В 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)

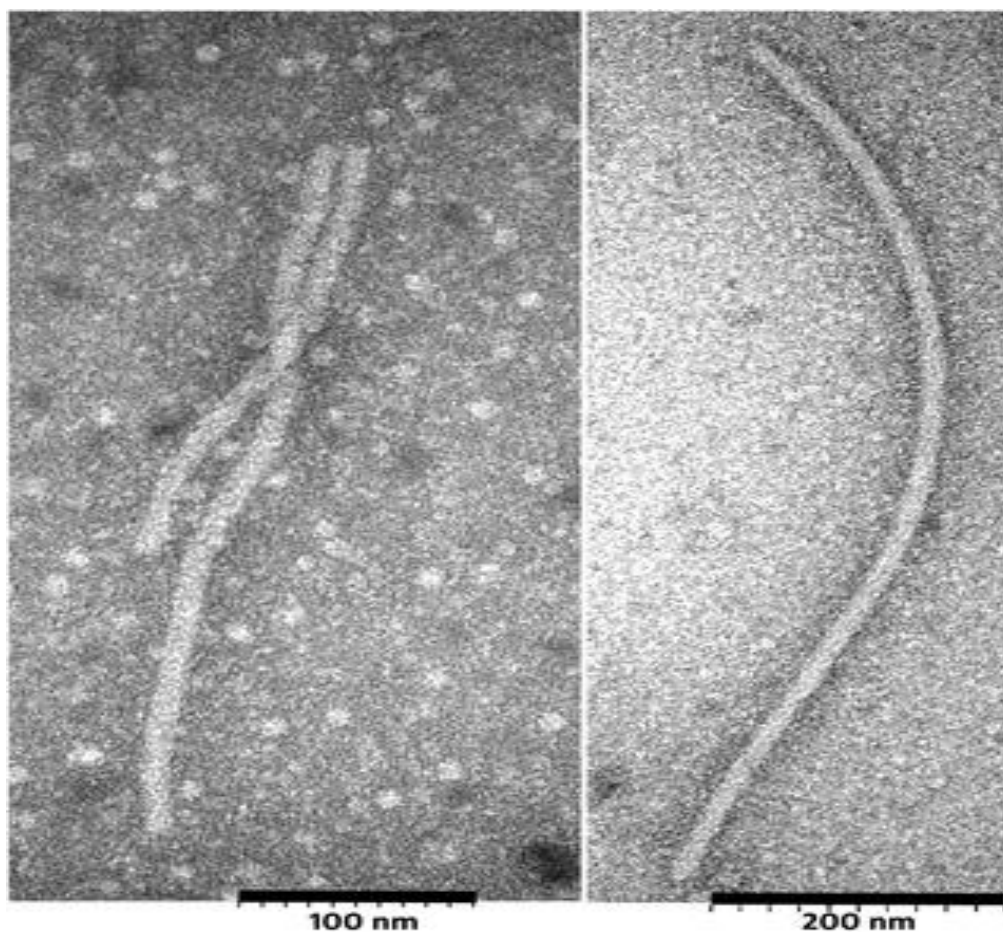
Вірус часнику E (GarV-E)

Вірус часнику X (GarV-X)

Вірус шалот X (ShV-X)

Вірус люцерни S

Вірус арахісу пінтої



**Рис. 1.1.** Вірусні частки

У той час як більшість алексивірусів 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.

У той час як більшість алексивірусів в основному інфікують такі види *Allium*, як часник, цибуля та шалот, але деякі види були ідентифіковані і в інших родинях рослин. Класифікація та таксономія роду *Allexivirus* постійно розвиваються, оскільки відкриваються нові види вірусів, а прогрес у молекулярних методах дозволяє точніше характеризувати ці віруси.

Аллексивіруси, як і інші члени сімейства *Alphaflexiviridae*, демонструють чіткі молекулярні особливості, які є вирішальними для їх реплікації, руху та патогенності в рослинах-господарях. Ключові молекулярні особливості роду *Allexivirus* наступні:

Організація геному: алексивіруси мають одноланцюговий одноланцюговий геном позитивної РНК довжиною від 8,3 до 9,0 кілобаз (кб). Їхні геноми містять п'ять-шість відкритих рамок зчитування (ORF), які кодують вірусні білки з різними функціями. 5'- і 3'-нетрансльовані ділянки (UTR) геному відіграють істотну роль у реплікації, трансляції та стабільності вірусу.

Генна структура та функції: ORF у геномі алексивірусу 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.

Білки потрійного блоку генів (TGB): ORF 2, 3 і 4 кодують три білки TGB (TGB1, TGB2 і TGB3), 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].

Білок оболонки (CP): ORF5 кодує білок оболонки, який відповідає за інкапсуляцію вірусної РНК у віріони. CP відіграє важливу роль у стабільності вірусу, передачі векторами та уникненні імунної відповіді господаря.

Додатковий білок: у деяких видах алексивірусу може бути присутнім

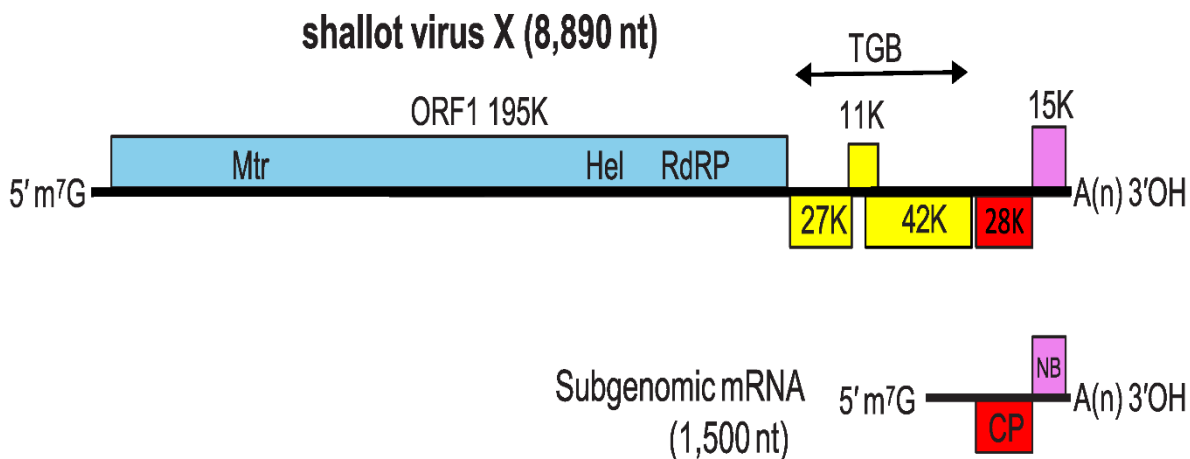
додатковий ORF (ORF6), який кодує білок із ще невідомою функцією.

Механізми реплікації: Алексівіруси реплікуються в 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.

Геномна організація алексівірусів характеризується одноланцюговим одноланцюговим геномом позитивної РНК довжиною від 8,3 до 9,0 кб (рис. 1.2.). Лінійний РНК-геном алексівірусів зазвичай кодує п'ять-шість відкритих рамок зчитування (ORF), фланкованих 5'- і 3'-нетрансльованими ділянками (UTR).

5' UTR містить структуру кепки, яка має вирішальне значення для ініціації трансляції, тоді як 3' UTR містить полі(A) хвіст, який сприяє стабільності РНК і ефективності трансляції.

Відкриті рамки зчитування (ORF): геном алексівірусу містить п'ять-шість ORF, які кодують вірусні білки, що беруть участь у реплікації, переміщенні та інкапсуляції. ORF1: кодує великий поліпротеїн, пов'язаний з реплікацією, з кількома функціональними доменами, включаючи РНК-залежну РНК-полімеразу (RdRp), геліказу та метилтрансферазу. Ці домени відіграють важливу роль у реплікації вірусу, транскрипції та блокуванні РНК. Білки потрійного блоку генів утворюють рибонуклеопротеїнові комплекси та взаємодіють з факторами хазяїна, щоб забезпечити транспорт вірусу через плазмодесми та судинну систему рослини. CP відіграє життєво важливу роль у стабільності вірусу, передачі векторами та ухиленні від імунної відповіді господаря.



**Рис.1.2.** Організація геному та стратегія трансляції на прикладі X-вірусу шалоту

Алексівіруси розмножуються в цитоплазмі рослини-господаря, використовуючи клітинний механізм господаря для синтезу нових вірусних РНК-геномів і білків. Механізми реплікації алексівірусів слідує загальній моделі, яка є загальною для вірусів позитивної РНК. Ключові етапи процесу реплікації:

Трансляція асоційованого з реплікацією поліпротеїну:

Після проникнення в клітину-хазяїна геном позитивної РНК алексівірусу служить шаблоном для трансляції. Рибосоми господаря транлюють ORF1, який кодує великий поліпротеїн, пов'язаний з реплікацією, що містить кілька функціональних доменів, таких як РНК-залежна РНК-полімераза (RdRp), геліказа та метилтрансфераза.

Переробка поліпротеїну:

Поліпротеїн, пов'язаний з реплікацією, розщеплюється протеазами вірусу або господаря на окремі функціональні домени. Цей етап обробки вивільняє домени RdRp, гелікази та метилтрансферази, необхідні для реплікації вірусу та блокування РНК.

Синтез негативно-сміслової РНК:

Домен RdRp зв'язується з 3'-кінцем вірусного геному та синтезує

комплементарний ланцюг негативно-сміслової РНК. Ця негативно-сміслова РНК служить шаблоном для виробництва нових позитивно-сміслових вірусних геномів РНК. Домен гелікази допомагає в цьому процесі, розкручуючи проміжні дволанцюгові РНК.

Синтез геномів позитивної РНК:

Використовуючи негативно-сміслову РНК як матрицю, RdRp синтезує нові позитивно-сміслові вірусні геноми РНК. Ці нещодавно синтезовані геноми можуть бути використані для трансляції для отримання більшої кількості вірусних білків або інкапсульовані білком оболонки для утворення нових віріонів.

Блокування РНК:

5'-кінець вірусної РНК закритий доменом метилтрансферази, який додає структуру кепки, необхідну для стабільності РНК та ефективної трансляції рибосомами господаря.

Інкапсуляція та складання віріону:

Білок оболонки, кодований ORF5, інкапсулює геноми позитивної РНК, утворюючи нові віріони. Ці віріони потім транспортуються в рослину-хазяїна або вивільняються для передачі новим рослинам-господарям векторами.

## 1.2. Біологічні особливості Alexivirus

Alexiviruses демонструють різноманітний діапазон хазяїв із різним ступенем специфічності між різними видами в межах роду. У той час як більшість алексівірусів в основному інфікують такі види *Allium*, як часник, цибуля та цибуля-шалот, деякі види були виявлені в інших сімействах рослин, демонструючи здатність цих вірусів інфікувати більш широкий спектр видів рослин [7]. Основні господарі: відомо, що більшість видів Alexivirus інфікують

види *Allium*, включаючи часник (*Allium sativum*), цибулю (*Allium cepa*) і шалот (*Allium ascalonicum*) [8]. Ці віруси можуть викликати різні симптоми у рослин *Allium*, такі як жовті смуги, мозаїчні візерунки та затримка росту, що призводить до значних втрат урожаю [9].

Специфічність хазяїна: діапазон хазяїв окремих видів алексівірусів різний, при цьому деякі віруси демонструють високий ступінь специфічності хазяїна, тоді як інші можуть інфікувати ширший спектр видів рослин. Фактори, що визначають специфічність господаря в алексівірусах, ще не повністю вивчені, але можуть включати взаємодію між вірусними білками та специфічними факторами господаря, а також здатність вірусу уникати імунної відповіді господаря.

Передача вектором: на спектр хазяїв і специфічність алексівірусів також можуть впливати їхні вектори передачі. Аллексівіруси зазвичай передаються декількома видами кліщів непостійним способом [10]. Харчова поведінка, уподобання господаря та розподіл цих кліщів можуть впливати на поширення алексівірусів та їхню здатність інфікувати різні види рослин [11].

Алексівіруси переважно передаються кліщами (рис 1.3.), які відіграють вирішальну роль у їх поширенні серед рослин-господарів. Взаємодія між алексівірусами та їх переносниками кліщами має значний вплив на епідеміологію, екологію та лікування захворювань, спричинених цими вірусами. Ключові аспекти передачі алексівірусу та взаємодії векторів включають:

Переносники: Ефективність передачі може бути різною для різних видів кліщів залежно від їх харчової поведінки, уподобань господаря та динаміки популяції.

Непостійна передача: алексівіруси передаються кліщами непостійним способом, тобто вірус не розмножується всередині переносника, а процес передачі є відносно короткочасним [12]. Під час непостійної передачі вірусні частинки прикріплюються до стилету ротового апарату кліща та переносяться на

нову рослину-хазяїна, коли кліщ досліджує або харчується тканиною флоєми рослини [13].



**Рис.1.3.** Переносники вірусів роду *Allexivirus* – еріофіїдові кліщі

Придбання та інокуляція: кліщ отримує вірус, коли харчується зараженою рослиною, збираючи частинки вірусу на своєму стилеті. Вірус може бути заражений новою рослиною-господарем, коли кліщ досліджує або харчується флоємою здорової рослини [14]. Через непостійний характер передачі кліщ може втратити здатність передавати вірус через короткий проміжок часу, зазвичай протягом годин.

Діапазон господарів і специфічність вектора: діапазон господарів і специфічність алексивірусів можуть залежати від їх переносників. Харчова поведінка, уподобання господаря та розподіл цих кліщів можуть впливати на поширення алексивірусів та їхню здатність інфікувати різні види рослин. Крім того, деякі алексивіруси, можливо, розвинули адаптації для посилення їх передачі конкретними видами кліщів, що ще більше формує діапазон їхніх

господарів та епідеміологію [15].

Взаємодія вірус-вектор: молекулярні механізми, що лежать в основі взаємодії алексівірусу та кліщів, ще не повністю вивчені. Однак вважається, що специфічні вірусні білки, такі як білок оболонки, можуть взаємодіяти з білками кліщів, щоб полегшити прикріплення та передачу вірусу.

Зараження алексівірусами може призвести до ряду симптомів захворювання рослин-господарів, особливо у видів *Allium*, таких як часник, цибуля та шалот. Тяжкість симптомів може змінюватися залежно від конкретного вірусу, виду хазяїна та умов навколишнього середовища. Розуміння симптомів захворювання та патогенезу алексівірусних інфекцій має важливе значення для діагностики та лікування цих захворювань у сільськогосподарських умовах. Симптоми захворювання:

Мозаїка та жовті смуги: на заражених рослинах можуть з'явитися мозаїчні візерунки на листі, які характеризуються нерегулярними жовтими, зеленими або білими плямами. Жовті смуги, іноді супроводжувані хлоротичними плямами, також можуть з'являтися на листках заражених рослин.

Уповільнений ріст: алексівірусні інфекції можуть призвести до уповільненого росту, що призводить до зменшення висоти рослини, розміру листя та загальної біомаси. У важких випадках це може істотно вплинути на врожайність [16].

Скручування та деформація листя: у заражених рослин може спостерігатися скручування або деформація листя, коли листя скручується або спотворюється за формою. Це може вплинути на здатність рослини ефективно фотосинтезувати та може сприяти зниженню врожаю [17].

Некроз: у деяких випадках алексівірусні інфекції можуть спричинити некроз, що призводить до загибелі тканин рослини, особливо листя та стебла. Некротичні ураження можуть проявлятися у вигляді коричневих або чорних плям на уражених тканинах [18].

Патогенез:

Проникнення та реплікація вірусу: алексівіруси проникають у рослину-господаря через рани або природні отвори, наприклад продихи. Потрапляючи всередину рослини, вірус розмножується в цитоплазмі клітини-хазяїна, використовуючи клітинний механізм хазяїна для виробництва нових геномів і білків вірусної РНК.

Переміщення від клітини до клітини: білки потрійного генного блоку (TGB), кодовані ORF2, ORF3 і ORF4, полегшують переміщення вірусу від клітини до клітини в рослині-хазяїні. Ці білки утворюють рибонуклеопроїєнові комплекси з вірусною РНК і взаємодіють з факторами хазяїна, щоб забезпечити транспорт через плазмодесми, мікроскопічні канали, які з'єднують сусідні рослинні клітини.

Системний рух: алексівіруси також системно переміщуються всередині рослини-господаря, подорожуючи через флоему, щоб досягти віддалених тканин і органів [19]. Білки TGB відіграють вирішальну роль у цьому переміщенні на великі відстані, сприяючи транспорту вірусної РНК у судинній системі рослини.

Розвиток симптомів: молекулярні механізми, що лежать в основі розвитку симптомів при алексівірусних інфекціях, ще не повністю вивчені. Однак вважається, що взаємодія між вірусними білками та факторами хазяїна, а також порушення клітинних процесів шляхом вірусної реплікації сприяють вираженню симптомів. Крім того, імунна відповідь рослини-господаря на вірус також може відігравати роль у розвитку симптомів.

Порівняння з іншими спорідненими вірусами:

Алексівіруси є частиною родини *Alphaflexiviridae*, яка складається з кількох родів вірусів позитивної одноланцюгової РНК, які інфікують рослини. Інші споріднені роди в сімействі *Alphaflexiviridae* включають *Potexvirus*, *Mandarivirus* і *Capillovirus*, серед інших. Порівняння між алексівірусами та спорідненими вірусами можна зробити на основі кількох факторів, таких як

організація геному, функції генів, передача та діапазон господарів.

Організація геному:

Алексівірус: геном алексівірусів зазвичай кодує п'ять-шість відкритих рамок зчитування (ORF), включаючи поліпротеїн, пов'язаний з реплікацією, білки блоку потрійних генів (TGB1, TGB2 і TGB3) для переміщення між клітинами та білок оболонки (CP).

Потексвірус: як і алексівіруси, потексвіруси також кодують поліпротеїн, асоційований з реплікацією, білки блоку потрійних генів і білок оболонки [20]. Однак потексвіруси зазвичай мають додаткову ORF, яка кодує супресор глушіння РНК [21].

Mandarivirus і Capillovirus: ці роди мають простішу організацію геному порівняно з алексівірусами, з меншою кількістю ORF. Зазвичай вони кодують поліпротеїн, асоційований з реплікацією, і білок оболонки, але їм не вистачає білків потрійного генного блоку.

Алексівірус, потексвірус, мандарівірус і капіловірус кодує асоційований з реплікацією поліпротеїн, що містить домени, такі як РНК-залежна РНК-полімераза (RdRp), геліказа та метилтрансфераза, які необхідні для реплікації вірусу.

Алексівірус і потексвірус мають потрійні генні блоки білків, які полегшують пересування від клітини до клітини та пересування на великі відстані в рослині-хазяїні [22]. Навпаки, у мандарівірусу та капіловірусу відсутні ці білки, і вони можуть використовувати різні механізми для пересування в рослині-хазяїні.

Спосіб передавання:

Алексівірус: алексівіруси в основному передаються кліщами непостійним способом.

Потексвірус: Потексвіруси також можуть передаватися попелицями непостійним способом, а також механічними засобами або шляхом вегетативного

розмноження.

Мандарівірус. Мандарівіруси передаються білокрилками напівстійким способом, який відрізняється від непстійної передачі, яка спостерігається в алексівірусів і потексвірусів [23].

Капіловірус: Капіловіруси переважно передаються шляхом вегетативного розмноження та живцювання, а також механічними способами. Відомо, що вони не передаються комахами-переносниками [24].

Діапазон хостів:

Алексівірус: Алексівіруси переважно інфікують такі види *Allium*, як часник, цибуля та шалот, хоча деякі види були виявлені в інших родинах рослин.

Потексвірус: Потексвіруси мають широкий діапазон господарів, інфікуючи різні види рослин, у тому числі економічно важливі культури, такі як картопля, помідори та перець [25].

Мандарівірус: Мандарівіруси мають вужче коло господарів, головним чином заражаючи цитрусові [26]. Капіловірус: Капіловіруси інфікують обмежену кількість рослин-господарів, включаючи яблуні, груші та виноградну лозу [27].

Підводячи підсумок, хоча алексівіруси мають деякі спільні риси з іншими спорідненими вірусами в сімействі *Alphaflexiviridae*, такі як організація геному та функції генів, існують також чіткі відмінності в механізмах передачі та діапазоні господарів, які відрізняють їх. Розуміння цих подібностей і відмінностей може допомогти в дослідженні біології, екології та боротьби з цими вірусами в сільськогосподарських умовах.

### **1.3. Теоретичні основи пов'язані з родом *Allexivirus***

Застосування теорій і методів молекулярної біології до дослідження алексівірусів може значно покращити наше розуміння вірусу та сформувати

інформацію для розробки ефективних стратегій пом'якшення його впливу на сільське господарство. Деякі ключові підходи молекулярної біології, які можна застосувати до дослідження алексівірусу, включають:

Секвенування геному та аналіз: використання технологій секвенування наступного покоління для визначення повних послідовностей геному різноманітних ізолятів алексівірусу може дати розуміння їхнього генетичного різноманіття, еволюційних зв'язків і молекулярних детермінант специфічності хазяїна, патогенезу та передачі. Інструменти біоінформатики можна використовувати для аналізу отриманих послідовностей і ідентифікації функціональних доменів, консервативних мотивів і передбачуваних регуляторних елементів у вірусних геномах.

Зворотна генетика: Розробка систем зворотної генетики, таких як інфекційні клони кДНК або вірусні реплікони, може полегшити вивчення реплікації алексівірусу, експресії генів і функцій білка. Вводячи цільові мутації або делеції в конкретні вірусні гени, дослідники можуть оцінити їхній вплив на придатність вірусу, діапазон господарів і розвиток симптомів.

Дослідження взаємодії білок-білок: такі методи, як дріжджові двогібридні системи, ко-імунопреципітація та аналізи з витягуванням, можна використовувати для дослідження взаємодії між білками алексівірусу та факторами хазяїна або між самими вірусними білками. Ці дослідження можуть виявити молекулярні механізми, що лежать в основі реплікації вірусу, пересування та розвитку симптомів, а також відповіді господаря на інфекцію.

Приглушення РНК і противірусний захист: Дослідження ролі шляхів приглушення РНК у противірусному захисті рослин-господарів від алексівірусної інфекції може дати цінну інформацію про молекулярні механізми стійкості господаря [28]. Такі методи, як секвенування малих РНК, індуковане вірусом мовчання генів (VIGS) і опосередковане CRISPR/Cas9 нокаут генів господаря, залучених до глушіння РНК, можуть допомогти з'ясувати важливість

цих шляхів для обмеження реплікації та поширення вірусу [29].

Транскриптоміка та протеоміка: високопродуктивне секвенування РНК (RNA-seq) і протеоміка на основі мас-спектрометрії можуть бути використані для аналізу глобальних змін у експресії генів хазяїна та кількості білка під час алексівірусної інфекції. Ці підходи можуть допомогти ідентифікувати гени господаря та шляхи, які модулюються під час інфекції, проливаючи світло на молекулярну основу розвитку симптомів і відповіді господаря на вірус.

Функціональна геноміка. Застосування інструментів функціональної геноміки, таких як CRISPR/Cas9-опосередковане редагування генів або VIGS, можна використовувати для дослідження ролі конкретних генів-господарів у сприйнятливості або стійкості до алексівірусу [30]. Створюючи нокаутні або нокдаун-мутанти генів-кандидатів-господарів, дослідники можуть оцінити їхній вплив на реплікацію вірусу, рух і розвиток симптомів.

Структурна біологія: визначення тривимірних структур протеїнів алексівірусу за допомогою рентгенівської кристалографії або кріоелектронної мікроскопії може дати розуміння їх функцій і взаємодії з факторами хазяїна або іншими вірусними білками [31]. Структурна інформація може керувати дизайном противірусних сполук або розробкою стратегій для порушення критичних білок-білкових взаємодій.

Відомості про взаємодії рослин і вірусів і специфічність хазяїна:

Вхід, опосередкований рецепторами: Віруси рослин часто покладаються на специфічні рецептори хазяїна, щоб проникнути в клітини рослин. Ці рецептори можуть бути білками, вуглеводами або іншими клітинними компонентами, які розпізнають і зв'язуються з вірусними частинками або білками. Специфічність господаря може визначатися наявністю або відсутністю сумісних рецепторів у різних видів рослин.

Експлуатація факторів хазяїна: щоб успішно реплікуватися та поширюватися в хазяїні, рослинним вірусам необхідно захопити клітинний

механізм господаря та уникнути його імунної системи. Віруси можуть взаємодіяти з факторами господаря, які сприяють реплікації вірусу, такими як РНК-залежні РНК-полімерази, гелікази або фактори трансляції [32]. На специфічність господаря може впливати сумісність вірусних білків із цими факторами господаря.

Імунна відповідь господаря: рослини мають вроджену імунну систему, яка розпізнає вірусні інфекції та реагує на них. Рецептори розпізнавання образів (PRR) можуть виявляти консервативні ознаки вірусу, відомі як патоген-асоційовані молекулярні шаблони (PAMP), запускаючи захисні реакції. Крім того, рослини використовують шляхи глушіння РНК як основний механізм противірусного захисту. На специфічність хазяїна може впливати ефективність імунної відповіді рослини проти певного вірусу, а також здатність вірусу пригнічувати або уникати цих захисних механізмів.

Переміщення вірусу всередині хазяїна: рослинним вірусам необхідно переміщатися від клітини до клітини та системно всередині рослини-хазяїна, щоб запровадити успішну інфекцію. Цей рух часто залежить від вірусних білків, які взаємодіють з компонентами господаря, такими як плазмодесми або флоема. На специфічність хазяїна може впливати сумісність білків руху вірусу з транспортними системами хазяїна.

Розвиток симптомів і патогенез: молекулярні механізми, що лежать в основі розвитку симптомів в інфікованих рослинах, часто включають складні взаємодії між вірусними білками та факторами господаря. Віруси можуть порушувати клітинні процеси, що призводить до таких симптомів, як хлороз, некроз або затримка росту. На специфічність хазяїна може впливати сприйнятливість клітинних процесів рослини до руйнування вірусними білками або здатність хазяїна викликати цілеспрямовану імунну відповідь.

Спільна еволюція господарів і вірусів: рослини-господарі та віруси постійно беруть участь в еволюційній гонці озброєнь, коли господарі розвивають нові

захисні механізми, а віруси — контрстратегії. Специфічність хазяїна може бути сформована коеволюційною динамікою між вірусом і його хазяїном, що може призвести до адаптації до певного виду хазяїна або появи нових вірусних штамів.

Теоретичні погляди на еволюцію та адаптацію вірусів:

Еволюція та адаптація вірусів є ключовими аспектами біології вірусів, які сприяють їх здатності виникати, відновлюватися та зберігатися в популяціях хазяїв. Кілька теоретичних поглядів допомагають пояснити процеси та рушійні сили еволюції та адаптації вірусу, зокрема:

Мутації та генетичні варіації: Віруси, особливо РНК-віруси, такі як *Allexivirus*, мають високу частоту мутацій через відсутність механізмів корекції в їхніх РНК-залежних РНК-полімеразах. Ці мутації породжують генетичні варіації у вірусних популяціях, які служать сировиною для еволюції та адаптації. Деякі мутації можуть надавати селективну перевагу вірусу, наприклад посилення реплікації, передачі або ухилення від захисних механізмів господаря.

Генетична рекомбінація: деякі віруси можуть піддаватися генетичній рекомбінації, коли різні вірусні штами обмінюються генетичним матеріалом під час спільного зараження клітини-господаря. Рекомбінація може призвести до нових комбінацій генетичних ознак і сприяти появі нових вірусних штамів з відмінними властивостями, такими як зміна діапазону хазяїв або підвищена вірулентність.

Природний відбір: Віруси піддаються природному відбору, який впливає на генетичні варіації, породжені мутаціями та рекомбінаціями. Корисні мутації, які підвищують придатність вірусу (наприклад, реплікація, передача або ухилення від імунітету), швидше за все, передадуться майбутнім поколінням, стимулюючи адаптацію вірусних популяцій до середовища їхнього господаря.

Генетичний дрейф: на вірусні популяції також впливають випадкові зміни частот алелів через генетичний дрейф, особливо в невеликих популяціях або під час передачі вузьких місць. Генетичний дрейф може призвести до втрати або

фіксації генетичної варіації, впливаючи на еволюцію та адаптацію вірусу способами, незалежними від природного відбору.

Спільна еволюція хоста та вірусу: Віруси та їхні господарі беруть участь у безперервній коеволюційній гонці озброєнь, коли хости розробляють нові захисні механізми, а віруси — контрстратегії. Ця динамічна взаємодія стимулює еволюцію як хазяїна, так і вірусної популяції та може призвести до появи нових вірусних штамів або адаптації вірусів до певного виду хазяїна.

Популяційна динаміка та епідеміологія: популяційна динаміка та епідеміологія вірусів у їхніх популяціях-господарях також впливають на їх еволюцію та адаптацію. Такі фактори, як швидкість передачі, розмір і структура популяції господаря, а також поширеність супутніх інфекцій, можуть впливати на еволюційні процеси вірусу та ймовірність успішної адаптації.

Фактори навколишнього середовища: Зовнішні фактори, такі як температура, вологість та екологічні взаємодії (наприклад, з переносниками чи іншими мікробами), можуть впливати на еволюцію та адаптацію вірусів, впливаючи на їх розмноження, передачу та виживання в навколишньому середовищі.

#### **1.4. Вплив на здоров'я рослин та сільське господарство**

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: алексивірусні 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: алексивірусні 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: алексивірусні інфекції

можуть впливати на динаміку популяцій переносників, 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.

### **1.5. Стратегії виявлення та діагностики алексівірусів:**

Точне та своєчасне виявлення та діагностика алексівірусних інфекцій мають важливе значення для ефективного лікування та профілактики захворювань у сільському господарстві. Для виявлення та діагностики алексівірусу можна застосувати кілька стратегій і методів, зокрема:

Візуальний огляд і оцінка симптомів. Початковий етап виявлення алексівірусу включає візуальний огляд рослин на наявність симптомів, що вказують на інфекцію, наприклад хлороз листя, мозаїчні візерунки, некроз, затримку росту або аномальний розвиток плодів. Однак цей метод не завжди надійний, оскільки симптоми можуть бути схожими на симптоми, спричинені іншими збудниками або факторами навколишнього середовища.

Серологічні аналізи: Серологічні аналізи ґрунтуються на виявленні вірусних білків за допомогою специфічних антитіл. Імуноферментний аналіз (ІФА) та тести з імуно-смужками зазвичай використовуються серологічними методами виявлення алексівірусу. Ці тести є відносно швидкими, економічно ефективними та можуть використовуватися для широкомасштабного скринінгу рослинного матеріалу.

Молекулярні методи: Молекулярні методи, такі як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) і ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), використовуються для ампліфікації та виявлення специфічних послідовностей нуклеїнових кислот вірусу. Ці методи є високочутливими та специфічними, що дозволяє точно

ідентифікувати алексівірусні інфекції. Кількісну ПЛР у режимі реального часу (qPCR) також можна використовувати для кількісного визначення вірусних нуклеїнових кислот, надаючи розуміння вірусного навантаження та тяжкості захворювання.

Ізотермічна ампліфікація, опосередкована петлею (LAMP): LAMP — це швидка та чутлива молекулярна техніка, яка ампліфікує специфічні послідовності нуклеїнових кислот вірусу в ізотермічних умовах. Аналіз LAMP можна проводити за допомогою простого обладнання та адаптувати для використання в польових умовах, що робить їх придатними для виявлення алексівірусу на місці.

Секвенування наступного покоління (NGS): технології NGS можна використовувати для секвенування повних геномів ізолятів алексівірусу або для аналізу профілів невеликих РНК інфікованих рослин. Ці підходи можуть надати цінну інформацію про генетичне різноманіття вірусів, взаємодію хазяїн-вірус і молекулярні механізми, що лежать в основі симптомів захворювання.

Гібридизація *in situ*: методи гібридизації *in situ*, такі як флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) або хромогенна гібридизація *in situ* (CISH), можна використовувати для візуалізації присутності та розподілу нуклеїнових кислот алексівірусу в тканинах рослин. Цей метод може надати уявлення про локалізацію та переміщення вірусу в інфікованих рослинах.

Електронна мікроскопія. Трансмсійну електронну мікроскопію (TEM) можна використовувати для візуалізації вірусних частинок у рослинних тканинах або для спостереження за ультраструктурними змінами, пов'язаними з алексівірусною інфекцією. Хоча цей метод зазвичай не використовується для звичайного виявлення, він може надати цінну інформацію про морфологію вірусу та взаємодію хазяїн-патоген.

Вибір стратегії виявлення та діагностики Alexivirus залежить від кількох факторів, включаючи наявність ресурсів, рівень досвіду та конкретні вимоги

сценарію тестування (наприклад, широкомасштабний скринінг проти підтверджувального тестування). Поєднання кількох методів виявлення може підвищити точність і надійність діагностики алексівірусу та допомогти розробити цілеспрямовані стратегії лікування захворювання.

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 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 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 кліща або порушити життєвий цикл переносника, може допомогти зменшити ризик передачі алексівірусу.

Біологічний контроль: використання природних ворогів переносників кліщів, 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 кліщів або безпосередньо пригнічувати розмноження вірусу. Однак хімічний контроль слід використовувати розумно та разом з іншими стратегіями ІРМ, щоб мінімізувати ризик розвитку резистентності.

Обізнаність та освіта громадськості: підвищення обізнаності про алексівірусні інфекції, їхній вплив на сільське господарство та важливість заходів профілактики та контролю може сприяти застосуванню найкращих практик фермерами, зацікавленими сторонами галузі та політиками.

Потенційне застосування в селекції рослин та генній інженерії:

Селекція рослин і генна інженерія пропонують багатообіцяючі шляхи для розвитку сільськогосподарських культур, стійких або толерантних до алексівірусних інфекцій, зрештою покращуючи врожайність і якість

сільськогосподарських культур. Потенційні застосування в селекції рослин і генній інженерії включають:

Традиційна селекція: програми селекції можуть бути зосереджені на виявленні та відборі сортів рослин із природною стійкістю або толерантністю до алексівірусних інфекцій. Схрещування цих сортів з високоврожайними або іншими бажаними сортами може допомогти розробити нові лінії рослин із покращеною стійкістю до вірусу, зберігаючи при цьому інші агрономічно важливі ознаки.

Селекція за допомогою маркерів (MAS): Молекулярні маркери, пов'язані з генами стійкості до алексівірусу, можна використовувати для прискорення процесу розведення. MAS дозволяє селекціонерам перевіряти великі популяції рослин на наявність цих генів стійкості, скорочуючи час і ресурси, необхідні для розробки стійких сортів.

Трансгенні підходи: Генну інженерію можна використовувати для розробки трансгенних рослин, які експресують гени стійкості до вірусів або гени, які перешкоджають реплікації або руху вірусу. Приклади включають експресію генів вірусного білка оболонки (CP), що може індукувати явище, відоме як резистентність, отримана від патогенів, або експресію конструкцій РНК-інтерференції (RNAi), які спрямовані на важливі вірусні гени.

Редагування геному: передові методи редагування геному, такі як CRISPR/Cas9, можна використовувати для введення цільових модифікацій у геномах рослин для підвищення стійкості до алексівірусних інфекцій. Це може включати точну модифікацію ендогенних генів рослин, залучених до вірусної стійкості, або введення нових генів стійкості з інших видів рослин або навіть нерослинних джерел.

Інженерна стійкість до переносників кліщів: Генну інженерію також можна використовувати для створення рослин, стійких до переносників, відповідальних за передачу алексівірусу. Це може включати експресію генів, які виробляють

інсектицидні білки (наприклад, Bt-токсини), або маніпуляцію генами рослин, які беруть участь у привабленні кліщів, харчуванні чи розмноженні.

Індукована резистентність: рослини можна сконструювати для експресії генів, які активують або посилюють їхні природні захисні реакції проти алексівірусних інфекцій. Це може включати надмірну експресію генів, які беруть участь у виробництві захисних сполук, або активацію шляхів глушіння РНК, спрямованих на вірусні геноми.

Синтетична біологія: підходи синтетичної біології можна використовувати для проектування та створення власних генетичних ланцюгів, які надають рослинам стійкість до алексівірусу. Це може включати розробку складних регуляторних мереж, які координують численні захисні механізми, такі як експресія противірусних білків або активація шляхів глушіння РНК.

## РОЗДІЛ 2

### МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Імуноферментний аналіз (ІФА)

Імуноферментний аналіз у модифікації DAS-ELISA є вирішальним методом для ідентифікації вірусів роду *Allexivirus* у таких рослинах *Allium*, як цибуля, часникв. Процес починається з покриття пластини для мікротитрації специфічними антитілами для захоплення, які зв'язуються з вірусом. Потім готують зразки рослин шляхом подрібнення рослинної тканини в екстракційному буфері для вивільнення вірусних частинок. Приготований рослинний екстракт додається в покриті антитілами лунки, дозволяючи вірусу зв'язуватися з антитілами. Після інкубаційного періоду лунки промивають для видалення будь-якого незв'язаного матеріалу. Далі в лунки додають вторинне антитіло, специфічне до вірусу, кон'юговане з таким ферментом, як пероксидаза хрому. Це вторинне антитіло зв'язується із захопленим вірусом, утворюючи структуру, подібну до сендвіча. Лунки знову промивають для видалення надлишку вторинних антитіл. Потім у лунки додають субстрат для ферменту. Фермент реагує з субстратом, викликаючи зміну кольору. Інтенсивність забарвлення вимірюється спектрофотометром і прямо пропорційна кількості вірусу в зразку. Цей метод є високочутливим і специфічним, що робить його ідеальним для широкомасштабного скринінгу та раннього виявлення вірусних інфекцій у посівах луку, що є життєво важливим для ефективного контролю хвороб і захисту посівів в Україні.

## 2.2. Електрофорез в агарозному гелі

Електрофорез у агарозному гелі - це метод, який використовується для розділення і аналізу макромолекул, таких як ДНК, РНК і білки, на основі їхньої рухливості в електричному полі.

Процес починається з приготування гелю з агарози, який заливають у форму і дають застигнути. Потім у спеціальні лунки на одному кінці гелю наносять зразки макромолекул. Після цього гель поміщають у буферний розчин, який проводить електричний струм, і підключають до джерела електричного поля. Коли до системи прикладається напруга, молекули у зразках починають рухатися через гель: негативно заряджені молекули (наприклад, ДНК) рухаються до позитивного електрода (анода), тоді як позитивно заряджені молекули рухаються до негативного електрода (катода).

Швидкість руху молекул через гель визначається їхнім розміром і зарядом. Менші молекули рухаються швидше і проходять далі через гель, тоді як більші молекули рухаються повільніше і залишаються ближче до стартової точки. Завдяки цьому розділення, молекули з різними фізико-хімічними властивостями утворюють окремі смуги у гелі.

Після завершення електрофорезу, гель фарбують специфічними барвниками, які дозволяють візуалізувати розділені молекули. Для ДНК часто використовують бромистий ітидій або інші флуоресцентні барвники, які зв'язуються з нуклеїновими кислотами і світяться під ультрафіолетовим світлом. Це дозволяє визначити розмір фрагментів ДНК шляхом порівняння їх з маркерами - зразками з відомими розмірами, які одночасно запускалися в гель.

Приготування агарозного гелю:

Зважили 0.3 г порошку агарози для приготування гелю.

Розчинили агарозу в 20 мл буфера 1X TBE шляхом нагрівання в мікрохвильовій печі до повного розплавлення.

Дали розчину охолонути приблизно до 60°C.

Додавали 5 мкл бромістого ітидію до охолодженого розчину для візуалізації ДНК.

Розчин агарози налили в лоток для лиття гелю за допомогою гребінця, щоб сформувати лунки.

Дали гелю застигнути при кімнатній температурі приблизно 30 хвилин.

Налаштування апарату для електрофорезу:

Помістили затверділий агарозний гель у резервуар для електрофорезу.

Заповнили резервуар буфером TBE до повного занурення гелю.

Підготовка зразків ДНК:

Змішали 10 мкл кожного зразка ДНК з 2 мкл барвника.

Обережно завантажили змішані зразки в лунки агарозного гелю за допомогою мікропіпетки.

Завантажили 5 мкл драбини ДНК (маркера) в одну лунку, щоб служити еталонним розміром.

Запуск гелю:

Підключили резервуар для електрофорезу до джерела живлення.

Встановили напругу 200 вольт і запустили електрофорез протягом 20 хвилин.

Контролював просування фронту барвника, щоб переконатися, що він переміщувався на відповідну відстань.

Візуалізація смуг ДНК:

Вимкнули живлення і вийняли гель з резервуара.

Помістили гель на УФ-трансліюмінатор.

Візуалізація та фотографування смуг ДНК під УФ-світлом, щоб задокументувати результати.

### 2.3. Метод виділення РНК

Метод виділення РНК за допомогою хімічних агентів є важливою процедурою у біологічних дослідженнях, оскільки дозволяє отримати чисту РНК з клітин або тканин для подальших експериментів. Одним із найпоширеніших хімічних агентів, що використовуються для виділення РНК, є тризол.

Принцип дії тризолу полягає в тому, що він руйнує клітинні мембрани та білкові структури, залишаючи РНК у розчині. Спочатку зразки клітин або тканин обробляються тризолом, який розриває клітинні мембрани та розщеплює білки. Після цього додається хлороформ, який утворює двофазну систему з розчином тризолу. Під час цього етапу РНК переходить у верхню фазу, відокремлюючись від білкових та ДНК компонентів.

Після цього розчин збирають і додають алкоголь, зазвичай етанол або ізопропанол, для осадження РНК. Отриману осаджену РНК можна промивати етанолом для видалення залишкового солі, а потім розчиняти в денатуранті, такому як дистильована вода або розчин RNase-free.

Цей метод дозволяє ефективно і швидко отримувати високоякісну РНК з різних джерел, що відіграє важливу роль у біохімічних та молекулярно-біологічних дослідженнях, таких як реверс-транскрипція, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), секвенування РНК та аналіз експресії генів.

### 2.4. Зворотня транскрипція з полімер. реакцією (ЗТ-ПЛР)

Метод зворотної транскрипції з подальшою полімеразною ланцюговою реакцією (ЗТ-ПЛР, англ. RT-PCR) є важливим інструментом у молекулярній біології, що дозволяє аналізувати експресію генів через виявлення та кількісне визначення мРНК. Цей метод поєднує два основні етапи: зворотню транскрипцію

(ЗТ) та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

Збираючи біологічні зразки, такі як клітини, тканини або біологічні рідини, що містять РНК, далі РНК виділяється із зразків за допомогою методів, таких як фенол-хлороформна екстракція або використання комерційних наборів для виділення РНК.

На цьому етапі виділену РНК використовують як шаблон для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) за допомогою ферменту зворотної транскриптази.

Отриману кДНК використовують як шаблон для ампліфікації специфічних послідовностей ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Ці кроки повторюються у кількох циклах, що призводить до експоненціальної ампліфікації цільової ДНК-послідовності.

ЗТ-ПЛР широко використовується в біології та медицині для дослідження експресії генів, діагностики інфекційних захворювань, вивчення генетичних мутацій та визначення біомаркерів.

Екстракція РНК:

Загальну РНК виділяли із зібраних зразків рослин за допомогою відповідного набору для екстракції РНК або методу для забезпечення цілісності та чистоти РНК.

Зворотна транскрипція:

Зворотну транскрипцію (ЗТ) проводили для перетворення РНК у комплементарну ДНК (кДНК) з використанням ферменту зворотної транскриптази та праймерів, специфічних для цікавої вірусної РНК.

Налаштування ПЛР:

Готували реакційну суміш ПЛР, яка містила:

шаблон кДНК

Праймери, специфічні для цільових генів алексивірусу

dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфати)

Буферний розчин

фермент ДНК-полімераза

Негативні контролю (без шаблону) і позитивні контролю (відомі зразки, заражені алексівірусом) були включені в налаштування ПЛР.

ПЛР-ампліфікація:

ПЛР-ампліфікацію проводили в термоциклері з умовами циклу, оптимізованими для виявлення алексівірусу.

Денатурація: реакційну суміш нагрівали для денатурації ДНК при високій температурі ( $\sim 95^{\circ}\text{C}$ ) для розділення ланцюгів ДНК.

Відпал: температуру було знижено, щоб праймери могли специфічно зв'язуватися з комплементарними послідовностями на вірусній ДНК ( $\sim 50\text{-}65^{\circ}\text{C}$ ).

Подовження: температуру підвищили для ДНК-полімерази, щоб подовжити нові ланцюги ДНК з праймерів ( $\sim 72^{\circ}\text{C}$ ).

## 2.5. Метод візуальної діагностики

Основними симптомами, які можна виявити під час візуальної діагностики, є жовтування листя, яке проявляється у вигляді мозаїчних плям або рівномірного жовтування, деформація листя, яка включає скручування, зміну форми або ненормальні вигини, затримка росту, коли заражені рослини часто відстають у розвитку та мають менший розмір у порівнянні зі здоровими, а також плямистість та смуги, які проявляються у вигляді некротичних плям або смуг на листях.

Етапи проведення діагностики починаються з регулярного візуального огляду рослин на наявність зазначених симптомів, визначення ділянок поля з аномальними рослинами для більш детального дослідження. Наступним етапом є документування, яке включає фотографування рослин з підозрілими симптомами для подальшого аналізу та документування випадків. Порівняння з контрольними зразками дозволяє встановити здорові зразки для порівняння із

зараженими рослинами, що використовується для підтвердження підозри на вірусну інфекцію.

Метод візуальної діагностики є важливим першим кроком у виявленні вірусів роду *Allexivirus* на рослинах роду *Allium*. Хоча він має свої обмеження, комбінація візуального огляду з додатковими лабораторними методами дозволяє забезпечити точне і своєчасне ідентифікування вірусних інфекцій, що є ключовим для захисту врожаю і запобігання поширенню вірусів.

## 2.6. Методи статистичної обробки 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  $\sigma$  – величина стандартного відхилення генеральної сукупності, та  $n$  – об'єм вибірки.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Візуальний аналіз вірусоподібних симптомів на рослинах роду *Allium*

Метою візуального аналізу було ідентифікувати типові симптоми, які викликаються вірусними інфекціями. Ці симптоми є першими ознаками, які можуть вказувати на наявність вірусу. Зокрема, у нашому дослідженні візуальний аналіз дозволив виявити характерні симптоми вірусної мозаїки, що стало підставою для подальшого більш детального серологічного та молекулярного аналізу.

На рисунку 3.1. видно рослини з типовими симптомами мозаїки: нерівномірні світлі та темні смуги на листках. Листя має чітко виражені мозаїчні візерунки, що є типовим проявом інфекції вірусами роду *Allexivirus*.



**Рис.3.1.** Симптоми вірусної мозаїки на *Allium* сера

На рисунку 3.2. зображено більш виражені симптоми: жовтіння листя, що свідчить про сильне ураження. Жовті смуги чергуються з зеленими, утворюючи мозаїчний малюнок, а також спостерігається деформація листя.

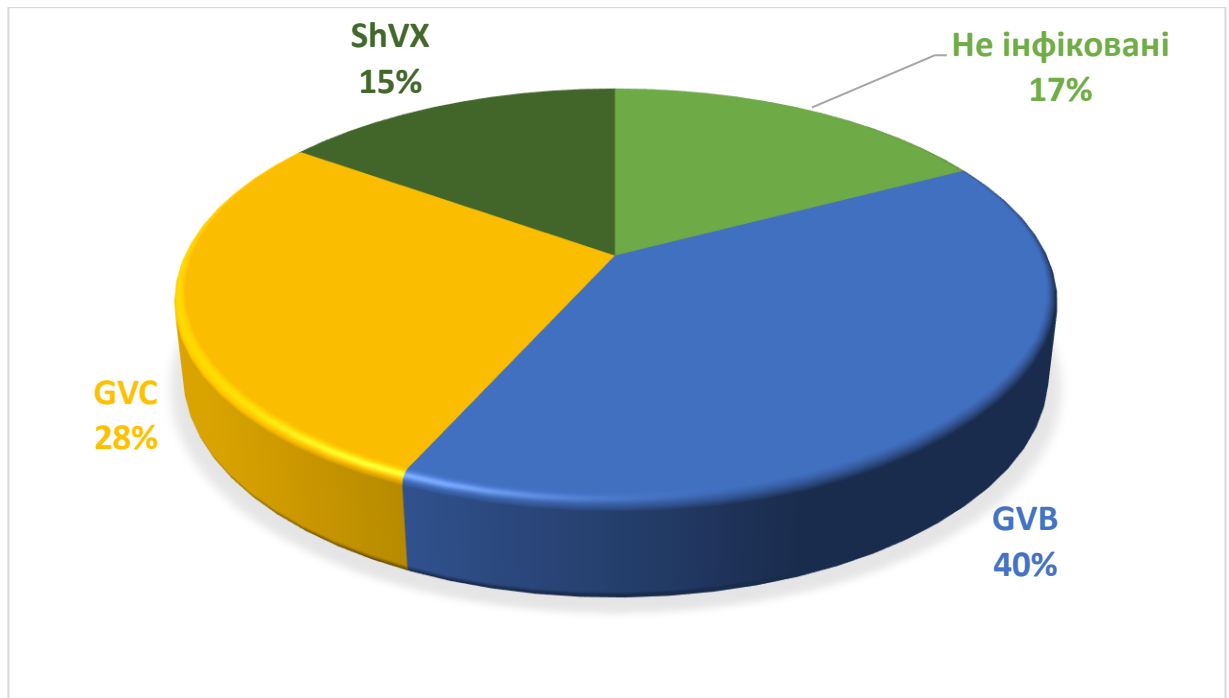


**Рис.3.2.** Симптоми вірусної мозаїки на *Allium sativum*

Ці симптоми найчастіше викликаються Garlic Virus B (GVB), Garlic Virus C (GVC) та Shallot Virus X (ShVX). Жовтіння листя та мозаїчні візерунки є типовими ознаками інфекції цими вірусами, а деформації листя свідчать про значне пошкодження тканин рослин.

### 3.2. Ідентифікації вірусів за допомогою ІФА

Під час проведення досліджень методом ІФА DAS-ELISA було проаналізовано 47 зразків рослин роду *Allium*, зібраних з різних полів. Метою цього аналізу було виявлення вірусних інфекцій, спричинених вірусами роду *Allexivirus*. Результати показали, що 17% зразків (8 зразків) виявилися не інфікованими *Allexivirus*. З інших зразків 40% (19 зразків) були заражені *Garlic Virus B (GVB)*, 28% (13 зразків) – *Garlic Virus C (GVC)*, і 15% (7 зразків) – *Shallot Virus X (ShVX)* (рис. 3.3.).



**Рис.3.3.** Відсотки інфікованих та неінфікованих зразків

У Черкаській області з 8 зразків лише 1 був заражений GVB, 1 – GVC, а решта 6 залишилися не інфікованими. У Полтавській області жоден з 3 зразків не виявився інфікованим. У Київській області з 18 зразків 8 були заражені GVB, 7 – GVC, і 4 – ShVX. У Закарпатській області з 5 зразків 3 були заражені GVB, 2 –

GVC, і жоден не був інфікований ShVX. В Одеській області з 11 зразків 5 були заражені GVB, 3 – GVC, і 3 – ShVX. У Запорізькій області всі 2 зразки були заражені GVB (табл. 3.1.).

**Таблиця 3.1.**

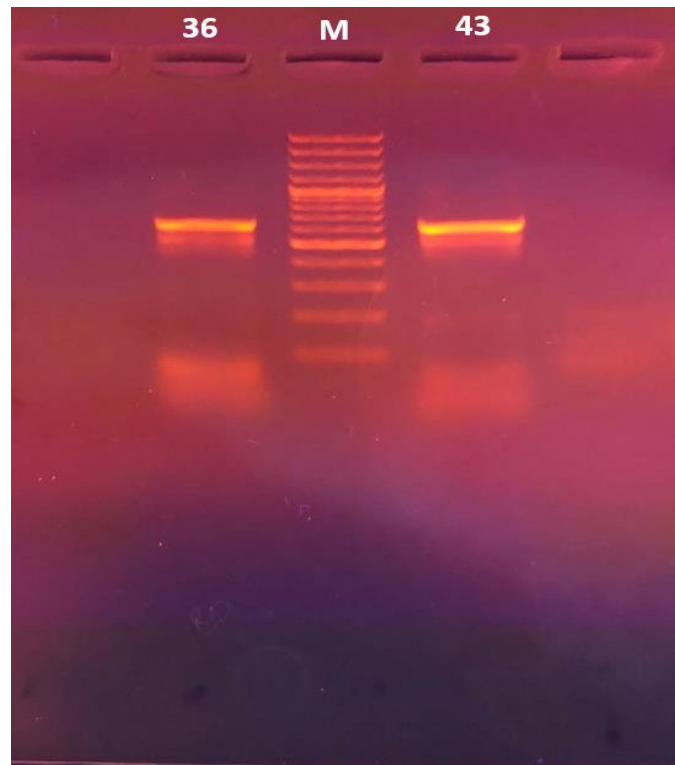
**Ідентифікація алексівірусів методом ІФА**

Область відбору зразків	# зразків	% уражених	GVB	GVC	ShVX
Черкаська	8	25%	1	1	0
Полтавська	3	0%	0	0	0
Київська	18	50%	8	7	4
Закарпатська	5	60%	3	2	0
Одеська	11	45%	5	3	3
Запорізька	2	100%	2	0	0
	47	83%	19	13	7

Отримані результати яскраво ілюструють масштаби поширення вірусів роду *Allexivirus* серед рослин роду *Allium* у різних регіонах України. Виявлені віруси викликають серйозні симптоми, такі як жовтіння, деформації та мозаїчні візерунки на листі, що може значно знижувати врожайність та якість продукції. Особливо тривожним є високий рівень інфікованості у Київській та Одеській областях, де більшість зразків виявилися зараженими. Ці результати підкреслюють важливість регулярного моніторингу стану рослин і своєчасного виявлення вірусних інфекцій.

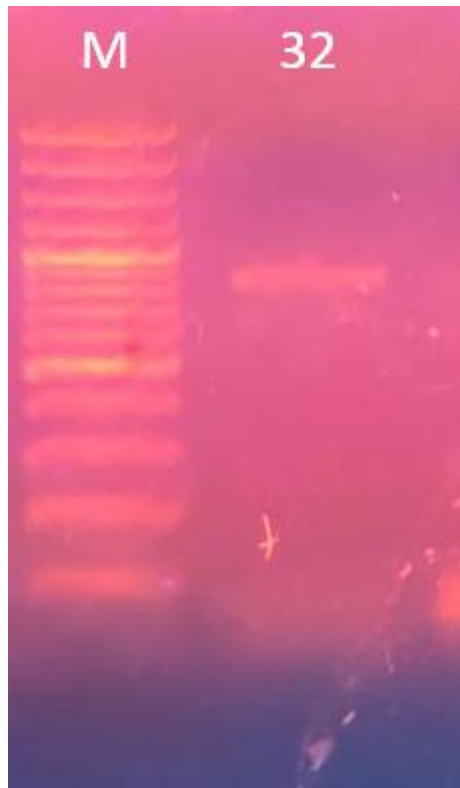
### 3.3. Аналіз дослідних зразків молекулярними методами на наявність представників роду *Allexivirus*

На рисунках 3.4 та 3.5 представлені результати ЗТ-ПЛР аналізу для виявлення вірусів у рослинних зразках. На рисунку 3.4 показано результати для зразків часнику з Запорізької та Київської областей з використанням праймерів до гену капсидного білку GV-B, де виявлено смугу розміром 576 bp, що свідчить про присутність цього вірусу (рис. 3.4.).



**Рис. 3.4.** Результати ЗТ-ПЛР з праймерами до GV-B (576 bp); 36 – Запорізька (часник), 43 – Київська (часник) області; маркери (M): 100 пар основ

На рисунку 3.5 продемонстровано результати для зразка цибулі з Київської області з використанням праймерів до гену капсидного білку ShVX, де спостерігається смуга розміром 800 bp, підтверджуючи наявність вірусу ShVX.

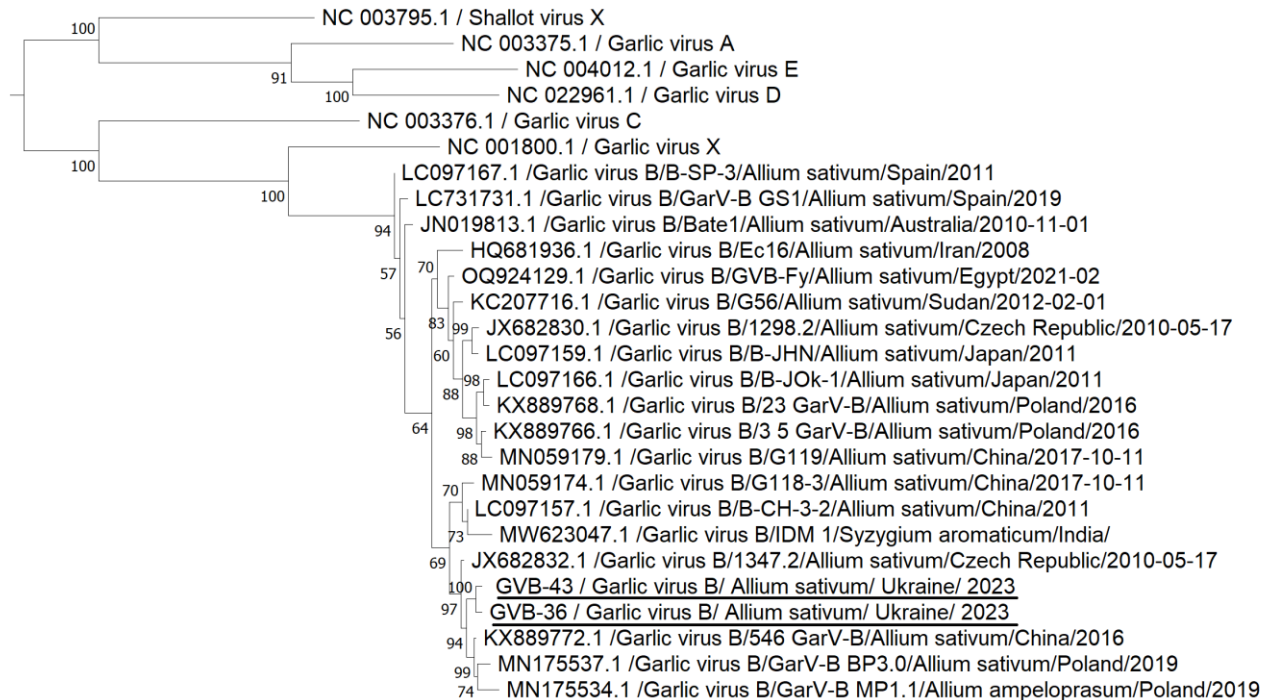


**Рис. 3.5.** Результати ЗТ-ПЛР з праймерами до ShVX (800 bp); 32 – Київська (цибуля); маркери (М): 100 пар основ

Амплікони, отримані в результаті ПЛР, були надалі сиквеновані і використані для філогенетичного аналізу.

#### **3.4. Філогенетичний аналіз гену капсидного білка Garlic virus B**

На рисунку 3.6. представлено філогенетичний аналіз часткових послідовностей гену капсидного білка Garlic Virus B (GVB), виконаний методом Maximum Likelihood за допомогою програм MAFFT та IQ-TREE. На дереві видно спорідненість ізолятів українських зразків з ізолятами з інших країн, що дозволяє зробити висновки про їх походження та розповсюдження. Відображені різні ізоляти Garlic Virus B та інші споріднені віруси.



**Рис.3.6.** Філогенетичний аналізу часткових послідовностей гену капсидного білка Garlic virus B

Найближчими до українських ізолятів є ізоляти з Китаю, Японії, Чехії та Польщі. Це свідчить про тісний філогенетичний зв'язок між українськими зразками та зразками з цих країн, що може вказувати на схожість шляхів поширення вірусу та можливий спільний походження.

Українські ізоляти (GVB-43 та GVB-36) показують високий ступінь спорідненості з ізолятами з Польщі (GarV-B BP3.0 та GarV-B MP1.1) та Китаю (GarV-B G118-3). Це можна пояснити тісними агрономічними зв'язками та обміном посадковим матеріалом між цими країнами.

У результаті проведених досліджень щодо виявлення та ідентифікації вірусів роду *Allexivirus* у рослинах роду *Allium* на території України було отримано важливі дані. Візуальний аналіз виявив симптоми вірусної мозаїки, такі

як мозаїчні візерунки, жовтіння та деформація листя, що підтверджує наявність вірусних інфекцій у досліджених зразках.

Метод ІФА DAS-ELISA показав, що з 47 досліджених зразків 17% були не інфіковані *Allexivirus*, 40% були уражені *Garlic Virus B (GVB)*, 28% уражені *Garlic Virus C (GVC)* та 15% уражені *Shallot Virus X (ShVX)*. Найчастіше спостерігалися такі симптоми як жовтіння та деформація листя, а також мозаїчні візерунки.

Молекулярні дослідження методом зворотної транскрипції-полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) підтвердили наявність *Garlic Virus B (GVB)* та *Shallot Virus X (ShVX)* у зразках з Запорізької та Київської областей. Значна частина зразків із Запорізької області була інфікована GVB, а також був підтверджений один випадок інфекції ShVX у Київській області. Філогенетичний аналіз часткових послідовностей гену капсидного білка *Garlic Virus B* методом Maximum Likelihood показав, що українські ізоляти мають високий ступінь спорідненості з ізолятами з Китаю, Японії, Чехії та Польщі. Це вказує на можливість спільного походження або схожі шляхи поширення вірусу.

Отримані результати свідчать про високий рівень інфікованості рослин роду *Allium* вірусами роду *Allexivirus* на території України. Найпоширенішим вірусом є *Garlic Virus B (GVB)*, що викликає серйозні симптоми ураження. Це підкреслює необхідність посилення моніторингу та впровадження заходів для контролю поширення цих вірусів. Таким чином, проведені дослідження не тільки підтверджують наявність та поширеність вірусних інфекцій у рослинах роду *Allium* в Україні, але й вказують на необхідність розробки ефективних стратегій для їхньої профілактики та контролю.

## ВИСНОВКИ

1. У ході досліджень було використано серологічні та молекулярні методи для ідентифікації представників роду *Allexivirus* на рослинах роду *Allium*, відібраних в 6 областях України.
2. Вперше знайдено представників трьох видів алексівірусів на часнику та цибулі в Україні.
3. За результатами ІФА було встановлено, що 40% зразків інфіковано GVB, 28% GVC, 15% ShVX. Тільки 17% не були інфіковані жодним досліджуваним алексівірусом.
4. Було отримано часткові послідовності генів капсидного білка для ShVX та GVB, та проведений філогенетичний аналіз ізолятів GVB-36 з Запорізької та GVB-43 з Київської областей, за результатами якого встановлено їх подібність з ізолятами з Польщі, Китаю та Чехії.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kreuze, J. F., Vaira, A. M., Menzel, W., Candresse, T., Zavriev, S. K., Hammond, J., Hyun Ryu, K., & Report Consortium, I. (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Alphaflexiviridae. *Journal of General Virology*, 101(7), 699-700. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001436>
2. Thekke-Veetil, T., Ho, T., Postman, J. D., Martin, R. R., & Tzanetakis, I. E. (2018). A Virus in American Blackcurrant (*Ribes americanum*) with Distinct Genome Features Reshapes Classification in the Tymovirales. *Viruses*, 10(8), 406. <https://doi.org/10.3390/v10080406>
3. ICTV. (n.d.). Genus: Allexivirus. Retrieved May 6, 2023, from <https://ictv.global/report/chapter/alphaflexiviridae/alphaflexiviridae/allexivirus>
4. Fermin, G. (2018). Host Range, Host–Virus Interactions, and Virus Transmission. *Viruses*, 101-134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811257-1.00005-X>
5. Lim, H. S., Bragg, J. N., Ganesan, U., Lawrence, D. M., Yu, J., Isogai, M., Hammond, J., & Jackson, A. O. (2008). Triple gene block protein interactions involved in movement of Barley stripe mosaic virus. *Journal of Virology*, 82(10), 4991-5006. <https://doi.org/10.1128/JVI.02586-07>
6. Krichevsky, A., Kozlovsky, S. V., Gafni, Y., & Citovsky, V. (2006). Nuclear import and export of plant virus proteins and genomes. *Molecular Plant Pathology*, 7(2), 131-146. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00321.x>
7. Mansouri, F., & Rysanek, P. (2021). Allexivirus: review and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*, 60(3), 389-402. <https://doi.org/10.36253/phyto-12043>
8. Paduch-Cichal, E., & Bereda, M. (2017). Viruses infecting ornamental *Allium* species in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 99(2), 509-512. <http://www.jstor.org/stable/44686800>

9. Lunello, P., Di Rienzo, J., & Conci, V. (2007). Yield loss in garlic caused by Leek yellow stripe virus Argentinean isolate. *Plant Disease*, 91(2). <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-2-0153>
10. 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), 1833-1840. PMID: 18092468
11. Caillaud, M. C., & Via, S. (2000). Specialized feeding behavior influences both ecological specialization and assortative mating in sympatric host races of pea aphids. *American Naturalist*, 156(6), 606-621. <https://doi.org/10.1086/316991>
12. Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Garzo, E., & Fereres, A. (2014). A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Research*, 186, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.012>
13. Jiménez, J., Moreno, A., & Fereres, A. (2020). Transmission of phloem-limited viruses to the host plants by their aphid vectors. In *Phloem-Transported Viruses* (pp. 1-25). [https://doi.org/10.1007/124\\_2020\\_47](https://doi.org/10.1007/124_2020_47)
14. Plant Pathology (Fifth Edition). (2005). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50020-8>
15. Gadhave, K. R., Gautam, S., Rasmussen, D. A., & Srinivasan, R. (2020). Aphid transmission of potyvirus: The largest plant-infecting RNA virus genus. *Viruses*, 12(7), 773. <https://doi.org/10.3390/v12070773>
16. Baranwal, V. K., Singh, P., Jain, R. K., & Joshi, S. (2011). First report of Garlic virus X infecting garlic in India. *Plant Disease*, 95(9), 1197. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0198>
17. Rodríguez-Verástegui, L. L., Ramírez-Zavaleta, C. Y., Capilla-Hernández, M. F., & Gregorio-Jorge, J. (2022). Viruses infecting trees and herbs that produce edible fleshy fruits with a prominent value in the global market: An evolutionary perspective. *Plants*, 11(2), 203. <https://doi.org/10.3390/plants11020203>

18. Chatzivassiliou, E. K. (2021). An annotated list of legume-infecting viruses in the light of metagenomics. *Plants*, *10*(7), 1413. <https://doi.org/10.3390/plants10071413>
19. Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., & Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 154. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154>
20. Loconsole, G., Onelge, N., Potere, O., Giampetruzzi, A., Bozan, O., Satar, S., De Stradis, A., Savino, V., Yokomi, R., & Saponari, M. (2012). Identification and characterization of Citrus yellow vein clearing virus, a putative new member of the genus Mandarivirus. *Phytopathology*, *102*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0140-R>
21. Qu, F., & Morris, T. J. (2005). Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Letters*, *579*(27), 5958-5964. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.041>
22. Beck, D. L., Guilford, P. J., Voot, D. M., Andersen, M. T., & Forster, R. L. (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology*, *183*(2), 695-702. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90998-Q](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90998-Q)
23. Ghosh, S., & Ghanim, M. (2021). Factors determining transmission of persistent viruses by *Bemisia tabaci* and emergence of new virus-vector relationships. *Viruses*, *13*(9), 1808. <https://doi.org/10.3390/v13091808>
24. ICTV. (n.d.). Genus: Capulavirus. Retrieved May 6, 2023, from <https://ictv.global/report/chapter/geminiviridae/geminiviridae/capulavirus>
25. Vlugt, R., Cuperus, C., Vink, J., Stijger, I., Lesemann, D.-E., Verhoeven, J., & Roenhorst, J. (2003). Identification and characterization of Pepino mosaic potexvirus in tomato. *EPPO Bulletin*, *32*(3), 503-508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2338.2002.00598.x>

26. ICTV. (n.d.). Genus: Mandarivirus. Retrieved May 6, 2023, from <https://ictv.global/report/chapter/alphaflexiviridae/alphaflexiviridae/mandarivirus>
27. Martelli, G. P., & Uyemoto, J. K. (2008). Plant Virus Diseases: Fruit Trees and Grapevine. In *Encyclopedia of Virology* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00727-5>
28. Akbar, S., Wei, Y., & Zhang, M.-Q. (2022). RNA interference: Promising approach to combat plant viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5312. <https://doi.org/10.3390/ijms23105312>
29. Guo, Q., Liu, Q., Smith, N. A., Liang, G., & Wang, M. B. (2016). RNA silencing in plants: Mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Current Genomics*, 17(6), 476-489. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160520103117>
30. Zulfiqar, S., Farooq, M. A., Zhao, T., Wang, P., Tabusam, J., Wang, Y., Xuan, S., Zhao, J., Chen, X., Shen, S., & Gu, A. (2023). Virus-induced gene silencing (VIGS): A powerful tool for crop improvement and its advancement towards epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5608. <https://doi.org/10.3390/ijms24065608>
31. Wang, H. W., & Wang, J. W. (2017). How cryo-electron microscopy and X-ray crystallography complement each other. *Protein Science*, 26(1), 32-39. <https://doi.org/10.1002/pro.3022>
32. Nagy, P. D., & Pogany, J. (2010). Global genomics and proteomics approaches to identify host factors as targets to induce resistance against Tomato bushy stunt virus. *Advances in Virus Research*, 76, 123-177. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(10\)76004-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(10)76004-8)
33. Chatzivassiliou, E. (2021). An annotated list of legume-infecting viruses in the light of metagenomics. *Plants*, 10(7), 1413. <https://doi.org/10.3390/plants10071413>

34. Chowdhury, M. S. R., Rahman, M. A., Nahar, K., Dastogeer, K. M. G., Hamim, I., & Mohiuddin, K. M. (2022). Mineral nutrient content of infected plants and allied soils provide insight into wheat blast epidemics. *Heliyon*, 8(2), e08966. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08966>
35. Mandadi, K. K., & Scholthof, K. B. (2013). Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease? *Plant Cell*, 25(5), 1489-1505. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111658>
36. Della Bartola, M., Byrne, S., & Mullins, E. (2020). Characterization of Potato Virus Y isolates and assessment of nanopore sequencing to detect and genotype potato viruses. *Viruses*, 12(4), 478. <https://doi.org/10.3390/v12040478>
37. Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, 72(1), 32-42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>
38. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62, 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
39. Likhite, N., & Warawdekar, U. M. (2011). A unique method for isolation and solubilization of proteins after extraction of RNA from tumor tissue using trizol. *Journal of Biomolecular Techniques*, 22(1), 37-44. PMID: 21455480; PMCID: PMC3059540
40. Khakimov, A., Salakhutdinov, I., Omonlikov, A., & Utaganov, S. (2022). Traditional and current-prospective methods of agricultural plant diseases detection: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 951, 012002. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/951/1/012002>