

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА
Протокол № ____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**ВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ В КОЛЕКЦІЇ СУКУЛЕНТНИХ РОСЛИН
БОТАНІЧНОГО САДУ ІМ. О.В. ФОМІНА**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання
за спеціальністю біологія
Яковенко Анастасії Олегівни

Науковий керівник від кафедри
к.б.н., доц. Коротєєва Г.В.

Оцінка захисту роботи

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

Київ – 2024 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГРС – граничне розведення соку

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЕМ – електронна мікроскопія

ЕФ – електрофорез

ІФА – імуноферментний аналіз

ТЗІ – тривалість збереження інфекційності

ТТІ – точка температурної інактивації

ФБР – фосфатний буферний розчин

СMV – Cucumber mosaic virus, вірус огіркової мозаїки

CVX – Cactus virus X, X вірус кактусу

CV-2 – Cactus virus 2, вірус кактусу 2

Ig G – імуноглобуліни класу G

ELISA – sandwich enzyme linked immunosorbent analysis

OpVX – Opuntia virus X, X вірус опунції

PVM – Potato virus M, M-вірус картоплі

PVS – Potato virus S, S-вірус картоплі

PVX – Potato virus X, X-вірус картоплі

PVY – Potato virus Y, Y-вірус картоплі

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика вірусів, що уражують сукуленти	7
1.1. Загальна характеристика сукулентів	7
1.2. Колекція сукулентних рослин Ботанічного саду О.В. Фоміна	9
1.3. Віруси, що уражують сукуленти	13
1.3.1. X вірус кактусу	13
1.3.2. Потексвірус зигокактусу X.....	13
1.3.3. Вірус кактусу Сагуаро	14
1.3.4. Вірус кактусу 2.....	14
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	15
2.1. Матеріали та реактиви.....	15
2.2. Відбір зразків.....	15
2.3. Біологічне тестування.....	16
2.4. Імуноферментний аналіз.....	16
2.5. Електронно-мікроскопічні дослідження.....	18
2.6. Виділення тотальної РНК.....	18
2.7. Постановка ЗТ-ПЛР.....	20
2.8. Електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі та виділення продуктів ампліфікації	20
2.9. Сиквенс кДНК.....	22

2.10. Побудова філогенетичних дерев.....	22
2.11. Статистична обробка даних.....	23
РОЗДІЛ 3. Результати дослідження та обговорення.....	25
3.1. Візуальна діагностика уражень відібраних рослин.....	25
3.2. Результати біологічного тестування.....	29
3.3. Виявлення уражених сукулентних рослин методом імуноферментного аналізу.....	33
3.4. Результати електронномікроскопічного дослідження соку інфікованих рослин	35
3.5. Підтвердження наявності вірусної інфекції в кактусах методом ЗТ-ПЛР.....	36
3.6. Штамова приналежність українського ізоляту CVX.....	38
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	41

ВСТУП

Сукулентні рослини вражають своєю екзотичною зовнішністю, витонченими формами та здатністю адаптуватися до найрізноманітніших умов середовища. Специфіка екологічних і морфологічних властивостей цих рослин дає можливість вирощувати їх при значних температурах, інтенсивній інсоляції, а також при сухості повітря і земляного кома. Однак величезне різноманіття сукулентних, їх різко відмінні еколого-біологічні особливості викликають цілий ряд труднощів, пов'язаних передусім з утриманням цих рослин в умовах закритого гранту. Крім того постійно збільшується їх асортимент з метою широкого використання для озеленення інтер'єрів приміщень.

Проте, разом із захоплюючою красою, сукулентні рослини також піддаються впливу різноманітних факторів, серед яких важливе місце посідає вірусна інфекція.

Колекції сукулентів збираються протягом багатьох років та часто містять нетестовані на вірусоносійство рослини. Тому при вегетативному розмноженні, що нерідко проводиться без вірусологічного контролю, відбувається накопичення великої кількості уражених вірусом рослин. Окрім цього, деякі віруси, що викликають захворювання кактусових можуть розповсюджуватись не лише механічним шляхом, але за допомогою переносників (нематодами, кліщами). Залишається невідомим, який відсоток даних рослин зникає внаслідок вірусного ураження. Аналіз вірусних інфекцій сукулентних рослин не лише збагатить наше розуміння різноманітності вірусів у рослинному світі, але й допоможе розробити ефективні заходи контролю та профілактики хвороб сукулентів для збереження біорізноманіття цих рослин.

Саме тому метою цієї роботи було дослідження колекції сукулентних рослин ботанічного саду ім. О.В. Фоміна на наявність збудників вірусної етіології.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ, ЩО УРАЖУЮТЬ СУКУЛЕНТИ

1.1. Загальна характеристика сукулентів

Сукуленти — це рослини, які мають здатність адаптуватися до аридних умов шляхом зберігання води в своїх тканинах. Ця унікальна адаптація дозволяє їм виживати в середовищах, де доступ до води обмежений. Ось основні характеристики сукулентів:

1. **М'ясисті частини:** Однією з найважливіших особливостей сукулентів є м'ясисті листки, стебла або корені, що зберігають воду. Це допомагає рослині залишатися зволоженою навіть у дуже сухих умовах.

2. **Ефективність використання води:** Сукуленти мають особливі механізми для зменшення втрати води, включаючи закриття своїх продихів (стом) вдень, коли температура та випаровування води найвищі.

3. **Товсті, воскові листки:** Багато сукулентів мають воскове покриття на своїх листках, яке допомагає зменшити втрату води через випаровування.

4. **Глибокі кореневі системи:** Деякі сукуленти розвивають глибокі кореневі системи, щоб досягати води в глибоких шарах ґрунту.

5. **Цвітіння:** Сукуленти можуть мати дуже красиві та різноманітні квіти. Часто цвітіння відбувається після довгого періоду спокою та залежить від умов догляду.

6. **Різноманітність форм та кольорів:** Сукуленти мають широкий діапазон форм, розмірів та кольорів, що робить їх популярними серед любителів домашніх рослин.

7. Адаптація до різних умов середовища:

Сукуленти відомі своєю невибагливістю та здатністю виживати у важких умовах з обмеженим доступом до води, що робить їх ідеальними рослинами для вирощування в сухих кліматах або для тих, хто шукає легкі в догляді домашні рослини.

Морфологічні та фізіологічні особливості сукулентів відображають їхню адаптацію до аридних умов та здатність зберігати воду. Ось деякі з найважливіших особливостей:

Спеціальні клітини: у м'ясистих тканинах сукулентів зазвичай знаходяться спеціальні клітини, які містять велику кількість води. Ці клітини допомагають рослинам зберігати воду та використовувати її під час посухи.

Мікроскопічні пори: Сукуленти мають мікроскопічні пори, відомі як стоми, через які відбувається обмін газів. У деяких сукулентів стоми можуть бути закриті вдень, щоб зменшити випаровування води.

Глибокі кореневі системи: Багато сукулентів мають глибокі та розгалужені кореневі системи, які допомагають рослинам здобувати воду з глибоких шарів ґрунту.

Ечеверія (Echeveria). Ечеверії мають густо розташовані листки, які формують розетки різного кольору та розміру. Ці рослини популярні завдяки своїм декоративним листям і легкості у догляді.

Красула (Crassula). До цього роду належить велика кількість різних видів сукулентів, включаючи добре відомий "Дерево грошей" (*Crassula ovata*). Красули можуть мати різні форми і розміри, але більшість з них мають товсті, м'ясисті листя, що дозволяє їм зберігати воду.

Алое (Aloe). Алое - це великий рід, що включає багаторічні рослини з товстими, м'ясистими листями. Вони відомі не тільки своїми декоративними якостями, але й лікувальними властивостями соку, особливо виділеними з Алое вера.

Седум (Sedum). Седуми, або очитки, - це багаторічні сукулентні рослини, які мають товсті листя і часто використовуються в садівництві як покривні рослини. Вони легко пристосовуються до різних умов і можуть виживати в посушливих середовищах.

Кактуси (Cactaceae). Кактуси - це, мабуть, найвідоміша група сукулентів, яка включає тисячі видів з різноманітними формами, розмірами та колючками. Хоча більшість людей асоціюють кактуси з пустелями, деякі види можуть зростати в тропічних лісах.

Це лише кілька прикладів сукулентних рослин, і існує багато інших видів і родів, кожен з яких має унікальні особливості та вимоги до утримання. Сукуленти стають все більш популярними завдяки їх здатності виживати.

В Україні сукуленти користуються великою популярністю серед любителів кімнатних рослин та декораторів інтер'єрів, оскільки вони не лише красиві, але й невибагливі у догляді. Ці рослини ідеально підходять для сучасного стилю життя, де може не вистачати часу на регулярний догляд за більш вимогливими рослинами. Ось кілька видів сукулентів, які популярні в Україні:

1.2. Колекція сукулентних рослин Ботанічного саду О.В. Фоміна

Колекція сукулентних рослин ботанічного саду ім. О.В. Фоміна Київського національного університету є найбільшою в Україні. До її складу входить понад 2500 видів і внутрішньовидових таксонів із 36 родин. Сукулентні рослини згруповані за еколого-географічним та на стелажах за систематичним принципом. Колекція складається з п'яти ґрунтових експозицій. Особливо численні представники сімейства кактусових, які нараховують понад 1500 видів і внутрішньовидових

таксонів. Найбільшу цінність мають рідкісні та зникаючі види кактусів, яких у колекції майже 600 видів.

В оранжереях представлена найбільша в Україні колекція сукулентних рослин, яка налічує понад 2500 видів і внутрішньовидових таксонів з 36 родин. Рослини демонструються в п'яти ґрунтових експозиціях за еколого-географічним принципом та на стелажах за систематичним принципом.

Найбільш численною є колекція кактусів, яка включає понад 1500 видів та внутрішньовидових таксонів. Серед них майже 600 видів рідкісних і зникаючих у природі кактусів. Вони виділяються яскравим і тривалим цвітінням. Деякі, наприклад, айлостера, мамілярія та ребуція, починають цвісти у віці 3-5 років. Особливий інтерес викликає родокактус великолистковий, який має справжні листки та квітує з квітня по вересень. Також можна побачити цереус перуанський заввишки 7-8 метрів та 50-річні екземпляри ехінокактуса Грузона, діаметр яких перевищує 35 см.

Агави відомі своїми технічними і лікарськими властивостями. У колекції представлені такі види, як агава сизалева та агава фуркрееподібна, які вирощуються на промислових плантаціях у тропічних країнах.

Унікальна експозиція "Кактуси тропічного лісу" містить представників роду Селеніцереус з великими запашними квітками діаметром до 20 см, які розкриваються вночі. Також тут можна побачити гілоцереус, квітки якого досягають 25 см. Роди Рипсаліс і Лепісміум з ампельними пагонами створюють атмосферу тропічного лісу Південної Америки.

Сукуленти острова Мадагаскар та Південної Африки. Ця експозиція включає рослини родини Барвінкові, такі як пахіподіум Ламера і пахіподіум Жайї, відомі своїми шипами на стовбурах. Також представлені рослини з родин Виноградові, Гарбузові та Бурсерові. Смоли

з кори рослин родини Бурсерові, відомі як мирра, використовуються у релігійних обрядах.

Сукуленти Африканського континенту. В центрі цієї експозиції знаходяться сукуленти роду Молочай, які виглядають як кактуси. Деревоподібні молочаї, такі як молочай великорогий, великозубий, канделяброподібний і оленерогий, є окрасою експозиції. Поруч з ними ростуть представники родини Дідієреєвих, ендеміки острова Мадагаскар, а також рослини роду Алое, зокрема алое деревоподібне (столітник), відоме своїми лікарськими властивостями. Представники родини Товстянкові, такі як еоніум, ечеверія та товстянка, мають високу декоративну цінність. Лікарські властивості мають також каланхое перисте та каланхое Дегремона.

Найбільш поширеними видами колекції є рослини родів *Opuntia*, *Agave*, *Stapelia*, *Schlumbergera*, *Portulaca* та *Crassula*.

Opuntia microdasys, часто відома як "баранячі вуха" або "бараняча кашка", це рослина роду *Opuntia*, що належить до родини кактусових (Cactaceae). Вона поширена в Мексиці та Центральній Америці.

Opuntia microdasys формує густі кущі, які можуть досягати висоти до 60 см. Рослина складається з плоских, овальних або круглих члеників (подобу листків), які ростуть один на одному. Членики зазвичай зеленого кольору, хоча можуть мати жовті або червоні відтінки залежно від сорту.

Відомо, що замість традиційних колючок, *Opuntia microdasys* має дрібні, шовковисті колючки, звані глохідіями, які легко відриваються та можуть викликати подразнення шкіри при контакті. Тому при догляді за цією рослиною рекомендується використовувати захисні рукавички.

Opuntia insularis, також відома як "острівні опунції", є видом *Opuntia*, який поширений в Мексиці, Північній Америці та Карибському басейні. Про "infesta" немає достовірної інформації, можливо, це є помилкою або неофіційною назвою.

Agave americana, відома також як Американська агава або Сто років, є великою сукулентною рослиною з родини *Asparagaceae*. Ця агава поширена в Мексиці, але також була широко розповсюджена в інших регіонах світу як декоративна рослина, в тому числі в середземноморському кліматі та в південних частинах Сполучених Штатів.

Eriphyllum sp. належить до роду епіфітних кактусів, які часто відомі як орхідейні кактуси. Вони відрізняються від більшості інших кактусів тим, що ростуть на інших рослинах (епіфітно) у природі, зазвичай в тропічних лісах, а не в пустелях. Вони не є сукулентами в класичному розумінні цього слова, але їх часто групують з сукулентами через подібні потреби в догляді та здатність зберігати воду.

Stapelia – це рід сукулентних рослин родини *Arosynaceae*, який включає близько 40 видів. Вони походять з південної Африки та відомі своїми унікальними, часто великими квітками, які імітують форму і колір м'яса або розкладаючихся органічних матеріалів, щоб приваблювати запилювачів, таких як мухи. Деякі види мають досить сильний, неприємний запах, що ще більше приваблює мух.

Schlumbergera, відома також як Різдвяний кактус, належить до родини кактусових (*Cactaceae*). Це епіфітні сукуленти, що природно ростуть у вологих тропічних лісах Бразилії на деревах або скелях. Вони відрізняються від більшості кактусів тим, що не мають колючок, а їхні сте

Portulaca filsonii належить до роду *Portulaca* в родині *Portulacaceae*. Цей рід включає багато сукулентних видів, відомих своєю здатністю витримувати посушливі умови і яскравими квітами.

Crassula - це рід сукулентних рослин, який включає багато видів і різноманітних форм. Вони належать до родини *Crassulaceae* і є поширеними в різних регіонах світу.

1.3. Віруси, що уражують сукуленти

1.3.1. X вірус кактусу

З моменту виявлення першого рослинного вірусу в 1892 році було проведено численні дослідження для виявлення вірусів рослин. Ранні дослідники цікавилися сукулентними рослинами через їх дивну форму при культивуванні в Європі і, тому у зв'язку з піком інтересу до вивчення кактусів, було повідомлено про чисельні випадки вірусного ураження цих видів рослин. Вперше *Cactus virus X (CVX)* було виявлено у рослинах *Opuntia monacantha* в Німеччину 1958 р. Амелунксеном.

Натепер CVX класифікується як представник роду *Potexvirus* родини *Alphaflexiviridae*. Віріони CVX представляють собою паличкоподібні частинки і мають довжину 520 нм і діаметр 13 нм. Генوم вірусу одноланцюгова РНК позитивної полярності ((+) ssRNA), загальним розміром 6,5 кб. За класифікацією Балтимору відноситься до IV групи.

Раніше під спільною назвою X вірус кактусу було об'єднано три віруси: X вірус опунції, X вірус шлюмбергера та X вірус зігокактусу [20]. Тепер це три різні віруси.

1.3.2. Потексвірус зігокактусу X

Синонім цього вірусу - *Zygocactus virus X* [TAX:253701]. Відноситься до того ж роду, що і CVX, і має подібні характеристики. Цей вірус був виявлений у 1969 р. на гібриді *Zygocactus x Schlumbergera* у Європі. Передається при механічній інокуляції із соком уражених рослин.

1.3.3. Вірус кактусу Сагуаро

Вірус кактусу Сагуаро (SgCV, Saguaro cactus virus [TAX:52274]). SgCV вперше виділено з безсимптомного гігантського кактуса сагуаро (*Carnegiea gigantea*) в Арізоні, США. Вірус відноситься до роду *Carmovirus* родини *Tombusviridae*. Віріони без оболонки. Нуклеокопсид ізометричний, 32 нм в діаметрі.

1.3.4. Вірус кактусу 2

Вірус Cactus 2 (CV-2) вперше був описаний у 1959 р., але деякі властивості цього вірусу ще охарактеризовані CV-2 належить до роду *Carlavirus* родини *Betaflexiviridae*. Властивості вірусу аналогічні до типових вірусів роду: віріони мають довжину 650 нм та діаметр 12 нм.

Геном представлений лінійними молекулами РНК позитивної полярності. Перебіг хвороб, спричинених CV-2, безсимптомний, але симптоми можуть з'являтися залежно від сезону.

Крім вірусів із позитивно поляризованими РНК-генами, кактуси уражуються також двома видами вірусів з роду *Tospovirus*.

Отже, величезне різноманіття сукулентів, їх різко відмінні еколого-біологічні особливості викликають цілий ряд труднощів, пов'язаних передусім з утриманням цих рослин у закритих приміщеннях. До таких обмежуючих факторів відносяться і вірусні інфекції. Саме тому дослідження вірусів цієї групи рослин є дуже важливим на сьогоднішній день.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

3.1. Матеріали та реактиви

При виконанні роботи були використані наступні реактиви:

- поліетиленгліколь 6000, уранілацетат, N-n-нітрофенілфосфат (“Serva”, Німеччина);
- неорганічні компоненти буферних систем вітчизняного виробництва марок “хч” та “чда”;
- 96-лункові планшети (“Labsystems”, Фінляндія);
- мікропланшетний спектрофотометр Bio-Tek, «μQuant™»(BioTek^R Instruments. |Inc., США);
- антитіла проти імуноглобулінів кроля, кон’юговані з лужною фосфатазою (“Bio-Rad”, США);
- сироватки для виявлення антигенів вірусів PVM, PVS, PVX, PVF та TMV (Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, м. Чернігів).

3.2. Відбір зразків

Для дослідження біологічних характеристик вірусів та їх різноманіття відбирали зразки кактусів захищеного ґрунту з ботанічного саду Київського національного університету ім. О.В. Фоміна. Зразки були відібрані в двох повторностях, внесені в стерильні пакети. Відбір зразків був проведений співробітниками кафедри вірусології біологічного

факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для тестування були відібрані наступні рослини: *Agave americana*, *Eriphyllum sp.*, *Stapelia sp.*, *Schlumbergera sp.*, *Portulaca filsonii* – сукуленту, *Opuntia microdasys*, *Crassula L.*, *Opuntia insularis*.

2.3. Біологічне тестування

Біологічні властивості вірусів сукулентних рослин вивчали за допомогою спектру рослин-індикаторів, загальноприйнятих для CVX, CV2, SCV, OpMV та інших вірусів кактусових: *Atriplex hortensis*, *Datura stramonium L.*, *Petunia x hybrida hort.*, *N. tabacum L.*, *N. tabacum cv. Samsun*, *Phaseolus vulgaris*

Рослини уражували у жилку соком кактусів захищеного ґрунту з симптомами вірусного ураження у 0,1 ФСБ, рН 7,4 у трьохразовому повторенні на кожній рослині у віці чотирьох справжніх листків .

2.4. Імуноферментний аналіз

У роботі застосовували метод непрямого твердофазного ІФА. Методика проведення непрямого твердофазного ІФА була наступною:

1. Підготовка планшетів: до лунок мікротитраційного планшета додавали антиген і інкубували при 4°C протягом ночі для його зв'язування з поверхнею.

2. Промивання: планшети промивали буфером PBS-T (фосфатний сольовий буфер з додаванням твіну-20) для видалення незв'язаного антигену.
3. Блокування: до лунок додавали блокуючий розчин (звичайно, 1-5% розчин BSA або молочного порошку в PBS-T) для блокування вільних зв'язуючих ділянок, щоб мінімізувати неспецифічне зв'язування.
4. Додавання первинних антитіл: у лунки додавали розчин первинних антитіл, специфічних до досліджуваного антигену, і інкубували при 37°C протягом 1-2 годин.
5. Промивання: Планшети знову промивали PBS-T для видалення незв'язаних первинних антитіл.
6. Додавання вторинних антитіл: До лунок додавали розчин вторинних антитіл, кон'югованих з ферментом (наприклад, HRP), і інкубували при 37°C протягом 1 години.
7. Промивання: Планшети промивали PBS-T для видалення незв'язаних вторинних антитіл.
8. Додавання субстрату: У кожну лунку додавали субстратний розчин (наприклад, ТМВ для HRP), який фермент перетворював у кольоровий продукт.
9. Зупинка реакції: Після досягнення бажаної інтенсивності кольору, реакцію зупиняли додаванням стоп-розчину (наприклад, сірчаної кислоти).
10. Зчитування результатів проводили на мікропланшетному спектрофотометрі Біо-Тек, «μQuant™» при довжинах хвиль 405/630 нм. Позитивними вважали результати, для яких показник E405 втрічі перевищував показник негативного контролю. Для порівняння результатів використовували середній показник (середнє арифметичне)

2.5. Електронномікроскопічні дослідження

Для визначення наявності вірусів в зразках використовували метод електронної мікроскопії []. У дослідженні використовувалося електронно-мікроскопічні дослідження з використанням соку *Opuntia*

Процедура проведення електронної мікроскопії для виявлення вірусів включала наступні кроки:

Підготовка зразків: зразки тканин рослин оброблялися для вилучення вірусних часток. Це включало гомогенізацію зразків у відповідному буферному розчині (0,1М PBS, рН 7,4).

Нанесення на сітку: Концентровані вірусні частки наносили на спеціальні електронно-мікроскопічні сітки, покриті вуглецевою плівкою.

Негативне фарбування: Зразки фарбували негативним барвником, таким як фосфотунгстатна кислота або ураніл ацетат, для створення контрасту між вірусними частками та фоном.

Просушування: сітки із зразками просушували для видалення надлишків рідини.

Спостереження: сітки із зразками поміщали в електронний мікроскоп JEOL (JEM-1400) (Центрі колективного користування Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН), де проводили спостереження та фотографування вірусних часток при з інструментальному збільшенні 60 тис.

2.6. Виділення тотальної РНК

Виділення загальної РНК є основним методом для виявлення вірусів кактусів. Ця РНК включає як вірусну, так і РНК хазяїна, і її можна виділити з інфікованих тканин рослин за допомогою різних методів, таких

як екстракція фенолом-хлороформом або комерційні набори для виділення РНК.

Виділення загальної РНК є ключовим етапом у виявленні та ідентифікації вірусів і часто поєднується з іншими методами, такими як ELISA та електронна мікроскопія, щоб забезпечити всебічний аналіз вірусних інфекцій.

У дослідженні використовували комерційний набір для виділення рослинної РНК, який передбачає такі кроки:

1. 100 мг зразків листя гомогенізували в 1 мл буфера для лізису після попереднього гомогенізування в рідкому азоті.
2. Гомогенат перемішували протягом 10-20 секунд і інкубували при 56°C протягом 3 хвилин, після чого центрифугували при 11 000 об/хв протягом 5 хвилин.
3. 500 мкл супернатанту збирали і переносили в спеціальну колонку для екстракції з набору. Додавали етанол і центрифугували протягом 1 хвилини при 11 000 об/хв, після чого осад видаляли.
4. Додавали 400 мкл «промивного буфера 1», центрифугували протягом 1 хвилини при 11 000 об/хв і видаляли осад.
5. Додавали 300 мкл «промивного буфера 2», центрифугували протягом 1 хвилини при 11 000 об/хв і видаляли осад. Цей крок повторювали.
6. Колонку переносили в нову пробірку Eppendorf, додавали 50 мкл води, вільної від РНКаз, і центрифугували протягом 1 хвилини при 11 000 об/хв. Отриману РНК використовували негайно або зберігали при -80°C.

2.7. Постановка ЗТ-ПЛР

Полімеразна ланцюгова реакція зворотної транскрипції (RT-PCR) є широко використовуваним молекулярним методом для виявлення вірусів рослин, у тому числі тих, що інфікують сукуленти.

Полімеразна ланцюгова реакція зі стадією зворотної транскрипції була проведена з використанням кіт SuperScript II (Invitrogen, США). Ампліфікацію ділянок гену капсидного білка (CP) OpVC проводили з використанням праймерів [29]:

CVX-F: 5'- GCGTCACACAAAAGAАСТСС

CVX-R: GTTAAGCAGGATAGGCACG

(очікуваний розмір продукту ампліфікації - 500 нт).

2.8. Електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі та виділення продукту ампліфікації з агарозного гелю

Електрофорез в агарозному гелі – метод, що використовується для розділення макромолекул за розміром і електричним зарядом. Рух заряджених частинок в електричному полі називається електрофорезом.

Електрофорез в агарозному гелі – стандартний метод для виділення, ідентифікації та очищення фрагментів нуклеїнових кислот. Цей метод є простим і швидким. Для візуалізації нуклеїнових кислот у гелі використовується етидій бромід, флуоресцентний інтеркалюючий барвник, у низьких концентраціях.

Для візуалізації результатів виділення тотальної РНК проводили електрофорез в агарозному гелі, використовуючи буферний гель, який складався з 1,5% агарози та 98,5% TBE з додаванням 10 мкл етидію броміду як барвника.

Напруга, прикладена до електродів на обох кінцях гелю, є рушійною силою електрофорезу. Швидкість міграції молекул через гель залежить від їхніх характеристик.

Для підготовки до електрофорезу наливали гель, готували електрофорезні камери та гребінці. Розчин маркера для визначення довжини фрагментів ДНК (GeneRuler 50bp DNA ladder від Fermentas) готували шляхом додавання 8 мкл ddH₂O та 2 мкл маркера і барвника до зразків.

Після електрофорезу результати переглядали на трансільюмінаторі, аналізували та фотографували для документування.

Виділення продукту ампліфікації:

1. Після електрофорезу в агарозному гелі продукти вирізали за допомогою стерильного скальпеля та переносили в стерильну мікропіпетку.
2. До геля додавали зв'язувальний буфер у співвідношенні 3:1.
3. Суміш інкубували 10 хвилин при температурі 50-60 °C.
4. Переносили 800 мкл суміші в колонку.
5. Центрифугували колонку 1 хвилину зі швидкістю 12000 об/хв.
6. Додавали 100 мкл буфера для зв'язування в колонку.
7. Повторювали крок 5.
8. Додавали 700 мкл промивного буфера до колонки і центрифугували протягом 1 хвилини зі швидкістю 12000 об/хв. Переміщували колонку в нову стерильну мікроцентрифужну пробірку та центрифугували протягом 1 хвилини зі швидкістю 12000 об/хв.
9. Додавали 50 мкл елююючого буфера до колонки і центрифугували протягом 1 хвилини зі швидкістю 12000 об/хв.

2.9. Секвенс кДНК

Для філогенетичного аналізу та порівняння нуклеотидних послідовностей українських ізолятів з відомими ізолятами необхідно секвенувати амплікони гена капсидного білка, отримані методом зворотно транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Після ампліфікації гена капсидного білка, нуклеотидну послідовність можна визначити шляхом очищення продукту ампліфікації за допомогою колонок Mini Elute (Qiagen, UK). Очищені ампліфіковані фрагменти секвенували в Оксфордському університеті (Оксфорд, Великобританія) на ДНК-аналізаторі Applied Biosystems 3730x1, використовуючи реагенти термінатора Big Dye версії 3.1 (Applied Biosystems, США).

2.10. Побудова філогенетичних дерев

Для аналізу геномів вірусів сукулентів з метою побудови філогенетичних дерев використовували послідовності вірусних геномів, отримані за допомогою ЗТ-ПЛР. Надалі послідовності були вирівняні, щоб визначити подібності та відмінності між ними. Філогенетичний аналіз допомагає встановити зв'язок між різними штамами або підтипами вірусів, а також простежити їхнє походження та еволюцію.

Для дослідження послідовностей українського ізоляту використовували ресурс MEGA, виконуючи такі кроки:

1. Завантаження послідовностей у форматі FASTA до програми MEGA.
2. Вирівнювання послідовностей за допомогою алгоритму ClustalW.
3. Побудова філогенетичного дерева з використанням методу Maximum Likelihood.

4. Оцінка надійності отриманих дерев за допомогою бутстреп-аналізу.
5. Інтерпретація результатів для визначення еволюційних зв'язків та класифікації вірусних ізолятів.
6. Цей підхід дозволив ефективно проаналізувати генетичну різноманітність вірусів сукулентів та внести вклад у розуміння їхньої еволюційної історії.

2.11. Статистична обробка даних

Статистична обробка даних, отриманих при проведенні ІФА, електрофорезу нуклеїнових кислот та електронної мікроскопії, проводилася з врахуванням стандартного відхилення [1]:

Статистична обробка даних, отриманих при проведенні імуноферментного аналізу (ІФА), електрофорезу нуклеїнових кислот та електронної мікроскопії, проводилася з врахуванням стандартного відхилення. Для кожного виду аналізу були визначені середні значення результатів, після чого розраховувалося стандартне відхилення для оцінки розсіювання даних від середнього.

Ці результати були аналізовані з використанням методів дескриптивної статистики, що включають розрахунок середнього значення, стандартного відхилення, мінімального та максимального значення. Для визначення статистично значущих різниць між групами даних було використано t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Важливо відзначити, що перед проведенням t-тесту перевірялася нормальність розподілу даних з використанням критерію Шапіро-Вілка.

Крім того, для більш глибокого аналізу взаємозв'язків між різними параметрами було використано кореляційний аналіз. Визначення

кореляційних коефіцієнтів дозволило оцінити ступінь лінійної залежності між змінними.

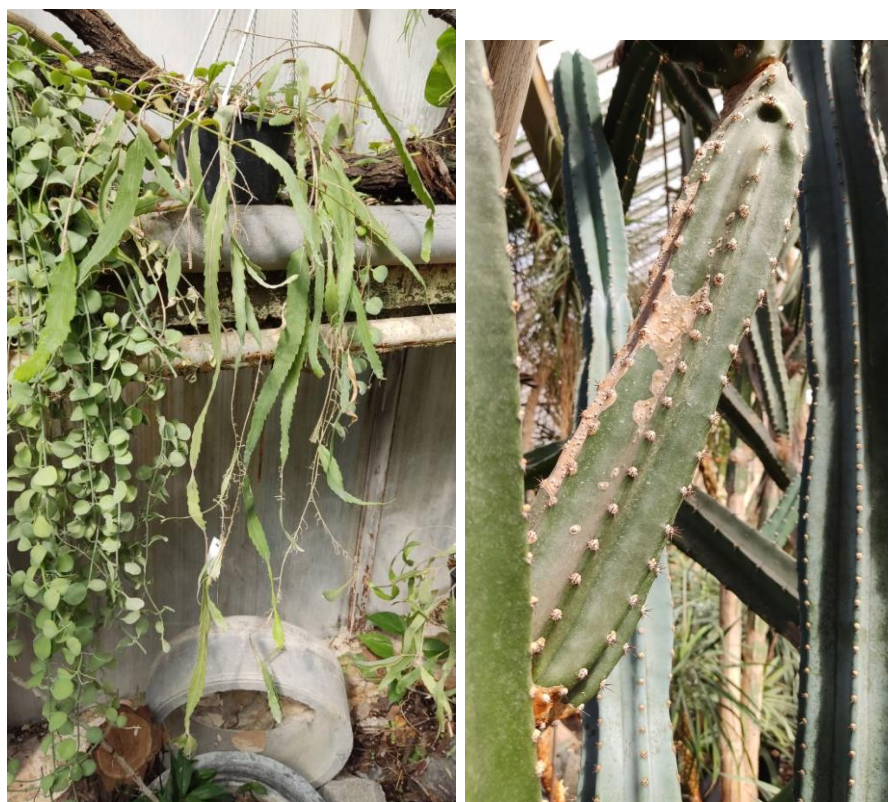
Результати цієї статистичної обробки дозволяють науковцям не тільки кількісно оцінити зміни, викликані різними експериментальними умовами, але й якісно аналізувати взаємодію між різними параметрами дослідження. Це, в свою чергу, сприяє глибшому розумінню механізмів, що лежать в основі вивчених процесів, та розвитку нових наукових гіпотез.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Візуальна діагностика уражень відібраних рослин

При обстеженні колекції сукулентів Ботанічного саду ім. О.В. Фоміна Київського національного університету нами були виявлені симптоми мозаїки, плямистості, хлоротичного забарвлення стебел, некрозів, зморшкуватість та відмирання пагонів (рис.3.1. - 3.3.).



А

В

Рис. 3.1. Всихання стебел *Pseudorhipsalis* (А) та некрози на стеблах *Myrtillocactus* (В)

Одним з поширених симптомів у досліджуваних рослин виявились некрози (рис.3.1., рис.3.3). Як видно на зазначених фотографіях

пошкодження стебел рослини подібні до тих, що викликаються вірусною інфекцією []. Спостерігаються некротичні плями та всихання тканин на стеблах. Симптоми некротизації полягають у формуванні на стеблі великих коричневих некрозів овальної форми, які можуть зливатися, утворюючи суцільне ураження.

Такі симптоми можуть виникати через кілька основних причин:

1. Інфекційні захворювання (вірусного, грибкового або бактеріального походження). Окрім вірусів, деякі патогенні гриби та бактерії можуть спричиняти некрози, плямистості та відмирання тканин у рослин.

2. Пошкодження комахами або кліщами. Живлення шкідників, наприклад, попелиць або кліщів, може призводити до локальних некрозів та пошкоджень рослинних тканин.

3. Фізичні або хімічні ушкодження. Механічні пошкодження, опіки в ідперегріву чи сонця, хімічні опіки від пестицидів тощо теж можуть викликати некротичні ураження.

4. Нестача або надлишок поживних речовин у ґрунті. Дефіцит або токсичні рівні певних елементів живлення здатні провокувати некрози та відмирання частин рослини.

Для точного встановлення причини та розробки потенційного лікування необхідно проаналізувати наступні дані: вид рослини, умови вирощування, наявність шкідників та результати діагностики на наявність певних патогенів. Своєчасна діагностика допоможе зупинити поширення ураження рослин колекції.



Рис. 3.2. Мозаїка на стеблах *Myrtillocactus geometrizans*

Крім того, поширеними симптомами були пов'язані зміною кольору стебел – хлорози та мозаїка. Найчастіше подібні симптоми спостерігали на рослинах родів *Myrtillocactus* (рис.3.2) та *Opuntia*. Хлоротичне забарвлення і деформацію пагонів (“відьміни метли”) спостерігали лише на рослинах роду *Opuntia*.



Рис. 3.3. Мозаїка та некрози на дистках *Agave americana*

У досліджуваній колекції симптоми дещо відрізнялись між собою. Найгірший фітосанітарний стан при візуальному обстеженні був характерний для рослин роду *Opuntia*.

Слід зазначити, що перед розміщенням в теплиці кактусові не проходили попереднього тестування на наявність вірусних патогенів. На рослинах з вищезазначеними симптомами у деяких випадках були зареєстровані шкідники, зокрема нематоди та кліщі, а також хвороби не вірусного походження. Хоча на сьогоднішній день не доведена можливість передачі вірусів за допомогою переносників, існує вірогідність, що наявність шкідників і хвороб спричиняє погіршення фізіологічного стану рослин, що, в свою чергу, призводить до зниження стійкості кактусових до вірусів.

3.2. Результати біологічного тестування

З метою біологічної зарактеристики вірусів нами були проведені біологічні тести з використанням 5-х видів рослин-індикаторів. Для ураження відбирали сік рослин з симптомами ураження. При постановці ІФА із зразками цих рослин, були отримані позитивні результати.

У результаті біологічного тестування зразків кактусових, нами були отримані результати, представлені в таблиці 3.1.

Atriplex hortensis, *Datura stramonium* L., *Petunia* x *hybrida hort*, *N. tabacum* L., *N. tabacum* cv. *Samsun*, *Phaseolus vulgaris*

Таблиця 3.1.

Симптоми на рослинах-індикаторів, при інокуляції соком досліджуваних рослин

Вид рослини-індикатора	Симптоми при інокуляції соком	
	<i>Opuntia microdasys</i>	<i>Schlumbergera</i> sp.
<i>Atriplex hortensis</i>	*	некрози
<i>Datura stramonium</i> L.	*	некрози
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>Samsun</i>	мозаїка	*
<i>Nicotiana tabacum</i> L.		мозаїка
<i>Petunia</i> x <i>hybrida hort</i> ,	некрози	мозаїка
<i>Phaseolus vulgaris</i>	плямистість, некрози	некрози

*- симптоми відсутні

Симптоми, що виникли на рослинах *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun*, представлені на рисунку 3.4, не є характерними для відомих вірусів, що уражують кактуси.



Рис.3.4. Мозаїка на листках *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun* при ураженні соком *Schlumbergera* sp.

Через 19 днів після інокуляції рослин *Phaseolus vulgaris* соком 2 з'явилися прижилкові некрози та жовта плямистість (рис.3.4)



А

В

Рис.3.5. Плямистість та некрози на листках *Phaseolus vulgaris*, при ураженні соком *Schlumbergera sp.* (А) та *Opuntia microdasys* (В)

При ураженні соком рослин *Schlumbergera sp.* на листках *Phaseolus vulgaris* та *Petunia hybrida* через 10 днів після інокуляції з'явилися симптоми некрозів та мозаїки, відповідно (рис.3.5).



Рис.3.6. Некрози на листках *Phaseolus vulgaris* та *Petunia hybrida*, при ураженні соком *Schlumbergera sp.*

Симптоми, що виникли на рослинах *Atriplex hortensis* та *Datura stramonium* L. характерні при ураженні рослин X вірусом кактусу, а на рослинах *Gomphrena globosa* для вірусом кактусу 2.

Отже, симптоми, що з'явилися на рослинах-індикаторах, є характерними для двох вірусів.

3.3. Виявлення уражених сукулентних рослин методом імуноферментного аналізу

Спостереження за зовнішніми симптомами ураження не є достатньо надійним способом для виявлення та діагностики вірусних інфекцій, оскільки вираженість симптомів залежить від взаємодії між вірусом та рослиною. Додатково, різні штами одного вірусу можуть викликати різноманітні симптоми у рослин того ж виду, варіюючи від повної нечутливості до безсимптомного носійства. Також на прояв симптомів впливають умови вирощування та наявність додаткових інфекцій, що часто супроводжують вірусні ураження кактусів. Таким чином, діагноз "вірусна інфекція" повинен бути підтверджений за допомогою спеціалізованих методів діагностики вірусних інфекцій та ідентифікації самого вірусу.

У роботі застосовували методи непрямого імуноферментного аналізу з використанням сироваток до PVM, PVS, PVX, PVY, PVF, CMV та TMV (Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, м. Чернігів).

У результаті проведення непрямого твердофазного ІФА з використанням сироваток до PVM та PVS було отримано позитивні результати для зразку № 1, № 5, №9, №10 та № 11 (рис.3.7.). Нами було зроблено припущення про наявність у соці відібраних зразків антигенів вірусу кактусу 2, оскільки він серологічно споріднений з PVM та PVS [1].

Результати тестування рослин методом непрямого ІФА з використанням сироваток до PVX (цей вірус серологічно споріднений з XVC та вірусом зигокактусу) казали наявність антигенів у зразку № 5, № 9 та №11, а антигени вірусів, споріднених з CMV, були виявлені у зразках № 4, №11 та № 12. Антигени вірусів, споріднені з PVY, були виявлені у зразках № 9, №10 та № 12. Тестування із сироватками до PVF та TMV не

дали жодного позитивного результату з соком піддослідних рослин (рис.3.7).

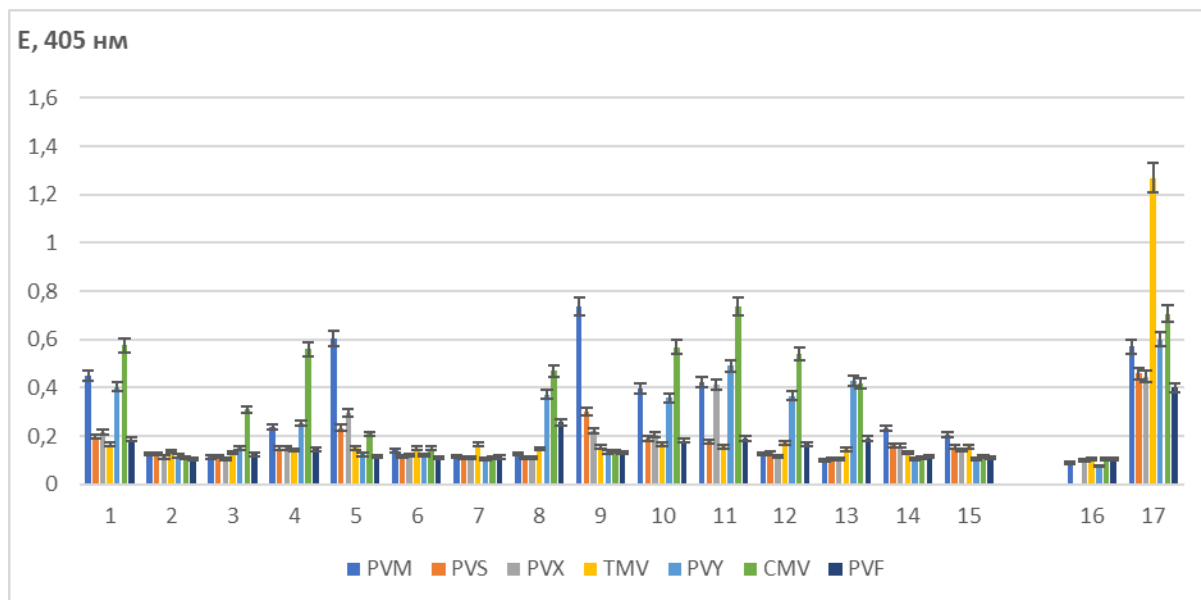


Рис. 3.7. Результати тестування рослин колекції сукулентів ботанічного саду ім. О.В. Фоміна методом непрямого твердофазного ІФА:

Opuntia microdasys, 2 - *Kalanchoe chevalierj*, 3 - *Agave americana*, 4 - *Sansevieria perrotii warburg*, 5- *Epiphyllum sp.*, 6 - *Stapelia sp.* 7 - *Kalanchoe sp.*, 8 - *Gymnocalycium [hyptiacanthum](#)*, 9 - *Schlumbergera sp.*, 10 - *Portulaca filsonii*, 11 - *Opuntia microdasys*, 12 - *Opuntia insularis*, 13 - *Crassula L.*, 14 - *Rhipsalis noulletiana Gem*, 15 - *Sansevieria perrotii*, 16 – інтактна рослина, 17 – позитивний контроль.

Таким чином, зразки № 9 (*Schlumbergera sp.*) та № 11 (*Opuntia microdasys*) були найбільш уражені, у них було виявлено найбільшу кількість антигенів вірусів. Змішана інфекція, що спричинена декількома вірусами, часто призводить до значного погіршення фізіологічного стану рослин, спотворення їх зовнішнього вигляду, а крім того знижує захисну

відповідь кактусів до патогенів інших класів. У подальшому в нашій роботі ми звернули увагу на дослідження саме цих двох видів рослин колекції.

3.4. Результати електронномікроскопічного дослідження соку інфікованих рослин

Метод електронної мікроскопії було застосовано для виявлення вірусів у соці кактусових та підтвердження результатів ІФА. Морфологію вірусів було визначено методом трансмісивної електронної мікроскопії шляхом негативного контрастування. Інструментальне збільшення становило 30 тис.

Для проведення аналізу відбирали сік уражених рослин сукулентів колекції ботанічного саду Київського національного університету ім. О.В. Фоміна з симптомами некрозу та хлорозу на стеблах .

У препаратах із рослин *Opuntia microdasys* v. *rufida* спостерігали два типи ниткоподібних вірусних частинок: довші (рис. 3.8. А) та коротші (рис.3.8. В).

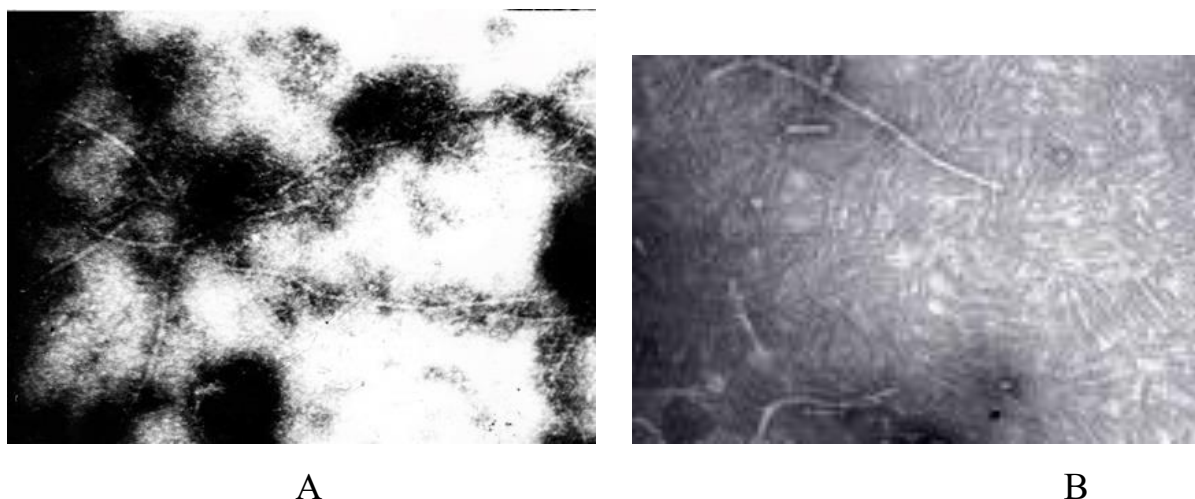


Рис. 3.8. Електронномікроскопічне зображення довгих (А) та коротких (В) ниткоподібних часток, лінійка 100 нм

Коротші ниткоподібні вірусні частки мали розміри $517 \times 22 \pm 2$ нм, а довші ниткоподібні $650 \times 12 \pm 2$ нм. Розміри коротших віріонів відповідають розмірам X вірусу кактусу, а довших ниткоподібних часток розмірам вірусу кактусу 2. Таким чином, за допомогою методу ЕМ були підтвердженні результати ІФА.

3.5. Підтвердження наявності вірусної інфекції в орхідеях методом ЗТ-ПЛР

Продукти ПЛР-ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі, а потім очищали за допомогою гелевого набору, який використовує Mini Elute Columns від Qiagen, Великобританія. Потім очищені амплікони секвенували на аналізаторі ДНК Applied Biosystems 3730x1 з використанням термінаторів Big Dye, версія 3.1 (Applied Biosystems, США). Отримані нуклеотидні послідовності вірусу OpVX порівнювали за допомогою ресурсу BLAST.

Отримані продукт гену капсидного білка OpVX відповідають за довжиною очікуваним: 500 пар основ (рис.3.8.).

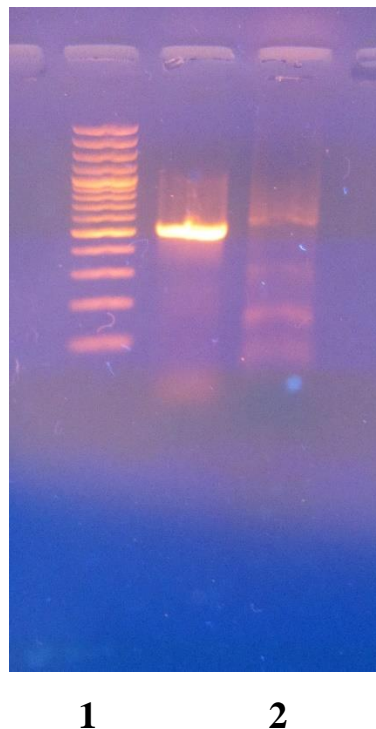


Рис.3.8. Електрофореграма продуктів RT-PLR в агарозному гелі – кДНК гену капсидного білка XVC: 1 – маркери (100 по, Fermentas), 2– продукт ампліфікації

Отже, продукти, отримані за допомогою специфічних праймерів, підтверджують наявність OpMV зразках опунції колекції Ботанічного саду ім. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

3.6 Штамова приналежність українського ізоляту OpVX

За допомогою ресурсу BLAST були отриманні філогенетичне дерево, для встановлення спорідненості українських ізолятів OpVX, отриманих з колекції рослин колекції Ботанічного саду ім. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка, з ізолятами з інших країн (рис.3.9). Всього для порівняння було відібрано 7 послідовностей ізолятів OpMV з бази даних GenBank. Для побудови кореня дерева було депоновано ізолят ZVX (JF930326).

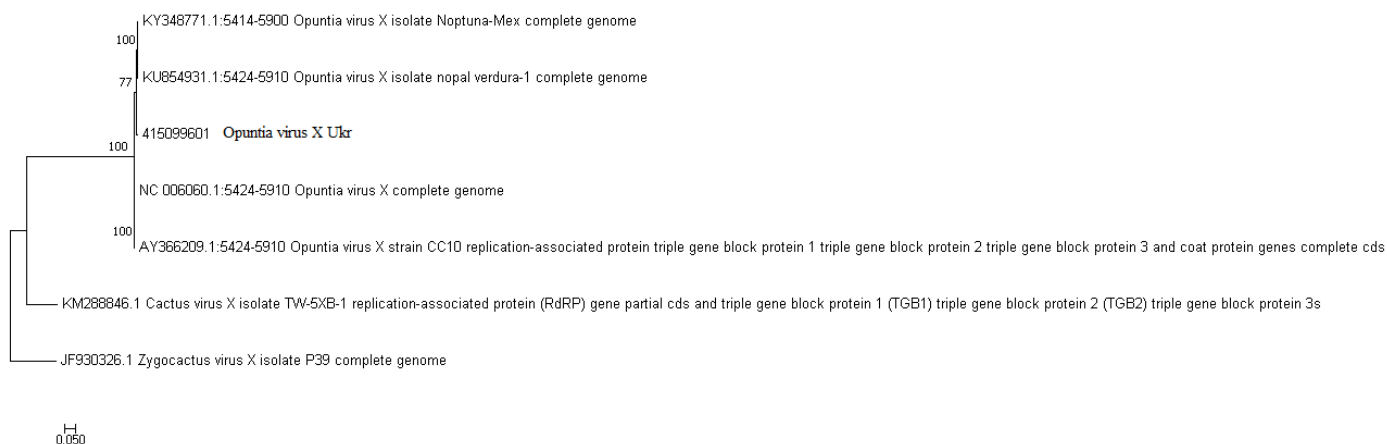


Рис.3.9. Філогенетичні відносини ізолятів OpVX за нуклеотидною послідовністю гену капсидного білка методом Maximum likelihood, модель Jukes-Cantor. 100 bootstrap replications

За допомогою програми MEGA 7 було побудоване філогенетичне дерево методом максимальної правдоподібності за моделлю Джукса-Кантора. Як видно з філограми, за результатами філогенетичного аналізу встановлено, що ізолят OpVX є найбільш подібним до ізолятів,

ідентифікованих у кактусів з Мексики. Це може свідчити про їх ймовірне спільне походження.

Отже, вірусні інфекції є однією з найсерйозніших загроз для сукулентних рослин в колекціях закритого гранту, які мають високу цінність як наукову так і декоративну. Саме тому аналіз вірусних інфекцій сукулентних рослин не лише збагатить наше розуміння шкодочинності фітовірусів, але й допоможе у розробці ефективних заходів контролю та профілактики вірусних хвороб сукулентів для збереження біорізноманіття цих рослин.

ВИСНОВКИ

1. Проведено обстеження сукулентних рослин з колекції ботанічного саду ім. О.В. Фоміна на наявність вірусного ураження. Методом непрямого імуноферментного аналізу визначено, що найбільш інфікованими є рослини роду *Opuntia* та *Schlumbergera*.
2. Виявлено методом електронної мікроскопії в соці рослини роду *Opuntia* два типи ниткоподібних вірусних часточок, розмірами $650 \times 12 \pm 2$ нм та $517 \times 22 \pm 2$ нм, відповідно.
3. За серологічними, біологічними та морфологічними властивостями виявлені віруси, подібні до CV2 та OpVX.
4. Ампліфіковано та секвеновано кДНК, які відповідають ділянкам гену капсидного білка OpVX. Їх біоінформатичний аналіз у поєднанні з вивченням біологічних, серологічних та морфологічних властивостей підтвердив, що виявлений патоген є вірусом мозаїки опунції.
5. За результатами філогенетичного аналізу встановлено, що ізолят OpVX є найбільш подібним до ізолятів, ідентифікованих у кактусів з Мексики.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Andrews, H.C. 1797–1799. The botanists's repository: for new, and rare plants, Volume 1. Plate XXVI. Printed by Bensley, London. Digitised by Google.
2. Foden, W. & Potter, L. 2009. *Crassula fascicularis* Lam. National Assessment: Red List of South African Plants version 2015.1. Accessed on 2015/09/23
3. Goldblatt, P. & Manning, J. 2000. Cape Plants. A conspectus of the Cape flora of South Africa. *Strelitzia* 9. National Botanical Institute, Pretoria & Missouri Botanical Garden, Missouri.
4. Jackson, W.P.U. 1990. Origins and meanings of names of South African plant genera. University of Cape Town.
5. Johnson, S.D., Ellis, A.G., Carrick, P.J., Swift, A., Van Rensburg, S., Horner, N, & Bond, W.J. 1993. Moth pollination and rhythms of advertisement and reward in *Crassula fascicularis* (Crassulaceae). *South African Journal of Botany* 59(5): 511–513.
6. Leistner, O.A. (ed.). 2000. Seed plants of southern Africa: families and genera. *Strelitzia* 10. National Botanical Institute, Pretoria.
7. Toelken, H.R. 1977. A revision of the genus *Crassula* in southern Africa. *Contributions from the Bolus Herbarium* No.8. Bolus Herbarium, University of Cape Town.
8. Trinder-Smith, T. 2006. Wild flowers of Table Mountain. Botanical Society of South Africa, Cape Town
9. Van Rooyen, G. & Steyn, H. 1999. Cederberg Clanwilliam & Biedouw Valley South African wildflower guide 10. Botanical Society of South Africa, Cape Town.

10. Von Willert, D.J., Eller, B.M., Werger, M.J.A., Brinckmann, E. & Ihlenfeldt, H.-D. 1992. Life strategies of succulents in deserts, with special reference to the Namib desert. Cambridge University Press, Cambridge.
11. Brummitt, N. A., Bachman, S. P., Griffiths-Lee, J., Lutz, M., Moat, J. F., Farjon, A., & Nic Lughadha, E. M. (2015). Green plants in the red: A baseline global assessment for the IUCN Sampled Red List Index for Plants. PLoS ONE, 10(8), e0135152.
12. Charmaz, K. (2006). Constructing grounded theory: A practical guide through qualitative analysis. Sage Publications.
13. Christie, P., Oracio, E. G., & Eisma-Osorio, L. (2011). Impacts of the CITES listing of seahorses on the status of the species and on human well-being in the Philippines: A case study. FAO Fisheries and Aquaculture Circular. UN Food and Agriculture Organisation.
14. Cooney, R., Challender, D. W. S., Broad, S., Roe, D., & Natusch, D. J. D. (2021). Think Before You Act: Improving the Conservation Outcomes of CITES Listing Decisions. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9:631556. <http://doi.org.10.3389/fevo.2021.631556>
15. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). (2022). The CITES species. <https://cites.org/eng/disc/species.php>
16. Corbin, J., & Strauss, A. (2008). Basics of qualitative research: Techniques and procedures for developing grounded theory (3rd ed.). Sage.
17. Cousins, S. R., & Witkowski, E. T. F. (2017). African cycad ecology, ethnobotany and conservation: A synthesis. *The Botanical Review*, 83(2), 152-194.
18. Dang Vu, H. N., & Nielsen, M. R. (2018). Understanding utilitarian and hedonic values determining the demand for rhino horn in Vietnam. *Human Dimensions of Wildlife*, 23(5), 417-432.

19. De Swert, K. (2012). Calculating inter-coder reliability in media content analysis using Krippendorff's Alpha. Center for Politics and Communication.
20. Duffy, R. (2013). Global environmental governance and north-south dynamics: The case of the CITES. *Environment and Planning C: Government and Policy*, 31(2), 222-239.
21. Duffy, R. (2022). *Security and conservation: The politics of the illegal wildlife trade*. Yale University Press.
22. Feldman, R. (2013). Techniques and applications for sentiment analysis. *Communications of the ACM*, 56(4), 82-89.
23. Fukushima, C. S., Tricorache, P., Toomes, A., Stringham, O. C., Rivera-Téllez, E., Ripple, W. J., & Cardoso, P. (2021). Challenges and perspectives on tackling illegal or unsustainable wildlife trade. *Biological Conservation*, 263, 109342.
24. Goettsch, B., Hilton-Taylor, C., Cruz-Piñón, G., Duffy, J. P., Frances, A., Hernández, H. M., & Gaston, K. J. (2015). High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*, 1(10), 1-7.
25. Hayes, A. F., & Krippendorff, K. (2007). Answering the call for a standard reliability measure for coding data. *Communication Methods and Measures*, 1(1), 77-89.
26. Hinsley, A., De Boer, H. J., Fay, M. F., Gale, S. W., Gardiner, L. M., Gunasekara, R. S., Kumar, P., Masters, S., Metusala, D., Roberts, D. L., Veldman, S., & Phelps, J. (2018). A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4), 435-455.
27. Hinsley, A., Keane, A., St John, F. A., Ibbett, H., & Nuno, A. (2019). Asking sensitive questions using the unmatched count technique: Applications and guidelines for conservation. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(3), 308-319.

28. Hinsley, A., Nuno, A., Ridout, M., John, F. A. S., & Roberts, D. L. (2017). Estimating the extent of CITES noncompliance among traders and end-consumers; lessons from the global orchid trade. *Conservation Letters*, 10(5), 602-609.
29. Liou, M.R., Hung, C.L. and Liou, R.F. (2001). First Report of Cactus virus X on *Hylocereus undatus* (Cactaceae) in Taiwan. *Plant disease*, 85(2), pp.229–229. doi:<https://doi.org/10.1094/pdis.2001.85.2.229a>.
30. International Union for Conservation of Nature (IUCN). (2022). The IUCN Red List of Threatened Species: Version 2022-1. <https://www.iucnredlist.org>
31. Jordaan, N. (2021). American fined R500,000, banned from SA for ‘stealing’ protected plant. TimesLive. <https://www.timeslive.co.za/news/south-africa/2020-04-01-american-fined-...>
32. Kay, J., Strader, A. A., Murphy, V., Nghiem-Phu, L., Calonje, M., & Griffith, M. P. (2011). Palma corcho: A case study in botanic garden conservation horticulture and economics. *HortTechnology*, 21(4), 474-481.
33. Krippendorff, K. (2011). Computing Krippendorff's alpha-reliability. https://repository.upenn.edu/asc_papers/43
34. Krippendorff, K. (2021). Multi-valued coding of predefined units. In K. Krippendorff (Ed.), *The reliability of generating data* (pp. 137-152). Chapman and Hall/CRC.
35. Kurland, J., Pires, S. F., & Marteache, N. (2018). The spatial pattern of redwood burl poaching and implications for prevention. *Forest Policy and Economics*, 94, 46-54.
36. Lavorgna, A., Middleton, S. E., Pickering, B., & Neumann, G. (2020). FloraGuard: Tackling the online illegal trade in endangered plants through a cross-disciplinary ICT-enabled methodology. *Journal of Contemporary Criminal Justice*, 36(3), 428-450.

37. Christenhusz, M. J. M. & Byng, J. W. (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*. 261 (3): 201—217
38. ↑ Mottram, R. (1071) Proposal to Change the Conserved Type of Cactaceae, nom. cons., and the Entries of the Conserved Names *Mammillaria* and *Melocactus*//*Taxon*. — 1993 — 42(2) — p.457-464
39. ↑ Gorelick R. Northern Range Limit of *Opuntia fragilis* and the Cactaceae is 56° N, not 58° N // *Madroño*. — 2015 — 62(2) — p. 115—123
40. † Moreira-Muñoz, A. (2010). Cactaceae, a Weird Family and Postmodern Evolution. *Plant and Vegetation*, 197—220
41. Dzul, A.S., Martinez, R.I.R., Martínez, D.O., Mejía, E.Z., Brito, D.P., Juárez, C.H. and Martínez, D.R. (2012). Virus associated with thickening of the cladodes of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* Mill.). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(4), pp.100–107. doi: <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v2n4.dzul>.