

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____ 2026 р.

**ЗМІШАНІ ВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ РОСЛИН РОДУ ALLIUM В
АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ**

випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія»
Превора Дмитра Олеговича

Науковий керівник від кафедри
д-р. біол. наук., професор 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 – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

GCLV	– Garlic common latent virus;
LYSV	– Leek yellow stripe virus;
ORF	– Open Reading Frame;
OYDV	– Onion yellow dwarf virus;
SLV	– Shallot latent virus;

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика збудників вірусних інфекцій рослин роду <i>Allium</i>.....	6
1.1 Характеристика роду <i>Potyvirus</i>	6
1.2 Характеристика роду <i>Carlavirus</i>	9
1.3 Характеристика роду <i>Allexivirus</i>	14
РОЗДІЛ 2 Поширення вірусів родів: <i>Potyvirus</i>, <i>Carlavirus</i>, <i>Allexivirus</i>.....	19
РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи досліджень.....	25
2.1. Метод імуноферментного аналізу в модифікації DAS-ELISA.....	25
2.2. Метод виділення тотальної РНК.....	25
2.3. Метод електрофорезу в агарозному гелі.....	26
2.4. Метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією.....	28
2.5. Методи статистичної обробки результатів.....	30
РОЗДІЛ 4. Результати досліджень та обговорення.....	31
4.1. Ідентифікації вірусів роду <i>Allexivirus</i> за допомогою ІФА.....	31
4.2. Визначення видового складу вірусів роду <i>Carlavirus</i> серед рослин роду <i>Allium</i> в Україні.....	34
4.3. Встановлення змішаної вірусної інфекції серед рослин роду <i>Allium</i>	37
4.4. Підготовка вірусних ізолятів для секвенування.....	44
ВИСНОВКИ.....	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	50

ВСТУП

Рослини роду *Allium*, насамперед часник, цибуля та шалот, належать до вегетативно або клонально розмножуваних культур, тому вірусні агенти можуть зберігатися й накопичуватися в посадковому матеріалі та передаватися з покоління в покоління. Для часнику це особливо характерно: у польових умовах вірусні інфекції часто виявляють у складі комплексів, а заражені рослини демонструють поступове зниження врожайності та якості продукції [1, 2].

Для культур роду *Allium* найчастіше описують представників родів *Potyvirus*, *Carlavirus* і *Allexivirus*. У сучасних дослідженнях у зразках часнику та інших *Allium* нерідко виявляють змішані інфекції: у європейській колекції часнику всі 105 досліджених зразків були інфіковані щонайменше двома вірусами, а в угорському дослідженні було підтверджено наявність LYSV, GCLV, SLV, GarV-B, GarV-C і GarV-D; вірус-вільних зразків не виявили [3, 4].

Окремого значення набувають карлавіруси, зокрема Garlic common latent virus і Shallot latent virus, які часто перебігають без вираженої симптоматики, але входять до складу змішаних інфекцій і можуть посилювати негативний ефект інших вірусів. Такі інфекції складно виявити лише за зовнішніми ознаками, тому для їхньої коректної діагностики необхідні серологічні та молекулярні методи. [4-6]

Allexivirus є ще однією важливою групою вірусів *Allium*: для них характерні дуже гнучкі ниткоподібні віріони, одноланцюгова РНК позитивної полярності, шість великих ORF і передача кліщами. Саме тому одночасний моніторинг карлавірусів, алексівірусів і потивірусів є необхідним для об'єктивної оцінки вірусного навантаження в насадженнях *Allium* та для відбору матеріалу, придатного для подальшого молекулярного аналізу [4, 7, 8].

Мета: виявити та охарактеризувати вірусні інфекції рослин роду *Allium* в агроценозах України шляхом серологічної та молекулярної ідентифікації

представників родів *Allexivirus* і *Carlavirus*, визначення частоти змішаних інфекцій і відбору вірусних ізолятів для подальшого секвенування.

Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

1. Провести серологічний скринінг зразків рослин роду *Allium* методом DAS-ELISA для виявлення інфекції, асоційованої з *Allexivirus*.
2. Визначити видовий склад вірусів роду *Carlavirus* серед досліджених зразків рослин роду *Allium* в Україні.
3. Оцінити поширеність змішаних вірусних інфекцій серед досліджених зразків і встановити їхні найчастіші комбінації.
4. Виконати відбір вірусних ізолятів, придатних для подальшого секвенування, на основі результатів DAS-ELISA та RT-PCR.
5. Підготувати вірусний матеріал для молекулярного аналізу, зокрема після екстракції РНК, ампліфікації та електрофоретичної візуалізації продуктів.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗБУДНИКІВ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ РОСЛИН РОДУ *ALLIUM*

1.1 Характеристика роду *Potyvirus*

Рід *Potyvirus* належить до родини *Potyviridae* порядку *Patatavirales* і є найбільшим родом цієї родини. Типовим видом роду є Potato virus Y (PVY). Представники *Potyvirus* є рослинними вірусами з одноланцюговим позитивно-спрямованим РНК-геномом, що узгоджується із загальними ознаками родини *Potyviridae*, для якої характерні гнучкі ниткоподібні віріони, наявність VPg на 5'-кінці геному та полі(А)-послідовність на 3'-кінці для більшості вірусів родини [9, 10]

Віріони *Potyvirus* мають форму гнучких філаментів довжиною приблизно 680–900 нм і діаметром 11–20 нм, із гвинтовою симетрією. Для них також описано фізико-хімічні характеристики, типові для представників родини *Potyviridae*, а саме наявність однієї молекули лінійної позитивно-спрямованої ssRNA довжиною близько 8,5-12 п.н. та одного капсидного білка масою 28.5–47 кДа. У клітинах, інфікованих потивірусами, характерним є формування цитоплазматичних циліндричних включень типу *pinwheel*, які пов'язані з вірусним білком CI і є типовою ультраструктурною ознакою інфекції, схематичне зображення геному вірусів роду *Potyvirus* подано на риснку 1.1. [9, 11]

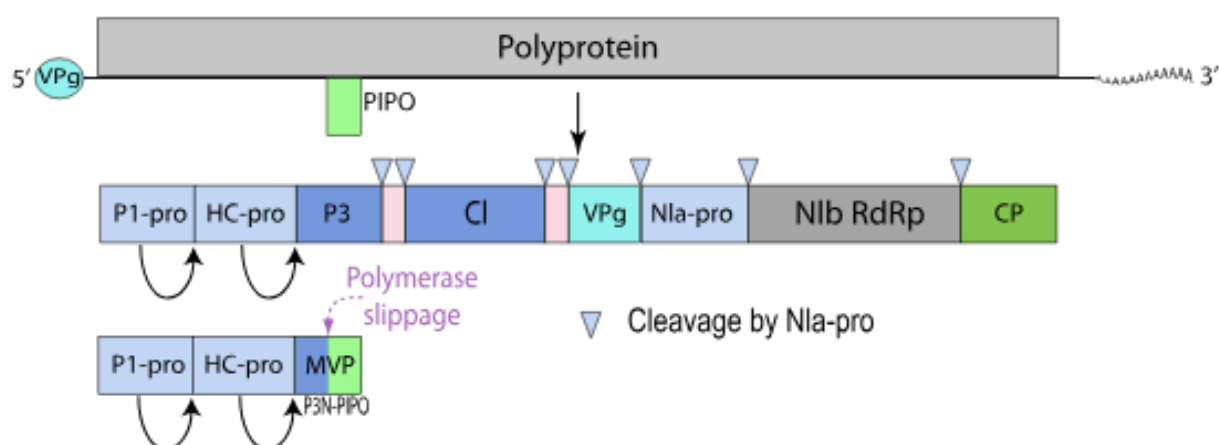


Рис. 1.1. Схематичне зображення геному вірусів родини *Potyvirus* [11]

Геном *Potyvirus* є моночастинним і зазвичай має довжину приблизно 8-12 п.н [12]. Він організований як одна велика відкрита рамка зчитування, що кодує поліпротеїн, який далі автокаталітично та протеолітично розщеплюється на низку функціональних білків. Класичний набір зрілих продуктів поліпротеїну включає P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb і CP [13]. У частини видів додатково утворюються трансрамкові продукти, зокрема P3N-PIPO, а в окремих підгрупах батату – P1N-PISPO [14]. Важливо, що 5'-кінцева ділянка геному пов'язана з VPg, тоді як 3'-кінець містить полі(A)-хвіст, який є типовою ознакою більшості потивірусів [11].

Функціональна організація потивірусного поліпротеїну є консервативною для роду і визначає основні етапи інфекційного циклу. P1 і HC-Pro здійснюють розщеплення власних N-кінцевих ділянок, а NIa-Pro відповідає за більшість інших протеолітичних розщеплень поліпротеїну; саме таким чином із одного великого попередника формуються зрілі вірусні білки, необхідні для реплікації, руху та формування віріонів. NIb виконує функцію РНК-залежної РНК-полімерази, а CP бере участь в інкапсуляції вірусної РНК, стабілізації віріонів та переміщенні вірусу в тканинах рослини [10].

Реплікація *Potyvirus* відбувається в цитоплазмі клітини-господаря та пов'язана з мембранозв'язаними реплікативними комплексами, що формуються на похідних ендоплазматичного ретикулума, зокрема за участі білка 6K2 [15]. Таким чином, *Potyvirus* використовує типову для позитивно-ланцюгових РНК-вірусів рослин схему, за якої геномна РНК безпосередньо слугує матрицею для трансляції, а далі запускається поліпротеїнове дозрівання та реплікація нових геномів.

З біологічної точки зору *Potyvirus* характеризується надзвичайно широкою екологічною та господарською різноманітністю. Колективно представники роду охоплюють щонайменше 57 родин рослин [16], однак окремі види зазвичай мають відносно вузький спектр хазяїв. Водночас існують винятки: зокрема, деякі види здатні інфікувати рослини з 38 і більше родин

[16]. Це свідчить про високу мінливість в контексті вибору хазяїв у межах роду та про його значну здатність до адаптації до різних рослинних систем.

Передача *Potyvirus* переважно відбувається попелицями у непостійний, нециркулюючий спосіб. Для багатьох видів роду саме цей механізм є основним, а деякі ізоляти передаються малоефективно або взагалі не передаються попелицями, що пов'язано з варіаціями в ділянках генів, які кодують HC-Pro та/або CP [17]. Окрім передавання попелицями, для частини потивірусів можливе механічне поширення, а для деяких видів – передача насінням. Це робить цей шлях поширення визначальним для епідеміології потивірусних інфекцій.

Молекулярною основою передавання через попелиць є взаємодія між HC-Pro і капсидним білком CP. У моделі «helper strategy» HC-Pro виконує роль молекулярного містка між віріоном і ротовим апаратом попелиці, тоді як на N-кінці CP часто присутній консервативний мотив DAG, а в HC-Pro – мотиви, функціонально еквівалентні РТК і КІТС; саме ці елементи є критичними для ефективної трансмісії. Порушення цих мотивів може знижувати або повністю блокувати переносимість вірусу, хоча наявність самого мотиву DAG не завжди є достатньою умовою для трансмісії, оскільки значення має і контекст послідовності, і сумісність з компонентами переносника [18].

Інфекції, спричинені потивірусами, мають істотне фітопатогенне та економічне значення. Для багатьох рослин-хазяїв описано симптоми мозаїчності, хлорозу, хлоротичних смуг, деформацій листя, скручування листових пластинок і пригнічення росту; у зернових і злакових культур окремі потивіруси викликають особливо тяжкі ураження, що призводять до суттєвих втрат урожаю. У кукурудзі віруси цієї групи можуть спричиняти мозаїку, смугастість, хлороз і різке зниження продуктивності, а в оглядових роботах підкреслюється, що потивіруси належать до найважливіших збудників хвороб культурних рослин у світовому землеробстві [19].

Еволюційні дані свідчать, що потивіруси є відносно молодого та швидко диверсифікованою групою. Філогенетичний аналіз показав, що радіаційна

еволюція роду *Potyvirus* почалася приблизно 6600 років тому, тобто в період, який збігається з інтенсифікацією землеробства [20], а зміни спектра хазяїв відбувалися часто й переважно на термінальних гілках еволюційного дерева. У середньому для аналізованих видів було реконструйовано 4,6 змін *host range* на один вид рослини, що включало 3,1 набуття та 1,5 втрати хазяїв, причому ці зміни були здебільшого недавніми. Це узгоджується з тим, що господарська діяльність людини істотно вплинула на еволюцію та поширення потивірусів [21].

Отже, *Potyvirus* є найбільшим родом родини *Potyviridae*, який об'єднує рослинні РНК-віруси з моночастинним позитивно-спрямованим геномом, поліпротеїновою стратегією експресії, ниткоподібними віріонами та переважною передачею попелицями у непостійний спосіб. Поєднання широкого господарського спектра на рівні роду, високої еволюційної пластичності, значного числа переносників і вираженого фітопатогенного потенціалу зумовлює те, що потивіруси залишаються однією з найважливіших груп рослинних вірусів з погляду фундаментальної вірусології та практичного рослинництва.

1.2. Характеристика роду *Carlavirus*

Рід *Carlavirus* належить до родини *Betaflexiviridae* порядку *Tymovirales* і включає рослинні віруси з одноланцюговим позитивно-спрямованим РНК-геномом. Ці віруси є типовими представниками групи фітовірусів, що інфікують широкий спектр культурних і дикорослих рослин та характеризуються спільними молекулярними й морфологічними ознаками, притаманними родині *Betaflexiviridae*. Типовим видом роду є *Carnation latent virus*, який використовується як референтний об'єкт для визначення таксономічних і біологічних характеристик інших представників роду. Представники родини *Betaflexiviridae*, до якої належить рід *Carlavirus*,

характеризуються наявністю гнучких ниткоподібних віріонів із гвинтовою симетрією, що є типовою морфологічною ознакою для вірусів цього таксономічного кластеру. Їхній геном представлений лінійною одноланцюговою РНК позитивної полярності (ssRNA(+)), яка безпосередньо виконує функцію матриці для синтезу вірусних білків після проникнення в клітину-хазяїна. На 3'-кінці геному наявний поліаденільований хвіст (poly(A)), що сприяє стабілізації РНК та ефективності трансляції, і є характерною рисою більшості представників родини *Betaflexiviridae*. Таким чином, рід *Carlavirus* об'єднує рослинні віруси з подібною морфологією віріонів, організацією геному та базовими механізмами функціонування, що визначають їх належність до родини *Betaflexiviridae* і порядку *Tymovirales* [8, 22].

Віріони *Carlavirus* мають форму гнучких філаментів довжиною приблизно 610–700 нм і діаметром 12–15 нм. Вони мають гвинтову симетрію, а їх капсид утворений одним білком [22]

Геном вірусів роду *Carlavirus* є моночастинним і представлений лінійною одноланцюговою РНК позитивної полярності, довжина якої за даними повногеномного секвенування становить приблизно 7,4–8,7 кб. Така організація геному є типовою для представників родини *Betaflexiviridae* і забезпечує реалізацію всіх основних етапів вірусного життєвого циклу в межах однієї РНК-молекули. Геном містить шість відкритих рамок зчитування (ORF), які розташовані послідовно і кодують білки, функціонально пов'язані з реплікацією, внутрішньоклітинним і міжклітинним переміщенням вірусу, а також формуванням віріонів. Перша відкрита рамка зчитування (ORF1) кодує великий реплікаційний білок масою приблизно 215–225 кДа, що включає консервативні функціональні домени, необхідні для синтезу вірусної РНК. Наступні три рамки зчитування (ORF2–ORF4) формують так званий потрійний генний блок (triple gene block, TGB), білки якого забезпечують переміщення вірусу з клітини в клітину через плазмодесми рослинних тканин і є ключовими для системного поширення інфекції в організмі рослини-хазяїна. П'ята відкрита рамка зчитування (ORF5) кодує капсидний білок із

молекулярною масою близько 32–36 кДа, який забезпечує інкапсуляцію вірусної РНК, формування стабільних віріонів і захист генетичного матеріалу від деградації. Шоста рамка зчитування (ORF6) кодує невеликий цистеїн-багатий білок, здатний зв'язувати нуклеїнові кислоти; цей білок вважається додатковим фактором, що бере участь у взаємодії вірусу з клітиною-хазяїном, хоча його функції залишаються не повністю з'ясованими [23]. схематичне зображення геному вірусів родини *Carlavirus* подано на риснку 1.2.

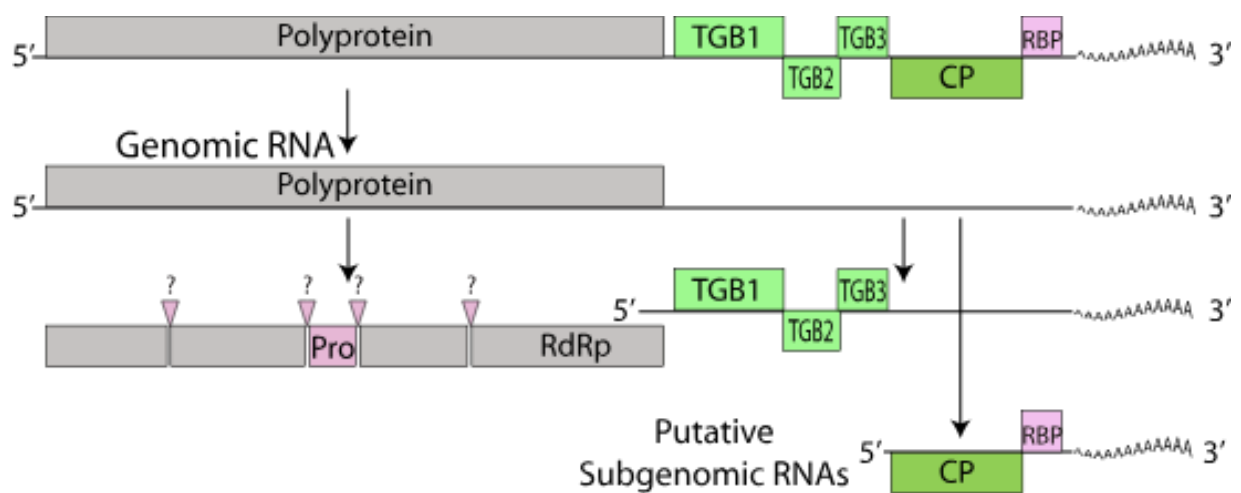


Рис. 1.2. Схематичне зображення геному вірусів родини *Carlavirus* [24]

Реплікаційний білок карлавірусів містить консервативні домени метилтрансферази, гелікази та РНК-залежної РНК-полімерази, що відносять їх до «alphavirus-like» суперродини РНК-вірусів. Реплікація відбувається в цитоплазмі клітини-хазяїна, а експресія генів, розташованих у 3'-частині геному, здійснюється через субгеномні РНК. Для частини карлавірусів експериментально підтверджено наявність двох субгеномних РНК [22].

Білки потрійного генного блоку (TGB) забезпечують міжклітинне переміщення вірусу через плазмодесми. Капсидний білок виконує функцію інкапсуляції вірусної РНК і формування зрілих віріонів. Білок ORF6 має здатність зв'язувати нуклеїнові кислоти; однак його точна функція остаточно

не визначена [22].

Біологічно *Carlavirus* характеризується відносно вузьким природним спектром хазяїв для кожного окремого виду, хоча експериментально деякі віруси можуть інфікувати ширший набір рослин [22].

Передача вірусів роду *Carlavirus* у природних умовах переважно здійснюється попелицями у непостійний (нециркулюючий) спосіб. За такого типу передачі вірус не проникає у внутрішні тканини організму переносника і не реплікується в ньому, а лише тимчасово адсорбується на стилеті ротового апарату. Внаслідок цього інфекційність переносника зберігається протягом короткого часу після набуття вірусу, що обмежує тривалість ефективної передачі, але водночас забезпечує швидке поширення інфекції в агроценозах за наявності великої чисельності попелиць. Водночас для окремих представників роду описані альтернативні шляхи передачі. Зокрема, *cowpea mild mottle virus* передається білокрилками виду *Bemisia tabaci*, що відрізняє його від більшості карлавірусів і свідчить про варіабельність механізмів взаємодії з переносниками в межах роду. Крім того, для деяких карлавірусів, які інфікують бобові культури, експериментально встановлена можливість передачі через насіння, що сприяє довготривалому збереженню вірусу в популяціях рослин і його географічному поширенню. Усі представники роду *Carlavirus* здатні передаватися механічно, зокрема через пошкодження тканин рослин під час агротехнічних операцій або контакту між рослинами. Такий шлях передачі не потребує участі біологічних переносників і має важливе значення для поширення інфекції в умовах інтенсивного вирощування культур, особливо за вегетативного розмноження рослин [22].

Поширення *Carlavirus* значною мірою пов'язане з вегетативним розмноженням рослин. Віруси, які інфікують вегетативно розмножувані культури, часто мають широке географічне поширення через перенесення зараженого посадкового матеріалу [22].

У клітинах, інфікованих карлавірусами, вірусні частинки накопичуються в цитоплазмі, іноді формуючи агрегати або включення овальної чи

неправильної форми. Водночас специфічні цитопатичні структури виражені не завжди [22].

З патогенетичної точки зору значна частина вірусів роду *Carlavirus* спричиняє слабо виражені або латентні інфекції, які часто не супроводжуються чіткими візуальними симптомами. Багато представників роду характеризуються відносно м'яким впливом на рослину-хазяїна, що ускладнює їх своєчасне виявлення в польових умовах і сприяє тривалому прихованому збереженню вірусу в інфікованих рослинах. Водночас окремі види *Carlavirus* здатні індукувати помітні патологічні зміни, ступінь прояву яких може варіювати залежно від виду вірусу, генотипу рослини-хазяїна та умов середовища. Серед описаних симптомів найчастіше відзначають мозаїчність листків, утворення кільцевих плям, хлороз різного ступеня вираженості, а також загальне пригнічення росту та розвитку рослин. Такі прояви можуть супроводжуватися зниженням продуктивності, особливо у разі тривалого інфікування або поєднання з іншими стресовими факторами [22]

Таким чином, рід *Carlavirus* представляє собою групу рослинних РНК-вірусів із моночастинним геномом позитивної полярності, що характеризується відносно компактною, але функціонально організованою структурою. Геном цих вірусів має типову шестигенну організацію, яка включає реплікаційний білок, білки потрійного генного блоку (TGB), капсидний білок та невеликий цистеїн-багатий білок, що забезпечує реалізацію основних етапів вірусного життєвого циклу. Віріони карлавірусів мають ниткоподібну, гнучку будову, характерну для представників родини *Betaflexiviridae*, і забезпечують ефективну інкапсуляцію геному та стабільність вірусних частинок. Поширення цих вірусів у природі відбувається переважно за участю попелиць, які здійснюють передачу у непостійний (нециркулюючий) спосіб, що передбачає короткочасне збереження вірусу в організмі переносника без його реплікації. Сукупність зазначених ознак – геномна організація, наявність потрійного генного блоку, морфологія віріонів і специфіка передачі – визначає таксономічне положення роду *Carlavirus* та

його біологічні властивості як групи фітопатогенних вірусів.

1.3. Характеристика роду *Allexivirus*

Рід *Allexivirus* належить до групи рослинних вірусів із позитивно-спрямованим одноланцюговим РНК-геномом і входить до складу родини *Alphaflexiviridae*. Представники цієї родини характеризуються наявністю гнучких ниткоподібних віріонів, довжина яких зазвичай становить 470–800 нм, а діаметр – 12–13 нм (рис. 1.1) [25]. Родина *Alphaflexiviridae* є однією з п'яти родин, що входять до порядку *Tymovirales*; для його представників загалом притаманні подібні принципи організації геному, реплікації та взаємодії з рослиною-хазяїном [26].

Allexivirus вирізняється специфічною організацією геному, наявністю стабільних консервативних послідовностей та переважною асоціацією з рослинами роду *Allium*, що відображає його еволюційну адаптацію до цієї групи хазяїв. Представники цього роду характеризуються подібною структурою геному та набором функціональних елементів, які забезпечують ефективну реплікацію та поширення вірусу в рослинному організмі. Геном вірусів роду *Allexivirus* є моночастинним і представлений лінійною одноланцюговою РНК позитивної полярності, довжина якої становить приблизно 8,3–9,0 кб. Він містить п'ять–шість відкритих рамок зчитування (ORF), які розташовані послідовно та кодують білки, залучені до основних етапів вірусного життєвого циклу, зокрема реплікації, внутрішньоклітинного та міжклітинного переміщення, інкапсуляції генетичного матеріалу та формування капсидної оболонки. Функціонування геному значною мірою визначається наявністю 5'- і 3'-нетрансльованих ділянок (UTR), які відіграють важливу роль у регуляції процесів реплікації та трансляції вірусної РНК. Ці ділянки містять консервативні структурні елементи та послідовності, що забезпечують зв'язування вірусних і клітинних білків, стабілізацію РНК та

ефективний запуск синтезу вірусних білків після інфікування клітини-хазяїна [27].

У складі роду *Allexivirus* на даний час визнається дев'ять видів: вірус часнику А (Garlic virus A, GarV-A), вірус часнику В (GarV-B), вірус часнику С (GarV-C), вірус часнику D (GarV-D), вірус часнику Е (GarV-E), вірус часнику Х (GarV-X), вірус шалоту Х (ShVX), вірус люцерни S та вірус арахісу пінтої [28]. Таксономічний склад роду не є статичним і може уточнюватися в міру накопичення нових молекулярних даних та виявлення нових ізолятів.

Більшість алексивірусів асоційовані з рослинами роду *Allium*, передусім із часником, цибулею та шалотом, однак окремі представники були виявлені і в інших родин рослин. Таким чином, для роду характерний варіабельний спектр хазяїв: частина вірусів виявляє вузьку специфічність, тоді як інші можуть бути пов'язані з ширшим колом рослинних видів [29]. Це свідчить про те, що еволюція представників *Allexivirus* відбувається в умовах тісної взаємодії з рослинами-хазяями та переносниками, а межі їх біологічної спеціалізації не є абсолютно сталими.

На молекулярному рівні *Allexivirus* має низку ознак, притаманних представникам *Alphaflexiviridae*, проте відрізняється власним набором функціональних елементів. Організація геному включає ORF1, що кодує великий поліпротеїн реплікаційного комплексу з доменами РНК-залежної РНК-полімерази (RdRp), гелікази та метилтрансферази. Ці домени забезпечують основні етапи відтворення вірусного геному, синтез комплементарних ланцюгів РНК і формування транскрипційно активних молекул. ORF2, ORF3 і ORF4 кодують білки потрійного генного блоку (TGB1, TGB2, TGB3), які відповідають за внутрішньоклітинне та міжклітинне переміщення вірусу в тканинах рослини-хазяїна [30]. ORF5 кодує білок оболонки (CP), необхідний для інкапсуляції вірусної РНК, формування зрілих віріонів, стабілізації генетичного матеріалу та участі в передачі вірусу. У деяких видів може бути також присутній додатковий ORF6, функція якого залишається недостатньо визначеною, схематичне зображення геному вірусів

родини *Carlavirus* подано на риснку 1.3.

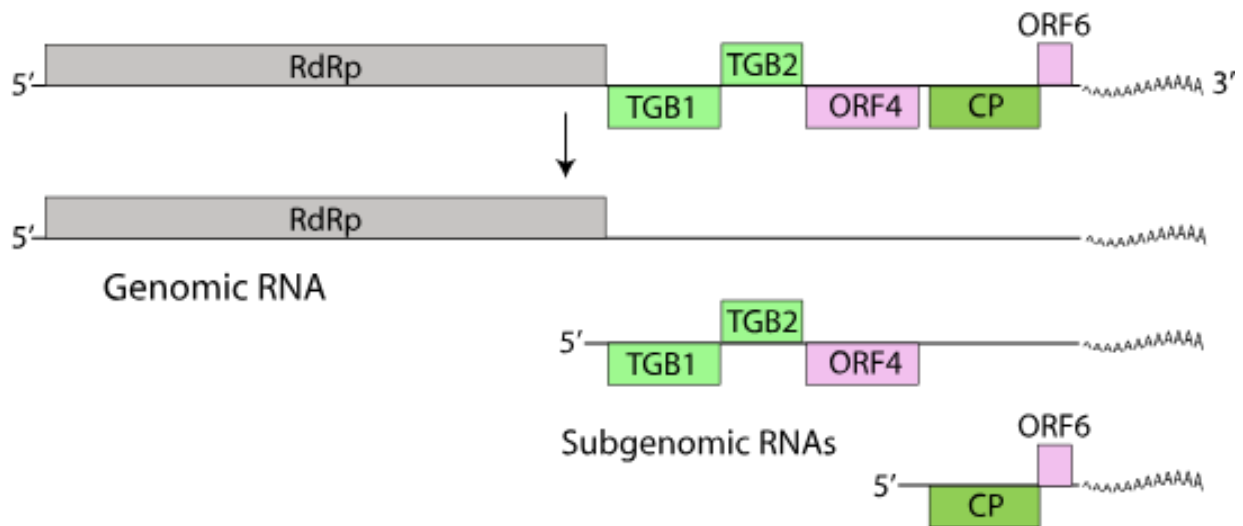


Рис. 1.3. Схематичне зображення геному вірусів родини *Alexivirus* [31]

Реплікація алексивірусів відбувається в цитоплазмі клітин рослини-хазяїна із залученням клітинних ресурсів інфікованого організму [32]. Після проникнення в клітину позитивно-спрямована РНК вірусу слугує матрицею для трансляції поліпротеїну, після чого відбувається його функціональне дозрівання з утворенням окремих білків реплікаційного комплексу. Домен RdRp синтезує негативно-сміслову комплементарну РНК, яка використовується як матриця для утворення нових позитивно-сміслових геномів. Надалі синтезовані геноми або залучаються до подальшої трансляції, або інкапсулюються білком оболонки з утворенням нових віріонів.

З біологічної точки зору *Alexivirus* характеризується відносно вузькою асоціацією з рослинами роду *Allium*, але при цьому має різний ступінь специфічності до конкретних видів-хазяїв. Основними господарями є часник (*Allium sativum*), цибуля (*Allium cepa*) та шалот (*Allium ascalonicum*) [33, 34]. Інфікування цих рослин супроводжується розвитком характерних симптомів, серед яких найчастіше відзначаються жовті смуги, мозаїчність листя та затримка росту [35]. Спектр симптомів може істотно змінюватися залежно від

виду вірусу, сорту рослини, віку інфікованого організму та умов середовища.

Хоча для більшості алексивірусів типовою є передача через рослини роду *Allium*, окремі види можуть мати ширший або, навпаки, більш обмежений діапазон хазяїв [33]. Специфічність взаємодії між вірусом і хазяїном, імовірно, зумовлюється поєднанням молекулярних механізмів розпізнавання, особливостей вірусних білків і здатності вірусу уникати або модифікувати захисні реакції рослини. Важливим чинником є також участь переносників, оскільки саме вони значною мірою визначають географічне поширення та екологічну динаміку вірусних популяцій [36, 37].

Передача алексивірусів здійснюється переважно еріофіїдовими кліщами і має непостійний характер [38]. Це означає, що вірус не реплікується всередині переносника, а передається протягом короткого проміжку часу після набуття на зараженій рослині. Вірусні частинки при цьому можуть тимчасово прикріплюватися до стилета ротового апарату кліща й переноситися на нову рослину під час живлення або пробного проколювання тканин [39]. Отже, ефективність поширення вірусу значною мірою залежить від біології переносника, його харчової поведінки, трофічних переваг і чисельності популяції [40, 41].

Інфікування рослин алексивірусами спричиняє широкий спектр патогенетичних змін. До основних проявів належать мозаїчність і хлороз листя, жовті смуги, скручування та деформація листкових пластинок, затримка росту, а за окремих умов – некротичні ураження [42-44]. Симптоматика залежить не лише від виду вірусу, а й від генотипу рослини, стадії її розвитку та поєднання з іншими патогенами. Ураження часто проявляється зниженням фотосинтетичної активності, порушенням ростових процесів, зменшенням біомаси та загальним послабленням рослини [42, 43]. У випадках тяжкого перебігу можуть спостерігатися значні втрати продуктивності та погіршення товарних якостей урожаю.

Після проникнення у рослину алексивіруси локалізуються в цитоплазмі клітин, де проходять реплікацію та накопичення. Подальше поширення

здійснюється як від клітини до клітини, так і на значні відстані по судинній системі рослини. Білки TGB відіграють ключову роль у транспортуванні вірусної РНК через плазмодесми та у забезпеченні системного руху по флоемі [45]. Таким чином, патогенез інфекції включає не лише безпосереднє розмноження вірусу, а й складну взаємодію з клітинними та тканинними бар'єрами рослини-хазяїна.

У межах родини *Alphaflexiviridae* *Allexivirus* має певні спільні риси з іншими родами, зокрема з *Potexvirus*, *Mandarivirus* і *Capillovirus*, однак відрізняється від них за окремими ознаками організації геному, колом хазяїв і механізмами передавання. Як і в *Potexvirus*, у *Allexivirus* наявні гени, що кодують реплікаційний поліпротеїн, білки TGB та білок оболонки [46-48]. Водночас *Potexvirus* часто має додаткову ORF, пов'язану з пригніченням РНК-сайленсингу [47]. Для *Mandarivirus* і *Capillovirus* характерна спрощеніша геномна організація: вони здебільшого кодують реплікаційний поліпротеїн і СР, але не мають повного набору білків TGB. Передача *Allexivirus* пов'язана переважно з кліщами і відбувається непостійним способом [38–41], тоді як інші роди родини можуть передаватися попелицями, білокрилками, механічним шляхом або шляхом вегетативного розмноження [49, 50]. Спектр хазяїв також істотно відрізняється: для *Allexivirus* типовими є рослини *Allium*, тоді як *Potexvirus* має ширший діапазон господарів, а *Mandarivirus* і *Capillovirus* зазвичай обмежуються іншими специфічними групами рослин [51, 52].

Таким чином, *Allexivirus* є окремою таксономічною групою рослинних РНК-вірусів із характерною геномною організацією, вузькою або помірно широкою спеціалізацією до рослин роду *Allium*, особливим типом передавання через еріофідових кліщів та вираженим фітопатогенним потенціалом. Їхнє значення визначається не лише біологічними властивостями, а й здатністю істотно впливати на продуктивність та якість сільськогосподарської продукції, що зумовлює необхідність подальшого вивчення їх поширення, різноманіття та методів діагностики.

РОЗДІЛ 2

ПОШИРЕННЯ ВІРУСІВ РОДІВ: *POTYVIRUS*, *CARLAVIRUS*, *ALEXIVIRUS*

Поширення вірусів, що уражують рослини роду *Allium*, має широкий географічний діапазон і водночас виражено нерівномірний характер. У різних країнах і навіть у межах однієї країни виявляють різні комбінації потивірусів, карлавірусів та аллексівірусів, а найвищі показники ураження зазвичай фіксують у культурних, вегетативно розмножуваних популяціях. У Чехії під час обстеження 883 рослин *Allium* із шести типів оселищ віруси виявили у 63,4% зразків; серед найчастіших були LYSV, GCLV, ShVX і OYDV, причому культурні види уражувалися значно частіше, ніж рослини дикого походження. В Австралії в комерційних посівах часнику більшість рослин мали принаймні один вірус із кожного з трьох досліджених родів, а в європейській колекції часнику всі 105 проаналізованих зразків були інфіковані різними вірусними комбінаціями. Це свідчить, що для *Allium*-рослин характерне формування стабільних вірусних комплексів, а не поодиноких інфекцій [3, 53, 54].

Серед представників роду *Potyvirus* для *Allium*-рослин найбільше значення мають Onion yellow dwarf virus (OYDV), Leek yellow stripe virus (LYSV) і, в окремих регіонах, Shallot yellow stripe virus (SYSV). У публікаціях підкреслюється, що LYSV уражує leek, garlic і onion у світовому масштабі, а філогенетичний аналіз глобальних ізолятів цього вірусу поділяє їх щонайменше на три основні групи – S, L і N. Для OYDV також описано широку присутність у виробничих зонах *Allium*, а в дослідженні комерційних посівів часнику в Австралії саме OYDV і LYSV належали до найчастіше виявлюваних вірусів. У чеському дослідженні OYDV і LYSV також були серед найпоширеніших патогенів, особливо у культурних зразках [53-57].

Для поширення потивірусів у системах *Allium*-рослин принципове значення має поєднання кількох шляхів збереження й перенесення інфекції.

Potyvirus загалом переважно передаються попелицями у непостійний спосіб, тобто без тривалої реплікації в організмі переносника. Для часнику додатково показано, що potyviruses можуть транслокуватися до справжнього насіння від інфікованої материнської рослини під час розвитку квітки та після запліднення; отже, навіть статеве розмноження не гарантує повного усунення інфекції. У сполученні з вегетативним розмноженням це створює умови для тривалого збереження вірусів у виробничих популяціях [40, 58]

Окремі дослідження також демонструють, що потивіруси здатні поширюватися в межах регіонів нерівномірно, залежно від культивара, джерела посадкового матеріалу та локальних агротехнічних практик. В австралійському дослідженні інфекція LYSV і OYDV істотно відрізнялася між штатом Квінсленд та іншими регіонами, що автори інтерпретували як наслідок не одного локального епіфітотичного процесу, а кількох незалежних занесень інфікованого матеріалу. Подібна логіка узгоджується з тим, що для часнику як вегетативно розмножуваної культури заражені цибулини та зубки фактично є основним інокулюмом для наступних генерацій [54, 59].

Отже, поширення *Potyvirus* у рослинах роду *Allium* слід розглядати як результат взаємодії широкого ареалу вірусів, афідного перенесення, можливого насінневого передавання для окремих ізолятів і багаторічного накопичення інфекції в вегетативно розмножуваному посадковому матеріалі. Саме тому OYDV і LYSV у більшості досліджень фігурують як одні з провідних вірусів *Allium*-агроценозів [40, 53, 54, 60]

Рід *Carlavirus* має добре задокументоване поширення в багатьох країнах, а для *Allium*-рослин найбільш значущими є Garlic common latent virus (GCLV) і Shallot latent virus (SLV). У класичному огляді та сучасніших дослідженнях підкреслюється, що ці віруси регулярно виявляють у часнику, цибулі та шалоті в різних регіонах світу, а в європейській колекції часнику з п'яти країн GCLV і SLV були присутні практично повсюдно: їх виявляли в більшості або всіх перевірених зразках залежно від методу діагностики. У цій самій роботі автори наголосили, що всі 105 зразків мали щонайменше одну вірусну інфекцію, а

GCLV і SLV стабільно входили до складу найтипівіших комплексів [3, 4].

В Австралії карлавіруси також були широко представлені в комерційних посівах часнику. Під час обстеження східноавстралійських полів GCLV і SLV виявлялися часто, а їх частота варіювала між штатами та культиварами. Автори відзначили, що така неоднорідність відповідає картині множинних занесень вірусів разом із рослинним матеріалом, а не лише локальному поширенню в межах окремого господарства. Подібні дані важливі тим, що вони показують: навіть латентні карлавірусні інфекції не залишаються статичними, а можуть накопичуватися в системах, де посадковий матеріал регулярно відбирають і повторно використовують [54].

У Центральній Європі та суміжних регіонах карлавіруси також є типовою складовою вірусного комплексу *Allium*-рослин. У дослідженні в Чехії GCLV належав до вірусів, які виявляли найчастіше серед культивованих видів, а серед усіх зразків спостерігали високу частоту змішаних інфекцій. У дослідженні в Угорщині, де аналізували вірусні хвороби часнику, усі проаналізовані зразки були інфіковані принаймні одним вірусом, а серед ідентифікованих патогенів були LYSV, GCLV, SLV і кілька аллексівірусів; при цьому саме аллексівіруси переважали, але карлавіруси залишалися постійною частиною комплексу. Така повторюваність у різних країнах свідчить, що GCLV і SLV давно інтегровані в глобальну вірусну популяцію *Allium*-культур [4, 53]

Для карлавірусів характерна переважно векторна передача попелицями, а також дуже тісний зв'язок із вегетативним розмноженням хазяїв. У системах часнику і шалоту це означає, що інфекція здатна підтримуватися навіть без вираженої симптоматики, оскільки латентний перебіг не перешкоджає подальшому поширенню через посадковий матеріал. Саме тому в практичних дослідженнях карлавіруси часто виявляють не окремо, а в поєднанні з потивірусами та аллексівірусами, формуючи стабільний багатокомпонентний вірусний комплекс [54].

Таким чином, поширення *Carlavirus* у *Allium*-рослин є результатом їх

широкої присутності в міжнародному посадковому матеріалі, частого латентного перебігу, повторного використання інфікованих цибулин і, у загальному для роду плані, афідного перенесення. Для досліджень часнику та цибулі це означає, що GCLV і SLV слід розглядати як постійні елементи вірусного фону, а не як випадкові патогени.

Рід *Allexivirus* є одним із найхарактерніших компонентів вірусного комплексу часнику та інших *Allium*-рослин. У сучасному огляді підкреслено, що цей рід уперше був описаний у 1970 році, а згодом його представників виявили в багатьох країнах. Хоча основними хазяями є рослини родини *Amaryllidaceae*, окремі види або ізоляти описано також у *Fabaceae*, *Rosaceae* та *Orchidaceae*. На цей час описано тринадцять видів аллексівірусів, з яких вісім пов'язані з *Allium*-хазяями: ShVX, GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E, GarV-X та GarMbFV. Така таксономічна й господарська структура показує, що саме *Allium*-рослини є головною екологічною нішею для більшості представників роду [61].

Практично у всіх великих польових і колекційних дослідженнях аллексівіруси демонструють високу частоту виявлення. У європейській колекції часнику з п'яти країн перевіряли також GarV-A, GarV-B і GarV-C; автори показали, що ураження цими вірусами є дуже поширеним, а їх елімінація методом меристемної культури відбувається зі змінною ефективністю. В австралійських комерційних посівах часнику GarVA, GarVB, GarVC і GarVX виявляли в усіх обстежених районах, хоча їх частота відрізнялася між регіонами та сортами. Автори зробили висновок, що така географічна варіабельність найкраще узгоджується з кількома незалежними занесеннями інфікованого матеріалу [54].

У дослідженні *Allium*-рослин у Чехії аллексівіруси також були дуже поширеними. Автори показали, що склад представників роду істотно відрізнявся залежно від таксономічної групи хазяїв та типу оселища, а в природних популяціях дикого походження рівень інфекції був нижчим, ніж у культурних рослин. Водночас змішані інфекції були поширені: у роботі

описано, що вони траплялися у 51,1% аналізованих рослин, а серед комбінацій часто поєднувалися GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, ShVX, LYSV, GCLV і SLV. Це свідчить, що аллексівіруси рідко функціонують як одиничний патоген і частіше входять до складу складних вірусних асоціацій [53].

Важливим чинником поширення аллексівірусів є їхнє перенесення еріофіїдовими кліщами, насамперед *Aceria tulipae*. У літературі зазначено, що для *Allium*-інфікуючих аллексівірусів доведено передавання кліщами, а експериментальні роботи показали семіперсистентний характер такого перенесення. Паралельно з векторною передачею суттєве значення має поширення через інфікований посадковий матеріал: саме так віруси зберігаються в системах вирощування часнику та шалоту, де одна й та сама лінія матеріалу проходить багато поколінь вегетативного розмноження. Сукупність цих механізмів пояснює, чому аллексівіруси часто переважають у вірусному комплексі часнику в окремих країнах і районах [62, 63].

У дослідженні, проведеному в Угорщині, саме аллексівіруси виявилися домінантними, зокрема GarVD, тоді як LYSV, GCLV і SLV також були присутні у вірусному комплексі. Така картина є показовою, оскільки демонструє, що в реальних польових умовах різні роди вірусів не лише співіснують, а й формують стійкі регіональні комплекси з різною часткою кожного компонента. У практичному сенсі це означає, що діагностика лише одного вірусу не відображає справжньої епізоотичної ситуації в посівах *Allium* [4].

Для *Potyvirus*, *Carlavirus* і *Allexivirus* спільним є те, що їхнє поширення в *Allium*-агроценозах підтримується поєднанням біології переносників, особливостей рослини-хазяїна та міжнародного обігу посадкового матеріалу. У дослідженні на імпортованих до Австралії цибулинах часнику, які походили з Китаю, США, Мексики, Аргентини та Іспанії, виявили стійке інфікування одним або кількома РНК-вірусами після багатьох вегетативних генерацій. Це демонструє, що вірусні комплекси здатні зберігатися і переміщуватися між континентами разом із рослинним матеріалом. У поєднанні з місцевими

векторами – попелицями для потивірусів і карлавірусів та еріофіїдовими кліщами для аллексівірусів – це формує умови для стабільної циркуляції всіх трьох родів у виробничих системах [40, 62, 63].

З практичної точки зору найбільше епідеміологічне значення мають не поодинокі інфекції, а саме змішані варіанти зараження. Для часнику, цибулі, шалоту й порею типовими є поєднання OYDV або LYSV з GCLV, SLV і різними аллексівірусами, а в окремих роботах описано також комбінації з трьох, чотирьох і більше вірусів в одному рослинному організмі. Саме такий багатокomпонентний характер інфекції ускладнює оцінку реальної поширеності окремих вірусів і пояснює, чому серологічні та молекулярні методи діагностики мають застосовуватися разом.

Отже, поширення родів Potyvirus, Carlavirus і Allexivirus у Allium-рослин є глобальним, але неоднорідним за регіонами та господарями. Potyvirus представлені насамперед OYDV і LYSV; Carlavirus – GCLV і SLV; Allexivirus – групою вірусів часнику та шалоту, серед яких особливо часто виявляють GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D і ShVX. Усі три роди найчастіше циркулюють не поодинокі, а у складі змішаних інфекцій, що підтримуються вегетативним розмноженням, переміщенням зараженого матеріалу та, залежно від роду, відповідними переносниками. Саме ця біологічна й епідеміологічна особливість визначає високу стійкість вірусних комплексів у системах вирощування Allium-рослин.

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Метод імуноферментного аналізу в модифікації DAS-ELISA

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.

3.2. Метод виділення тотальної 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.

3.3. Метод електрофорезу 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 бромистого 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-трансілюмінатор.

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

3.4. Метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією

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: зворотну 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 алексівірусу

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 (~95°C) для розділення ланцюгів ДНК.

Відпал: температуру було знижено, щоб праймери могли специфічно зв'язуватися з комплементарними послідовностями на вірусній ДНК (~50-65°C).

Подовження: температуру підвищили для ДНК-полімерази, щоб подовжити нові ланцюги ДНК з праймерів (~72°C).

3.5. Методи статистичної обробки результатів

Для аналізу даних використовувалися формули середнього арифметичного: $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$ та стандартного відхилення генеральної сукупності: $\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$, де σ – величина стандартного відхилення генеральної сукупності, та n – об'єм вибірки.

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

4.1. Ідентифікації вірусів роду *Allexivirus* за допомогою ІФА

У ході дослідження, проведеного із застосуванням імуноферментного аналізу за методом DAS-ELISA, було проаналізовано 47 зразків рослин роду *Allium*, відібраних із різних польових ділянок. Основною метою даного етапу роботи було виявлення наявності вірусних інфекцій, асоційованих із представниками роду *Allexivirus*, які є поширеними патогенами цибулинних культур та можуть суттєво впливати на їх продуктивність.

Отримані результати свідчать про неоднорідний рівень інфікованості досліджуваних зразків. Зокрема, встановлено, що 17% зразків (8 із 47) не містили вірусів роду *Allexivirus*. Водночас у більшості зразків було виявлено наявність вірусної інфекції різного типу. Найбільш поширеним виявився Garlic Virus B (GVB), який було ідентифіковано у 40% зразків (19 із 47). Дещо нижчий рівень поширення продемонстрував Garlic Virus C (GVC), виявлений у 28% зразків (13 із 47). Найменшу частку серед детектованих вірусів становив Shallot Virus X (ShVX), який було зафіксовано у 15% зразків (7 із 47).

Таким чином, результати ІФА-аналізу вказують на значну поширеність вірусів роду *Allexivirus* серед досліджуваних рослин, а також дозволяють оцінити співвідношення окремих вірусних агентів у вибірці (рис. 4.1)

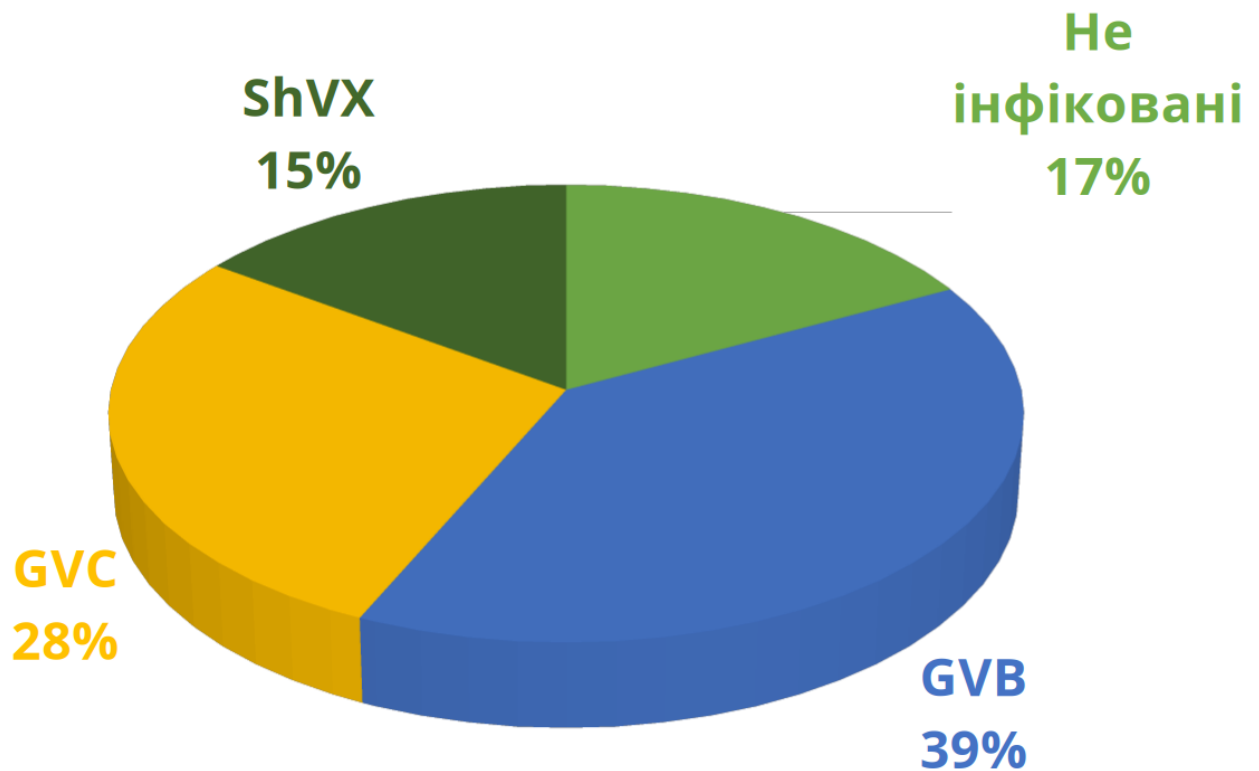


Рис.4.1. Кругова діаграма, що відображає скільки було знайдено вірусів у зразках

Аналіз поширення вірусів у розрізі окремих регіонів продемонстрував суттєву варіабельність рівнів інфікованості досліджуваних зразків. Зокрема, у Черкаській області серед 8 проаналізованих зразків лише по одному випадку було зафіксовано для вірусів GVB та GVC, тоді як переважна більшість зразків (6 із 8) виявилися неінфікованими представниками роду *Allexivirus*. У Полтавській області всі досліджені зразки (3 із 3) не містили ознак вірусної інфекції.

Натомість у Київській області зафіксовано значно вищий рівень інфікованості: із 18 досліджених зразків 8 були уражені вірусом GVB, 7 – GVC, а ще 4 – ShVX, що свідчить про циркуляцію кількох типів вірусів у межах регіону. У Закарпатській області серед 5 зразків переважали інфекції GVB (3 випадки) та GVC (2 випадки), при цьому вірус ShVX у жодному зі зразків не був виявлений.

В Одеській області також спостерігалася наявність усіх трьох досліджуваних вірусів: із 11 зразків 5 були інфіковані GVB, 3 – GVC, і ще 3 –

ShVX, що вказує на відносно високу різноманітність вірусних агентів у даному регіоні. У Запорізькій області обидва досліджені зразки (2 із 2) виявилися інфікованими вірусом GVB.

Таким чином, отримані дані (табл. 4.1) свідчать про нерівномірний характер поширення вірусів роду *Allexivirus* у різних регіонах, із чіткою тенденцією до домінування вірусу GVB у більшості проаналізованих областей.

Ідентифікація алексівірусів методом ІФА

Таблиця 4.1.

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.

4.2. Визначення видового складу вірусів роду *Carlavirus* серед рослин роду *Allium* в Україні

Відомо, що часник та інші споріднені цибулеві культури уражаються кількома представниками роду *Carlavirus*, серед яких GCLV та Shallot latent virus (SLV) займають провідне місце. За даними багатьох досліджень, GCLV розглядають як один із найпоширеніших карлавірусів часнику, що часто реєструється поряд зі SLV у багатьох регіонах вирощування *Allium*-культур. Особливістю GCLV є його здатність інфікувати не лише часник (*Allium sativum*), але й інші види роду *Allium*, зокрема цибулю ріпчасту (*Allium cepa*), порей (*Allium porrum*) та шніт-цибулю (*Allium schoenoprasum*), що свідчить про широку біологічну пластичність вірусу та його адаптивність до різних господарських рослин.

З огляду на актуальність проблеми поширення карлавірусів у сільськогосподарських культурах України, метою нашого дослідження було визначення видової структури карлавірусних інфекцій у колекції зразків рослин роду *Allium*, відібраних у різних регіонах країни. Для досягнення поставленої мети було здійснено комплексний аналіз результатів серологічних тестів за методом ELISA, а також молекулярної діагностики методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із зворотною транскрипцією для виявлення вірусів GCLV, SLV та потенційно супутніх фітовірусів, що інфікують цибулеві культури.

За сукупними результатами дослідження ($n = 110$ зразків) позитивне визначення наявності GCLV спостерігалось у 39 випадках, що становить 35,5% досліджених зразків. У свою чергу, присутність SLV була зафіксована у 58 зразках, що відповідає частоті 52,7%. При цьому тест вважався позитивним у випадках наявності специфічного ампліфікату цільової послідовності вірусу у реакційній суміші, що відповідало інтерпретації результату як «+» або «+–» за результатами ПЛР-аналізу.

Отримані частоти виявлення вірусів SLV і GCLV серед зразків *Allium*-

культур в Україні є суттєво нижчими порівняно з аналогічними даними, наведеними у ряді європейських досліджень. Наприклад, у великій колекції європейського часнику GCLV і SLV виявлялися у $\approx 89\text{--}90\%$ протестованих проб, що свідчить про набагато вищий рівень інфекційного навантаження на посадковий матеріал. Зазначену відмінність можна пояснити рядом факторів: по-перше, ширшим спектром видів рослин у складі нашої вибірки, яка включала не лише часник, а й інші види роду *Allium*; по-друге, різними умовами відбору та обробки зразків, що могли вплинути на ефективність виявлення латентних інфекцій.

Таким чином, результати дослідження вказують на порівняно помірне поширення карлавірусних інфекцій серед *Allium*-культур в Україні, однак з урахуванням латентного перебігу захворювань і можливості кумулятивного вірусного навантаження ці дані потребують подальшого моніторингу та розширеного тестування у більш репрезентативних вибірках [3].

Серед різних видів *Allium* найвищий рівень інфікування SLV був зафіксований у часнику (*Allium sativum*). Із 62 досліджених зразків часнику позитивними щодо наявності SLV виявилися 41, що становить 66,1%. Це свідчить про високу поширеність вірусу саме серед комерційно важливих форм *Allium*, які культивуються в Україні.

Крім того, SLV був широко представлений в інших цибулевих культурах. Усі чотири протестовані зразки цибулі шалоту (*Allium cepa* var. *aggregatum*) виявилися позитивними на SLV, що відповідає 100% рівню інфікування. Подібна ситуація спостерігалася і серед мускусної цибулі (*Allium ampeloprasum*), де 3 з 4 протестованих зразків (75%) містили SLV. Це узгоджується з наявними літературними даними, які вказують на високу спорідненість цибулі шалоту та мускусної цибулі із часником за спектром ураження латентними вірусами.

Натомість у ріпчастій цибулі (*Allium cepa* var. *sepa*) частота виявлення SLV була значно нижчою: лише 7 з 36 досліджених зразків ($\sim 19\%$) дали позитивні результати. Цей факт може бути пов'язаний із меншою

спорідненістю цієї форми цибулі до класичних шляхів передачі SLV або з можливим впливом генетичних особливостей даного виду на ефективність вірусного інфікування.

Окремої уваги заслуговують поодинокі випадки інфікування інших видів *Allium*. Так, у шніт-цибулі (*Allium schoenoprasum*), цибулі-ліхтарику (*Allium fistulosum*) та проліскаскородушці (*Allium scorodoprasum*) кожен досліджений зразок (1/1) виявився позитивним на SLV. Незважаючи на обмежену кількість протестованих рослин, дані свідчать про те, що господарський спектр SLV охоплює широкий ряд видів роду *Allium*, включаючи як культурні, так і напівкультурні або дикорослі форми.

У свою чергу, інфікування GCLV мало інший розподіл серед досліджених видів. Виявлено, що GCLV майже виключно асоційований із часником і близькими видами. Так, 36 із 62 зразків часнику (58,1%) були позитивними на GCLV, що підкреслює тісний зв'язок цього вірусу саме із даним видом *Allium*. Подібно до цього, серед чотирьох досліджених зразків мускусної цибулі три (75%) містили GCLV, що також свідчить про наявність природної схильності до інфікування у цього виду.

На відміну від цього, в жодному зі зразків ріпчастої цибулі (*A. сера* var. *сера*) та шалоту (*A. сера* var. *aggregatum*) не було виявлено присутності GCLV (0/36 та 0/4 відповідно). Це може свідчити або про обмежену природну сприйнятливість цих форм до GCLV, або про відмінності у шляхах передачі та механізмах зараження.

Інші види *Allium* давали лише поодинокі позитивні результати щодо GCLV (не більше одного позитивного випадку на вид). Така картина добре узгоджується з відомими літературними даними, які підкреслюють, що GCLV традиційно асоціюється передусім із часником, тоді як у ріпчастій цибулі або інших менш спеціалізованих видах цей вірус зустрічається значно рідше або практично не фіксується.

Таким чином, результати нашого дослідження підтверджують, що SLV має ширший спектр потенційних господарів серед *Allium*-рослин, тоді як

GCLV демонструє вузьку спеціалізацію, переважно асоційовану з часником та його близькими родичами.

При розподілі за регіонами також виявлено значну варіабельність. Так, у Полтавській області у всіх 11 досліджених проб було зафіксовано SLV (100%), водночас GCLV відсутній. У Київській області SLV виявили у 19 з 33 зразків (57,6%), GCLV – у 11 з 33 (33,3%). Навпаки, у Вінницькій області GCLV виявився частіше (11 з 17, 64,7%), ніж SLV (3 з 17, 17,6%). У Черкаській області SLV зустрічався у 10 з 17 (58,8%), GCLV – у 2 з 17 (11,8%). У інших регіонах (Одеська область – 8/16 SLV; Тернопільська область– 3/6 GCLV тощо) також спостерігалися різні співвідношення.

Сумарно можна констатувати, що серед карлавірусів у досліджуваному матеріалі SLV зустрічався найчастіше, а GCLV – дещо рідше. Отримані дані підтверджують, що SLV відіграє значну роль у комплексі вірусних захворювань цибулевих культур, заражаючи як часник, так і різні види цибулі. GCLV, хоча й поширений широко в часнику, є менш частим інфекційним агентом у інших видах цибулевих. Ці висновки узгоджуються з літературними даними про часту присутність SLV і GCLV у зразках *Allium* по всьому світу [3]. У результаті аналізу встановлено, що більше ніж у 50% зразків рослин виявлено SLV і значна (але менш ніж 40%) – GCLV. Ці дані можуть бути використані для подальшого моніторингу та розробки заходів боротьби з вірусними хворобами рослин роду *Allium*.

4.3. Встановлення змішаної вірусної інфекції серед рослин роду *Allium*

Усього в дослідженні було 110 зразків рослин роду *Allium*. З них 70 зразків (63,6 %) містили дві або більше вірусних інфекцій одночасно. Серед найпоширеніших комбінованих інфекцій були одночасні виявлення GCLV і SLV (28 випадків) та OYDV і SLV (11 випадків). Також у чотирьох пробах одночасно виявлено чотири віруси (LYSV, OYDV, GCLV і SLV). Інші випадки

змішаних інфекцій включали LYSV+OYDV (10 зразків), GCLV+GVB (3 зразки) та інші комбінації. Моноінфекції (лише один вірус) становили 36,4 % зразків. Загальний розподіл кількості вірусів на зразок, а також їх комбінацій, ілюструє діаграма на рисунку 4.2.

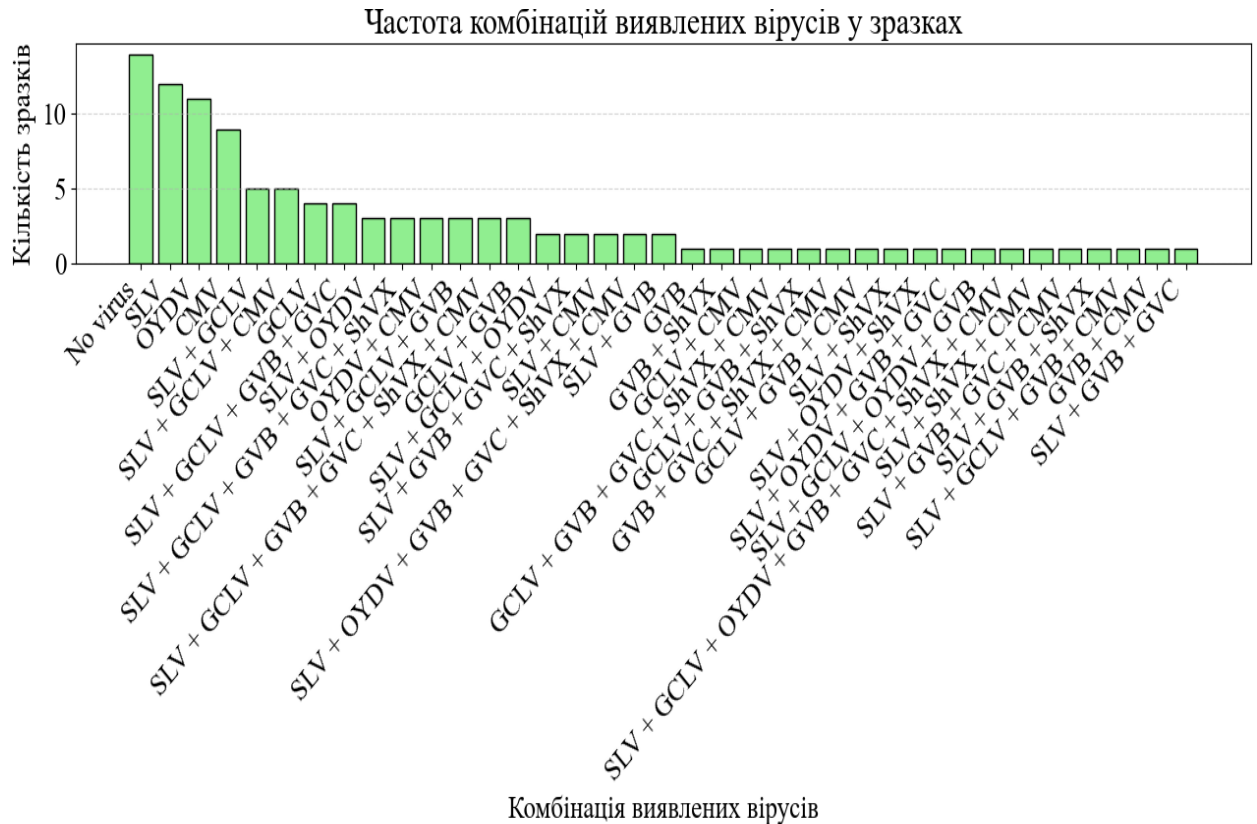


Рис. 4.2. Частота випадків залежно від комбінацій виявлених вірусів у зразках рослин роду *Allium*

На діаграмі представлено розподіл комбінацій фітовірусів, виявлених у проаналізованих зразках рослин роду *Allium* за результатами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Кожен стовпчик відповідає певному варіанту інфікування, що включає один або кілька вірусів, зокрема SLV, GCLV, OYDV, GVB, GVC, ShVX, CMV та IYSV. Вісь абсцис містить скорочені позначення відповідних комбінацій вірусів, які були одночасно виявлені в окремому зразку. Вісь ординат відображає кількість зразків, у яких була зафіксована кожна з цих комбінацій.

Аналіз діаграми дозволяє оцінити поширеність як монокомпонентних, так

і змішаних вірусних інфекцій серед досліджуваних рослин. Найчастіше трапляються поєднання SLV та GCLV, що узгоджується з відомими літературними даними про синергічний ефект цих карлавірусів. Також відзначено наявність великої кількості зразків із двома або трьома вірусами одночасно, що свідчить про значну частоту змішаних інфекцій у популяціях *Allium*-культур. Наявність зразків, де не виявлено жодного вірусу (“No virus”), може бути обумовлена як справжньою відсутністю інфекцій, так і обмеженою чутливістю методів детекції або низьким титром вірусів у тканинах.

Дані, представлені на рисунку, підкреслюють важливість комплексного вірусологічного моніторингу з урахуванням потенційного полівірусного зараження, що має безпосередній вплив на якість та врожайність *Allium*-культур.

За видами рослин значно відрізнялася частота змішаних інфекцій. Найбільший відсоток змішаних заражень виявлено у *Allium sativum* (часник) – 51 із 62 проб (82,3 %) були одночасно інфіковані кількома вірусами. У *A. sepa* var. *sepa* (цибуля ріпчаста) цей показник був значно нижчий: лише 12 з 36 проб (33,3 %) мали змішане інфікування. Серед менш численних груп слід відзначити *A. ampeloprasum* та *A. sepa* var. *aggregatum* – кожен мав по 4 проби, з них по 3 із змішаними інфекціями (75 %). Єдиний зразок *A. schoenoprasum* (цибуля шніт) мав дві різні інфекції (SLV і CMV) – тобто 100 %. Навпаки, по одному зразку *A. fistulosum*, *A. scorodoprasum* і *A. tuberosum* дали поодинокі випадки з одним вірусом та не містили змішаних інфекцій. Рисунок 4.3. демонструє – частота змішаних інфекцій (%) серед основних видів *Allium*.

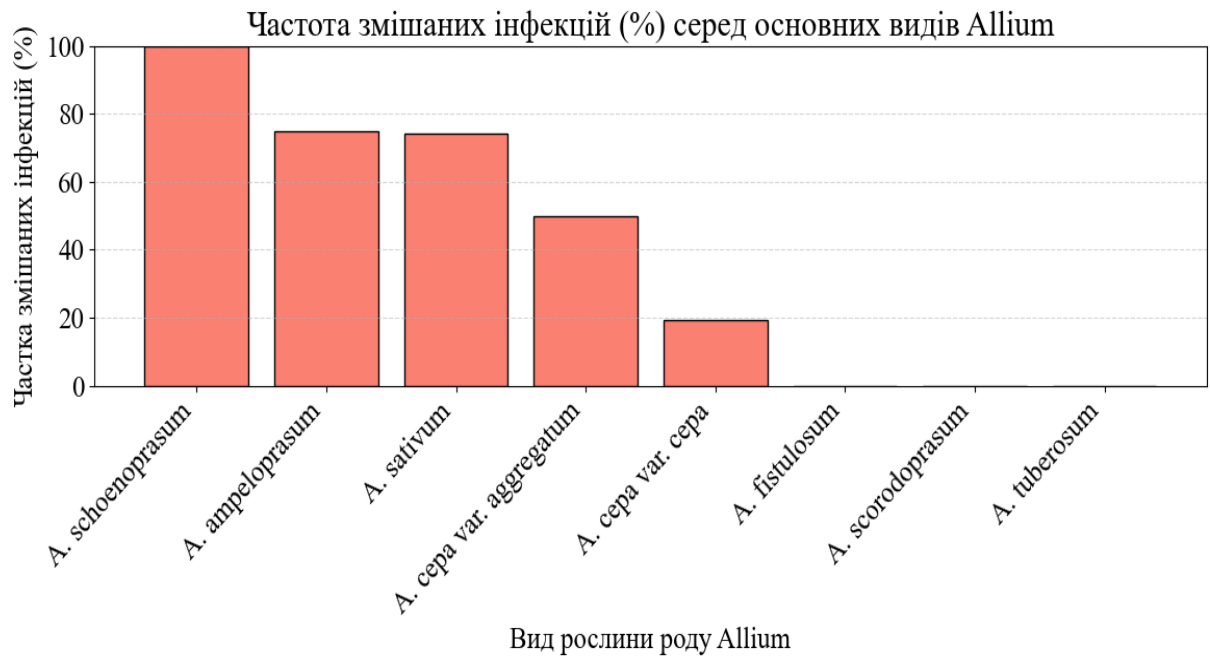


Рис. 4.3. Частота змішаних інфекцій (%) серед основних видів

На рисунку представлено розподіл частоти змішаних інфекцій серед основних видів рослин роду *Allium*, досліджених у рамках даної роботи. Змішаною інфекцією вважалася наявність двох або більше вірусів у межах одного зразка, що визначалося за результатами ПЛР-аналізу.

Результати свідчать, що найвищий рівень змішаних інфекцій було зафіксовано у зразках *A. schoenoprasum* (100 %), *A. ampeloprasum* (75 %) та *A. sativum* (74,2 %). Значна частка інфікованих зразків спостерігалася також серед *A. cepa var. aggregatum* (50 %), тоді як у зразках *A. cepa var. cepa* рівень змішаних інфекцій становив лише 19,4 %.

Натомість серед деяких менш поширених або дикорослих форм *Allium*, таких як *A. fistulosum*, *A. scorodoprasum* та *A. tuberosum*, не було зафіксовано жодного випадку змішаної інфекції. Це може бути зумовлено як меншим розміром вибірки для цих видів, так і потенційною видовою несприйнятливістю до одночасного ураження кількома вірусами.

Отримані дані вказують на нерівномірний розподіл полівірусних уражень серед представників роду *Allium* і підкреслюють важливість фітосанітарного контролю особливо для культурних форм, таких як *A. sativum* та *A. cepa*.

Аналіз за регіонами (областями) показав нерівномірний розподіл змішаних заражень. Найвищий відсоток проб зі змішаними інфекціями спостерігався у пробах із Одеської (13 з 16, 81,3 %) та Вінницької (14 з 17, 82,4 %) областей. Всі проби з Запорізької області (3 зразки) також містили дві або більше інфекцій. Показники Київської області склали 19 з 33 (57,6 %), Полтавської – 7 з 11 (63,6 %), Черкаської – 8 з 17 (47,1 %). Менш репрезентативними були Закарпатська (5 проб, з них 3 змішані, 60 %) та Тернопільська (6 проб, з них 3 змішані, 50 %) області. Поодинокі проби із Миколаївщини не показали змішаних інфекцій. Регіональний розподіл можна звести в діаграму що представлена на рисунку 4.5.

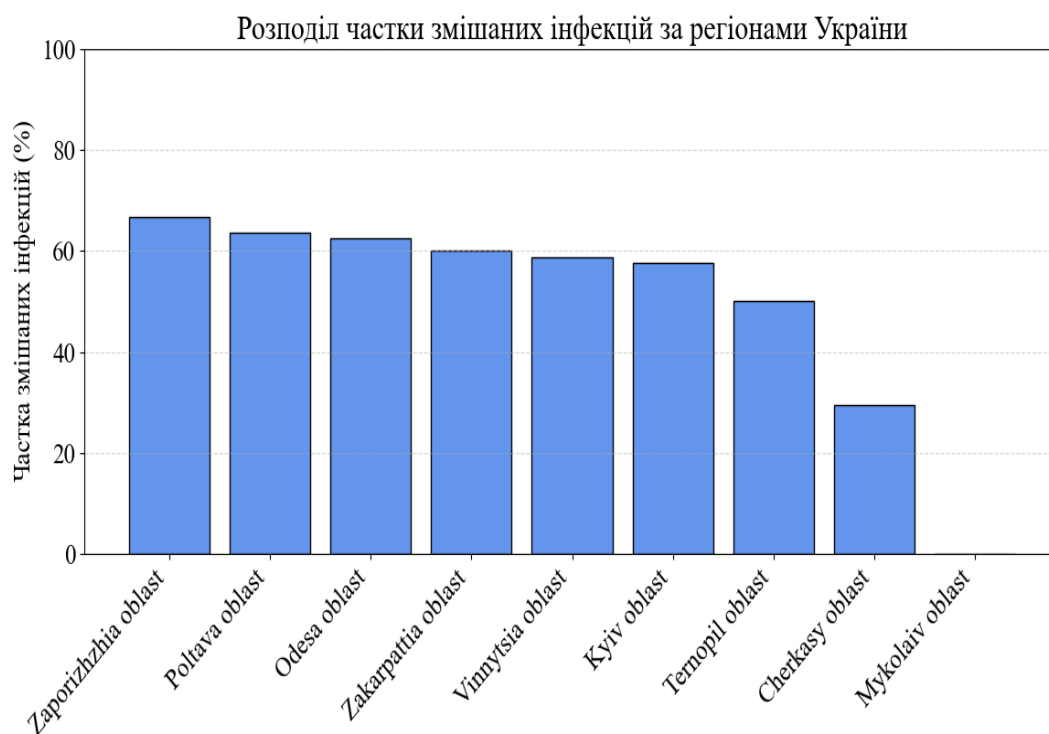


Рис. 4.5. Розподіл частки змішаних інфекцій (%) за регіонами України

На рисунку представлено частку зразків рослин роду *Allium*, у яких було виявлено змішані вірусні інфекції (наявність двох або більше вірусів), у розрізі адміністративних регіонів України. Дані базуються на результатах ПЛР-діагностики фітовірусів, проведеної для колекції зразків, зібраних у межах дослідження.

Загалом 63,6 % від усієї сукупності аналізованих зразків ($n = 110$) мали ознаки змішаних вірусних інфекцій (тобто ≥ 2 різних віруси одночасно). Цей високий показник свідчить про поширеність ко-інфекцій в культури *Allium*, особливо у часнику. Графічно цю величину можна було спостерігати на рисунку 3.1.

Найчастіше множинне зараження спостерігалось у городу (*A. sativum*) – часник: серед вибірки цього виду понад 80 % проб мали одразу декілька вірусів. У цибулі ріпчастій (*A. сера* var. *сера*) змішані інфекції виявлені значно рідше (~33 %), що може бути пов'язано з характером поширення шкідників або з методологією відбору зразків.

Деякі поодинокі випадки мають складні комбінації: наприклад, в одному зразку часнику з Закарпатської області було виявлено відразу 8 вірусів (CMV, GCLV, GVB, GVC, LYSV, OYDV, SLV, ShVX).

Усі три проби з Запорізької області містили кілька вірусів одночасно (максимум три). Проби з Вінницької та Одеської областей також мали надзвичайно високі частки ко-інфекцій (>80 %).

Деякі види роду *Allium* (наприклад, *A. schoenoprasum* – цибуля шніт) були представлені малою кількістю зразків, але показали 100 % змішані інфекції.

Наші дані про високий відсоток змішаних вірусних інфекцій у *Allium* (цибуля, часник) узгоджуються з результатами одного дослідження [3]. В дослідженні виявили, що серед 105 зразків європейського часнику жодного вірусу-вільного рослини не було, тобто всі аналізовані рослини мали подвійні й більш комплексні інфекції [3]. В цьому ж дослідженні повідомляють, що частка змішаних інфекцій у різних країнах перебувала в діапазоні від 21% (Чехія) до 100% (Польща) [3]. У Польщі, наприклад, всі досліджені екземпляри часнику були інфіковані п'ятьма вірусами одночасно [3]. Ці дані підтверджують загальну тенденцію: змішані інфекції у культур *Allium* мають дуже поширений характер у світі (особливо в часнику), що повністю відповідає нашим спостереженням високої частоти мікс-інфекцій. Mang et al. також відзначають, що найскладніші, п'ятикомпонентні інфекції

(OYDV+LYSV+SLV+GCLV+GarV-A/B/C) становили 59–100% в окремих країнах, що узгоджується з тим, що й у нашій роботі більшість уражених рослин мала більше двох вірусів [3].

Інший приклад – дослідження в Ефіопії, де виявили змішану інфекцію у 65.7% зразків культивованого часнику [64]. Вони виявили, що 73.7% відбірних зразків містили хоча б один вірус (найпоширеніший – OYDV), а співзустріч двох і більше вірусів мала величину $\approx 65.7\%$ [64]. Таким чином, частота мікс-інфекцій в ефіопському часнику була також дуже високою. І співавт. підкреслюють, що в сумісних інфекціях часто зустрічаються зв'язані з ними алексівіруси та карлавіруси, що збільшує агрономічну шкоду. Це узгоджується з нашими результатами: незалежно від регіону, віруси *Potyvirus* (зокрема, OYDV і LYSV) практично у всіх випадках супроводжуються вторинними інфекціями з іншими родами вірусів, що призводить до змішаних комплексів.

В іншому дослідженні дослідили цибулю, часник і цибулю-порей у Туреччині і також відзначили значну частку спільних інфекцій. У їхньому зразку (N=494 рослини) 95 рослин були інфіковані лише OYDV, 52 – лише LYSV, а 33 ($\approx 6.7\%$) – одночасно двома вірусами (OYDV + LYSV) [55]. Хоч загальний відсоток подвійного зараження тут менший, ніж у більшості прикладів із часником, цей приклад свідчить: хоча найпоширенішими були окремі інфекції OYDV чи LYSV, певна частина рослин мала змішані інфекції саме цих двох потентних вірусів [55]. Порівняно з нашими даними, де змішані інфекції також траплялися найчастіше серед сумішей вірусів (LYSV+OYDV) та їх поєднання з іншими родинами, турецькі результати вказують на подібну тенденцію: OYDV та LYSV часто ідуть “пліч-о-пліч”, що потребує інтегрованого контролю.

Підтвердженням є і польське дослідження щодо алексівірусів часнику. Вони вказали, що GarV-D, GarV-X, GarV-B були найпоширенішими і зустрічалися в 84%, 67% і 54% зразків відповідно [65]. Крім того, дослідники повідомляють, що алексівіруси в зразках були переважно змішані, тобто жоден із цих вірусів не виявлений ізольовано – алексівірусні інфекції завжди

виявлялись разом (в комплексі). Це цілком узгоджується з нашими спостереженнями, що наявність будь-якого алексівірусу майже автоматично поєднується з іншими вірусами в рослинах *Allium* [65].

Важливо зазначити, що у культурних регіонах змішані інфекції можуть траплятись рідше або по-іншому. ще в одному дослідженні проаналізували японський часник і виявили, що тільки 2 з 40 рослин (5%) мали одночасно дві форми LYSV (тип N і S) [66]. Це свідчить, що у даному випадку два ізольовані підтипи одного вірусу майже не співіснували в одній рослині. Проте ця рідкість змішаних інфекцій у Японії швидше є винятком через особливості локальної популяції та умов передачі (наприклад, зміни у P1-генах LYSV), ніж правилом. Загалом, усі наведені дослідження показують: частота та склад змішаних інфекцій *Allium* у світі досить варіабельні та залежать від регіону, виду господаря і специфіки поширених вірусів [66]. Однак наші результати загалом узгоджуються з літературою: змішані інфекції *Allium* є звичним явищем і зазвичай трапляються із значно вищою частотою, ніж поодинокі, особливо в часнику та цибулі (сумісні інфекції наземних вірусів рідко виявляються “поодинокі” у рослині).

4.4. Підготовка вірусних ізолятів для секвенування

Відбір вірусних ізолятів для секвенування проводився у декілька етапів. На початковому етапі всі зразки рослинного матеріалу скринінгувались методом DAS-ELISA, який широко використовується для виявлення вірусних антигенів [67]. Подібний підхід із ELISA застосовували і в інших дослідженнях для виявлення алексі- та потивірусів у цибульних культурах [68] Інтенсивність оптичного сигналу в ІФА корелює з вмістом вірусу у пробі: високі показники оптичної щільності свідчать про великий вміст вірусних частинок [67]. Таким чином до наступного етапу відбиралися ті проби, які давали найбільш виражений ІФА-сигнал.

З ІФА-позитивних зразків екстрагували вірусну РНК і проводили ЗТ-ПЛР з універсальними (degenerate) праймерами [68]. ПЛР-ампліфікація є високочутливою методикою, яка дозволяє підсилювати й виявляти цільові фрагменти вірусної РНК навіть при низькому початковому титрі [67].

Остаточний вибір ізолятів здійснювався за подвійними критеріями: проба мала одночасно мати високу інтенсивність реакції ELISA та позитивний результат ЗТ-ПЛР. Це гарантувало відбір ізолятів, в яких вірусна інфекція була підтверджена обома методами.

Після RT-PCR продукти ампліфікації були розділені в агарозному гелі і результати візуалізовані під УФ-світлом, результат можна спостерігати на рисунку 4.6.

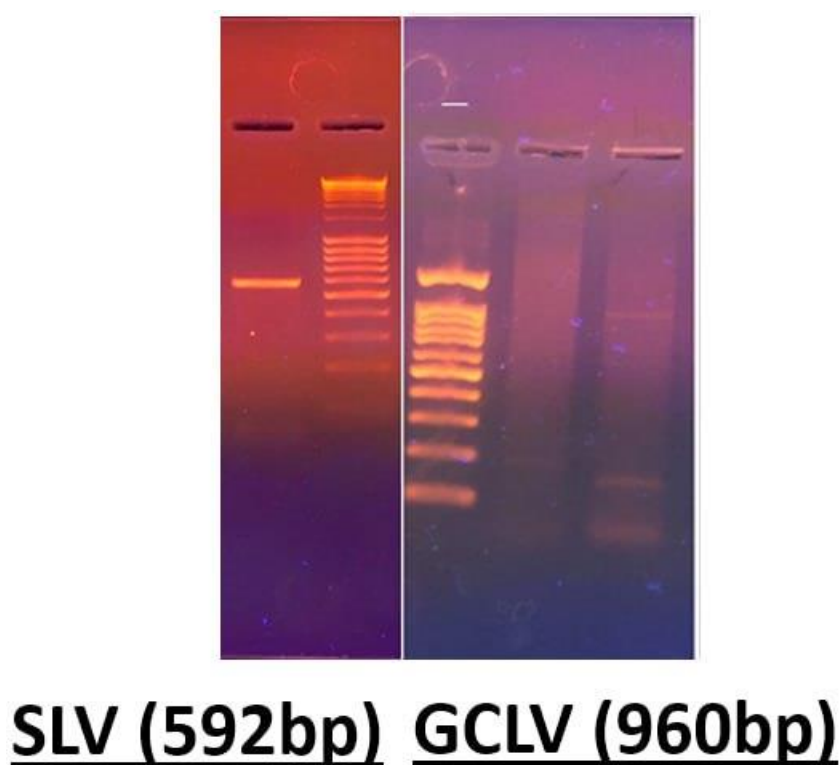


Рис. 4.6. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР (ДНК маркер 100по).

На рисунку: Ліворуч (592 bp) – специфічний фрагмент SLV, виявлений у зразку цибулі (*Allium cepa*) з Черкаської області. Праворуч (960 bp) – специфічний фрагмент GCLV, виявлений у зразку часнику (*Allium sativum*) з Вінницької області.

У результаті описаної процедури було відібрано 2 вірусних ізолята,

отриманих із уражених рослин роду *Allium*, які відповідали зазначеним критеріям.

На рисунках 4.7 та 4.8 наведено результати аналізу методом зворотної транскрипції з подальшою полімеразною ланцюговою реакцією, спрямованого на виявлення вірусів у рослинних зразках. Даний підхід дозволяє ідентифікувати наявність вірусного генетичного матеріалу навіть за його низької концентрації, що забезпечує високу чутливість і специфічність.

Зокрема, на рисунку 4.7 представлено результати аналізу зразків часнику, відібраних у Запорізькій та Київській областях, із використанням праймерів, специфічних до гена капсидного білка вірусу GV-B. У досліджуваних зразках виявлено ампліфікований фрагмент довжиною 576 пар нуклеотидів, що відповідає очікуваному розміру цільового продукту. Наявність чітко вираженої смуги відповідної довжини на електрофореграмі свідчить про присутність вірусу GV-B у проаналізованих рослинних зразках, підтверджуючи їх інфікованість. На рисунку 4.7. наведено електрофореграму продуктів ЗТ-ПЛР, отриманих із використанням праймерів до вірусу GV-B (576 п.н.). Трек 36 відповідає зразку часнику, відібраному в Запорізькій області, тоді як трек 43 – зразку з Київської області. Як молекулярний маркер довжини (М) використано ДНК-лінійку з кроком 100 пар основ, що дозволяє оцінити розмір ампліфікованих фрагментів.

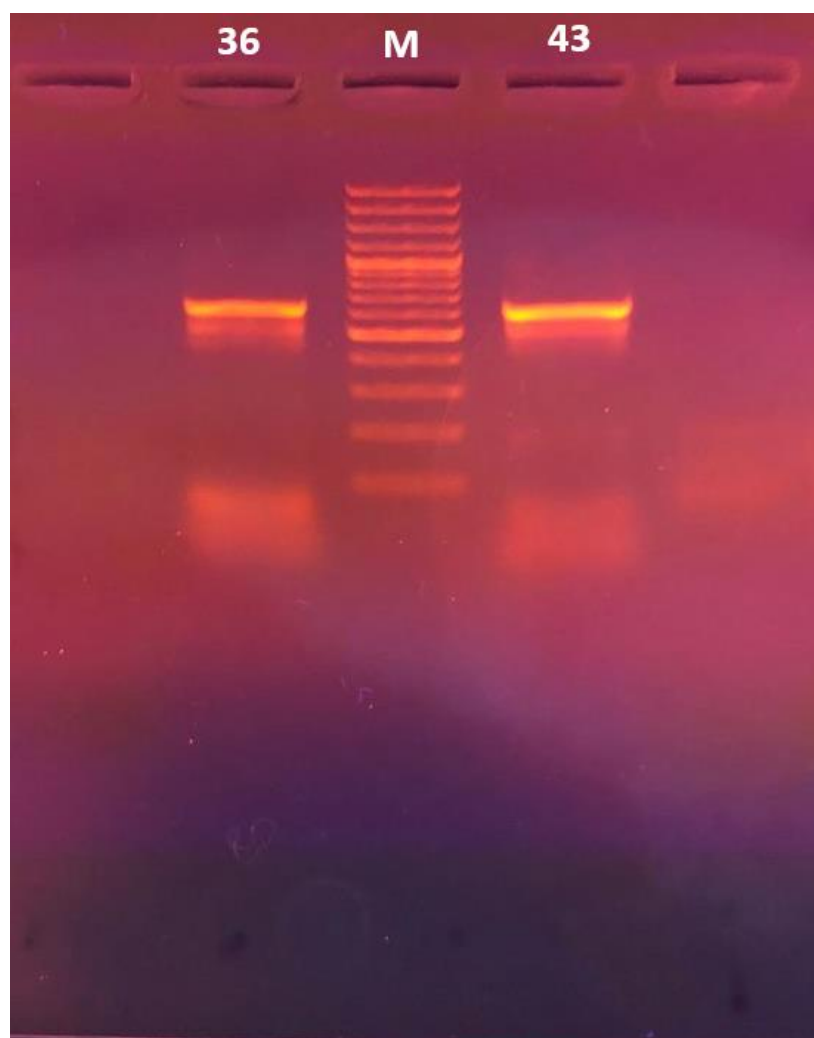


Рис. 4.7. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами до GV-B (ДНК маркер 100по).

На рисунку 4.8 продемонстровано результати аналізу зразка цибулі, відібраного в Київській області, проведеного із застосуванням праймерів, специфічних до гена капсидного білка вірусу ShVX. У процесі електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації виявлено фрагмент довжиною 800 пар нуклеотидів, що відповідає очікуваному розміру цільового амплікону. Наявність чітко вираженої смуги відповідної довжини свідчить про присутність вірусу ShVX у досліджуваному зразку та підтверджує його інфікованість. Результати аналізу методом ЗТ-ПЛР із використанням праймерів, специфічних до вірусу ShVX (800 п.н.), представлені для зразка 32, що відповідає цибулі, відібраній у Київській області. Як молекулярний маркер (М) застосовано ДНК-лінійку з інтервалом 100 пар основ, що забезпечує

можливість визначення розміру отриманих ампліфіконів.

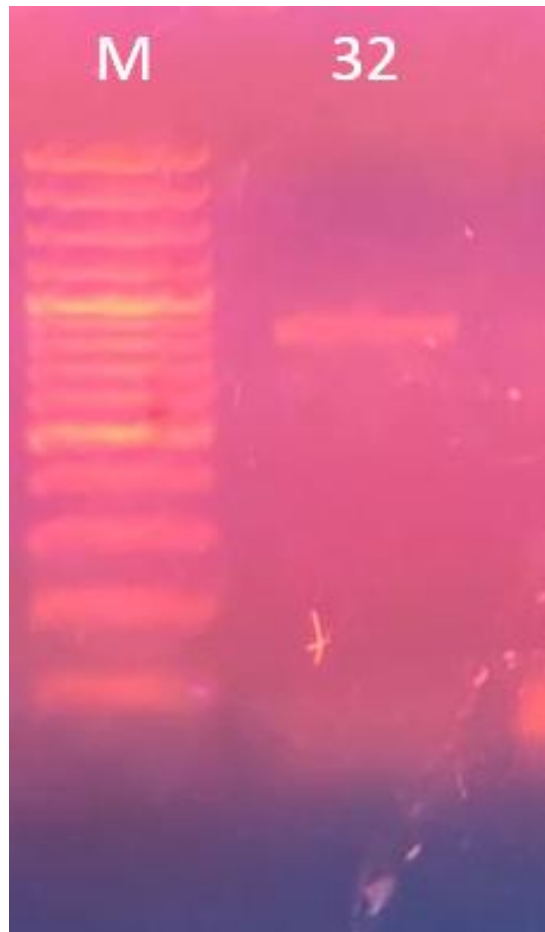


Рис. 4.8. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами до ShVX (ДНК маркер 100по).

Амплікони, отримані в результаті полімеразної ланцюгової реакції, у подальшому піддавали секвенуванню з метою визначення їх нуклеотидної послідовності та були використані для проведення філогенетичного аналізу, що дозволило оцінити їх еволюційні взаємозв'язки та генетичну спорідненість із відомими ізолятами відповідних вірусів.

ВИСНОВКИ

У ході виконання роботи показано, що вірусні інфекції рослин роду *Allium* в Україні мають виражений комплексний характер і включають як *Allexivirus*, так і *Carlavirus*; для більшості проаналізованих рослин характерна висока частота інфікування, а змішані інфекції є типовим, а не поодиноким явищем. Отримані дані підтверджують доцільність поєднання серологічних і молекулярних методів для виявлення латентних вірусів та відбору ізолятів для подальшого секвенування.

1. З різних регіонів України на основі візуальної діагностики відібрані 110 симптоматичних зразків рослин роду *Allium*. Тестування комплементарними серологічними та молекулярними методами підтвердило значне поширення таксономічно різних РНК-вмісних вірусів, які зазвичай існують у вигляді вірусних комплексів.
2. За результатами ІФА встановлено високу поширеність представників роду *Allexivirus* в тестованих рослинах. Аллексівіруси були детектовані у 83% рослин, з домінуванням таких патогенів, як GVB (39% зразків) і GVC (28% зразків). Також був детектований ShVX, однак він був значно менш поширений (15 % зразків).
3. Згідно результатів діагностики, встановлено видовий склад представників роду *Carlavirus*, які циркулюють в Україні на цибулевих культурах: SLV (52,7% зразків) і GCLV (35,5% зразків), причому SLV переважно детектували у рослинах часнику.
4. Вперше експериментально підтверджено, що змішані вірусні інфекції є типовими для рослин роду *Allium*. Вірусні комплекси виявлені у 63,6% зразків, найчастіше у вигляді комбінацій GCLV+SLV (25% зразків) та OYDV+SLV (10% зразків). Також була детектована комбінація з чотирьох вірусів вірусів LYSV, OYDV, GCLV і SLV (3,6 % зразків).
5. Підготовлені для секвенування 5 ампліконів вірусних ізолятів: SLV (592 п.н.), GCLV (960 п.н.), ShVX (800 п.н.) і два ізоляти GV-B (576 п.н.).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Benke, A., Krishna, R., Khandagale, K., Gawande, S., Shelke, P., Dukare, S., Dhumal, S., Singh, M. and Mahajan, V. (2023). Efficient Elimination of Viruses from Garlic Using a Combination of Shoot Meristem Culture, Thermotherapy and Chemical Treatment. *Pathogens*, [online] Volume 12(1), p. 129. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens12010129> [Accessed 12 Jan. 2023].
2. Conci, V. C., Canavelli, A., Lunello, P., Di Rienzo, J., Nome, S., Zumelzu, G. and Italia, R. (2003). Yield Losses Associated with Virus-Infected Garlic Plants During Five Successive Years. *Plant disease*, 87(12), pp. 1411–1415.
3. Altieri, L., Candido, V., Miccols, V. and Camele, I. (2022). Garlic (*Allium* spp.) viruses: detection, distribution and remediation attempts in a European garlic collection. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(3), pp. 12779-12779.
4. Koczor, Á., Ádám, J., Ágoston, J., Salánki, K. and Palkovics, L. (2024). Investigation of viral diseases of garlic (*Allium sativum* L.), new primers for RT-PCR detection and diversity of garlic viruses in Hungary. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, [online] Volume 134, p. 102394. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102394> [Accessed 6 Sep. 2024].
5. Marais, A., Faure, C., Theil, S. and Candresse, T. (2019). Characterization of the virome of shallots affected by the shallot mild yellow stripe disease in France. *PloS one*, [online] Volume 14(7), p. e0219024. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219024> [Accessed 24 Jul. 2019].
6. Karavina, C., Ibaba, J. and Gubba, A. (2023). Detection and molecular analysis of shallot latent virus infecting *Allium sativum* in Zimbabwe. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, [online] Volume 128, p. 102175. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102175> [Accessed 31 Oct. 2023].
7. Genus: *Allexivirus* | ICTV. Available at:

- <https://ictv.global/report/chapter/alphaflexiviridae/alphaflexiviridae/allexivir>
[us](#) (Accessed 3 March 2026).
8. Family: *Betaflexiviridae* (Interim Report) | ICTV. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/betaflexiviridae/betaflexiviridae> (Accessed 5 March 2026).
 9. Gibbs, A., Hajizadeh, M., Ohshima, K. and Jones, R. (2020). The Potyviruses: An Evolutionary Synthesis Is Emerging. *Viruses*, [online] Volume 12(2), p. 132. Available at: <https://doi.org/10.3390/v12020132> [Accessed 22 Jan. 2020].
 10. Inoue-Nagata, A., Jordan, R., Kreuze, J., Li, F., López-Moya, J., Mäkinen, K., Ohshima, K., Wylie, S., Siddell, S., Lefkowitz, E., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Zerbini, F., Smith, D. and Rubino, L. (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae* 2022. *Journal of General Virology*, [online] Volume 103(5). Available at: <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001738> [Accessed 5 May. 2022].
 11. *Potyviridae* ~ ViralZone. Available at: <https://viralzone.expasy.org/48> (Accessed 8 March 2026).
 12. Sharma, P. (2023). Epidemiology of potyviruses infecting crops of Cucurbitaceae. In *Plant RNA Viruses*, pp. 213-227.
 13. Nemchinov, L., Hammond, J., Jordan, R. and Hammond, R. (2004). The complete nucleotide sequence, genome organization and specific detection of Beet mosaic virus. *Archives of virology*, 149(6), pp. 1201–1214.
 14. Mingot, A., Valli, A., Rodamilans, B., San León, D., Baulcombe, D., García, J. and López-Moya, J. (2016). The P1N-PISPO trans-Frame Gene of Sweet Potato Feathery Mottle Potyvirus Is Produced during Virus Infection and Functions as an RNA Silencing Suppressor. *Journal of virology*, 90(7), pp. 3543–3557.
 15. Rantalainen, K., Eskelin, K., Tompa, P. and Mäkinen, K. (2011). Structural flexibility allows the functional diversity of potyvirus genome-linked protein VPg. *Journal of virology*, 85(5), pp. 2449–2457.

16. Moury, B. and Desbiez, C. (2020). Host Range Evolution of Potyviruses: A Global Phylogenetic Analysis. *Viruses*, [online] Volume 12(1), p. 111. Available at: <https://doi.org/10.3390/v12010111> [Accessed 16 Jan. 2020].
17. Gadhave, K., Dutta, B., Coolong, T. and Srinivasan, R. (2019). A non-persistent aphid-transmitted Potyvirus differentially alters the vector and non-vector biology through host plant quality manipulation. *Scientific Reports*, [online] Volume 9(1), p. 2503. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39256-5> [Accessed 21 Feb. 2019].
18. Valli, A., Gallo, A., Rodamilans, B., López-Moya, J. and García, J. (2018). The HCPro from the Potyviridae family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Molecular plant pathology*, 19(3), pp. 744–763.
19. Zwart, M., Daròs, J. and Elena, S. (2012). Effects of potyvirus effective population size in inoculated leaves on viral accumulation and the onset of symptoms. *Journal of virology*, 86(18), pp. 9737–9747.
20. Nigam, D., LaTourrette, K., Souza, P. and Garcia-Ruiz, H. (2019). Genome-wide variation in potyviruses. *Frontiers in Plant Science*, [online] Volume 10, p. 1439. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01439> [Accessed 12 Nov. 2019].
21. Gibbs, A., Ohshima, K., Phillips, M. and Gibbs, M. (2008). The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. *PloS one*, [online] Volume 3(6), p. e2523. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002523> [Accessed 25 Jun. 2008].
22. *Betaflexiviridae* | ICTV. Available at: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae (Accessed 9 March 2026).
23. Thekke-Veetil, T., McCoppin, N., Hobbs, H., Hartman, G., Lambert, K., Lim, H. and Domier, L. (2021). Discovery of a Novel Member of the Carlavirus Genus from Soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Pathogens (Basel, Switzerland)*, [online] Volume 10(2), p. 223. Available at:

- <https://doi.org/10.3390/pathogens10020223> [Accessed 18 Feb. 2021].
24. *Carlavirus* ~ ViralZone. Available at: <https://viralzone.expasy.org/268> (Accessed 10 March 2026).
 25. Kreuze, J., Vaira, A., Menzel, W., Candresse, T., Zavriev, S., Hammond, J., Hyun Ryu, K. and Report Consortium, I. (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Alphaflexiviridae*. *Journal of General Virology*, 101(7), pp. 699-700.
 26. Thekke-Veetil, T., Ho, T., Postman, J., Martin, R. and Tzanetakis, I. (2018). A Virus in American Blackcurrant (*Ribes americanum*) with Distinct Genome Features Reshapes Classification in the Tymovirales. *Viruses*, [online] Volume 10(8), p. 406. Available at: <https://doi.org/10.3390/v10080406> [Accessed 3 Aug. 2018].
 27. Genus: *Allexivirus* | ICTV. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/alphaflexiviridae/alphaflexiviridae/allexivirus> (Accessed 11 March 2026).
 28. Fermin, G. (2018). Host Range, Host–Virus Interactions and Virus Transmission. *Viruses*, pp. 101-134.
 29. Lim, H., Bragg, J., Ganesan, U., Lawrence, D. M., Yu, J., Isogai, M., Hammond, J. and Jackson, A. (2008). Triple gene block protein interactions involved in movement of Barley stripe mosaic virus. *Journal of Virology*, 82(10), pp. 4991-5006.
 30. *Allexivirus* ~ ViralZone. Available at: <https://viralzone.expasy.org/266> (Accessed 13 March 2026).
 31. Krichevsky, A., Kozlovsky, S., Gafni, Y. and Citovsky, V. (2006). Nuclear import and export of plant virus proteins and genomes. *Molecular Plant Pathology*, 7(2), pp. 131-146.
 32. Mansouri, F. and Rysanek, P. (2021). *Allexivirus*: review and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*, 60(3), pp. 389-402.
 33. Paduch-Cichal, E. and Bereda, M. (2017). Viruses infecting ornamental *Allium* species in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 99(2), pp. 509-512.
 34. Lunello, P., Di Rienzo, J. and Conci, V. (2007). Yield loss in garlic caused by

- Leek yellow stripe virus Argentinean isolate. *Plant Disease*, pp. 153-158.
- 35.Kang, S., Koo, B., Lee, E. and Chang, M. (2007). Allexivirus transmitted by eriophyid mites in garlic plants. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(11), pp. 1833–1840.
 - 36.Caillaud, M. and Via, S. (2000). Specialized feeding behavior influences both ecological specialization and assortative mating in sympatric host races of pea aphids. *American Naturalist*, 156(6), pp. 606-621.
 - 37.Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Garzo, E. and 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, pp. 38-46.
 - 38.Jiménez, J., Moreno, A. and Fereres, A. (2020). Transmission of phloem-limited viruses to the host plants by their aphid vectors. In *Phloem-Transported Viruses*, pp. 1-25.
 - 39.Agrios, G. (2005). Plant diseases caused by viruses. *Plant Pathology*, pp. 723-824.
 - 40.Gadhawe, K., Gautam, S., Rasmussen, D. and Srinivasan, R. (2020). Aphid transmission of potyvirus: The largest plant-infecting RNA virus genus. *Viruses*, [online] Volume 12(7), p. 773. Available at: <https://doi.org/10.3390/v12070773> [Accessed 17 Jul. 2020].
 - 41.Baranwal, V., Singh, P., Jain, R. and Joshi, S. (2011). First report of Garlic virus X infecting garlic in India. *Plant Disease*, [online] Volume 95(9), p. 1197. Available at: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0198> [Accessed 11 Aug. 2011].
 - 42.Rodríguez-Verástegui, L., Ramírez-Zavaleta, C., Capilla-Hernández, M. and 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*, [online] Volume 11(2), p. 203. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants11020203> [Accessed 13 Jan. 2022].
 - 43.Chatzivassiliou, E. (2021). An annotated list of legume-infecting viruses in the light of metagenomics. *Plants*, [online] Volume 10(7), p. 1413. Available

- at: <https://doi.org/10.3390/plants10071413> [Accessed 10 Jul. 2021].
44. Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V. and Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, [online] Volume 4, p. 154. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154> [Accessed 24 May. 2013].
 45. Loconsole, G., Onelge, N., Potere, O., Giampetruzzi, A., Bozan, O., Satar, S., De Stradis, A., Savino, V., Yokomi, R. and Saponari, M. (2012). Identification and characterization of Citrus yellow vein clearing virus, a putative new member of the genus Mandarivirus. *Phytopathology*, 102. pp. 1168-1175.
 46. Qu, F. and Morris, T. J. (2005). Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Letters*, 579(27), pp. 5958-5964.
 47. Beck, D., Guilford, P., Voot, D. andersen, M. and Forster, R. (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology*, 183(2), pp. 695-702.
 48. Ghosh, S. and Ghanim, M. (2021). Factors determining transmission of persistent viruses by Bemisia tabaci and emergence of new virus-vector relationships. *Viruses*, [online] Volume 13(9), p. 1808. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13091808> [Accessed 11 Sep. 2021].
 49. Genus: *Capulavirus* | ICTV. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/geminiviridae/geminiviridae/capulavirus> (Accessed 14 March 2026).
 50. Vlugt, R., Cuperus, C., Vink, J., Stijger, I., Lesemann, D., Verhoeven, J. and Roenhorst, J. (2003). Identification and characterization of Pepino mosaic potexvirus in tomato. *EPPO Bulletin*, 32(3), pp. 503-508.
 51. Genus: *Mandarivirus* | ICTV. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/alphaflexiviridae/alphaflexiviridae/mandarivirus> (Accessed 14 March 2026).
 52. Martelli, G. and Uyemoto, J. (2008). Plant Virus Diseases: Fruit Trees and

- Grapevine. *In Encyclopedia of Virology*, 1(5), pp. 201-207.
53. Mansouri, F., Krahulec, F., Duchoslav, M. and Ryšánek, P. (2021). Newly identified host range of viruses infecting species of the genus *Allium* and their distribution in six habitats in the Czech Republic. *Plant Pathology*, 70(6), pp. 1496-1507.
 54. Cremer, J., Campbell, P., Steele, V., Persley, D., Thomas, J., Harper, S. and Gambley, C. (2021). Detection and Distribution of Viruses Infecting Garlic Crops in Australia. *Plants*, [online] Volume 10(5), p. 1013. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants10051013> [Accessed 19 May. 2021].
 55. Tuzlali, H., Karanfil, A. and Korkmaz, S. (2021). Occurrence of leek yellow stripe virus and onion yellow dwarf virus from edible *Allium* plants in the south Marmara region of Turkey. *3 Biotech*, [online] Volume 11(12), p. 516. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03067-1> [Accessed 1 Dec. 2021].
 56. Kebede, Y., Singh, J. and Majumder, S. (2020). Molecular characterization of the partial coat protein gene of an Onion yellow dwarf virus isolate detected in garlic (*Allium sativum* L.) from the West Shewa zone of Ethiopia. *Journal of Plant Protection Research* 60(1), pp. 106-111.
 57. Kawakubo, S., Kim, H., Takeshita, M. and Masuta, C. (2023). Host-specific adaptation drove the coevolution of leek yellow stripe virus and *Allium* plants. *Microbiology Spectrum*, 11(5), pp. 1-18.
 58. Shanmugam, K., Perumal, R., Oliva, R., Cheng, H. W., Iruthayasamy, J., Angappan, S., Chandrasekaran, I. and Nallusamy, S. (2024). Seed transmission of potyviruses: A threat to crop health. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 52(4), pp. 13698-13698.
 59. Wylie, S., Li, H., Saqib, M. and Jones, M. (2014). The global trade in fresh produce and the vagility of plant viruses: a case study in garlic. *PLoS One*, [online] Volume 9(8), p. e105044. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105044> [Accessed 18 Aug. 2014].
 60. Shemesh-Mayer, E., Gelbart, D., Belausov, E., Sher, N., Daus, A.,

- Rabinowitch, H. and Kamenetsky-Goldstein, R. (2022). Garlic Potyviruses Are Translocated to the True Seeds through the Vegetative and Reproductive Systems of the Mother Plant. *Viruses*, [online] Volume 14(10), p. 2092. Available at: <https://doi.org/10.3390/v14102092> [Accessed 21 Sep. 2022].
61. Mansouri, F. and Ryšánek, P. (2021). Allexivirus: review and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*, 60(3), pp. 389-402.
62. Mansouri, F., Richert-Pöggeler, K., Lewandowski, M. and Ryšánek, P. (2021). Transmission characteristics of allexiviruses by the eriophyid mite, *Aceria tulipae* (Keifer)(Acari: Eriophyidae) from naturally mixed infected garlic (*Allium sativum* L.). *European Journal of Plant Pathology*, 160(4), pp. 789-796.
63. Dąbrowska, E., Lewandowski, M., Koczkodaj, S. and 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*, 157(1), pp. 215-222.
64. Abraham, A., Kidanemariam, D. and Holton, T. (2019). Molecular identification, incidence and phylogenetic analysis of seven viruses infecting garlic in Ethiopia. *European journal of plant pathology*, 155, pp. 181–191.
65. Chodorska, M., Paduch-Cichal, E., Kalinowska, E. and Szyndel, M. (2013). Assessment of allexiviruses infection in garlic plants in Poland. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 13(2), pp. 179-186.
66. Sasaki, J., Kawakubo, S., Kim, H., Kim, O., Yamashita, K., Shimura, H. and Masuta, C. (2022). Leek Yellow Stripe Virus Can Adjust for Host Adaptation by Trimming the N-Terminal Domain to Allow the P1 Protein to Function as an RNA Silencing Suppressor. *The plant pathology journal*, 38(4), pp. 383–394.
67. Wang, H. and Wang, J. (2017). How cryo-electron microscopy and X-ray crystallography complement each other. *Protein Science*, 26(1), pp. 32-39.
68. Nagy, P. and 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, pp. 123-177.