

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри д.б.н., проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2026 р.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ІЗОЛЯТІВ CHERRY LEAF ROLL VIRUS ТА  
КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ІНФІКОВАНИХ  
РОСЛИНАХ БУЗИНИ ЧОРНОЇ**

Випускна кваліфікаційна робота  
студента денної форми навчання  
за спеціальністю біологія та біохімія  
Котікова Всеволода Вадимовича  
Науковий керівник від кафедри  
к.б.н., асистент Дуніч А.А.

Робота виконана на базі ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом д.б.н. професора Міщенко Л.Т.

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2026 р.**

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТ – антитіла

БАР – біологічно активні речовини

ЕГК – еквівалент галової кислоти

ЕК – еквівалент кверцетину

ІФА – імуноферментний аналіз

кДНК – клонована ДНК

НК – нуклеїнова кислота

СВ – суха вага

ApMV – apple mosaic virus

ApNV – apple necrotic mosaic virus

BSMV – bean common mosaic virus

BCTV – beet curly top virus

CLRV – cherry leaf roll virus

CMV – cucumber mosaic virus

CP – coat protein (білок оболонки)

CSSVD – cocoa swollen shoot virus

DAS-ELISA – double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay  
(«подвійний сендвіч» імуноферментний аналіз)

DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил

EcYVV – eclipta yellow vein virus

GLRaV-3 – grapevine leafroll-associated virus 3

MP – movement protein (білок руху)

ORF – open reading frame (відкрита рамка зчитування)

RdRp – RNA-dependent RNA polymerase (РНК залежна РНК полімераза)

TMV – tobacco mosaic virus

UTR – untranslated region (регіон, який не трансліюється)

VPg – viral protein genome-linked (вірусний білок пов'язаний з геномом)

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>РОЗДІЛ 1. Характеристика cherry leaf roll virus та біологічно активних речовин бузини чорної</b> .....	6
1.1. Характеристика cherry leaf roll virus.....	6
1.1.1. Морфологія та фізичні властивості віріонів CLRV.....	6
1.1.2. Поширення CLRV.....	6
1.1.3. Організація геному CLRV.....	7
1.1.4. Білки CLRV.....	8
1.1.5. Еволюційні зв'язки CLRV.....	9
1.1.6. Хазяї CLRV.....	10
1.1.7. Симптоми CLRV.....	11
1.1.8. Міжклітинний та системний рух CLRV у рослині.....	12
1.1.9. Передача CLRV.....	13
1.1.10. Шляхи боротьби з поширенням CLRV.....	15
1.2. Біологічно активні речовини бузини чорної.....	16
1.2.1. Основні біологічно активні речовини бузини чорної.....	16
1.2.2. Синтез флавоноїдів та фенольних кислот.....	18
1.2.3. Вплив зовнішніх факторів на синтез фенольних сполук.....	19
<b>РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень</b> .....	21
2.1. Візуальна діагностика.....	21
2.2. Імуноферментний аналіз.....	22
2.3. Виділення тотальної РНК.....	23
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією.....	24
2.5. Електрофорез нуклеїнових кислот.....	25
2.6. Філогенетичний аналіз.....	26
2.7. Виділення фенольних сполук.....	27
2.8. Визначення загального вмісту фенольних сполук.....	27
2.9. Визначення загального вмісту флавоноїдів.....	28

2.10. Визначення загального вмісту фенольних кислот.....	30
2.11. Загальна антиоксидантна активність за реакцією відновлення DPPH..	31
2.12. Статистичний аналіз.....	32
<b>РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....</b>	<b>33</b>
3.1. Візуальна діагностика зразків.....	33
3.2. Діагностика CLRV у листі методом ІФА.....	42
3.3. Діагностика CLRV у листі методом ЗТ-ПЛР.....	42
3.4. Філогенетичний аналіз.....	43
3.5. Загальний вміст фенольних сполук.....	46
3.6. Загальний вміст флавоноїдів.....	48
3.7. Загальний вміст фенольних кислот.....	50
3.8. Антиоксидантна активність.....	52
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>55</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>56</b>

## ВСТУП

Бузина чорна – представник роду *Sambucus* родини *Adoxaceae*. Кущиста рослина, іноді деревце, 2–6 м заввишки. Росте зазвичай у чагарниках, лісах, на пустирях. Цвіте з травня по червень пахучими жовто-білими квітами, які зібрані в суцвіття-щиток. Чорно-фіолетові ягоди дозрівають у період із серпня по вересень [1].

Квіти бузини чорної є цінною сировиною для фармацевтичної промисловості. Наразі в Україні зареєстровані 19 препаратів, які в своєму складі містять екстракти з квіток або сушені квітки бузини чорної. Більшість цих препаратів має снодійно-седативну, протизапальну, антимікробну, кардіологічну, протиалергічну, спазмолітичну, відхаркувальну, урологічну та сечогінну дію [2].

Як і більшість інших рослин, бузина зазнає негативного впливу з боку вірусів. Одним з цих вірусів є вірус скручування листків черешні (*cherry leaf roll virus, CLRV*). Вірусні інфекції можуть впливати на метаболізм рослин. Це може призводити до змін якості сировини з уражених рослин [3]. Було показано, що CLRV здатен викликати зміни у деяких біохімічних показниках ягід та листків бузини чорної [4].

В Україні галузь культивування бузини майже нерозвинена, а сировина отримується з дикорослих рослин. Тому важливим є дослідження дикої бузини на наявність вірусних інфекцій, у тому числі й CLRV, а також визначення її біохімічних властивостей.

Метою цієї роботи є проведення серологічної та молекулярної ідентифікації CLRV у рослинах бузини і визначення кількісного вмісту біологічно активних речовин у інфікованих вірусом та здорових рослинах.

# РОЗДІЛ 1

## ХАРАКТЕРИСТИКА CHERRY LEAF ROLL VIRUS ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН БУЗИНИ ЧОРНОЇ

### 1.1. Характеристика cherry leaf roll virus

#### 1.1.1 Морфологія та фізичні властивості віріонів CLRV

*Cherry leaf roll virus* є членом родини *Secoviridae*, роду *Nepovirus*. Цей вірус є простим. Розмір капсиду становить приблизно 28 нм. Симетрія капсиду ікосаедрична [5].

Коефіцієнт седиментації вірусних частинок становить 115S та 128S. Частилки з різними коефіцієнтами седиментації не можуть самостійно спричинити появу вірусної інфекції. Якщо ці два типи часток змішати, інфекційність відновлюється. За допомогою серологічних методів частки розрізнити неможливо, що свідчить про те, що їх капсиди формуються одним і тим самим білком [6]. Представники роду *Nepovirus* можуть формувати три типи вірусних частинок. Це пов'язано з тим, що їх геном розділений на два фрагменти РНК, тому залежно від наявності РНК у капсиді та від того, яка саме РНК наявна в капсиді, маса вірусних частинок буде варіюватися [7].

#### 1.1.2. Поширення CLRV

Вірус розповсюджений на всіх континентах, крім Антарктиди та Африки [8]. Найширше поширення вірус має в країнах Європи, Азії та Північної Америки.

За допомогою баєсівського філодинамічного аналізу 81-ї послідовності капсидного білка CLRV були отримані результати, що припускають початок поширення сучасних ізолятів CLRV з Нової Зеландії. Аналіз торговельних шляхів вишнею між країнами дає змогу припустити, що Німеччина відіграла важливу роль у поширенні CLRV у світі [9].

### 1.1.3. Організація геному CLRV

Геном CLRV представлений двома ланцюгами позитивної РНК. На 5'-кінці обох геномних РНК ковалентно приєднаний білок VPg, що захищає їх від деградації клітинними екзонуклеазами; 3'-кінець закінчується полі(А)-хвостом [5]. Довжина РНК1 становить 7,9 т.о., РНК2 – 6,4 т.о., якщо не враховувати довжину поліА-хвоста [10]. Також, є відомості, що CLRV може продукувати ще субгеномну РНК із довжиною приблизно 1,5 т.о., що відповідає 3'UTR [11].

Однією з особливостей неповірусів субгрупи С, до якої належить CLRV, є наявність майже ідентичних послідовностей на 5'-кінцях та 3'-кінцях обох геномних РНК. У CLRV довжина ділянок із високою ідентичністю на 5'-кінці становить приблизно 660 нуклеотидів, що відповідає ділянці послідовності 5'UTR та частині послідовності на N-кінці поліпротеїнів Р1 на РНК1 та Р2 на РНК2. Ділянка з високою ідентичністю на 3'-кінці відповідає 3' UTR і становить приблизно 1540 нуклеотидів. Найвища ідентичність зберігається в межах штаму і стає меншою в межах виду, оскільки на обох РНК наявні два старткодони, що розташовані біля послідовностей, які відповідають послідовності Козак. Однак через те, що неповіруси не мають кеп на 5'-кінці, фрагменти їхніх РНК мають формувати структури, які будуть стимулювати трансляцію. Якщо ініціація трансляції CLRV відбувається за цим механізмом, то перший старткодон не зможе бути точкою початку синтезу поліпротеїнів. Однак це припущення ще не має експериментальних підтверджень [10].

#### 1.1.4. Білки CLRV

Кожна з геномних РНК кодує по одному поліпротеїну. РНК1 кодує поліпротеїн P1, РНК2 – Р2. Далі ці два поліпротеїни розщеплюються на функціональні білки вірусною протеазою [5]. Фундаментальних досліджень функцій більшості білків, які заковані в геномі CLRV, не проводилося. Тому припущення про їхню роль у життєвому циклі вірусу можна будувати виключно, спираючись на дослідження білків інших представників роду *Nepovirus*.

P1 розщеплюється на шість білків:

X1 – один з унікальних білків представників субгрупи С родини *Nepovirus*. Функція цього білка до кінця не вивчена, однак N-кінець цього білка у вірусу кільчастої плямистості томатів (ToRSV) має ідентичну послідовність до N-кінця білка X3 [12]. Це дає змогу припустити, що їх функції можуть бути подібними, але це буде залежати від того, як на його фолдинг буде впливати C-кінець цього білка.

X2 – білок, що має мотиви, подібні до Co-Pro, який впливає на активність протеази. Однак подібного впливу не було помічено у X2. Цей білок має гідрофобні фрагменти, що сприяють його закріпленню на мембрані ендоплазматичного ретикулюма. Можливо, цей білок бере участь у формуванні вірусних фабрик [5].

NTV – геліказа. Необхідна для розкручування дволанцюгових форм РНК, які утворюються під час реплікації [5].

VPg – білок, що ковалентно приєднаний до молекул РНК CLRV. Обробка геномних молекул РНК CLRV протеазами проназою або протеїназою К призводила до руйнування VPg. У результаті цього інфекційність вірусної РНК зменшувалась, але ефективність і точність трансляції *in vitro* не змінювались [13]. Ці дані можуть свідчити про те, що VPg бере участь у реплікації вірусу, але він не має або має мінімальний вплив на трансляцію вірусних поліпротеїнів.

Pro – 3С-подібна протеаза, що забезпечує розщеплення вірусних поліпротеїнів. У випадку CLRV сайтами розрізу протеази є Q/S та Q/G [14].

RDRP – забезпечує утворення нових РНК вірусу [5].

P2 розщеплюється на чотири білки:

X3 – білок, що має послідовності, подібні до білка P2A, який сприяє реплікації РНК2 у представників інших субгруп роду *Nepovirus* [5]. Тож можна припустити, що білок X3 має вплив на реплікацію РНК2.

X4 – малодосліджений білок. Припускається, що він може брати участь у пристосуванні вірусу до хазяїна та модулювати механізми РНК-інтерференції хазяїна, щоб сприяти розвитку вірусної інфекції. Також цей білок може бути нестабільним, оскільки його повнорозмірна форма не була знайдена в рослинах, які були уражені ToRSV [15].

MP – забезпечує локальний та системний рух вірусу в рослині [5]. Є необхідним для забезпечення насінневої передачі.

CP забезпечує захист вірусного геному від чинників навколишнього середовища. Необхідний для руху вірусу в організмі хазяїна. Характерною ознакою представників роду *Nepovirus* є наявність лише одного капсидного білка у складі капсомера [5].

### 1.1.5. Еволюційні зв'язки CLRV

Рід *Nepovirus* можна розділити на субгрупи: А, В та С. CLRV є представником субгрупи С. Найбільш спорідненим з ним видом є вірус кільчастої плямистості томату. За результатами філогенетичного аналізу було виявлено, що ORF1 є спорідненою РНК1 інших представників роду *Nepovirus* субгрупи С. Однак послідовність ORF2 РНК2 виявилася більш подібною до ORF2 представників субгрупи А [16].

Також було виявлено, що РНК1 деяких ізолятів могли утворитися внаслідок внутрішньовидової рекомбінації [16]. Ізоляти, які брали участь у

процесі рекомбінації, належать до різних груп ізолятів CLRV, що може свідчити про наявність міжвидового горизонтального шляху передачі.

Для проведення філогенетичного аналізу зазвичай використовують фрагмент 3'-UTR CLRV. Як згадувалося раніше, ця ділянка є досить консервативною. Однак у межах фрагмента, що використовується для побудови філогенетичних дерев, між різними ізолятами спостерігається відмінність послідовності, яка може сягати 17%. Ізоляти CLRV можуть бути розподілені на 6 груп: А, В, С, D1, D2 та Е [17].

Найбільше тяжіння до калстеризації спостерігається для ізолятів, що були виділені з одного виду хазяїна. Винятками є групи А, В та С, які містять ізоляти, що були виділені з різних хазяїв. Це може свідчити про неможливість ізолятів уражувати широке коло хазяїв або про ускладнену горизонтальну передачу вірусу [18]. Це збігається з тим фактом, що CLRV передається переважно пилком.

### 1.1.6. Хазяї CLRV

CLRV уражує дерева, кущі та трав'янисті рослини. У природних умовах було виявлено рослини цибулі духмяної (*Allium tuberosum*), берези повислої (*Betula pendula*), грабу звичайного (*Carpinus betulus*), дерену квітучого (*Cornus florida*), бруслини європейської (*Euonymus europaeus*), гортензії крупнолистої (*Hydrangea macrophylla*), буку звичайного (*Fagus sylvatica*), крушини ламкої (*Frangula alnus*), ясену звичайного (*Fraxinus excelsior*), горіху волоського (*Juglans regia*), бирючини звичайної (*Ligustrum vulgare*), яблуні домашньої (*Malus domestica*), маслини європейської (*Olea europaea*), черешні (*Prunus avium*), птелеї трилистої (*Ptelea trifoliata*), порічки червоної (*Ribes rubrum*), ожини (*Rubus fruticosus*), малини звичайної (*Rubus idaeus*), щавелю горобиноного (*Rumex acetosella L.*), бузини чорної (*Sambucus nigra*), горобини звичайної (*Sorbus aucuparia*), бузку звичайного (*Syringa vulgaris*), настурції великої

(*Tropaeolum majus*), вязу американського (*Ulmus americana*), чорниця Дарроу (*Vaccinium darrowii*), винограду справжнього (*Vitis vinifera*), Картоплі безстеблової (*Solanum acaule*) та ревеню (*Rheum rhabarbarum*), які були уражені CLRV [8].

Окрім цього, у лабораторних умовах було штучно інфіковано деякі трав'янисті рослини, які використовуються як модельні об'єкти або рослини-індикатори. До них належать рослини тютюнів (*Nicotiana rustica*, *N. tabacum*), огірок (*Cucumis sativum*), лобода (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*) та гусимка (*Arabidopsis thaliana*) [19].

### 1.1.7. Симптоми CLRV

Типовими для CLRV-інфекції симптомами є пожовтіння жилок, хлоротичні кільцеві плями, крапчастість, скручування листків, відмирання гілок або загибель рослин. Розвиток симптомів та їхня інтенсивність у рослин, інфікованих CLRV, змінюються залежно від виду хазяїна через екологічні стреси та взаємодію з біотичними чинниками [18].

Розвиток симптомів залежить від штамів CLRV. На рослинах-індикаторах *C. amaranticolor*, ізоляти CLRV, що були виділені з порічки червоної, ревеню, малини, яблуні та лохини, мали різні симптоми. На одному виді рослини-індикатора симптоми різних ізолятів могли варіюватися від відсутності симптомів до загибелі рослини [19].

Те, як між РНК1 та РНК2 розподілені детермінанти симптомів, було визначено за допомогою утворення псевдорекомбінантів ізолятів CLRV з бузини та ревеню. Після цього рослини-індикатори *N. clevelandii*, *N. tabacum* cv. Samsun, *N. tabacum* cv. Xanthi, *C. amaranticolor* і *C. quinoa* були уражені батьківськими ізолятами вірусів та їхніми псевдорекомбінантами. За результатами було встановлено, що на розвиток симптомів у представників роду *Chenopodium* впливає білок або білки, заковані в РНК2. Детермінанти

системної симптоматики для тютюнів також закодовані в РНК2. Білки, що закодовані на РНК1, впливали на прояв локальних симптомів на рослинах тютюну [20]. Це свідчить про те, що білки або vsiРНК з обох геномних РНК можуть впливати на розвиток симптомів.

### **1.1.8. Міжклітинний та системний рух CLRV у рослині**

Для переміщення між клітинами, віруси з роду *Nepovirus* потребують білків CP та MP. Ці білки здатні специфічно взаємодіяти як самі з собою, так і один з одним. Окрім цього, у випадку ураження тютюну білок MP здатен взаємодіяти з At-4/1. Цей білок розміщений у плазматичеській мембрані, і схоже, що саме він забезпечує формування трубки з MP, яка забезпечує переміщення віріонів через плазматичеську мембрану [21].

У рослині тютюну вірусна РНК починає з'являтися через 20 годин після інюкуляції листка. Далі вірус починає рухатися в організмі рослини. Через 3 дні після інфікування вірусні частки переміщуються до провідних систем і починають рух до кореня. Далі вірус буде рухатися до верхніх листків. Досягнувши листка, вірус насамперед поширюється в клітинах його базальної частини, а далі рухається до дистальних частин. Здатність вірусу до системного руху залежить від стадії, на якій був інюкульований листок. Якщо інюкулювати молодий лист, то вірус матиме змогу до системного руху. Якщо уражувати майже дорослий листок (95% від фінального його розміру), то вірус буде накопичуватися тільки локально. У випадку зараження старого листка, вірус не зможе реплікуватися в ньому [22].

### 1.1.9. Передача CLRV

CLRV належить до роду вірусів, чия назва бере свій початок від виду їх передачі (nematode-transmitted, polyhedral particles) [5]. Однак цей вірус є винятком і, скоріш за все, не здатен до передачі за допомогою нематод. Деякі раніші роботи стверджували про можливість такого виду передачі, але подальші роботи не підтвердили ці результати. Було показано, що на відміну від деяких вірусів, що здатні переноситися нематодами, CLRV навіть не виявляється в тілі нематоди [23].

Найбільш раннім задокументованим шляхом передачі є механічний через прищепи, які призводять до ураження підщеп.

CLRV здатен уражати структури рослин, які пов'язані зі статевим розмноженням. Вірус присутній у клітинах, що формують внутрішній шар стінок пиляків у берези, волоського горіха та вишні. Також він був виявлений у цитоплазмі клітин незрілих пилкових зерен. Антигени вірусу відсутні на зовнішній поверхні пилкових зерен [24].

CLRV також здатен уражувати і жіночі репродуктивні органи рослин. У випадку інфікування материнських тканин берези ембріони деяких насінин можуть бути вільними від вірусу [25].

Залежно від того, яка з батьківських рослин була уражена, відсоток насінневої передачі буде варіюватися. Так, у випадку зараження жіночих рослин берези в середньому 17% (від 0% до 38%) насінин містили CLRV. Якщо інфікованою була батьківська рослина, то середній відсоток ураженого насіння становив 30% (від 11% до 75%) [25].

У випадку запилення здорових дерев пилком, що містить CLRV, антиген вірусу виявлявся в ембріоні насіння берези, але не на насінневій стінці чи перикарпі. Насіння, що було уражене вірусом, мало зморщені ембріони, які розташовувалися в слабко волокнистому матриксі. У цьому матриксі було зафіксовано наявність вірсоподібних часточок у трубкоподібних включеннях.

Насіння берези, інфіковане CLRV, всходило гірше, й рослини, що проростали із цього насіння, росли повільніше, ніж здорові проростки [25].

Окрім вертикальної передачі, пилок може сприяти й горизонтальній. CLRV був виявлений у квітках черешні, що не були інфіковані цим вірусом, після запилення їх пилом, який містив вірус. На різних етапах розвитку плоду вірус був у різних частинах майбутнього плоду та материнської рослини. У період опадання чашолистиків вірус був наявний у зав'язі та плодоніжці. Вірус був розташований поруч із провідними тканинами в зав'язі та плодоніжці, але частково був виявлений і в субепідермальній зоні плодоніжки. Під час подальших етапів розвитку плоду CLRV був у ендокарпі, мезокарпі, насінні. Вірус був також і в плодоніжках, але тільки в субепідермальних клітинах. Це може свідчити про рух вірусу від плоду до материнської рослини в період опадання чашолистиків, оскільки в період після збору плодів CLRV було виявлено в листках дерев на тих гілках, на яких розвивалися інфіковані плоди. Запилення не є необхідним для передачі вірусу [26].

CLRV також був виявлений у членистоногих *Kleidocerys resedae* та *Kybos lindbergi* [27]. Можливо, коли вони харчуються тканинами уражених рослин, вірус може потрапляти на їхні ротові апарати й тимчасово лишатися там. Це може призвести до ураження наступної рослини, на якій будуть харчуватися комахи. Роль цих комах у поширенні CLRV потребує подальшого дослідження.

Також припускається, що CLRV може передаватися бджолами та трипсами. Передача, можливо, відбувається, коли комахи пошкоджують рослини під час харчування, й у цей момент вірус, що був перенесений із пилом цими комахами, уражує рослину. Однак, опублікованих даних, що підтверджують цей шлях передачі, наразі немає [26].

### 1.1.10. Шляхи боротьби з поширенням CLRV

Як і для інших вірусних інфекцій, для CLRV невідомий метод лікування інфікованих рослин. Якщо рослина була уражена цим вірусом, то єдине, що можна зробити, — видалити її, щоб унеможливити подальше розповсюдження на сусідні рослини.

Найбільш надійним способом, для зменшення шкоди від вірусних інфекцій, є використання стійких сортів. Активний захист рослин забезпечується тісно зв'язаними між собою відповідями імунітету, що активується молекулярними патернами, що асоційовані з патогенами (РТІ), та імунітету, що активується ефекторами (ЕТІ). Наслідком активації ЕТІ може бути реакція гіперчутливості (HR), яка полягає в загибелі клітин, що були інфіковані патогеном [28]. Саме HR є причиною виникнення чорних ліній у деяких сортів волоського горіху після інфікування CLRV. Ген, який відповідає за виникнення HR у взаємодії волоський горіх-CLRV є домінантним [29].

Наявність відповіді РТІ на ураження CLRV та трав'янистих рослин було зафіксовано. У клітинах *Nicotiana tabacum* cv. Xanthine у відповідь на ураження CLRV синтезуються кислі та основні хітинази. Їх наявність була зафіксована на 3-й день після інокуляції в листках, через які відбувалося інфікування вірусом, та на 8-й день у системно інфікованих листках. Хітинази та їхні мРНК були в некротичних кільцях та навколо них. Окрім того, наявність хітиназ на базальному рівні було зафіксовано і в безсимптомних частинах системно уражених листків [30]. Хоча роль хітиназ у протидії вірусним інфекціям рослин не зрозуміла, їх наявність свідчить про існування рецептора, який може детектувати наявність CLRV. Цей рецептор у подальшому може бути використаний для створення стійких сортів рослин методами селекції чи генної інженерії.

Є методи для звільнення від вірусної інфекції посадкового матеріалу. Для цього культури клітин, що були отримані від рослин, обробляються фізичними чи хімічними факторами. Так, одним з таких факторів є температура. Було

показано, що 22 °C було недостатньо для очищення культури клітин *Nicotiana rustica* від CLRV. Вирощування культури клітин протягом 5 днів за 32 °C призводило до відсутності видимих симптомів, однак не до звільнення клітин від вірусу, оскільки після кількох днів вирощування за зниженої температури на рослинах, що виглядали здоровими, починали проявлятися симптоми. Чисті від вірусу рослини були отримані з культур клітин, які вирощувалися за температури 32 °C протягом 20 днів або 7 днів за температури 40 °C [31]. Ще одним способом для очищення культур тканин від CLRV є електротерапія [32].

Є спроби використання генної інженерії для створення рослин, що були б стійкими до CLRV. У протопласти, що були отримані з клітин тютюну, було внесено плазмід, які містили капсидний білок у смисловій та антисмисловій послідовності й ділянку 3'-UTR. Через 12 годин протопласти були інфіковані CLRV шляхом електропорації. Накопичення вірусу було зменшено в протопластах, що містили плазмід з смисловою послідовністю капсидного білка й ділянкою 3'-UTR [33].

## **1.2. Біологічно активні речовини бузини чорної**

### **1.2.1. Основні біологічно активні речовини бузини чорної**

Біологічно активні речовини (БАР) – це речовини, що при взаємодії з певними елементами тканини мають на неї позитивний чи негативний вплив. Рослини синтезують велику кількість біологічно активних сполук, і велика їх кількість належить до вторинних метаболітів. Ці речовини синтезуються з первинних метаболітів рослин, і раніше вважалося, що вони не виконують ніяких функцій. Наразі відомо, що вони залучені до процесів регуляції

життєдіяльності рослин, регуляції екологічних взаємовідносин рослин з іншими організмами тощо [34].

Основними БАР бузини чорної, які мають велику цінність для використання в медицині, є фенольні сполуки. Згідно з фармакопеею України, вміст флаванолідів в квітах бузини має становити не менше 0,60% у перерахунку на ізокверцитрозид і суху сировину [35]. Відповідно до оціночного звіту європейської медичної агенції квіти бузини чорної мають містити не менше 0,80% флаванолідів, у перерахунку на ізокверцитрозид і суху сировину [36].

Одним із класів вторинних метаболітів рослин є фенольні сполуки. Ці речовини містять у своїй структурі хоча б одне ароматичне кільце, до якого приєднано гідроксильну групу. Їх класифікують за кількістю ароматичних кілець, місцем розташування на них гідроксильних груп та наявністю інших атомів карбону у структурі молекули. Базовими субстратами для синтезу фенольних сполук є речовини, що залучені до метаболізму вуглеводів. Фенольні сполуки регулюють ріст та розвиток рослин, проростання насіння, приваблюють запилювачів, сприяють захисту від патогенів та травоядних тварин [37].

Флавоноїди – це фенольні сполуки, які складаються з двох ароматичних кілець, які позначають літерами А та В, що з'єднані гетероциклічним кільцем С, яке містить атом кисню. В залежності від розміщення та кількості гідроксильних груп, наявності карбонільної групи в кільці С і місця приєднання ароматичного кільця В до гетероциклічного кільця С, флавоноїди діляться на флаволи, флаванони, флавоноли, флаваноли, антоціаніни, ізофлавоноїди та неофлавоноїди [38]. Найбільш розповсюдженим флавоноїдом у квітах бузини чорної є рутин [39,40,41]. Даний флавонол має протиракову, протизапальну, антимікробну, протівірусну та деякі інші активності, що сприяють покращенню здоров'я людини [42]

Іншою групою фенольних сполук, які часто виявляють у бузині чорній, є фенольні кислоти. До цієї групи належать сполуки, які мають у своїй структурі

ароматичне кільце, до якого приєднано одну або кілька гідроксильних груп та карбоксильну групу. За будовою фенольні кислоти можна розділити на гідроксибензойні та гідроксикоричні кислоти. У гідроксибензойних кислот карбоксильна група приєднана до ароматичного кільця прямо. У гідроксикоричних кислот карбоксильна група приєднана до ароматичного кільця через ланцюжок з двох атомів карбону, що поєднані подвійним зв'язком [43]. Серед цих сполук найвищий вміст у квітах бузини чорної мають кавова кислота та її похідні [39, 40, 41]. Данні сполуки мають антиоксидантні, антимікробні, протидіабетичні, протизапальні та протипухлинні властивості [44].

### 1.2.2. Синтез флавоноїдів та фенольних кислот

Синтез усіх рослинних фенольних сполук бере свій початок з шикіматного шляху. Цей шлях складається з семи реакцій, що забезпечують перетворення однієї молекули фосфоенолпірувату та однієї молекули еритрозо-4-фосфату на хоризмову кислоту. Ферменти, які забезпечують перебіг цих реакцій, знаходяться в пластидах [45]. Однак наявність ізозимів деяких з цих ферментів у цитозолі може нашоувхувати на думку, що шикіматний шлях може відбуватися і поза межами пластид [46]. Проте наразі поза межами пластид виявлено лише частину ферментів, які є необхідними для каталізу реакцій шикіматного шляху у деяких видів рослин. Тому наразі наявність шикіматного шляху поза пластидами є лише гіпотетичною.

Хоризмова кислота є спільним субстратом для синтезу великої кількості ароматичних сполук. Серед них – амінокислота фенілаланін, яка може бути перетворена на кумароїл-КоА шляхом послідовних реакцій, які каталізуються фенілаланін-аміаковою ліазою, цианат-4-гідроксилазою та 4-кумарат:КоА лігазою [47].

Кумароїл-КоА та чотири молекули малоніл-КоА під дією ферменту халкон-синтази перетворюються на нарінгенін-халкон. Ця сполука має в своїй структурі кільця А, що було утворено з малоніл-КоА, та В, яке було присутнє у кумароїл-КоА. Надалі халкон-ізомераза формує С-кільце і тим самим перетворює нарінгенін халкон на нарінгенін. Надалі нарінгенін зазнає певних модифікацій, що призводить до утворення груп флавоноїдів, які були перераховані вище. Після синтезу більшість груп флавоноїдів переміщується до тонопласту за допомогою білків-транспортерів. Там вони можуть зазнавати додаткових модифікацій [48].

Гідроксикоричні та гідроксибензойні кислоти синтезуються з коричної кислоти, яка утворюється внаслідок відщеплення аміногрупи від фенілаланіну. Надалі корична кислота може зазнавати гідроксилювання та інших модифікацій за різними положеннями ароматичного кільця, що призводить до появи різноманітних гідроксикоричних кислот. Альтернативними шляхами модифікації коричної кислоти є шлях, який не залежить від КоА та без  $\beta$ -окиснення, шлях, що залежить від КоА та без  $\beta$ -окиснення та шлях КоА-залежного  $\beta$ -окиснення, які проходять у цитоплазмі, пероксисомах та мітохондріях, відповідно. В результаті усіх трьох шляхів утворюється бензойна кислота, що може зазнавати гідроксилювання та інших модифікацій задля утворення гідроксибензойних кислот [49]. Однак саліцилова кислота також може бути синтезована з ізохоризмової кислоти через синтез та розпад ізохоризмоїл-глутамату А. У клітині фенольні кислоти перебувають у формах глікозидів, естерів, етерів або ж прикріплені до клітинної стінки [43].

### **1.2.3. Вплив зовнішніх факторів на синтез фенольних сполук**

На синтез фенольних сполук мають вплив абіотичні фактори. Так, кількість флавоноїдів та фенольних кислот у рослинах може збільшуватися у

разі надмірного сонячного опромінення, наявності важких металів та надмірної кількості солей у ґрунті, надмірної вологості ґрунту, посухи, зниження або підвищення температури тощо [50]. Це пов'язано з тим, що за впливу стресів на рослину активні форми кисню є важливими елементами сигнальної системи рослин [51]. Однак надмірне їх накопичення може нашкодити клітині через пошкодження нуклеїнових кислот, білків, ліпідів [52]. Тому накопичення антиоксидантних сполук, до яких відносяться і феноли, є важливим для підтримки гомеостазу в рослинних клітинах за стресових умов.

Синтез фенольних сполук залежить також від впливу біотичних факторів, до яких належать патогени рослин та шкідники. Індукція синтезу фенольних сполук сприяє захисту від шкідників та патогенів. По-перше, фенольні сполуки мають протипатогенну дію. Так, накопичення фенольних сполук спостерігається при інфікуванні рослин патогенними бактеріями, грибами та вірусами, що супроводжується негативним впливом на життєдіяльність патогенів. По-друге, фенольні сполуки є антиоксидантами, що здатні поглинати активні форми кисню, які утворюються внаслідок інфікування рослини патогеном чи пошкодження її шкідником [37]. По-третє, типовою реакцією на біотичний стрес є посилення клітинної стінки. Серед компонентів потовщеної клітинної стінки є й поліфеноли [47].

Оскільки фенольні сполуки, що містяться в бузині чорній, мають позитивний вплив на здоров'я людини, а на їх накопичення можуть впливати біотичні чинники, то важливим є поглиблення знань з приводу змін фенольних сполук за умов інфікування бузини різними патогенами.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Зразки

Для роботи було відібрано 11 зразків. У місті Києві було відібрано 8 зразків: 2 зразки були відібрані з Полтавської області і 1 з Хмельницької області (табл.2.1).

**Таблиця 2.1**

#### Зразки бузини і місце їх відбору

№ зразка	Місце відбору
6	Полтавська обл.
10	м. Київ
12	м. Київ
13	м. Київ
14	м. Київ
15	м. Київ
16	м. Київ
17	м. Київ
18	м. Київ
20	Хмельницька обл.
40	Сумська обл.
42	м. Київ
43	м. Київ
44	м. Київ
45	м. Київ

Для подальшого дослідження було відібрано листки та, в деяких випадках, квіти з кущів бузини, що мали ознаки інфікування CLRV.

## 2.2. Імуноферментний аналіз

DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) був проведений для підтвердження наявності CLRV у зразках. Для проведення DAS-ELISA були використані комерційні антитіла фірми Loewe проти CP CLRV. Матеріалом зразків, який використовувався для аналізу, слугували листки. Для деяких зразків додатково було проведено аналіз квіток на наявність CLRV. Як негативний контроль було використано листки бузини, які були попередньо перевірені на наявність CLRV, і антигенів вірусу в них не було виявлено. Позитивним контролем слугували листки бузини, в яких було виявлено наявність антигену CLRV.

Листки попередньо було подрібнено ножицями. Далі подрібнені листки або квіти були пересипані в ступку і залиті рідким азотом і перетерті. Коли рідкий азот випарувався, зразки були залиті фосфатним буфером (в пропорції 1 мг зразку/2 мл 0,1 М PBS) і їх гомогенізація продовжилася до стану однорідної субстанції. Цей гомогенат був відфільтрований через марлеву тканину в мікропробірки. Далі було проведено центрифугування при 3500 об/хв впродовж 5 хв.

У карбонатному буфері були розведені АТ1 в співвідношенні 1:200 (АТ1:карбонатний буфер) і внесені в лунки мікропланшету по 100 мкл в кожному лунку. Далі була проведена інкубація в термостаті впродовж 4-х годин за 37 °С. Наступним був етап відмивки за допомогою буферу відмивки, щоб позбутися АТ1, які не були адсорбовані на поверхні лунок. Було проведено 3 акти відмивки по 5 хв кожний.

Далі в лунки було внесено по 50 мкл надосадової рідини, очищеної центрифугуванням зразків, негативного та позитивного контролів та 50 мкл

буферу зразку. У цей раз процес інкубації відбувався впродовж ночі за температури 4 °С. Далі було проведено відмивку за тою ж схемою, що була описана вище.

Після цього АТ2 були розведені в буфері зразку та внесені в лунки по 100 мкл. Інкубація проводилася в термостаті впродовж 4-х годин за 37 °С. Наступним був етап відмивки, що проходив так само, як і попередні два рази, за винятком того, що в кінці був доданий ще один акт промивки 0,1 М PBS впродовж 5 хв.

Далі було приготовано субстратний розчин та в кожную лунку було внесено по 100 мкл цього розчину. Заключна інкубація проводилася впродовж 1,5 год в термостаті за 37 °С.

Спектрофотометром Thermo Labsystems Odis MR (Dynex Technologies, США) reader з програмним устаткуванням Dynex Revelation Quicklink було отримано результати DAS-ELISA. Реєстрація результатів проводилася на довжині хвилі 405 нм. Позитивним вважався результат, що у 3 рази перевищував значення, які були отримані для негативного контролю [53].

### **2.3. Виділення тотальної РНК**

Комерційний набір GeneJet PlantRNA Purification K 0801 (Thermo Scientific, США) був використаний для виділення РНК з досліджуваних зразків. Першим кроком було подрібнення ножицями рослинного матеріалу для формування наважок по 100 мг, які далі були перенесені в ступку, залиті рідким азотом і перетерті до гомогенного стану. Далі гомогенат був перенесений в мікропробірку ємністю 1,5 мл і залитий лізуючим буфером об'ємом 500 мкл. Наступним кроком було перемішування зразка з лізуючим буфером впродовж 15 секунд на вортексі. Після цього мікропробірку з наважкою та лізуючим буфером ставили на 3 хв на водяну баню за температури 56 °С.

Далі мікропробірку зі зразком було відцентрифугувано в режимі 14 тис. об./хв впродовж 5 хв. 500 мкл надосаду, що був отриманий в результаті центрифугування, було перенесено в чисту мікропробірку. До надосаду було додано 250 мкл етанолу (96%); отримана суміш була ретельно перемішана й перенесена у collection tube з колонкою для очищення.

Далі розчин було центрифугувано в режимі 11 тис. об./хв впродовж 1 хв. Після центрифугування колонка була вийнята, а розчин з collection tube вилито, після чого колонка була повернена назад. В колонку було додано 700 мкл Wash Buffer 1 і проведено центрифугування в режимі 11 тис. об./хв впродовж 1 хв.

Колонка була перенесена в чисту collection tube об'ємом 2 мл, після чого, до неї було додано 500 мкл Wash Buffer 2 і проведено центрифугування при 11 тис. об./хв впродовж 1 хв. З collection tube було злито розчин, що пройшов крізь неї. Далі було проведено повторне додавання Wash Buffer 2 і низькошвидкісне центрифугування.

Потім, колонка була перенесена в чисту мікропробірку об'ємом 1,5 мл. Далі в колонку було додано 50 мкл стерильної води. Останнім етапом було проведення низькошвидкісного центрифугування в режимі 11 тис. об./хв впродовж 1 хв. З мікропробірки, в якій знаходилась очищена РНК, було вийнято колонку.

#### **2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією**

Для виявлення генетичної послідовності CLRV спочатку необхідно отримати клоновану ДНК (кДНК). З цією метою було використано комерційний набір RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, США, EP0441).

До мікропробірки об'ємом 500 мкл було додано 8,5 мкл стерильної води, 3 мкл РНК, що була очищена зі зразка, і по 1 мкл праймеру 1 та праймеру 2

( $\mu\text{M}$ ). Праймер 1 – 5'-TGGCGACCGTGTAACGGCA-3'. Праймер 2 – 5'-GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG-3' [54]. Інкубація даної суміші відбувалася в термоциклері впродовж 5 хв за температури 65 °С. Далі мікропробірка була перенесена на лід та до неї було додано 2 мкл dNTP, 4 мкл 5-кратного RT-буфера та 1 мкл зворотної транскриптази. Після цього була проведена інкубація в термоциклері впродовж години за температури 42 °С.

З метою ампліфікації цільового фрагмента ДНК було використано набір DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США). До мікропробірки об'ємом 500 мкл було додано 12,5 мкл 2-кратного буферу Dream Taq Green PCR Master Mix, 7,5 мкл стерильної води, 3 мкл кДНК та по 1 мкл праймеру 1 та праймеру 2 (10  $\mu\text{M}$ ). Праймер 1 – 5'-TGGCGACCGTGTAACGGCA-3'. Праймер 2 – 5'-GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG-3'. Далі мікропробірку було поміщено в термоциклер із режимом ампліфікації:

95°C – 3 хв

95°C – 30 с (30 циклів)

55°C – 30 с (30 циклів)

72°C – 1 хв (30 циклів)

72°C – 10 хв

Горизонтальний електрофорез в агарозному гелі був використаний для підтвердження наявності цільового продукту ампліфікації.

## 2.5. Електрофорез нуклеїнових кислот

Електрофорез нуклеїнових кислот проводився у 1,5% агарозному гелі. Для його приготування 300 мг агарози було додано до 20 мл 0,089 М TBE-буферу. Для розплавлення агарози отримана суміш була нагріта в мікрохвильовій пічці впродовж 1–2 хв. 15 мкл розчину бромистого етидію (0,5 мг/мл) було додано до суміші після її охолодження. Після того, як суміш була

налита у форму, у неї було поміщено гребінку для формування лунок на відстані 0,5–1 мм від дна форми. 2 мкл буфера зразка (DNA Gel Loading Dye (6X), R0611, Thermo Fisher Scientific) та 5 мкл досліджуваної НК були змішані в лунках мікропланшету.

Після застигання, гель було вийнято з форми та розміщено в камері для електрофорезу. У камеру з гелем було налито стільки TBE-буферу, щоб буфер покривав гель шаром товщиною в 1 см. Далі зразки НК були внесені в лунки гелю. Електрофорез був проведений у режимі 15В/см впродовж 20 хв. Для оцінки результатів гель було поміщено під ультрафіолетові промені.

## 2.6. Філогенетичний аналіз

Продукти ампліфікації (кДНК) очищали за допомогою набору реактивів QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Велика Британія). Сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на аналізаторі 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

За допомогою BLAST-аналізу було проведено порівняння отриманих послідовностей із послідовностями ізолятів CLRV із Генбанку. Розрахунок відсотків ідентичності та побудова їх теплової мапи були зроблені у програмному забезпеченні SDTv1.3 [55]. Інструменти, що надає програмний пакет MEGA 11 використовувалися для філогенетичний аналізу [56]. Інструмент Clustal W був використаний для вирівнювання послідовностей. Філогенетичні дерева конструювали методом максимальної правдоподібності з використанням найбільш оптимальної моделі [57].

## 2.7. Виділення фенольних сполук

Для проведення дослідження загального вмісту фенольних сполук, загального вмісту флавоноїдів, загального вмісту фенольних кислот та антиоксидантної активності було приготовано екстракти з 6-ти рослин бузини чорної, які були відібрані в Києві. Інфіковані CLRВ – №13, №15 та №16, здорові – №10, №14 та №17. Для виділення фенольних сполук з листків та квітів вони були попередньо висушені. Сушіння проводилося в термостаті за температури 60 °С впродовж 3 діб. Для екстракції наважку сухої речовини (25 мг) розтирали в порошок з невеликою кількістю скляного піску. Далі додавали 2 мл метанолу. Екстракцію проводили за температури 4 °С впродовж доби.

## 2.8. Визначення загального вмісту фенольних сполук

Для визначення загального вмісту фенольних сполук було використано реактив Фоліна-Чокальтеу (суміш фосфорно-вольфрамової та фосфорно-молібденової кислот) у модифікації [58]. Для проведення колориметричного аналізу вихідний реактив Фоліна-Чокальтеу було розведено у 10 разів. Окрім цього, було приготовано 7,5% розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (m/v). Далі, екстракти бузини, метанол, розчин Фоліна-Чокальтеу та розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  були внесені в кювети спектрофотометра та витримані впродовж години за кімнатної температури (табл.2.2).

Таблиця 2.2

**Схема внесення реактивів для аналізу загального вмісту фенольних сполук**

	<b>Екстракт/метанол</b>	<b>Реактив Фоліна</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>
Дослід	0,2 мл (екстракт)	2 мл	2 мл
Бланк	0,2 мл (метанол)	2 мл	2 мл

Спектрофотометром Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Японія) було виміряно оптичну густину. Спектрофотометричне дослідження проводилося при  $\lambda = 765$  нм.

Для перерахунку результатів у мг еквіваленту галової кислоти (ЕГК) на г сухої ваги зразка (СВ) було побудовано калібрувальну криву розчинів галової кислоти у метанолі з концентраціями 0,05–0,5 мг/мл.

Розрахунок загального вмісту фенольних сполук у зразку проводили за формулою:

$$\text{загальний вміст фенольних сполук [мг ЕГК/г СВ]} = V * (D - b) / (k * m) \quad (2.1)$$

де  $V$  – об'єм екстракту, мл;

$D$  – оптична густина;

$m$  – наважка, г;

$b$  – постійний член рівняння лінії тренду калібрувальної кривої;

$k$  – коефіцієнт рівняння лінії тренду калібрувальної кривої.

## 2.9. Визначення загального вмісту флавоноїдів

Загальний вміст флавоноїдів визначався колориметрично за утворенням комплексів флавоноїдів з AlCl<sub>3</sub> у модифікації [58]. Для проведення

колориметричного аналізу було приготовано 10% розчин  $AlCl_3$  (m/v) на метанолі та 1 М розчин  $CH_3COONa$ . Далі, екстракти бузини, метанол, розчин 10% розчин  $AlCl_3$  та розчин, 1М  $CH_3COONa$  та дистильована вода були внесені в кювети спектрофотометра та витримані впродовж 15 хв за кімнатної температури (табл.2.3).

Таблиця 2.3

**Схема внесення реактивів для аналізу загального вмісту флавоноїдів**

	<b>Екстракт/метанол</b>	<b><math>AlCl_3</math></b>	<b><math>CH_3COONa</math></b>	<b><math>H_2O_{дист}</math></b>
Дослід	0,250 мл (екстракт)	0,100 мл	0,100 мл	2,150 мл
Бланк	0,250 мл (метанол)	0,100 мл	0,100 мл	2,150 мл

Спектрофотометром Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Японія) було виміряно оптичну густина. Спектрофотометричне дослідження проводилося при  $\lambda = 415$  нм.

Для перерахунку результатів у мг еквіваленту кверцетину (ЕК) на г СВ було побудовано калібрувальну криву розчинів кверцетину на метанолі з концентраціями 0,01 – 0,5 мг/л.

Розрахунок загального вмісту фенольних сполук у зразку проводили за формулою:

$$\text{загальний вміст флавоноїдів [мг ЕК/г СВ]} = V * (D - b) / (k * m) \quad (2.2)$$

де  $V$  – об'єм екстракту, мл;

$D$  – оптична густина;

$m$  – наважка, г;

$b$  – постійний член рівняння лінії тренду калібрувальної кривої;

$k$  – коефіцієнт рівняння лінії тренду калібрувальної кривої.

## 2.10. Визначення загального вмісту фенольних кислот

Загальний вміст фенольних кислот було визначено колориметрично за їх реакцією з реактивом Арнова (суміш молібдату натрію (10%) та натрію азотистокиислового (10%) у воді) у модифікації [58]. Для проведення колориметричного аналізу було приготовано реактив Арнова: 0,5 М НСІ та 1 М NaOH. Далі, екстракти бузини, метанол, реактив Арнова, 0,5 М НСІ, 1 М NaOH та дистильована вода були внесені в кювети спектрофотометра та витримані впродовж 15 хв за кімнатної температури (табл.2.4).

**Таблиця 2.4**

### Схема внесення реактивів для аналізу загального вмісту фенольних кислот

	Екстракт/метанол	НСІ	Реактив Арнова	NaOH	H <sub>2</sub> O <sub>дист</sub>
Дослід	0,250 мл (екстракт)	0,500 мл	0,500 мл	0,500 мл	0,500 мл
Бланк	0,250 мл (метанол)	0,500 мл	0,500 мл	0,500 мл	0,500 мл

Спектрофотометром Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Японія) було виміряно оптичну густину. Спектрофотометричне дослідження проводилося при  $\lambda=490$  нм.

Для перерахунку результатів у мг ЕГК на г СВ було побудовано калібрувальну криву розчинів галової кислоти на метанолі з концентраціями 1 – 200 мг/л.

Розрахунок загального вмісту фенольних кислот у зразку проводили за формулою:

загальний вміст фенольних кислот [мг ЕГК/г СВ] =  $V * (D - b) / (k * m)$  (2.3)

де  $V$  – об'єм екстракту, мл;

$D$  – оптична густина;

$m$  – наважка, г;

$b$  – постійний член рівняння лінії тренду калібрувальної кривої;

$k$  – коефіцієнт рівняння лінії тренду калібрувальної кривої.

### 2.11 Загальна антиоксидантна активність за реакцією відновлення DPPH

Для визначення загальної антиоксидантної активності екстрактів використовують метод, що базується на знебарвленні 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (DPPH) [58] у модифікації. Для проведення колориметричного аналізу було приготовано 0,1 мМ розчину DPPH в метанолі. Далі, екстракти бузини, метанол та розчин DPPH були внесені в кювети спектрофотометра та витримані впродовж 15 хв за кімнатної температури (табл.2.5).

**Таблиця 2.5**

#### Схема внесення реактивів для аналізу антиоксидантної активності

	Екстракт/метанол	Розчин DPPH
Дослід	0,025 мл екстракту	3 мл
Контроль	0,025 мл метанолу	3 мл

Спектрофотометром Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Японія) було виміряно оптичну густина. Оптична густина була виміряна за довжини

хвилі 517 нм. Результати виражені у відсотках інгібування DPPH, що розраховані за формулою:

$$\text{Інгібування DPPH} = [(A_k - A_d)/A_k] \times 100\% \quad (2.4)$$

де  $A_k$  – оптична густина контрольної проби;

$A_d$  – оптична густина дослідної проби.

## 2.12. Статистичний аналіз

Для DAS-ELISA, колориметричні аналізи загального вмісту фенольних сполук, флавоноїдів, фенольних кислот та антиоксидантної активності було проведено 3 технічні повтори для кожного досліджуваного зразка. Результати аналізували за параметричними критеріями нормального розподілу та стандартного відхилення:

$$X = \bar{X} \pm \sigma \quad (2.5)$$

$$\bar{X} = (X_1 + X_2 + \dots + X_i) / i \quad (2.6)$$

де  $X$  – достовірне значення вимірюваної величини;

$\bar{X}$  – середнє арифметичне виміряних значень;

$X_1 \dots X_i$  – виміряні значення;

$\sigma$  – стандартне відхилення.

Для перевірки рівності середніх значень результатів колориметричних досліджень було використано t-критерій Стьюдента. Аналіз проводився з використанням комп'ютерного програми MS EXCEL.

Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстрептест з 1000 бутстреп реплікаціями.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Візуальна діагностика зразків

Типовими симптомами, що з'являються на бузині, що була інфікована CLRV, є хлоротичні кільця, мозаїка та пожовтіння жилок [18].

Зразок №6 мав жовту мозаїку між жилками листків (рис.3.1А). Окрім цього, у нього було наявне скручування листків (рис.3.1Б).



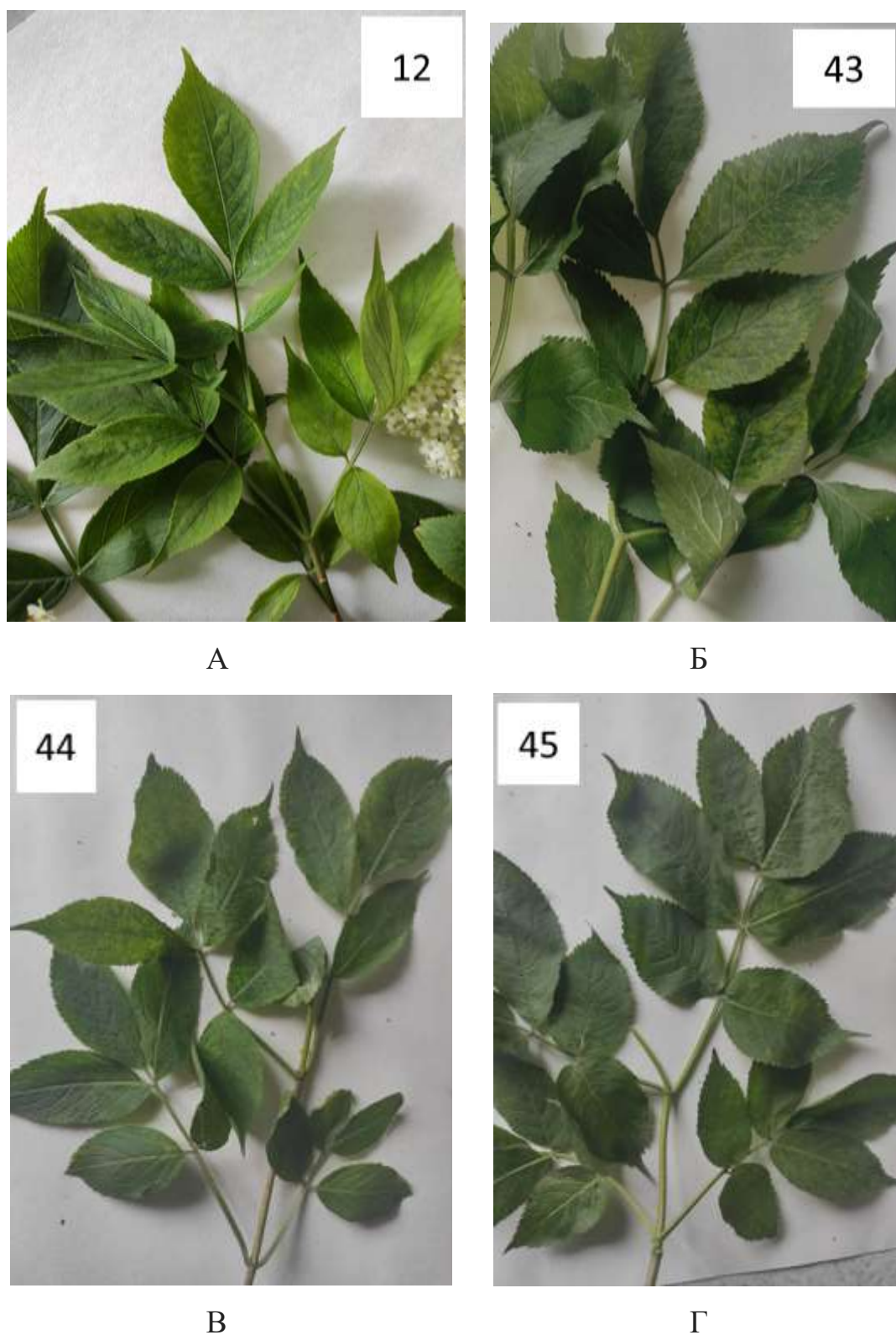
А



Б

**Рис.3.1.** Симптоми зразка №6, Полтавська область: А – міжжилкова мозаїка; Б – скручування листків

Деякі зразки з м.Києва мали хлоротичні плями на листках. Найбільш помітними вони були на зразках №12, №43, №44 та №45 (рис.3.2). Інших симптомів у цих зразках помічено не було.



**Рис.3.2.** Хлоротичні плями на листках: А – зразок №12; Б – зразок №43; В – зразок №44; Г – зразок №45

Найбільш слабкі симптоми серед досліджуваних зразків мав зразок №42 (рис.3.3). Він мав майже непомітні хлоротичні плями на деяких листках.



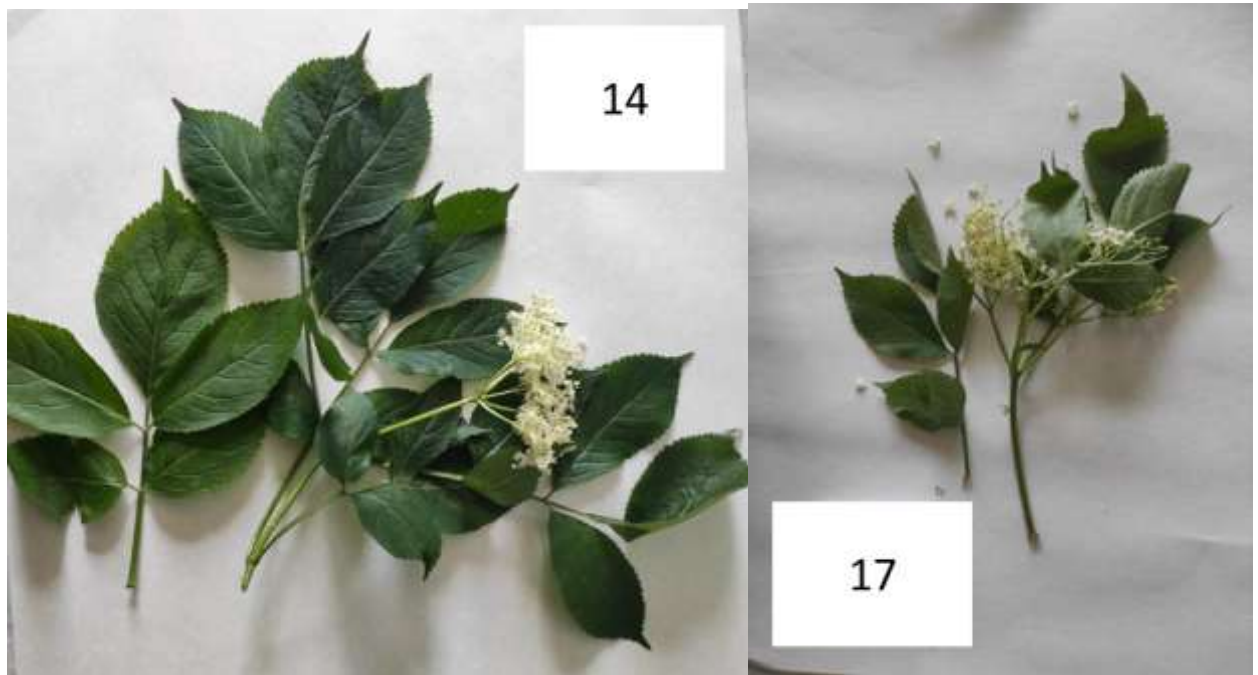
**Рис.3.3.** Слабкі хлоротичні плями на листках бузини, зразок №42

Зразок №10 мав скручені листки (рис.3.2А). Значних змін кольору листової пластини помічено не було, але деякі листки мали легке пожовтіння. Характерним симптомом, який мав зразок №18, є значна деформація листків (рис.3.2Б). Окрім скручування, яке є характерним симптомом ураження CLRV, листки мали зморшкуватий вигляд.



**Рис.3.4.** Скручування листків без мозаїчних симптомів: А – зразок №10; Б – зразок №18

Два зразки бузини були включені до роботи, хоча й не мали симптомів, які є характерними для ураження CLRV. Зразок №14 не мав явних симптомів (рис.3.4А). Рішення щодо включення його в роботу було прийнято через те, що бузина, з якої було отримано цей зразок, росла неподалік бузини, з якої був відібраний зразок №13. Зразок №17 не мав жодних інфекцій (рис.3.4Б). Він був відібраний для використання в якості негативного контролю в майбутніх дослідженнях.



А

Б

**Рис.3.5.** Зразки без візуальних симптомів: А – зразок №14; Б – зразок №17

Зразок №13 мав сильно виражену міжжилкову мозаїку. Листки цього зразка були скручені (рис.3.5А). У подальшому міжжилкова мозаїка зливалася в суцільну хлоротичну пляму (рис.3.5Б).

Суворість симптомів, можливо, можна пояснити несприятливим впливом навколишнього середовища. Відомо, що сигнальні шляхи, які контролюють відповідь рослин на біотичні та абіотичні, тісно зв'язані між собою. Отже, вплив чинників зовнішнього середовища може модулювати захисні реакції рослини на вірусні інфекції та навпаки, інфікування вірусом може змінювати реакцію рослин на абіотичні стреси [59]. Однак робіт, що висвітлюють вплив абіотичних чинників на CLRV-інфекцію, наразі небагато.

Іншим поясненням може бути відсутність або наявність певних генів у цієї бузини, що сприяють формуванню саме таких симптомів.

Подібні мозаїчні симптоми були присутні і у зразку №40 з Сумської обл. (рис.3.5В)



А

Б



В

**Рис.3.6.** Симптоми мозаїки на листках: А – зразок №13 (червень); Б – зразок №13 (серпень); В – зразок №40

На деяких зразках було чітко видно мозаїчні симптоми, однак скручування листків було відсутнє. До таких зразків належать зразок №15 та зразок №20 (рис.3.6). Мозаїка, яка була наявна на цих зразках, відрізнялася від тої, яка була в зразках №6, №13 та №40. Вона не мала чіткої міжжилкової локалізації і подекуди виглядала як скупчення хлоротичних плям або кілець.

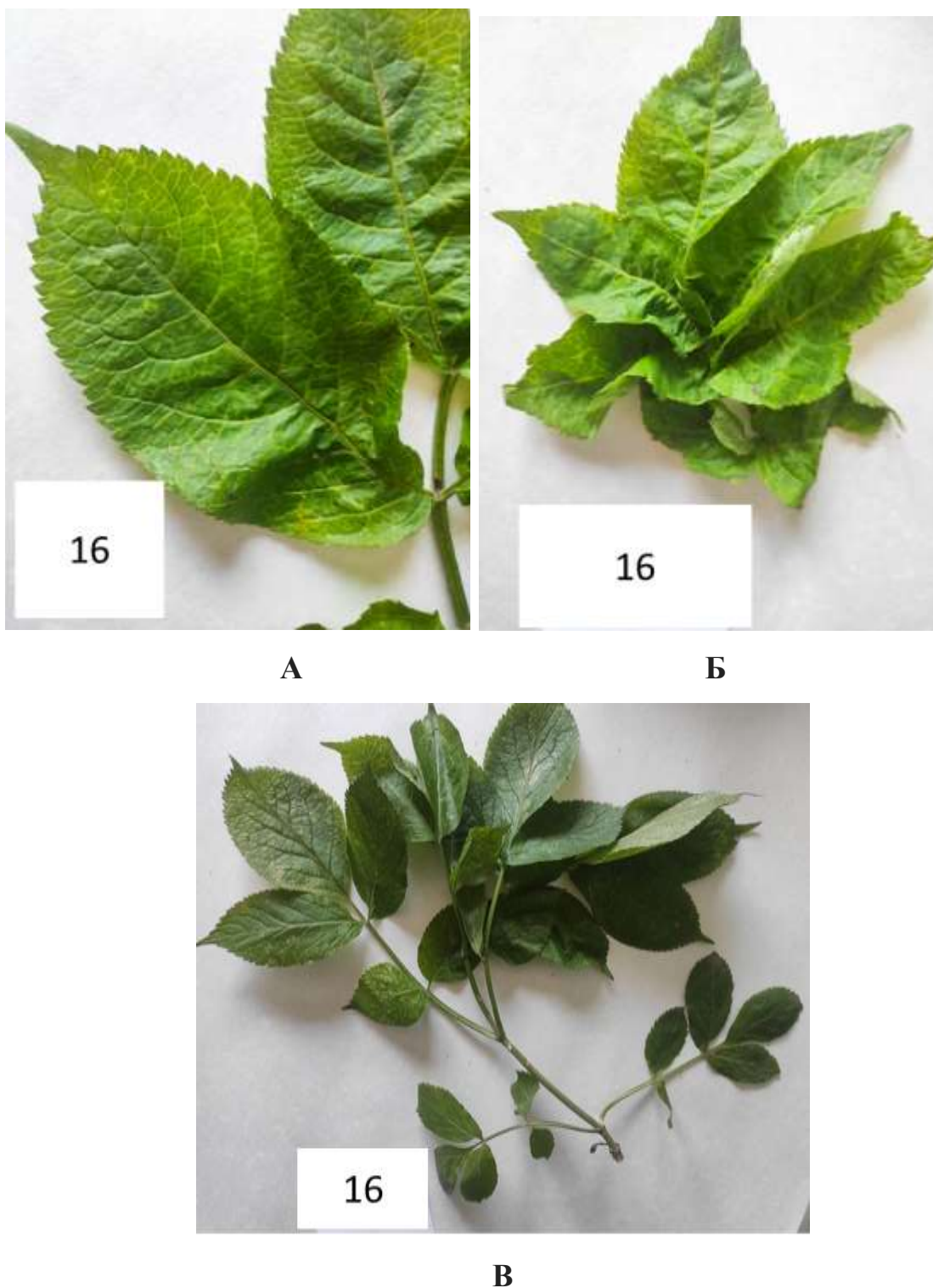


А

Б

**Рис.3.7.** Мозаїчні симптоми без скручування листків: А – зразок №15; Б – зразок №20

Найбільш різноманітний набір симптомів був присутній у зразку №16. Деякі листки були деформовані. Це могло проявлятися виключно у вигляді зморшкуватості (рис.3.7А) або у поєднанні зморшкуватості та скручування листків (рис.3.7Б). Це подібно до симптомів зразка №18, але в зразку №16 деформація була більш помірною. Для нього також була характерна міжжилкова мозаїка, що була подібною до тої, яка присутня в зразку №13 (рис.3.7В). Однак вона була присутня не на всіх листках і була не настільки яскраво виражена. На частині листків вона була присутня тільки вздовж країв листків.



**Рис.3.8.** Симптоми на листках, зразок №16, м. Київ: А – зморшкуватість листків; Б – зморшкуватість та скручування листків; В – Загальний вигляд гілки з листками, що має міжжилкову мозаїку

Наприкінці літа також були відібрані ягоди зразку №13, що мав найбільш яскраво виражені симптоми, та №14, що не мав симптомів (рис.3.8).



А

Б

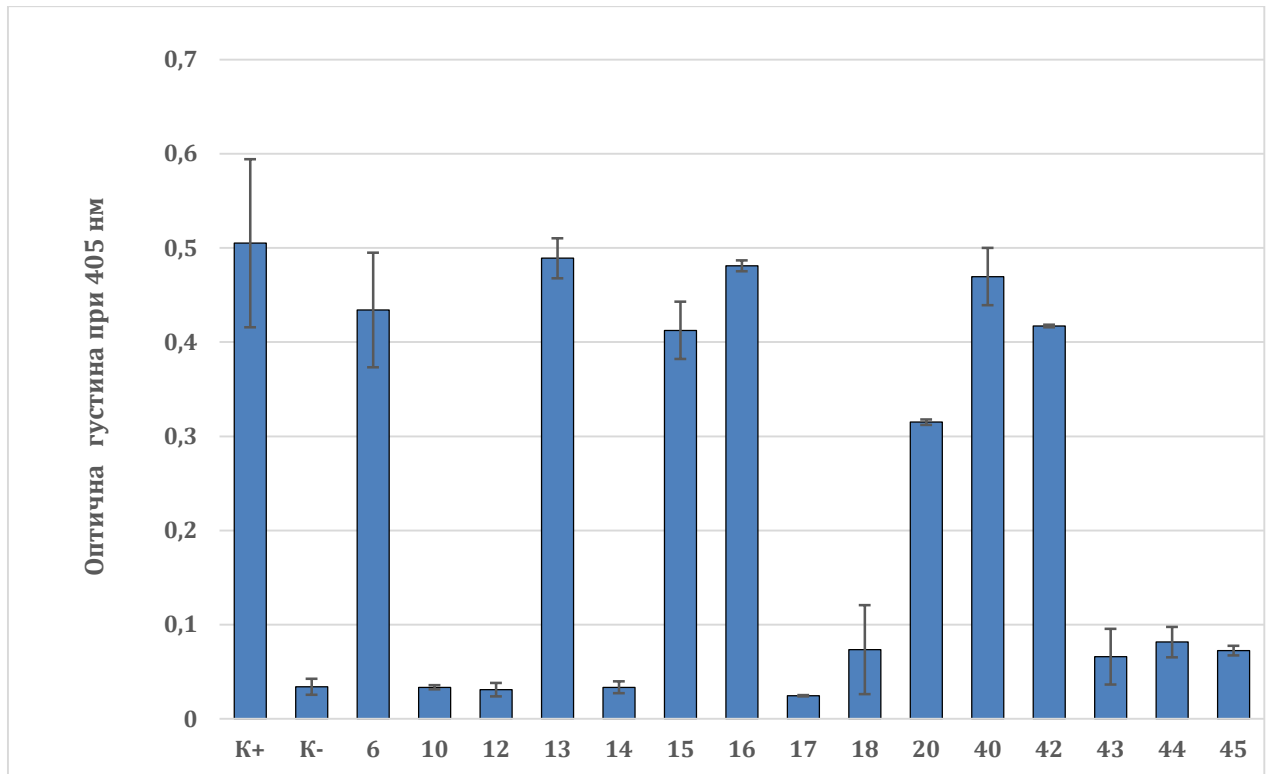
**Рис.3.9.** Ягоди бузини: А – зразок №13; Б – зразок №14

У бузини, з якої було отримано зразок №13, ягоди мали менший розмір, аніж ягоди зразка №14.

Про подібні симптоми в різних видів бузини, що інфіковані CLRV, вже повідомлялося в кількох країнах Європи. У Польщі повідомлялося про виявлення CLRV у рослинах бузини *Sambucus nigra*, *S. kamtschatica* та *S. racemosa*, які мали хлоротичні візерунки [60]. За описом це нагадує симптоми зразка №12. У Боснії та Герцеговині методом ІФА було ідентифіковано CLRV у рослинах *Sambucus nigra* L., що мали міжжилкову мозаїку, а пізніше на листках розвивалися невеликі некротичні плями та кільця [61]. Ця міжжилкова мозаїка є сильно подібною до тої, яка спостерігається в зразку №16 та на ранніх листках зразка №13. Однак, у цій роботі також повідомлялося, що окрім CLRV в рослинах бузини також був присутній вірус погримковості тютюну (Tobacco rattle virus, TRV). Це може свідчити про те, що дані симптоми є наслідком коінфекції цими двома вірусами. Окрім того, раніше в Україні теж було виявлено CLRV у рослинах бузини *Sambucus nigra* [62]. Характерними симптомами для інфікованої бузини були наявність мозаїк, скручування листків, редукування суцвіття та менший розмір ягід у інфікованих рослин.

### 3.2. Діагностика CLRV у листках та квітах методом ІФА

Першим методом, що був використаний для підтвердження наявності CLRV у відібраних зразках, був DAS-ELISA (рис.3.10).

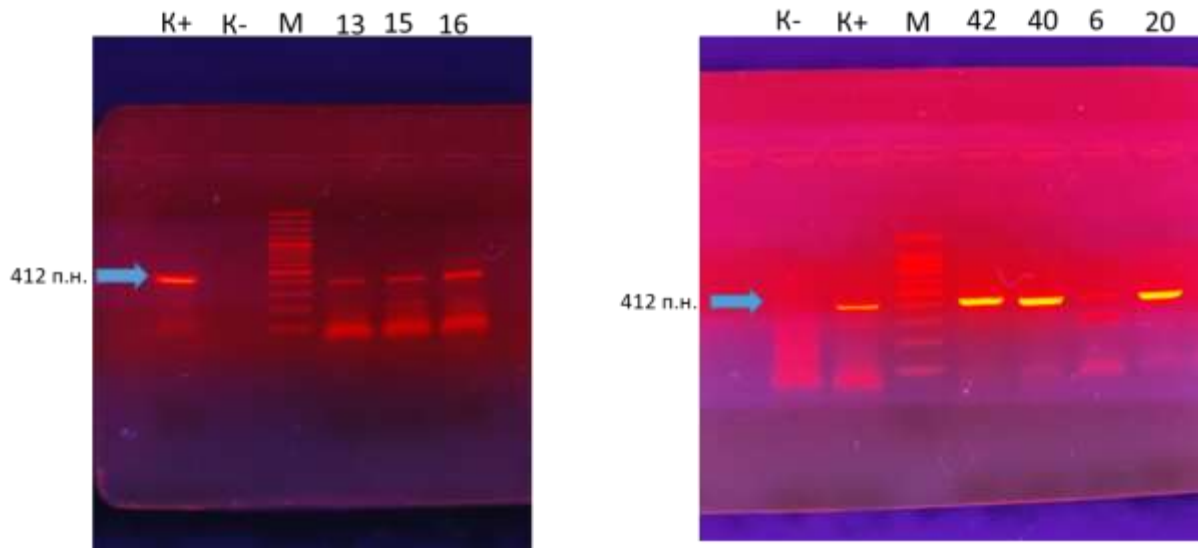


**Рис.3.10.** Результати DAS-ELISA для виявлення капсидного білка CLRV у листках бузини: K+ – позитивний контроль; K- – негативний контроль

За результатами цього аналізу наявність антигенів CLRV була підтверджена у листках зразків №6, №13, №15, №16, №20, №40 та №42.

### 3.3. Діагностика CLRV методом ЗТ-ПЛР

Для додаткового підтвердження наявності CLRV у зразках та подальшого секвенування була проведена полімеразна ланцюгова реакція (рис.3.11).

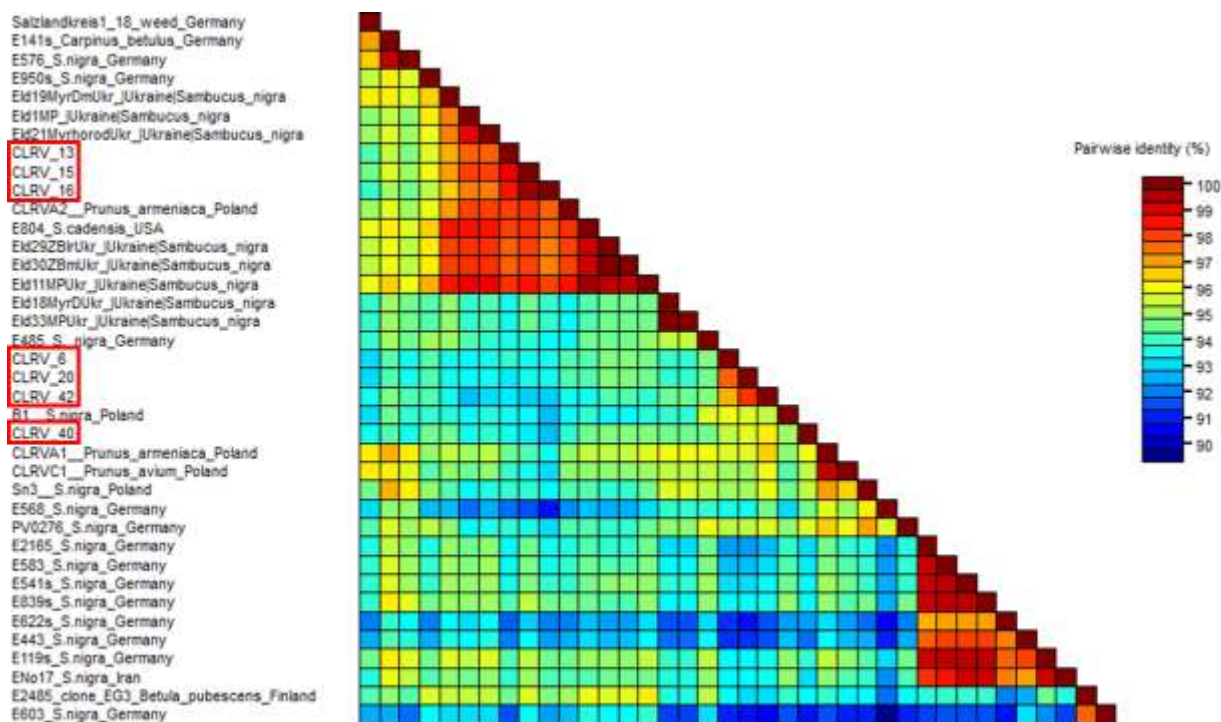


**Рис.3.11.** Електрофореграма продуктів ДНК із застосуванням праймерів до ділянки 3`UTR (412 п.н.): K+ – позитивний контроль; K- – негативний контроль; M – маркер ДНК MassRuler DNA Ladder Mix ready-to-use (Thermo Scientific, США)

За результатами ЗТ-ПЛР, наявність вірусної РНК була підтверджена в зразках №6, №13, №15, №16, №20, №40 та №42.

### 3.4 Філогенетичний аналіз

За розрахунками ідентичності результатів попарного вирівнювання послідовностей була побудована теплова матриця (рис.3.12). Відсоток ідентичності для досліджуваних ізолятів з іншими ізолятами CLRV варіювався від 85,45% до 98,48%. Найвищі відсотки ідентичності (90,30–98,48%) спостерігалися з ізолятами CLRV, які переважно були виділені з рослин бузини і належали до групи E [17] (рис.3.12).



**Рис.3.12.** Теплова мапа ідентичності ізолятів CLRV групи E за ділянкою 3'UTR (335 нуклеотидів)

Ізоляти, отримані зі зразків №13, №15, №16 та №6, №20, №40, №42, знаходилися в двох окремих кластерах. Найбільший відсоток ідентичності спостерігався між ізолятами зі зразків №13, №15, №16 (від 98,48% до 99,7%). Інші ізолти з якими дані мали високий відсоток ідентичності були CLRVA2 (від 97,58% до 98,18%), Eld11MPUkr (від 97,88% до 98,48%), E804 (від 97,88% до 98,18%), Eld1MP (від 97,88% до 97,88%), Eld21MyrhorodUkr(від 97,88% до 97,88%), Eld29ZBkrUkr (від 97,27% до 97,88%) та Eld30ZBmUkr (від 97,27% до 97,88%). В групі ізолятів зі зразків №6, №20, №40 та №42 відсоток ідентичності варіювався від 94,94% до 98,18%. Інші ізоляти, з якими дана група мала найвищі відсотки ідентичності, були B1 (від 94,85% до 95,77%), Sn3 (від 94,85% до 95,76%), CLRVA1 (від 95,45% до 96,36%), CLRVC1 (від 94,85% до 95,76%), PV0276 (від 95,15% до 95,45%).

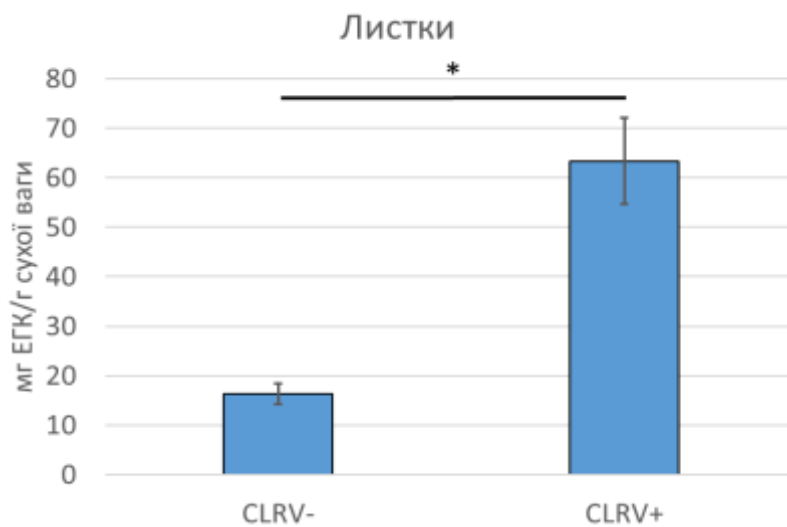
Для демонстрації еволюційних взаємовідносин між ізолятами було побудовано філогенетичне дерево (рис.3.13).



окрему гілку, яка розташована з гілкою, що складається з польського ізоляту Sn3 та німецьких PV-0276 та E568, які були виділені з бузини чорної, що може свідчити про їх імовірне спільне походження.

### 3.5. Загальний вміст фенольних сполук

За результатами колориметричного дослідження було встановлено, що вміст фенольних сполук значно відрізнявся у інфікованих вірусом рослинах бузини та неінфікованих рослинах (рис.3.14).

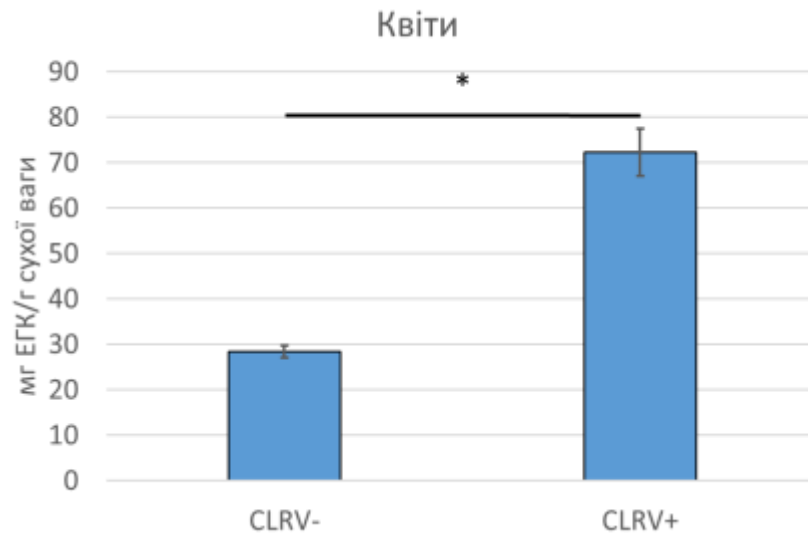


**Рис.3.14.** Вміст загальних фенольних сполук у листках бузини чорної: CLRV- – здорові рослини; CLRV+ – інфіковані рослини ( $M \pm \sigma$ ,  $n = 3$ ),

\* –  $p \leq 0,05$

Середнє значення загального вмісту фенольних сполук було на 47,07 мг ЕГК/г сухої ваги більшим у рослинах, у яких було встановлено наявність вірусу, в порівнянні з рослинами, що вірусу не містили.

Аналогічна ситуація з загальним вмістом фенольних сполук спостерігалася і у квітах аналізованих зразків (рис.3.15). У інфікованих вірусом рослинах вміст фенолів був на 43,91 мг ЕГК/г сухої ваги більшим, ніж у здорових рослин.



**Рис.3.15.** Вміст загальних фенольних сполук у квітах бузини чорної: CLRV- – здорові рослини; CLRV+ – інфіковані рослини ( $M \pm \sigma$ ,  $n = 3$ ),  
\* –  $p \leq 0,05$

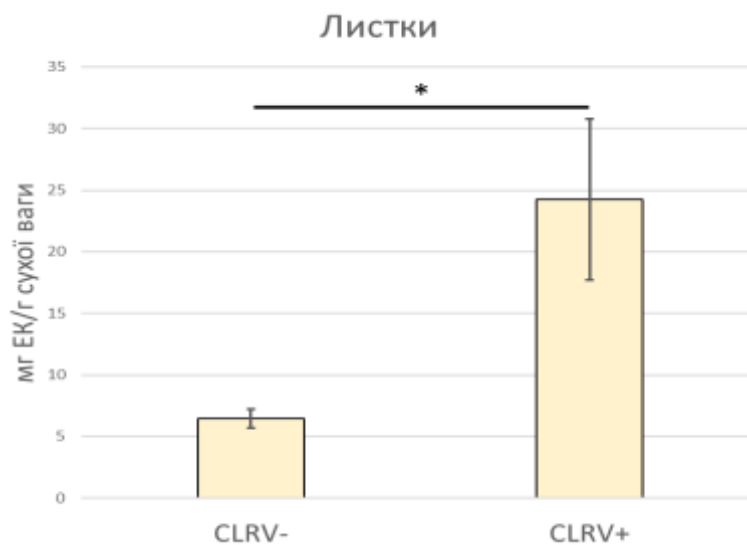
Ці дані узгоджуються з впливом на загальний вміст фенольних сполук у деяких інших системах вірус-рослина. Так, загальний вміст фенольних сполук у листках різних сортів яблук, що були уражені apple mosaic virus (ApMV) або apple necrotic mosaic virus (ApNMV), був вищим, ніж у неінфікованих рослин тих самих сортів [63]. Збільшення вмісту фенольних сполук спостерігалось у листі квасолі звичайної, що була інфікована bean common mosaic virus (BCMV). При цьому вищий вміст фенольних сполук мали як уражені стійкі рослини, так і рослини, що стійкості не мали. Різниця була відзначена у швидкості накопичення фенольних сполук. Більш стійкі сорти накопичували феноли швидше, що може свідчити про сильнішу захисну відповідь [64].

Однак подібна реакція рослини на ураження вірусом не є усезагальною. Так, листки коріандру, які були інфіковані beet curly top virus (BCTV), мали менший загальний вміст фенольних сполук у порівнянні зі здоровими контролями [65]. Змішані результати були отримані у дослідженні генетичної варіації стійкості какао до cocoa swollen shoot virus (CSSVD) залежно від загального вмісту фенольних сполук. Одні родини гібридів какао реагували на інфікування вірусом підвищенням загального вмісту фенольних сполук, а інші

– зменшенням [66]. Ймовірно, що накопичення фенольних сполук у рослинах інфікованих вірусами, залежить від наявності певних генів стійкості до конкретного виду вірусу, що сприятиме активації синтезу ферментів, що відповідальні за накопичення фенольних сполук, а також здатності вірусів пригнічувати метаболічні шляхи, які відповідальні за синтез фенольних сполук.

### 3.6. Загальний вміст флавоноїдів

Як і загальний вміст фенольних сполук, загальний вміст флавоноїдів був суттєво відмінним у листках здорових та інфікованих CLRV рослин бузини (рис.3.16).

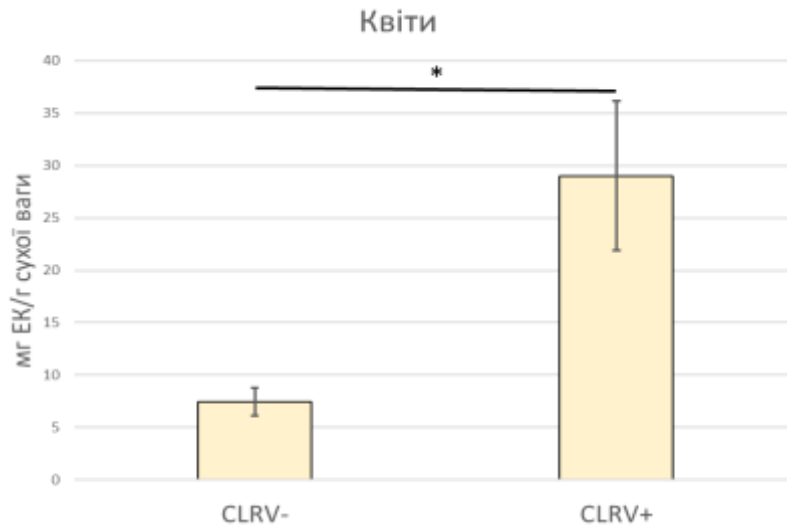


**Рис.3.16.** Загальний вміст флавоноїдів у листках бузини чорної: CLRВ- – здорові рослини; CLRВ+ – інфіковані рослини ( $M \pm \sigma$ ,  $n = 3$ )

\* –  $p \leq 0,05$

Загальний вміст флавоноїдів у вірусінфікованих рослинах був на 17,77 мг ЕК/г сухої ваги більшим у порівнянні зі здоровими.

Подібний результат був отриманий і для квітів інфікованих вірусом та здорових рослин (рис.3.17).



**Рис.3.17.** Загальний вміст флавоноїдів у квітах бузини чорної: CLRВ- – здорові рослини; CLRВ+ – інфіковані рослини ( $M \pm \sigma$ ,  $n = 3$ )

\* –  $p \leq 0,05$

Квіти здорових рослин бузини накопичували на 21,57 мг ЕК/г сухої ваги менше, ніж квіти інфікованих вірусом рослин.

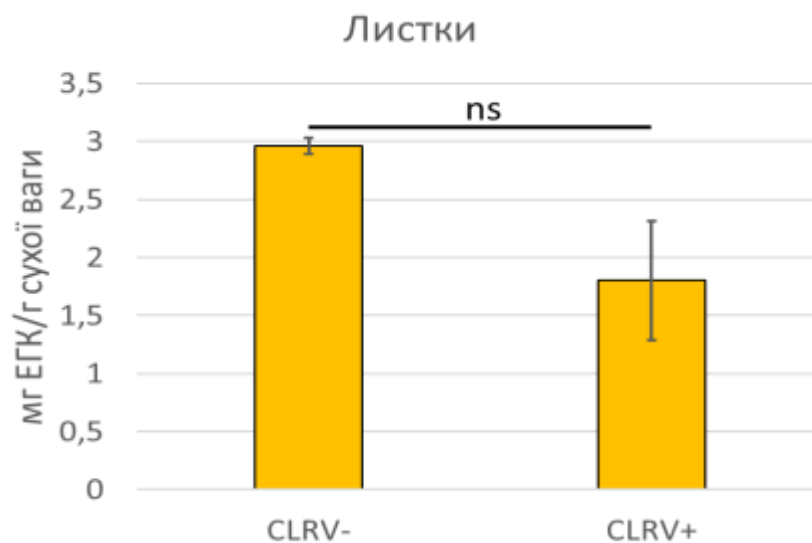
Загальний вміст флавоноїдів у листках яблук, які були інфіковані АрMV або АрNMV, був вищим, ніж у неінфікованих рослин [63]. Аналогічно, у листках квасолі, що була інфікована ВСMV, теж було зафіксовано вищий загальний вміст флавоноїдів у порівнянні зі здоровими рослинами [64]. Інфікування коріандру ВСТV призводило до зниження загального вмісту флавоноїдів в уражених рослинах [65].

Однак вірусна інфекція не однаково впливає на концентрацію різних флавоноїдів. У ягодах винограду, що був інфікований grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), кількісний вміст флаванолів епікатехіну та епігалокатехіну був нижчим, ніж у ягодах здорових рослин. В цей же час кількісний вміст флавонолу рутину в ягодах інфікованих рослин був вищим, ніж у ягодах неінфікованих рослин. Кількісний вміст інших аналізованих флавоноїдів не мав значної різниці [67]. У плодах томатів, що були інфіковані cucumber mosaic virus (CMV), було зафіксовано підвищення рівня флавоноїдів, за винятком кемпферол-3-О-рутинозиду. Його кількісний вміст не зазнав

значних змін [68]. Tobacco mosaic virus (TMV) призводив до значних змін в якісному та кількісному вмісті флавоноїдів у листках томатів. Ці зміни можуть бути пов'язані з впливом вірусної інфекції на транскрипцію генів, що кодують білки, відповідальні за синтез флавоноїдів [69]. Зміни в транскрипції ферментів, які залучені до синтезу флавоноїдів, та кількісному вмісті окремих флавоноїдів спостерігалися у рослинах кабачків, що були інфіковані CMV [70].

### 3.7. Загальний вміст фенольних кислот

На відміну від попередніх двох показників, загальний вміст фенольних кислот у листках інфікованої CLRV бузини не був більшим, ніж у листках неінфікованих рослин (рис.3.18).

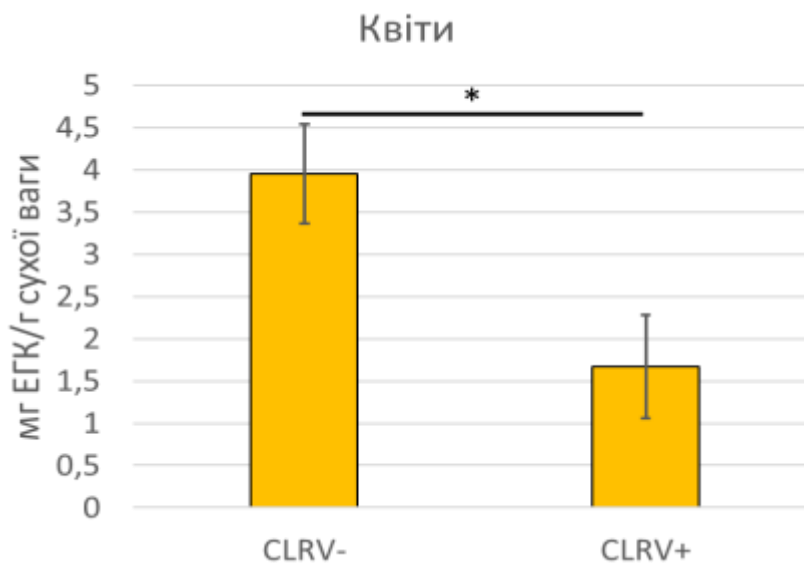


**Рис.3.18.** Загальний вміст фенольних кислот у листках бузини чорної: CLRV- – здорові рослини; CLRV+ – інфіковані рослини ( $M \pm \sigma$ ,  $n = 3$ )

ns –  $p > 0,05$

Різниця загального вмісту фенольних кислот у листі вірусінфікованих та здорових рослин бузини не була статистично значущою.

Менший вміст фенольних кислот був у квітах інфікованих вірусом рослин (рис.3.19). Різниця становила 2,29 мг ЕГК/г сухої ваги.



**Рис.3.19.** Загальний вміст фенольних кислот у квітах бузини чорної: CLRV- – здорові рослини; CLRV+ – інфіковані рослини ( $M \pm \sigma$ ,  $n = 3$ )

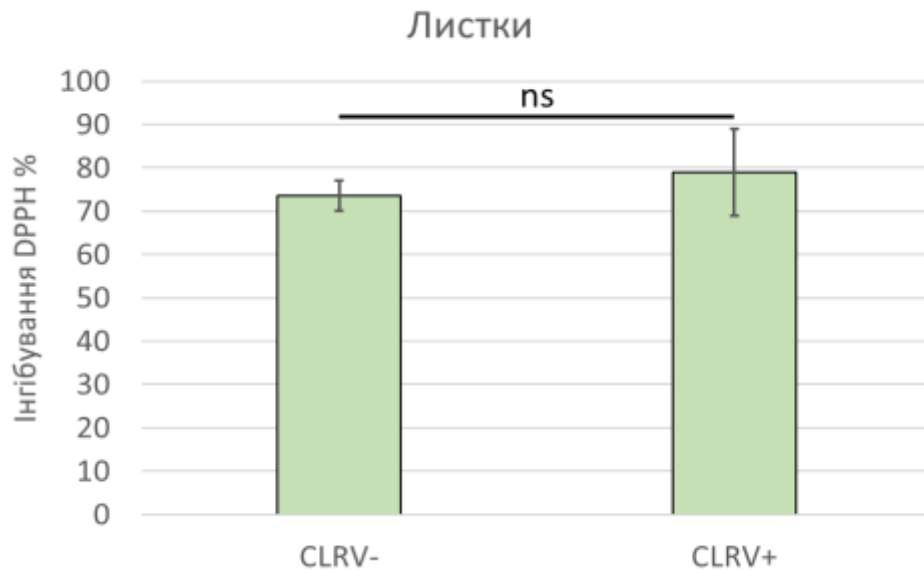
\* –  $p \leq 0,05$

Як і у випадку флавоноїдів, кількісний вміст окремих фенольних кислот може значно варіювати у здорових та інфікованих вірусом рослинах [67,68,69,70].

Фенольні кислоти можуть використовуватися для укріплення клітинної стінки рослин, що є одним із форм захисту у відповідь на проникнення в організм патогену [47]. Це призводить до зменшення кількості вільних фенольних кислот та їх похідних, що може бути причиною зниження загального вмісту фенольних кислот у екстрактах з квітів бузини, що інфіковані CLRV. Однак дана гіпотеза потребує детальнішого дослідження складу клітинної стінки тканин інфікованих вірусом рослин.

### 3.8. Антиоксидантна активність

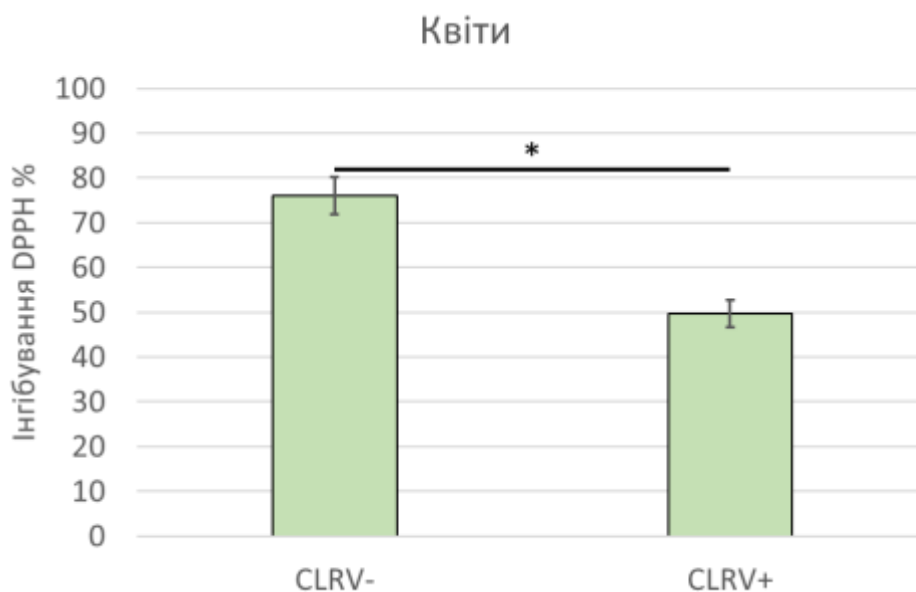
За результатами аналізу антиоксидантної активності, відмінностей між листками вірусінфікованої та здорової бузини, помічено не було (рис.3.20).



**Рис.3.20.** Антиоксидантна активність екстрактів з листків бузини чорної: CLRВ- – здорові рослини; CLRВ+ – інфіковані рослини ( $M \pm \sigma$ ,  $n = 3$ )  
ns –  $p > 0,05$

В той же час антиоксидантна активність екстрактів з квіток здорових рослин мала вище значення антиоксидантної активності у порівнянні з вірусінфікованими рослинами (рис.3.21). Різниця становила 26,33% інгібування DPPH.

Однак в інших системах хазяїн-вірус спостерігалися протилежні результати. Так, екстракти з листків яблунь, що були інфіковані АрMV або АрNMV, демонстрували сильнішу антиоксидантну активність, ніж екстракти з листків здорових яблунь [63]. Сильнішу антиоксидантну активність демонстрували і екстракти з листків андрагофісу, який був уражений есірта yellow vein virus (EcYVV), у порівнянні з екстрактами, отриманими з листків здорових рослин [71].



**Рис.3.21.** Антиоксидантна активність екстрактів з квітів бузини чорної: CLRV- – здорові рослини; CLRV+ – інфіковані рослини ( $M \pm \sigma$ ,  $n = 3$ )  
\* –  $p \leq 0,05$

Кількісний вміст окремих фенольних сполук може варіюватися у вірусінфікованих та здорових рослинах, про що було згадано раніше. Окрім цього, різні фенольні сполуки по-різному виявляються в колориметричному аналізі загального вмісту фенольних сполук з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу та в колориметричному дослідженні антиоксидантної активності з використанням DPPH [72]. Так, розчин кверцетину мав найкращі відновні властивості по відношенню до реактиву Фоліна-Чокальтеу серед речовин, що досліджувалися в [72], однак слабо відновлював DPPH. Натомість його 3'-глікозиди мали кращу здатність відновлювати DPPH. Одним із 3'-глікозидів кверцетину є кверцетин-3-О-рутинозид, що є основною фенольною сполукою, яка накопичується в квітах та листках бузини чорної [39, 40, 41]. Це нашоує на думку, що за умов зменшення вмісту рутину та збільшення вмісту кверцетину у органах інфікованих рослин може спостерігатися ситуація, коли колориметричний аналіз з використанням реагенту Фоліна-Чокальтеу демонструє вищі значення загального вмісту фенольних сполук, а здатність екстрактів відновлювати DPPH буде меншою,

якщо порівнювати зі здоровими рослинами. Ця зміна якісного вмісту може бути спричинена впливом CLRV на накопичення цукрів, оскільки відомо, що в ягодах ураженої CLRV бузини вміст цукру був значно меншим, ніж у неінфікованих рослинах [4]. Це гіпотетично може призводити до зниження синтезу глікозидів флавоноїдів. Однак для підтвердження цієї гіпотези необхідно провести детальний аналіз якісного та кількісного вмісту фенольних сполук за допомогою більш чутливих методів.

Тому, вплив фармацевтичних препаратів, що були виготовлені з квітів інфікованих CLRV рослин бузини чорної, на здоров'я людини гіпотетично може відрізнятися від впливу препаратів, які були виготовлені з квітів здорових рослин, через зниження антиоксидантної активності та відмінності у кількісному вмісті окремих фенольних сполук.

## ВИСНОВКИ

1. Проведено серологічну і молекулярну діагностику CLRV у рослинах бузини. Методами ІФА та ЗТ-ПЛР вірус виявлено у 7-ми протестованих зразках, що становить 46,7%.
2. За результатами філогенетичного аналізу сім досліджуваних ізолятів CLRV належать до групи Е, послідовності ділянки 3' UTR яких депоновано до Генбанку під номерами PZ361892 (зі зразка №6), PZ361893 (зі зразка №13), PZ361894 (зі зразка №15), PZ361895 (зі зразка №16), PZ361896 (зі зразка №20), PZ361897 (зі зразка №40), PZ361898 (зі зразка №42). Встановлено, що три ізоляти CLRV з Києва є найбільш спорідненими з польським ізолятом CLRVA2 із абрикоса; решта – з бузиновими польським Sn3 та німецькими PV-0276 і E568, що може свідчити про їх ймовірне спільне походження.
3. Загальний вміст фенольних сполук та флавоноїдів у листках ураженої CLRV бузини чорної був суттєво вищим (у 3,89 раза й у 3,75 раза відповідно), ніж у здорових рослинах. Різниці у вмісті фенольних кислот не відмічено.
4. Встановлено підвищення загального вмісту фенольних сполук (у 2,55 раза) та флавоноїдів (у 3,89 раза) у квітках CLRV-інфікованої бузини та зниження вмісту фенольних кислот у 1,53 раза порівняно зі здоровими рослинами. Ці відмінності можуть свідчити про можливий взаємозв'язок між кількісним вмістом фенольних сполук та вірусною інфекцією у бузині чорній.
5. Антиоксидантна активність екстрактів з листків здорової та інфікованої вірусом бузини не мала суттєвих відмінностей, а для екстрактів з квітів інфікованих CLRV рослин була нижчою у 2,37 раза порівняно зі здоровими, що може бути пов'язано зі змінами в якісному складі фенольних сполук.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D. and Łysiak, G.P. (2017). Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry, *Journal of Functional Foods*, 40, pp. 377–390, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.025> [Accessed 12 Apr. 2026].
2. Stadnytska, N. Y., Fedoryshyn, O. M., Mylyanych A. O., Kosarevych, K. I. and Novikov, V. P. (2019). *Sambucus nigra* в складі фармацевтичних препаратів, представлених на ринку України. *Фармацевтичний Часопис*, (2), pp. 52–59, [online]. Available at: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2019.2.10183> [Accessed 12 Apr. 2026].
3. Mishra, J., Srivastava, R., Trivedi, P.K. and Verma, P.C. (2020). Effect of virus infection on the secondary metabolite production and phytohormone biosynthesis in plants. *3 Biotech*, 10(12), p. 547, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02541-6> [Accessed 12 Apr. 2026].
4. Dunich, A., Molodchenkova, O., Nazarov, T., Dashchenko, A., Mishchenko, I., Kozub, N., Smertenko, A. and Mishchenko, L. (2025). Cherry leaf roll virus on elderberry in Ukraine: phylogeny, impact on yield, berry quality and some links of the immune response. *Journal of Plant Pathology*, 107(4), pp. 2197–2208, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s42161-025-01988-x> [Accessed 12 Apr. 2026].
5. Genus: nepovirus | ICTV (no date), [online]. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/secoviridae/secoviridae/nepovirus> [Accessed 12 Jan. 2026].
6. Jones, A.T. and Mayo, M.A. (1972). The two nucleoprotein particles of cherry leaf roll virus. *Journal of General Virology*, 16(3), pp. 349–358, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-16-3-349> [Accessed 12 Jan. 2026].

7. Sanfaçon, H. (2008). Nepovirus. in Elsevier eBooks, pp. 405–413, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-012374410-4.00449-0> [Accessed 12 Jan. 2026].
8. Nepovirus avii (CLRV00)[Overview]] EPPO Global Database (no date), [online]. Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/CLRV00> [Accessed 12 Jan. 2026].
9. Shen, J., Guo, J., Chen, X., Cai, W., Du, Z. and Zhang, Y. (2022). The spatial diffusion of cherry leaf roll virus revealed by a Bayesian phylodynamic analysis. *Viruses*, 14(10), p. 2179, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/v14102179> [Accessed 12 Jan. 2026].
10. Eastwell, K.C., Mekuria, T.A. and Druffel, K.L. (2012). Complete nucleotide sequences and genome organization of a cherry isolate of cherry leaf roll virus. *Archives of Virology*, 157(4), pp. 761–764, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1208-4> [Accessed 12 Jan. 2026].
11. Brooks, M. and Bruening, G. (1995). A Subgenomic RNA Associated with Cherry Leafroll Virus Infections. *Virology*, 211(1), pp. 33–41, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1376> [Accessed 12 Jan. 2026].
12. Sanfaçon, H., Zhang, G., Chisholm, J., Jafarpour, B. and Jovel, J. (2006). *Molecular Biology of Tomato Ringspot Nepovirus, a Pathogen of Ornamentals, Small Fruits and Fruit Trees*. In: Teixeira da Silva, J. (Ed.), Global Science Books, London, pp.540-546.
13. Hellen, C.U.T. and Cooper, J.I. (1987). The genome-linked protein of cherry leaf roll virus. *Journal of General Virology*, 68(11), pp. 2913–2917, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-11-2913> [Accessed 12 Jan. 2026].
14. Sanfaçon, H. (2022). Re-examination of nepovirus polyprotein cleavage sites highlights the diverse specificities and evolutionary relationships of nepovirus 3C-like proteases. *Archives of Virology*, 167(12), pp. 2529–2543, [online].

- Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05564-x> [Accessed 12 Jan. 2026].
15. Jafarpour, B. (2010). Characterization of the X4 protein of Tomato ringspot virus and analysis of its variability among virus isolates (T). *Electronic Theses and Dissertations (ETDs) 2008+*. University of British Columbia. Retrieved April 5, 2025, from <https://open.library.ubc.ca/collections/ubctheses/24/items/1.0069330> [Accessed 12 Jan. 2026].
  16. Hily, J.M., Poulicard, N., Kubina, J., Reynard, J.S., Spilmont, A.S., Fuchs, M., Lemaire, O. and Vigne, E. (2021). Metagenomic analysis of nepoviruses: diversity, evolution and identification of a genome region in members of subgroup A that appears to be important for host range. *Archives of Virology*, 166(10), pp. 2789–2801, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05111-0> [Accessed 12 Jan. 2026].
  17. Rebenstorf, K., Candresse, T., Dulucq, M.J., Bütner, C. and Obermeier, C. (2006). Host Species-Dependent population structure of a Pollen-Borne plant virus, cherry leaf roll virus. *Journal of Virology*, 80(5), pp. 2453–2462, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1128/jvi.80.5.2453-2462.2006> [Accessed 12 Jan. 2026].
  18. Plantwise Knowledge Bank. (2012). PlantwisePlus Knowledge Bank. [online]. Available at: <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/pwkb.species.16077> [Accessed 1 Jun. 2025].
  19. Woo, E.N.Y. and Pearson, M.N. (2013). Biological and molecular variation of Cherry leaf roll virus isolates from *Malus domestica*, *Ribes rubrum*, *Rubus idaeus*, *Rumex obtusifolius* and *Vaccinium darrowii*. *Plant Pathology*, 63(4), pp. 838–845, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/ppa.12166> [Accessed 13 Jan. 2026].
  20. Haber, S. and Hamilton, R.I. (1980). Distribution of Determinants for Symptom Production, Nucleoprotein Component Distribution and

- Antigenicity of Coat Protein between the Two RNA Components of Cherry Leaf Roll Virus. *Journal of General Virology*, 50(2), pp. 377–389, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-2-377> [Accessed 13 Jan. 2026].
21. Dierker, L., Von Bargaen, S. and Büttner, C. (2015). Interaction studies of cherry leaf roll virus (CLRV)-encoded proteins involved in intercellular virus movement in host plants. *Acta Horticulturae*, (1099), pp. 681–686, [online]. Available at: <https://doi.org/10.17660/actahortic.2015.1099.83> [Accessed 13 Jan. 2026].
22. Mas, P. and Pallas, V. (1996). Long-distance movement of cherry leaf roll virus in infected tobacco plants. *Journal of General Virology*, 77(3), pp. 531–540, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-3-531> [Accessed 13 Jan. 2026].
23. Jones, A.T., Mcelroy, F.D. and Brown, D.J.F. (1981). Tests for transmission of cherry leaf roll virus using *Longidorus*, *Paralongidorus* and *Xiphinema* nematodes. *Annals of Applied Biology*, 99(2), pp. 143–150, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1981.tb05141.x> [Accessed 13 Jan. 2026].
24. Massalski, P.R. and Cooper, J.I. (1984). The location of virus-like particles in the male gametophyte of birch, walnut and cherry naturally infected with cherry leaf roll virus and its relevance to vertical transmission of the virus. *Plant Pathology*, 33(2), pp. 255–262, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1984.tb02647.x> [Accessed 13 Jan. 2026].
25. Cooper, J.I., Massalski, P.R. and Edwards, M. (1984). Cherry leaf roll virus in the female gametophyte and seed of birch and its relevance to vertical virus transmission. *Annals of Applied Biology*, 105(1), pp. 55–64, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1984.tb02802.x> [Accessed 13 Jan. 2026].

26. Hou, H. (2006). *Pollen transmission of Cherry leafroll virus in sweet cherry (Prunus avium L.)*. MS. Washington State University, [online]. Available at: <https://hdl.handle.net/2376/100398> [Accessed 14 Jan. 2026].
27. Langer, J., Schuster, A. K., von Bargaen, S., Bandte, M. and Büttner, C. (2013). 9-9 Vector transmission of Cherry leaf roll virus? Candidate insect species infesting *Betula* spp. In: Schneider C, Lefert C, Feldmann (Eds), *Endophytes for plant protection: the state of the art*, pp. 313-314, [online]. Available at: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20153048005> [Accessed 20 Jun. 2025].
28. Ngou, B.P.M., Jones, J.D.G. and Ding, P. (2021). Plant immune networks. *Trends in Plant Science*, 27(3), pp. 255–273, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.012> [Accessed 14 Jan. 2026].
29. Woeste, K., Bernatzky, R. and McGranahan, G. (1993). THE GENETIC CONTROL OF HYPERSENSITIVITY TO CHERRY LEAF-ROLL VIRUS IN WALNUT AND THE IDENTIFICATION OF DNA MARKERS FOR THE RAPID IDENTIFICATION OF RESISTANT SEEDLINGS. *HortScience*, 28(5), pp. 454e–4454. [online]. Available at: <https://doi.org/10.21273/hortsci.28.5.454e> [Accessed 14 Jan. 2026].
30. Balsalobre, J.M., Más, P., Sánchez-Pina, M.A. and Pallás, V. (1997). Spatial distribution of acidic chitinases and their messenger RNAs in tobacco plants infected with Cherry leaf roll virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(6), pp. 784–788, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1094/mpmi.1997.10.6.784> [Accessed 14 Jan. 2026].
31. Cooper, V.C. and Walkey, D.G.A. (1978). Thermal inactivation of cherry leaf roll virus in tissue cultures of *Nicotiana rustica* raised from seeds and meristem-tips. *Annals of Applied Biology*, 88(2), pp. 273–278, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1978.tb00706.x> [Accessed 14 Jan. 2026].
32. Mirzaei, L., Yadollahi, A., Naderpour, M., Kermani, M.J., Zeinanloo, A.A., Eftekhari, M. and Eichmeier, A. (2024). Electrotherapy; a promising therapy

- to eradicate viruses from infected in vitro olive cv. Meshkat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 157(3), [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02777-7> [Accessed 12 Jan. 2026].
33. Brooks, M. and Bruening, G. (1995). Transient gene expression of antisense RNA and coat Protein-Encoding sequences reduced accumulation of cherry leafroll virus in tobacco protoplasts. *Virology*, 208(1), pp. 132–141, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1136> [Accessed 14 Jan. 2026].
34. Bernhoft, A. (2010). Bioactive compounds in plants: benefits and risks for man and animals: Proceedings from a Symposium Held in Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, 13 - 14 November 2008.
35. Державна Фармакопея України (2023). Вид. 2-ге, доповнення 6, Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 424 с.
36. *Sambuci flos - herbal medicinal product* | European Medicines Agency (EMA) (2025). [online]. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/sambuci-flos> [Accessed 9 Apr. 2026].
37. Pratyusha S. (2022). Phenolic compounds in the plant development and defense: an overview. In: *Plant stress physiology - Perspectives in Agriculture*. edited by Hasanuzzaman M., Nahar K. London: IntechOpen. [online]. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.102873> [Accessed 9 Apr. 2026].
38. Zhuang, W.-B., Li, Y.-H., Shu, X.-C., Pu, Y.-T., Wang, X.-J., Wang, T. and Wang, Z. (2023). The classification, molecular structure and biological biosynthesis of flavonoids, and their roles in biotic and abiotic stresses. *Molecules*, 28(8), p. 3599, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules28083599> [Accessed 9 Apr. 2026].
39. Uzlasir, T., Kadiroglu, P., Selli, S. and Kelebek, H. (2020). LC-DAD-ESI-MS/MS characterization of elderberry flower (*Sambucus nigra*) phenolic

- compounds in ethanol, methanol, and aqueous extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(8), [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14478> [Accessed 9 Apr. 2026].
40. Crișan, D., Frumuzachi, O., Babotă, M., Gavrițaș, L., Ranga, F., Mocan, A., Vodnar, D.C. and Crișan, G. (2025). Phytochemical variability and bioactive potential of *Sambucus nigra* L. flower extracts: A comparative study across four ecological regions from Romania. *Industrial Crops and Products*, 236, p. 121948, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.121948> [Accessed 9 Apr. 2026].
41. Christensen, L.P., Kaack, K. and Fretté, X.C. (2007). Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids. *European Food Research and Technology*, 227(1), pp. 293–305, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0723-8> [Accessed 9 Apr. 2026].
42. Semwal, R., Joshi, S.K., Semwal, R.B. and Semwal, D.K. (2021). Health benefits and limitations of rutin - a natural flavonoid with high nutraceutical value. *Phytochemistry Letters*, 46, pp. 119–128, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.10.006> [Accessed 9 Apr. 2026].
43. Valanciene, E., Jonuskiene, I., Syrpas, M., Augustiniene, E., Matulis, P., Simonavicius, A. and Malys, N. (2020). Advances and prospects of phenolic acids production, biorefinery and analysis. *Biomolecules*, 10(6), p. 874, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom10060874> [Accessed 10 Apr. 2026].
44. Chen, H., Pan, B., Zhang, S., Li, X., Zhang, Y., Gao, K., Chen, D., Wang, L., Jiang, T., Luo, C. and Huang, C. (2025) Recent advances in biosynthesis and bioactivity of plant caffeoylquinic acids. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(11), p. 942, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/cimb47110942> [Accessed 10 Apr. 2026].
45. Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B. and Villanueva-Cañongo, C. (2019) Shikimic acid pathway in biosynthesis of

- phenolic compounds. in IntechOpen eBooks, [online]. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.83815> [Accessed 10 Apr. 2026].
46. Lynch, J.H. (2022). Revisiting the dual pathway hypothesis of Chorismate production in plants. *Horticulture Research*, 9, p. uhac052, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1093/hr/uhac052> [Accessed 10 Apr. 2026].
47. Dong, N. and Lin, H. (2020). Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), pp. 180–209, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/jipb.13054> [Accessed 10 Apr. 2026].
48. Manzoor, M.A., Sabir, I.A., Shah, I.H., Riaz, M.W., Rehman, S., Song, C., Li, G., Malik, M.S., Ashraf, G.A., Haider, M.S., Cao, Y. and Abdullah, M. (2023). Flavonoids: a review on biosynthesis and transportation mechanism in plants. *Functional & Integrative Genomics*, 23(3), p. 212, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01147-4> [Accessed 10 Apr. 2026].
49. Marchiosi, R., Santos, W.D.D., Constantin, R.P., De Lima, R.B., Soares, A.R., Finger-Teixeira, A., Mota, T.R., De Oliveira, D.M., De Paiva Foletto-Felipe, M., Abrahão, J. and Ferrarese-Filho, O. (2020). Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(4), pp. 865–906, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2> [Accessed 10 Apr. 2026].
50. Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M. and Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), p. 2452, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24132452> [Accessed 10 Apr. 2026].
51. Ravi, B., Foyer, C.H. and Pandey, G.K. (2023). The integration of reactive oxygen species (ROS) and calcium signalling in abiotic stress responses. *Plant Cell & Environment*, 46(7), pp. 1985–2006, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/pce.14596> [Accessed 10 Apr. 2026].

52. Zheng, C., Chen, J.-P., Wang, X.-W. and Li, P. (2025) Reactive oxygen species in plants: metabolism, signaling, and oxidative modifications. *Antioxidants*, 14(6), p. 617, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox14060617> [Accessed 10 Apr. 2026].
53. Crowther, J.R. (1995). ELISA. Theory and practice. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 42, pp.1–218, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1385/0-89603-279-5:1> [Accessed 10 Jun. 2026].
54. Werner, R., Mühlbach, H. -p. and Büttner, C. (1997). Detection of cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. *European Journal of Forest Pathology*, 27(5), pp. 309–318, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1997.tb01085.x> [Accessed 10 Jun. 2025].
55. Muhire, B.M., Varsani, A. and Martin, D.P. (2014). SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE*, 9(9), p. e108277, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277> [Accessed 15 Aug. 2025].
56. Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), pp. 3022–3027, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120> [Accessed 15 Aug. 2025].
57. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), pp. 111–120, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/bf01731581> [Accessed 15 Aug. 2025].
58. Godočiková, L., Ivanišová, E. and Kačániová, M. (2017). The Influence of Fortification of Dark Chocolate with Sea Buckthorn and Mulberry on the Content of Biologically Active Substances. *Advanced Research in Life Sciences*, 1(1), pp. 26–31, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1515/arls-2017-0004> [Accessed 15 Aug. 2025].

59. Rahman, A., Sinha, K.V., Sopory, S.K. and Sanan-Mishra, N. (2021). Influence of virus–host interactions on plant response to abiotic stress. *Plant Cell Reports*, 40(11), pp. 2225–2245, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02718-0> [Accessed 11 Apr. 2026].
60. Berniak, H. (2016). Partial characterization of cherry leaf roll virus (CLRV) isolates infecting *Sambucus* spp. plants in Poland. *ACTA Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 15(2), pp 55-63, [online]. Available at: <https://czasopisma.up.lublin.pl/asphc/article/view/2428> [Accessed 11 Apr. 2026].
61. Jerković-Mujkić, A., Delić, O. and Bešta, R. (2010). Nalaz miješane virusne infekcije na crnoj zovi (*Sambucus nigra* L.). *Radovi Šumarskog Fakulteta Univerziteta U Sarajevu*, 40(1), pp. 73–80, [online]. Available at: <https://doi.org/10.54652/rsf.2010.v40.i1.158> [Accessed 11 Apr. 2026].
62. Mishchenko, L., Dunich, A., Dashchenko, A., Kozub N., Hlushchenko L. (2022). Screening of cherry leaf roll virus in *Sambucus nigra* plants in Ukraine. *Karantin I Zahist Roslin*, (3), pp. 11–14, [online]. Available at: <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2022.3.11-14> [Accessed 11 Apr. 2026].
63. Manzoor, S., Nabi, S.U., Rather, T.R., Verma, M.K., Alrobaish, S.A., Raja, W.H., Mir, J.I., Wani, T.A., Mir, R.R., Jeelani, F., Parveen, S. and Mansoor, S. (2024) Comparative biochemical and physiological responses to the virus-induced mosaic disease in apple (*Malus domestica*). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(6), pp. 1945–1958, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00974-2> [Accessed 12 Apr. 2026].
64. Adak, E., Demirezen, S., Karaman, E.Y., Gündoğmuş, B., Yeken, M., Morca, A.F., Güler, E., Yeken, M.Z., Santosa, A.I., Achs, A., Glasa, M. and Çelik, A. (2026) Contrasting antioxidant and metabolic responses of resistant and susceptible common bean varieties to bean Common mosaic virus (BCMV) infection. *Journal of Phytopathology*, 174(2), [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/jph.70273> [Accessed 12 Apr. 2026].

- 65.Saadati, M., Ayyari, M. and Shams-Bakhsh, M. (2023) The effect of beet curly top virus on growth and phytochemical constituents of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *South African Journal of Botany*, 162, pp. 804–812, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.10.009> [Accessed 12 Apr. 2026].
- 66.Ofori, A., Padi, F.K., Ameyaw, G.A., Dadzie, A.M. and Lowor, S. (2015) Genetic variation among cocoa (*Theobroma cacao* L.) families for resistance to cocoa swollen shoot virus disease in relation to total phenolic content. *Plant Breeding*, 134(4), pp. 477–484, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/pbr.12282> [Accessed 12 Apr. 2026].
- 67.Liu, N., Jiang, W., Zhou, H., Hao, X., Liu, G., Bao, W., Zhou, X., Xu, T. and Xu, Y. (2026) Effects of Grapevine leafroll-associated virus 3 on the chemical and sensory properties of cabernet sauvignon grape and wine. *Foods*, 15(4), p. 624, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods15040624> [Accessed 12 Apr. 2026].
- 68.Rendina, N., Nuzzaci, M., Sofò, A., Campiglia, P., Scopa, A., Sommella, E., Pepe, G., De Nisco, M., Basilicata, M.G. and Manfra, M. (2019) Yield parameters and antioxidant compounds of tomato fruit: the role of plant defence inducers with or without Cucumber mosaic virus infection. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(12), pp. 5541–5549, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9818> [Accessed 12 Apr. 2026].
- 69.Rabie, M., Aseel, D.G., Younes, H.A., Behiry, S.I. and Abdelkhalek, A. (2024) Transcriptional responses and secondary metabolites variation of tomato plant in response to tobacco mosaic virus infestation. *Scientific Reports*, 14(1), [online]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69492-3> [Accessed 12 Apr. 2026].
- 70.Abelkhalek, A., Király, L., Al-Mansori, A.-N.A., Younes, H.A., Zeid, A., Elsharkawy, M.M. and Behiry, S.I. (2022) Defense responses and metabolic changes involving phenylpropanoid pathway and PR genes in squash (*Cucurbita pepo* L.) following Cucumber mosaic virus infection. *Plants*,

- 11(15), p. 1908, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants11151908> [Accessed 12 Apr. 2026].
71. Khan, A., Luqman, S., Masood, N., Singh, D.K., Saeed, S.T. and Samad, A. (2016) Eclipta yellow vein virus enhances chlorophyll destruction, singlet oxygen production and alters endogenous redox status in *Andrographis paniculata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, pp. 165–173, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.03.027> [Accessed 12 Apr. 2026].
72. Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U. and Eisner, P. (2021) How does the phenol structure influence the results of the Folin-Ciocalteu assay? *Antioxidants*, 10(5), p. 811, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox10050811> [Accessed 12 Apr. 2026].