

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Будзанівська І. Г.

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2023 р.

**ШТАМОВА ПРИНАЛЕЖНІСТЬ ВІРУСУ КІЛЬЦЕВОЇ  
ПЛЯМИСТОСТІ ОДОНТОГЛОСУМУ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ  
РОСЛИН *PHALAENOPSIS* SP. КОЛЕКЦІЇ БОТАНІЧНОГО САДУ  
ІМ. О.В.ФОМІНА.**

Кваліфікаційна робота магістра  
денної форми навчання  
за спеціальністю 091 «Біологія»  
Пономаренка Андрія Андрійовича

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

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.

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2023 р.**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

CymMV	(Cymbidium mosaic virus) - Вірус мозаїки цимбідіуму.
ORSV	(Odontoglossum ringspot virus) - Вірус плямистості одонтоглосуму.
CP	(Capsid protein) - Капсидний білок.
RT-PCR	(Reverse transcription polymerase chain reaction) - Полімеразна ланцюгова реакція зі стадією зворотньої транскрипції.
ELISA	(Enzyme-linked immunosorbent assay) - Імуноферментний аналіз.
DAS-ELISA	(Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay) - Імуноферментний аналіз з модифікацією “Сендвіч”.
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція.
CMV	(Cucumber mosaic virus) - Вірус мозаїки огірка.
BYMV	(Bean yellow mosaic virus) - Вірус жовтої мозаїки квасолі.
TSWV	(Tomato spotted wilt orthotospovirus) - Вірус бронзовості томатів.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Загальна характеристика вірусів, що уражують орхідні.....	7
1.1. Характеристика рослин родини <i>Orchidaceae</i> Juss.....	7
1.2. Віруси та вірусні хвороби орхідних.....	11
1.3. Вірус мозаїки цимбідіуму.....	13
1.4. Вірус кільцевої плямистості одонтоглоссуму.....	15
1.5. Вірус огіркової мозаїки.....	17
1.6. Вірус жовтої мозаїки квасолі.....	20
1.7. Вірус плямистого зів'янення томатів.....	23
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи досліджень.....	27
2.1. Матеріали та реактиви.....	27
2.2. Відбір зразків.....	28
2.3. Біологічне тестування.....	30
2.4. Імуноферментний аналіз.....	31
2.5. Електронно-мікроскопічні дослідження.....	32
2.6. Виділення тотальної РНК.....	34
2.7. Постановка ЗТ-ПЛР.....	35
2.8. Електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі.....	36
2.9. Виділення продукту ампліфікації з агарозного гелю.....	36
2.10. Сиквенс кДНК.....	37
2.11. Побудова філогенетичних дерев.....	38
2.12. Статистична обробка даних.....	39

	4
<b>РОЗДІЛ 3. Результати дослідження та їхнє обговорення.....</b>	<b>40</b>
3.1. Результати візуального обстеження.....	40
3.2. Результати біологічного тестування.....	44
3.3. Виявлення уражених рослин орхідних методом імуноферментного аналізу.....	47
3.4. Дослідження соку інфікованих рослин за допомогою електронного мікроскопу.....	49
3.5. Підтвердження наявності вірусної інфекції в орхідеях методом ЗТ-ПЛР	50
3.6. Штамова приналежність українського ізоляту ORSV.....	52
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>55</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>56</b>

## ВСТУП

Орхідеї — це неймовірно різноманітна група рослин із широким діапазоном форм, кольорів і розмірів. Вони є найбільшою родиною в царстві рослин, що налічує понад 20 000 видів і незліченну кількість гібридних форм і різновидів. Перші екзотичні орхідеї потрапили в Європу в 16-17 століттях, і тривалий час вважалося, що ці рослини паразитують на деревах і не мають насіння. З часом орхідеї стали популярними у всьому світі і навчилися їх культивувати [1, 2].

В Україні більшість тропічних і субтропічних орхідей вирощують в умовах захищеного ґрунту, а колекції ботанічних садів з кожним роком поповнюються. Однак, незважаючи на зусилля щодо збереження цих колекцій, орхідеї все частіше заражаються різними хвороботворними агентами, включно з вірусами, які становлять значну загрозу для різноманітності та декоративної цінності будь-якої колекції. Введення орхідей у штучні екосистеми може призвести до зниження стійкості до хвороб і шкідників, у тому числі до вірусних інфекцій.

Через відсутність своєчасної та регулярної діагностики, дотримання правил стерильності, неконтрольованого ввезення та розповсюдження несертифікованого садивного матеріалу орхідеї стають більш уразливими до вірусних інфекцій. Тому дослідження, присвячені обстеженню колекцій орхідних на наявність патогенів вірусної природи, допоможуть визначити потенційні загрози для колекцій орхідних і розробити стратегії захисту цих цінних рослин.

Дослідження вірусних захворювань орхідей є важливим напрямком досліджень, який стрімко розвивається. Поширення вірусних інфекцій серед орхідей може становити значну загрозу для їх вирощування, збереження та комерційної та декоративної цінності. Крім того, орхідеї використовуються у

виробництві ліків, продуктів харчування та косметики, що робить їх збереження вирішальним для різних галузей промисловості.

В останні роки було проведено численні дослідження вірусних захворювань орхідей, приділяючи особливу увагу розробці стратегій виявлення та запобігання вірусним інфекціям. У багатьох із цих досліджень використовуються передові молекулярні методи, такі як RT-PCR, секвенування ДНК та аналіз мікроматриць, щоб ідентифікувати вірусні патогени та визначити їхню штамову приналежність. Ці методи дозволяють дослідникам швидко й точно виявляти віруси в орхідеях, що є важливим для ефективного управління та контролю вірусних захворювань.

Іншим важливим аспектом дослідження вірусних захворювань орхідей є розробка ефективних стратегій управління. Оскільки орхідеї широко використовуються в декоративному квітникарстві, виникає потреба у застосуванні ефективних заходів боротьби з поширенням вірусних інфекцій. Однією з таких стратегій є використання теплової терапії, яка передбачає витримування інфікованих рослин при високих температурах для знищення вірусів. Інші методи включають використання противірусних хімотерапевтичних речовин і створення орхідей, стійких до певних вірусних інфекцій.

Загалом дослідження вірусних захворювань орхідей є важливою сферою досліджень, яка потребує постійної уваги та інвестицій. Зі швидким розширенням обсягів вирощування орхідей та ростом їх комерційної цінності, розробка ефективних стратегій виявлення та контролю вірусних інфекцій має вирішальне значення для збереження цих рослин та подальшого використання в різних галузях промисловості.

Саме тому метою цієї роботи було дослідити колекції орхідей ботанічних садів України на наявність збудників вірусної етіології та визначення їх штамової приналежності.

# РОЗДІЛ 1

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ, ЩО УРАЖУЮТЬ ОРХІДНІ

### 1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА РОСЛИН РОДИНИ *ORCHIDACEAE* JUSS.

Орхідеї - це різноманітна родина рослин, яке включає понад 800 родів і понад 28 000 видів, причому найбільше їх різноманітність спостерігається в тропічних регіонах. Це різноманітна група квіткових рослин із широким спектром морфологічних характеристик. Ось деякі з ключових особливостей родини орхідних:

**Квіти:** квіти орхідеї зазвичай великі та ефектні, з трьома чашолисточками та трьома пелюстками. Пелюстки часто сильно модифіковані і можуть бути зрощені разом, щоб утворити унікальну структуру, яка називається губою або лабеллум . Лабеллум часто служить посадковим майданчиком для запилювачів і може мати досить складну форму, колір і текстуру.

**Суцвіття:** орхідеї створюють суцвіття, які є або поодинокими, або розташованими в пучках. Ці суцвіття можуть бути дуже великими, а деякі види утворюють десятки або навіть сотні квіток на одному стеблі.

**Листя:** Листя орхідеї зазвичай товсті та м'ясисті, з восковим покриттям, який запобігає втраті води. Вони можуть бути як прикореневими, так і по черзі розташованими на стеблі.

**Коріння:** Коріння орхідей є вузькоспеціалізованими і часто покриті губчастим шаром, який називається веламеном, який допомагає поглинати вологу з повітря. Деякі орхідеї також мають повітряні корені, які можуть допомогти рослині прикріпитися до дерев або інших опор.

**Псевдобульби:** деякі орхідеї, особливо з родів *Cattleya* та *Oncidium*, виробляють спеціальні органи зберігання, які називаються псевдобульбами. Це товсті, м'ясисті стебла, які зберігають воду та поживні речовини та

можуть допомогти рослині пережити періоди посухи або дефіциту поживних речовин.

Ці виключно трав'янисті та квіткові рослини мають двобічну симетрію і часто мають видозмінені та зрощені пелюстки та тичинки. Деякі орхідеї, такі як *Neottia* і *Corallorhiza*, утворюють мікоризу орхідей і отримують енергію та поживні речовини, паразитуючи на грибах. Багато орхідних розвинули складну структуру квітки, щоб залучити певних запилювачів, тоді як інші мають симбіотичні стосунки з грибами для проростання насіння та отримання поживних речовин.

Загалом морфологічні характеристики орхідей неймовірно різноманітні, що відображає широкий діапазон місць проживання та екологічних ніш, які займає ця родина рослин. Незалежно від того, чи ростуть вони в тропіках чи регіонах з помірним кліматом, орхідеї є справді чудовими та красивими рослинами.

Орхідеї - це різноманітна група квіткових рослин, які демонструють різноманітні репродуктивні властивості. Багато орхідей у дикій природі для розмноження покладаються на запилення певними комахами, птахами чи тваринами. Деякі орхідеї еволюціонували, щоб привабити своїх запилювачів і змусити їх переносити пилок між квітами одного виду. Цей процес відомий як «оманливе запилення», і він передбачає створення квіткових імітаторів інших рослин або об'єктів для залучення запилювачів.

Окрім природного запилення, орхідеї також можуть розмножуватися шляхом вегетативного розмноження, яке передбачає виробництво нових рослин з однієї батьківської рослини. Цей процес може відбуватися природним шляхом через утворення нових пагонів або за допомогою штучних методів розмноження, таких як обрізання стебла та культивування тканин.

У закритих ґрунтових середовищах, таких як оранжереї, орхідеї можна розмножувати за допомогою методів нестатевого розмноження, таких як клонування через культуру тканин, що дозволяє виробникам виробляти

велику кількість генетично ідентичних рослин. Цей метод особливо корисний для рідкісних і зникаючих видів орхідей, оскільки дозволяє масово вирощувати рослини для консервації та комерційних цілей.

Однак як у дикому, так і в закритому ґрунті орхідеї вразливі до низки репродуктивних проблем, включаючи вплив зміни клімату, руйнування середовища проживання та поширення хвороб і шкідників. Ці фактори можуть вплинути на доступність запилювачів, зменшити генетичне різноманіття та збільшити ризик інбридингу, що може негативно вплинути на репродуктивний успіх орхідей.

Тому розуміння репродуктивної біології орхідей має вирішальне значення для їх збереження, управління та сталого використання в закритих ґрунтових середовищах. Це включає визначення запилювачів і стратегій запилення різних видів орхідей, моніторинг здоров'я популяцій орхідей, а також розробку ефективних стратегій збереження та управління для підтримки та збільшення популяції орхідей для майбутніх поколінь.

Господарські характеристики родини орхідних пов'язані насамперед з їх значенням як декоративних рослин. Завдяки своїй екзотичній красі і довговічності суцвіть орхідеї користуються високим попитом на світовому квітковому ринку. Фактично, вони вважаються одними з п'ятірки найцінніших зрізаних квіткових культур у світі.

У дикій природі економічна цінність орхідей в основному пов'язана з їх роллю в екосистемних взаємодіях. Орхідеї відіграють важливу роль у запиленні, оскільки вони покладаються на певних комах або тварин для перенесення пилку з однієї рослини на іншу. Вони також впливають на місцеву економіку в регіонах, де орхідеї збирають у лікувальних цілях, наприклад, у традиційній китайській медицині.

У закритих умовах, таких як оранжереї, економічна цінність орхідей пов'язана з їх комерційним виробництвом. Вирощування орхідей у контрольованому середовищі дозволяє вирощувати цілорічне виробництво, що може призвести до більших прибутків для виробників. Крім того,

здатність контролювати умови вирощування може призвести до вищої якості рослин, які можуть мати вищі ціни на ринку.

Однак економічний потенціал орхідей часто опиняється під загрозою через виникнення хвороб, наприклад вірусних інфекцій. Вірусні захворювання можуть істотно вплинути на ринкову вартість орхідей, призводячи до втрати цілого врожаю і знищення цілих колекцій. Таким чином, існує потреба в постійних дослідженнях і розробці стратегій запобігання та контролю вірусних інфекцій в орхідей.

Орхідеї мали значний історичний вплив у всьому світі. Орхідеї високо цінували стародавні греки та римляни, які вважали, що вони мають лікувальні властивості. У 18 і 19 століттях орхідна лихоманка охопила Європу, коли колекціонери нищили по всьому світу в пошуках рідкісних і екзотичних видів. Це призвело до відкриття багатьох нових видів і розробки нових методів розведення.

Сьогодні орхідеї мають важливий економічний вплив, світова торгівля орхідеями сягає мільярдів доларів щороку. Багато орхідей культивують заради їх декоративності, а їх квіти використовують у виробництві парфумерії та косметики. У деяких країнах, таких як Таїланд і Еквадор, вирощування орхідей є основним джерелом доходу для місцевих громад.

Економічний вплив орхідей у дикій природі також є значним, оскільки багатьом орхідеям загрожує втрата середовища існування, надмірний збір та інші фактори. Деякі орхідеї вимерли в дикій природі, а інші знаходяться на межі зникнення. Тому збереження диких орхідей є важливим пріоритетом як через їхню екологічну цінність, так і через їхній економічний потенціал.

У закритому ґрунті орхідеї стали популярними як декоративні рослини завдяки своєму екзотичному вигляду і тривалому цвітінню. Вони зазвичай використовуються в закритих садах, оранжереях і ботанічних садах. Вирощування орхідей в закритому ґрунті вимагає спеціальних знань і техніки, і часто пов'язане з великими витратами. Однак економічна вигода

від вирощування орхідей у закритому ґрунті є значною, оскільки їх можна продавати як горщики або зрізані квіти.

Підсумовуючи, орхідеї мали багатий історичний вплив і продовжують мати значну економічну цінність як у дикій природі, так і в закритому ґрунті. Збереження диких орхідей має важливе значення для збереження їх екологічної та економічної цінності, тоді як вирощування орхідей у закритому ґрунті надає можливості для комерційного виробництва та досліджень.

## 1.2. Віруси та вірусні хвороби орхідних

Орхідеї є важливою декоративною рослиною в усьому світі, яка має велике економічне значення. Однак ці рослини вразливі до вірусних інфекцій, і було ідентифіковано понад 57 вірусів, що належать до 13 різних родів. Ці роди включають Potexvirus, Tobamovirus, Cucumovirus, Potyvirus, Closterovirus, Tobravirus, Tombuvirus, Nepovirus, Rhabdovirus, Tospovirus, Carlavirus, Sobemovirus і Carmovirus. Деякі з поширених вірусів, які вражають орхідеї, включають Cymbidium mosaic virus (CymMV), Odontoglossum ringspot virus (ORSV), Tobacco mosaic virus (TMV), Cucumber mosaic virus (CMV), and Bean yellow mosaic virus (BYMV), Calanthe mild mosaic virus (CalMMV), Ceratobium mosaic virus (CerMV), Clover yellow vein virus (CIYVV), Cypripedium virus Y (CypVY), Dendrobium mosaic virus (DeMV), Dendrobium severe mosaic virus (DeSMV), Diurus virus Y (DiVY), Habenaria mosaic virus (HaMV), Pecteilis mosaic virus (PcMV), Pleione virus Y (PIVY), Pterostylis virus Y (PtVY), Rhopalanthe virus Y (RhVY), Sarcophilus virus Y (SarVY), Turnip mosaic virus (TuMV), Vanilla mosaic virus (VanMV), Vanilla necrosis virus (VanNV), Watermelon mosaic virus 2 (WNV-2), Dendrobium vein necrosis virus (DVNV), Tobacco rattle virus (TRV), Cymbidium ringspot virus (CymRSV), Tomato ringspot virus (TomRSV), orchid fleck virus (OFV), Tomato

spotted wilt virus (TSWV), Impatiens necrotic spot virus (INSV), Calanthe mosaic virus (CalMV), Bean common mosaic virus (BCMV), Columbian datura virus (CDV), Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), Dasheen mosaic virus (DsMV), Ornithogalum mosaic virus (OrMV), Spiranthes mosaic virus 2 (SpiMV2), Spiranthes mosaic virus 3 (SpiMV3), Wisteria vein mosaic virus (WVMV), Capsicum chlorosis virus (CaCV), Phalaenopsis chlorotic spot virus/Basella rugose mosaic virus (PhCSV/BaRMV), Carntion mottle virus (CarMV), and Cymbidium chlorotic mosaic virus (CymCMV).

Серед цих вірусів вірус Cymbidium mosaic (CymMV) і Odontoglossum ringspot virus (ORSV) найчастіше зустрічаються в орхідеях. Оскільки орхідеї є важливою декоративною рослиною, надзвичайно важливо розуміти поширеність і поширення цих вірусів, чого можна досягти за допомогою передових методів діагностики та програм моніторингу. Ці знання можуть допомогти в розробці ефективних стратегій управління для контролю поширення цих вірусів і підтримки здоров'я популяції орхідей.

Значний вплив на орхідеї надають вірусні захворювання як в дикій природі, так і в закритому ґрунті. Віруси можуть інфікувати орхідеї різними способами, включаючи комах-переносників, механічну передачу через ріжучі інструменти та нестерилізоване середовище для росту.

У дикій природі орхідеї піддаються впливу широкого спектру вірусів, які можуть передаватися комахами та іншими переносниками. Це може призвести до зниження працездатності, зниження виробництва насіння та навіть смерті. Крім того, дикі орхідеї часто вирощують у районах із поганою якістю ґрунту та обмеженим доступом до поживних речовин, що робить їх більш уразливими до вірусних інфекцій.

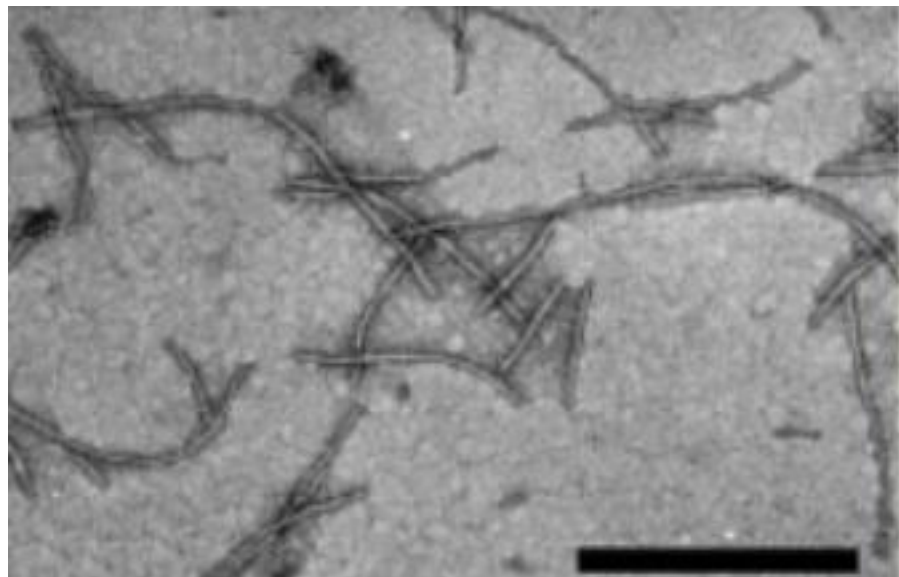
У закритих ґрунтових середовищах, таких як ботанічні сади чи оранжереї, орхідеї часто розмножують за допомогою методів культури тканин, що може збільшити ризик вірусних інфекцій. Вірусні захворювання орхідей можуть призвести до значних економічних втрат, оскільки заражені

рослини, можливо, доведеться знищити, щоб запобігти поширенню вірусу на інші рослини в колекції.

Зусилля, спрямовані на пом'якшення впливу вірусних захворювань на орхідеї, включають використання стійких до хвороб сортів, сувору санітарну практику для запобігання поширенню вірусів і регулярне діагностичне тестування для раннього виявлення вірусних інфекцій. Розуміючи вплив вірусних захворювань на орхідеї, виробники та дослідники можуть працювати разом, щоб розробити ефективні стратегії запобігання цим інфекціям і боротьби з ними [5].

### 1.3. Вірус мозаїки цимбідіуму

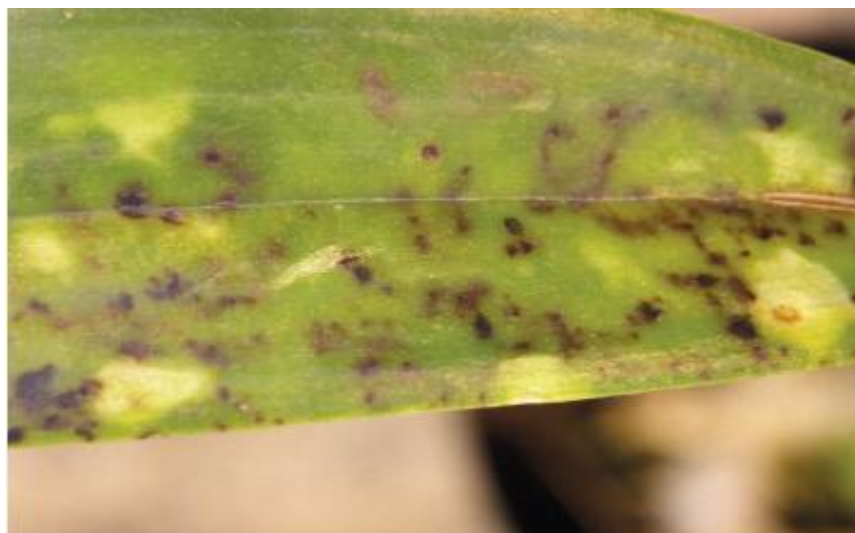
Вірус мозаїки цимбідіуму (CymMV) — ниткоподібний вірус, що належить до роду Potexvirus родини Alphaflexiviridae. Має спіральну симетрію з морфологією 475 x 13 нм. (рис 1.1)



**Рис.1.1.** Електронна мікроскопія. Вірус мозаїки цимбідіуму.

Морфологія – нитчаста. [7]

Капсид складається з структурного протеїну (CP) – масою 21-27 кДа. РНК геном має 5 відкритих рамок зчитування, що характерно для роду – *Potexvirus*. *CymMV* передається механічно через прямий контакт із зараженими тканинами рослин або зараженими інструментами, такими як секатори та ножиці. Вірус також може поширюватися через забруднену воду, ґрунт або середовище для вирощування. Вірус можна інактивувати, витримуючи його при температурі 65-70°C протягом 10 хвилин або залишивши його при кімнатній температурі на тиждень. Він має тривалу стабільність в органічних розчинниках, таких як хлороформ. *CymMV* інфікує рослини родини *Orchidaceae* та деякі види інших сімейств (*Amaryllidaceae* та *Liliaceae*) у всьому світі. Симптоми, викликані інфекцією *CymMV*, може змінюватися залежно від виду рослин-господарів, віку та факторів навколишнього середовища. У деяких випадках заражені рослини можуть не виявляти симптомів, тоді як в інших вірус може спричинити сильну мозаїку, появу смуг і некроз листя, що призводить до затримки росту та зниження врожаю. а при спільному зараженні вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ) викликає коричневі некротичні плями на дендробіумі. (рис 1.2).



**Рис.1.2.** Некротичні плями *CymMV* на *Dendrobium sp.* [7]

Ідентифікація вірусу в основному здійснюється за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зворотної транскрипції (RT-PCR). Інші методи ідентифікації включають метод ELISA та рослинні індикатори, такі як *Chenopodium amaranticolor*, *Cassia occidentalis* і *Datura stramonium*.

CymMV є значною загрозою для індустрії орхідей, оскільки може спричинити значні економічні втрати через зниження якості та ринкової вартості рослин. Вірус також може призвести до карантинування заражених рослин, що може вплинути на міжнародну торгівлю рослинами орхідей.

Найкращий спосіб боротьби з CymMV – це запобігти його інтродукції та поширенню в колекціях орхідей, дотримуючись суворих санітарних практик, таких як стерилізація інструментів, обладнання та середовищ для росту. Заражені рослини необхідно ізолювати та знищити, щоб запобігти подальшому поширенню вірусу. Крім того, використання вільного від вірусів рослинного матеріалу та регулярний моніторинг рослин орхідей може допомогти запобігти спалаху CymMV [6-11].

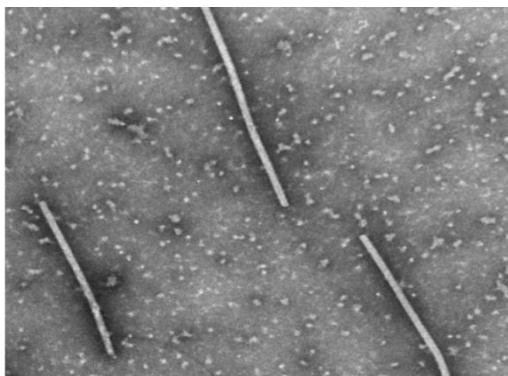
#### 1.4. Вірус кільцевої плямистості одонтоглоссуму

Вірус кільцевої плямистості *Odontoglossum* (ORSV) — паличкоподібний вірус, що належить до роду *Tobamovirus* родини *Virgaviridae*. Його віріон має розміри 300 x 18 нм і молекулярну масу  $40 \times 10^6$ . Плавуча густина в CsCl – 1.325г/см<sup>3</sup>. S<sub>20W</sub> – 212 S. A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> – 0.99. Віріон має несегментований РНК-геном. Структурний білок віріона має молекулярну масу 17-18 кДа і утворює жорсткі палички, хоча можливе також утворення дефектних, неінфекційних коротких паличок або окремих дисків. ORSV є високостабільним вірусом, який може виживати протягом кількох років у сухих тканинах рослин, що може сприяти поширенню вірусу в колекціях орхідей.

Вірус передається механічним шляхом і може вражати різні види орхідей і деякі рослини з інших родин по всьому світу, включаючи комерційно важливі, такі як *Cattleya*, *Dendrobium* і *Phalaenopsis*. Характерним симптомом ORSV є поява круглих плям на листках уражених рослин, а також кристалічні включення в уражених рослинах.



**А**



**В**



**С**

**Рис. 1.3.** А. Кільцева плямистість, викликана ORSV на листках *Cymbidium sp.*; В - електронна фотографія ORSV. Палички 300 x 18 нм.; С- електронна фотографія окремих дисків та коротких паличок ORSV. [7, 15]

Окрім круглих плям на листках, інфекція ORSV також може спричинити некроз, пожовтіння та спотворення уражених тканин рослини, що може призвести до затримки росту та погіршення якості квіток. Попелиць, що харчувалися інфікованим соком рослин пересаджували на здорові рослини. В останніх вірусні симптоми та сам вірус не виявлявся впродовж 5 тижнів. ORSV можна ідентифікувати за допомогою різних методів, включаючи ПЛР зі зворотною транскрипцією, серологічні тести, такі як DAS-ELISA, електронна мікроскопія. У *Nicotiana tabacum* – тютюн звичайний, утворюються невеликі некротичні плями 2-4 мм в діаметрі (на старих листях), або кільцеподібні плями (на молодих листях).

Вірус може передаватися шляхом вегетативного розмноження зараженого рослинного матеріалу, що підкреслює важливість використання вільного від вірусів рослинного матеріалу для вирощування орхідей.

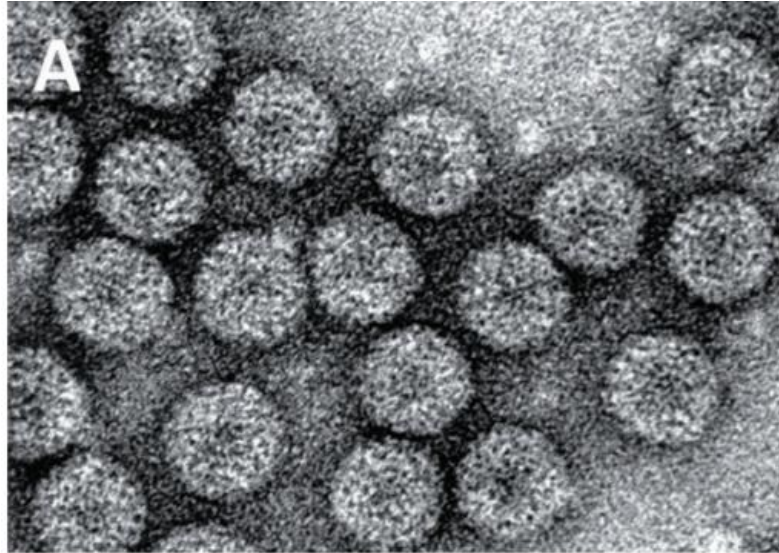
ORSV також може передаватися через заражені інструменти, обладнання та середовища для росту, що підкреслює необхідність дотримання належних санітарних практик у колекціях орхідей.

Заражені рослини необхідно знищувати, щоб запобігти подальшому поширенню вірусу. Тому профілактика є ключовою в лікуванні ORSV, а регулярний моніторинг і тестування на вірус є важливими для раннього виявлення та стримування [12-15].

### **1.5. Вірус огіркової мозаїки**

Вірус огіркової мозаїки (CMV) відноситься до родини Bromoviridae, роду Cucumovirus. Це простий вірус з діаметром 29 нм і ікосаедричною симетрією капсиду (рис. 1.4). Капсид складається з 180 окремих білків (СР) вагою близько 24,5 кДа. Вірусний геном складається з сегментованої РНК позитивної полярності, яка містить 5 генів. Вірус дуже чутливий до іонних

буферів, які можуть порушити взаємодію РНК-білок і призвести до його розпаду. Віріон має молекулярну масу  $6 \times 10^6$  кДа, ізоелектричну точку 4,7 рН і коефіцієнт екстинкції 5,0 при 260 нм. При високому розведенні значення S20w становить 98S. Вірусна реплікація проходить на тонопласті.[6, 7].



**Рис. 1.4.** Електронна мікроскопія. Вірус огіркової мозаїки [6]

Екологічна стійкість цього вірусу досить низька, і його передача відбувається переважно через попелиць. На даний момент ідентифіковано понад 85 видів попелиць, які здатні до неперсистентної передачі CMV при збереженні інфекційності протягом 4-х годин. Варто зазначити, що цей вірус не передається нащадкам зараженої попелиці, і спостерігалися випадки, коли здатність передавати вірус була втрачена певними видами попелиць та отримана іншими. Крім того, механічне пошкодження також може сприяти поширенню вірусу. Декоративні рослини, що вегетативно розмножуються, можуть виступати стабільним постачальником зараженого вірусом матеріалу на ринку, слугуючи тим самим додаткове джерело вірусу.

CMV-інфекція може проявлятися різними способами, починаючи від безсимптомного і закінчуючи вираженою мозаїчністю. Тому одних тільки візуальних симптомів недостатньо для ідентифікації інфекції в рослинах. Крім того, цей вірус є поліфагом і має широке глобальне поширення. Він

може інфікуватися разом з іншими вірусами, такими як PVX, потівіруси та тобамовіруси, що ускладнює діагностику. Однак мозаїчне забарвлення, деформація вен і локальний некроз є одними з основних симптомів CMV-інфекції. У рослинах тютюну викликає мозаїку, плямистість або може взагалі не проявляти жодних симптомів у *Nicotiana* sp. З іншого боку, може викликати деформацію листкової пластинки у орхідей (рис. 1.5).



**Рис.1.5.** Деформація листків Фаленопсису ураженого CMV [19]

Для CMV властиве ко-інфікування з сателітними РНК. Це призводить у томатів до появи некрозів, у тютюну та перцю - хлорозів. За іншими даними, у рослин, інфікованих одночасно CMV та сателітною РНК було встановлено зниження рівня прояву власних ознак ураження CMV [16, 20]. Цей вірус має велику генетичну різноманітність та кількість штамів по всьому світу. Виділяють субгрупи I та II в межах виду, які мають щонайменше 65% геномної ідентичності [6].

CMV широко поширений у країнах з помірним і тропічним кліматом і, як відомо, інфікує понад 1200 різних видів рослин як однодольних, так і дводольних, включаючи овочеві та декоративні рослини, а також гриби. Рід *Nemeroscallis* особливо чутливий до CMV-інфекції. Загальні методи ідентифікації вірусу включають RT-PCR, ELISA та дот-блот. Вірус часто виявляють за допомогою рослин-індикаторів, таких як :

*Capsicum annuum* (Овочевий перець) – системна деформація листків.

*Datura stramonium* (Дурман звичайний) - системна мозаїка.

*Solanum melongena* (Пасльон темний, баклажан) – системна плямистість та деформація листків.

*Chenopodium quinoa* ( Кіноа) – локальні некрози.

*Gomphrena globosa* ( Гомфрена кулеподібна) – локальні некрози.

Всі симптоми наведені вище з'являються протягом трьох тижнів після зараження.

Наразі не існує ефективних методів контролю CMV, що підкреслює важливість швидкої діагностики як основної стратегії пом'якшення вірусної інфекції [16]. З метою створення стійких гібридів проводяться дослідження природної стійкості рослин до CMV.

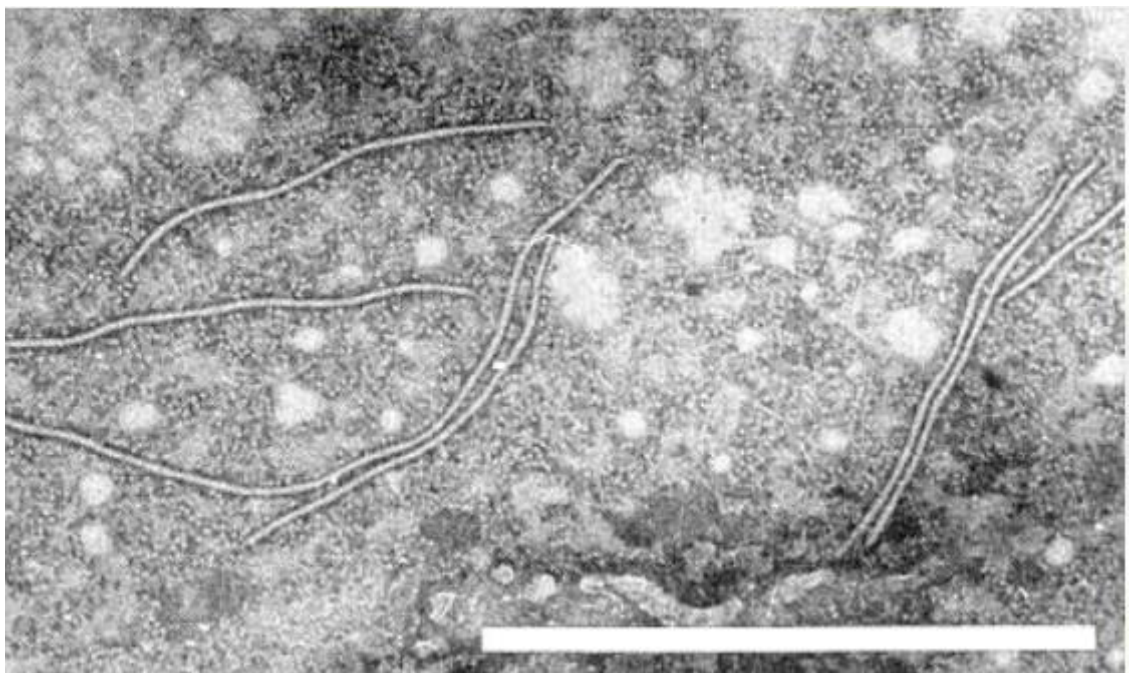
Широкий спектр рослин-господарів, широке поширення та різноманітні види переносників, відповідальних за передачу CMV, створюють значні економічні проблеми для багатьох країн світу. Окрім ураження численних економічно важливих культур, CMV також здатний інфікувати дикі бур'яни, сприяючи неконтрольованому розповсюдженню збудника [16-27].

## 1.6. Вірус жовтої мозаїки квасолі

Вірус жовтої мозаїки квасолі (BYMV ).

Представник роду *Potyvirus*, родини *Potyviridae*. BYMV має гнучку ниткоподібну частинку довжиною приблизно 750-800 нм і діаметром 11-13

нм. (рис.1.6.). Вірусний генوم являє собою одноланцюгову позитивну молекулу РНК, яка має довжину приблизно 10 kb і кодує великий поліпротеїн, який згодом розщеплюється на окремі білки вірусними протеазами. Тип симетрії – спіральна [6]. Для роду *Potyvirus* характерна маса капсидного протеїну 30-47 кДа. Плавуча густина в CsCl – 1.30 грам/см<sup>3</sup>. S20W для різних ізолятів ВУМВ становить 151-157 S.  $A_{260}/A_{280}$ : 1.21. [28]. Було виявлено циліндричні цитоплазматичні включення в процесі інфікування рослинної клітини [7].

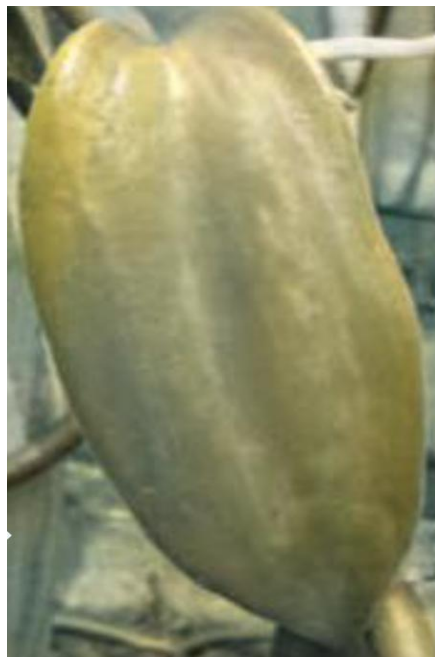


**Рис.1.6.** ВУМВ. Електронна мікроскопія, шкала – 900 нм. [6]

Різні ізоляти втрачають інфекційність при термічній обробці (50-70°C) 10 хв. Також втрачається інфекційність при розведенні до  $10^{-4}$ . Вірус інактивується при зберіганні при кімнатній температурі 1-2 дні, для деяких ізолятів 7 днів. ВУМВ поширений у всьому світі та був виявлений у бобових по всьому світу. Спочатку вважалося, що він заражає лише бобові, останні дослідження показали, що ВУМВ також може заражати рослини з інших родин. ВУМВ викликає широкий спектр симптомів, включаючи мозаїчні візерунки на листках, затримку росту та зниження врожаю.

Тяжкість симптомів різна для рослин-господарів, при цьому деякі рослини не виявляють видимих симптомів. Вірус може спричинити до 100% втрати врожаю у сильно заражених рослин. Інфекції BYMV також можуть призвести до підвищення сприйнятливості до інших патогенів рослин і шкідників. Вірус викликає мозаїку у багатьох бобових, апікальні некрози у квасолі звичайної, світлі полоси або латентну інфекцію у гладуолусів, у ірисів викликає типову мозаїку на листях. На орхідеях при розвитку інфекції спостерігаються хлоротичні полоси, мозаїка на молодих листках або порушення листкової пластинки на більш старих листях (рис.1.7) [6, 29-31].

Було виявлено багато гранулярних та/або кристалічних цитоплазматичних включень. Структура включень може варіювати в залежності від ізоляту, що спричиняє їх утворення. Вірус розповсюджується через механічні пошкодження рослин, органи вегетативного розмноження, та більш ніж 20-ма видами попелиць. Розповсюдження вірусу через насіння дуже рідкісне явище [6].



**Рис.1.7.** Мозаїка на листях ванільної орхідеї ураженої BYMV [31]

Для ідентифікації вірусу використовують ISEM, ELISA, та такі рослини індикатори:

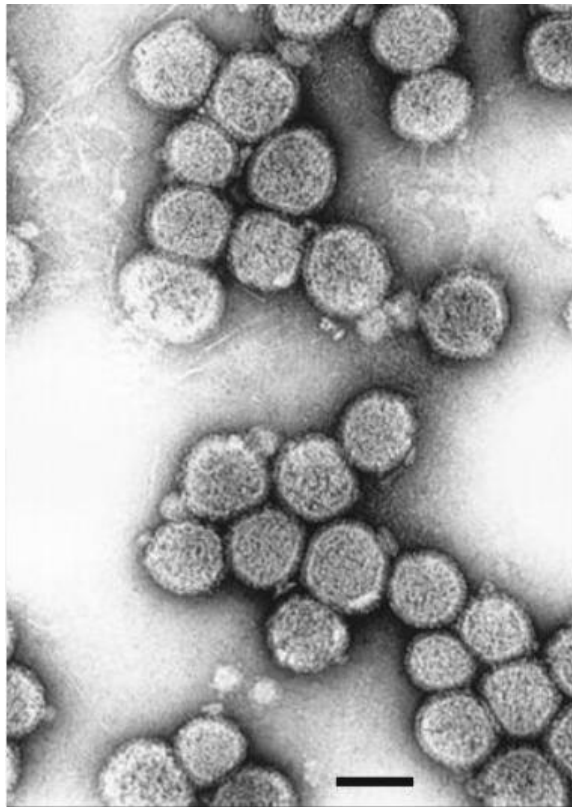
1. *Chenopodium quinoa* – Хеноподіум кіноа – локальні хлорози, без системного ураження.
2. *Gomphrena globosa* – Гомфрена кулеподібна – локальні некрози, без системного ураження.
3. *Nicotiana tabacum* – Тютюн звичайний – локальні хлорози.
4. *Vicia faba* – Біб кінський – Тимчасові хлорози жилок, потім з'являється типова мозаїка. Зазвичай без деформації листків. [6, 32]

Виділяють 4 штами за їх здатністю викликати різні симптоми у різних групах рослин. Для контролю інфекції треба максимізувати контроль над сприятливими для вірусу бур'янів, забезпечити ранній контроль рослин для своєчасного реагування, висівати між рядами культурних рослин, ряди несприятливих або резистентних рослин до цього вірусу. Не існує ефективних хімічних засобів боротьби з BYMV, тому найефективнішим методом боротьби є використання стійких сортів. Створення стійких до BYMV сортів за допомогою традиційної селекції або генної інженерії залишається активною сферою досліджень. Крім того, такі методи управління, як видалення заражених рослин і використання світловідбиваючої мульчі, можуть зменшити поширення BYMV.[32]

### 1.7. Вірус плямистого зів'янення томатів

Представник роду *Tospovirus*, родини *Bunyaviridae* [6]. Генотип TSWV складається з трьох сегментів РНК: великого (L), середнього (M) і малого (S) сегментів, які кодують РНК-залежну РНК-полімеразу, глікопротеїни Gn і Gc і нуклеокапсидний білок (N). відповідно. Вірус має сферичну форму з діаметром приблизно 80-120 нм і вкритий ліпідним подвійним шаром, що походить від мембрани клітини-господаря. Складний вірус. Віріон містить:

20-30% ліпідів, та 2-7% вуглеводів [6]. Вірусні частки – плеоморфні 80-120 нм. в діаметрі (рис.1.8). S20W: 530 – 583S. Маса капсидного білку – 29 кДа. Для роду *Tospovirus* характерна така плавучча густина в CsCl: 1,16 -1,18  $\text{грам/см}^3$  [6]. Вірус виявлений в усіх типах тканин та органів рослини, що говорить про можливість до системного ураження. Зрілі вірусні частинки акумулюються біля гранулярного ендоплазматичного ретикулуму. [7]



**Рис.1.8.** Вірус плямистого зів'янення томатів. Електронна мікроскопія [6].

Вірус втрачає інфекційність при 40-46°C протягом 10 хв. Вірус інактивується при кімнатній температурі протягом 2-5 годин, та при розведенні до  $10^{-4}$ . Вірус розповсюджений по всьому світу, через його широкий спектр господарів, та всесвітнє поширення його основного вектору – західного квіткового трипсу (*Frankliniella occidentalis*.) Найефективнішому розвитку вірусу сприяють теплиці, та помірний клімат. Вірус передається трипсами та має дуже широкий діапазон хазяїв, інфікуючи понад 1000 видів

рослин, включаючи численні економічно важливі культури, такі як помідори, перець, картопля, тютюн, арахіс та багато декоративних рослин. Викликає різноманітні симптоми: хлорози, плямистість (рис.1.9), затримка у рості, деформація органів та некрози листя, стебла та плодів. Ці симптоми можуть сильно відрізнятися залежно від рослини-господаря, віку та сорту. Вірус здатний викликати значні втрати врожаю уражених культур, а також погіршити якість зібраного врожаю. 10 видів трипсів забезпечують персистентне розповсюдження. Західний квітковий трипс основний вектор, що має короткий життєвий цикл, прихований спосіб життя, та може розповсюджувати вірус все життя. Відомо декілька видів, що розповсюджують вірус через насіння [7].



**Рис.1.9.** Симптоми TSWV на *Phalaenopsis sp.* [33]

Для ідентифікації вірусу використовують: RT-PCR, ELISA, та такі рослини індикатори:

1. *Petunia hybrida* – Петунія гібридна – локальні некрози через 2-4 дні після ураження, без системного ураження.
2. *Nicotiana tabacum* – тютюн звичайний – локальні некрози, системні некрози та деформація листків.

3. *Cucumis sativum* – огірок звичайний – через 4-5 днів після ураження, з'являються локальні хлорози з некрозом в центрі.

4. *Vinca rosea* – Катарантус рожевий – локальні чорні плями, через 10-14 днів після ураження. Системна мозаїка та деформація органів.

5. *Tropaeloum majus* – Квасоля велика – інфіковані листя безсимптомні, через 8-12 днів з'являється системна мозаїка з жовтим та темно-зеленим забарвленням, іноді з помірними некрозами [6, 7, 33].

В даний час не існує ефективних лікувальних засобів для рослин, інфікованих TSWV. Профілактичні заходи, такі як використання стійких сортів рослин і боротьба з трипсами, є найефективнішими способами боротьби з вірусом. Контроль TSWV вимагає постійного моніторингу росту бур'янів, оскільки вони є природними резервуарами вірусів. Крім того, необхідні часті модифікації існуючих інсектицидів, оскільки багато видів трипсів виробили стійкість до різних хімічних речовин. Тривають дослідження, спрямовані на визначення та розробку ефективних стратегій управління TSWV. [31]

Різноманітна структура та глобальне поширення вірусів, які вражають орхідеї, роблять їх дослідження та ідентифікацію надзвичайно важливими як з економічного, так і з соціального погляду. Контроль і управління цими вірусними захворюваннями вимагають постійних досліджень, розробки ефективних стратегій виявлення та профілактики, а також просування стійких до вірусів сортів орхідей. Розуміння природи вірусних інфекцій в орхідеях має вирішальне значення для забезпечення довгострокової життєздатності вирощування орхідей, збереження генетичного різноманіття та сталого виробництва. Необхідні подальші дослідження та спільні зусилля дослідників, виробників і регулюючих органів, щоб пом'якшити вплив вірусних захворювань і забезпечити постійне здоров'я та життєздатність індустрії орхідей.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали та реактиви

У дослідженні використовувалися різні реагенти, в тому числі уранілацетат, N-n-нітрофенілфосфат фірми «Serva» з Німеччини, а також буферні системи вітчизняних марок “хч” та “чда”. Використовувалися 96-лункові планшети від «Labsystems»(Фінляндія) разом із рідером IFA StatFax 2100 від «SFRI» (Франція). Набір для виділення рослинної РНК - “thermoscientific” (Литва). Також використовувався набір маркерних білків LMW фірми «Pharmacia» (Швеція), а також гліцин, акриламід, біс-акриламід і Ponceau фірми «BDH» (Англія). Використовувалися антитіла проти імуноглобулінів кроликів, кон’юговані з лужною фосфатазою від «Bio-Rad» (США), з комерційними сироватками від «Prime Diagnostics» (Нідерланди) для виявлення антигенів, таких як ORSV та CymMV.

#### 2.2. Відбір зразків

Метод ідентифікації та відбору рослинного матеріалу за зовнішніми ознаками ураження широко використовується в діагностиці та лікуванні хвороб рослин.

Відбір рослинного матеріалу за зовнішніми симптомами є важливим етапом у діагностиці вірусних захворювань, які можуть спричинити значні втрати врожаю посівів. Зовнішні симптоми можуть надати цінну інформацію про приналежність вірусу, стадію інфекції та тяжкість захворювання. Симптоми також можуть допомогти відрізнити вірусні захворювання від невірусних.

Важливо відзначити, що не всі віруси рослин викликають зовнішні симптоми, які легко видно неозброєним оком. Деякі віруси можуть викликати слабкі або періодичні симптоми, які можна легко пропустити під час вибору рослин. У таких випадках може знадобитися лабораторне дослідження для підтвердження наявності вірусу.

Загалом, метод ідентифікації та відбору рослинного матеріалу на основі зовнішніх симптомів пошкодження є цінним інструментом для діагностики хвороб рослин та лікування, а також може надати важливу інформацію щодо ідентичності та тяжкості вірусних інфекцій у рослинах.

Для дослідження вірусів декоративних рослин родини *Orchidaceae* Juss. використовували зразки що були відібрані з міста Київ, Ботанічного саду ім. Фоміна: листки *Cymbidium hybridum*, *Phalaenopsis sp.*, *Cymbidium sp.*, *Laellia sp.*, *Celogine sp.*, *Phalaenopsis calicorne.*, *Miltoniopsis* та зразки відібрані з міста Львів, Ботанічного саду імені І. Франка: листки *Zygopetalum sp.*, *Cymbidium sp.* та *cv.*, *Paphiopedium insigne*, *Cattlea hybridum*, *Phalaenopsis cv.*, *Coelogyne flaccida*, *Stanhopea*. Відбір зразків з характерними симптомами на орхідеях (чорні плями) був проведений співробітниками кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

### 2.3. Біологічне тестування

Метод індикаторних рослин на вірусні захворювання — діагностичний метод, заснований на використанні специфічних рослин, які сприйнятливі до певних вірусів і можуть проявляти характерні симптоми інфекції. Ці рослини використовуються як «індикатори» для виявлення присутності вірусних патогенів у певній місцевості.

Рослини-індикатори вибираються на основі їх чутливості до конкретних вірусів і характерних симптомів, які вони виявляють при зараженні. Наприклад, рослини тютюну зазвичай використовуються як індикатори багатьох вірусів рослин, оскільки вони дуже сприйнятливі та виявляють видимі симптоми, такі як плямистість листя, некроз і затримка росту.

Суть методу у передачі соку потенційно інфікованої рослини до рослин-індикаторів (через векторів, тісне посадження, полив, механічні маніпуляції або штучне введення соку) . Якщо у рослин-індикаторів з'являються характерні симптоми зараження, можна зробити висновок про присутність вірусу на даній ділянці.

Метод індикаторних рослин є цінним інструментом для виявлення вірусних захворювань рослин, оскільки він відносно простий, недорогий і може використовуватися в польових умовах. Однак важливо зазначити, що метод не завжди надійний, оскільки деякі віруси можуть не виявляти симптомів у вибраних рослинах-індикаторах. Тому важливо використовувати численні індикатори та інші методи діагностики для точного виявлення та ідентифікації вірусних збудників у рослинах.

Дослідження біологічних властивостей вірусів, а саме ORSV та CMV, проводили з використанням комплексу рослин-індикаторів. Соком орхідеї механічно заражали рослини на стадії чотирьох листків за допомогою абразиву (карборунду), змішаного з соком орхідеї з вірусоподібними симптомами в 0,1 М - PBS, рН 7,6, у трьох повторах. ORSV вивчали на рослинах *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. Ця рослина реагувала на інфекцію появою локальної зони некрозу на старому листі, тоді як у молодих рослин розвивалися зони локального кільцеподібного некрозу. *Chenopodium* sp. проявляла дрібні хлоротичні плями при інфікуванні ORSV. Для CymMV як рослини-індикатори використовували *Chenopodium amaranticolor* і *Datura stramonium*, які відреагували на інокуляцію появою повільно розвиваючих зон некрозу. [32, 33, 34]

## 2.4. Імуноферментний аналіз

Імуноферментний аналіз (ELISA) є широко використовуваним діагностичним інструментом для виявлення вірусів в орхідеях. У ELISA специфічні антитіла використовуються для виявлення вірусних білків або нуклеїнових кислот у тканинах рослин. Для вірусів орхідей сендвіч-ELISA з подвійними антитілами (DAS-ELISA)

ELISA є високочутливим і специфічним методом для виявлення вірусів орхідей, включаючи вірус кільцевої плямистості *Odontoglossum* (ORSV) і вірус *Cymbidium mosaic* (CymMV). Використання ELISA дозволяє швидко виявляти віруси в зразках рослин і є цінним інструментом для боротьби з хворобами орхідей. Метод відносно простий у виконанні та може бути адаптований для використання у високопродуктивному скринінгу великої кількості зразків.

У дослідженні використовувався подвійний імуносандвіч-метод (DAS-ELISA) з використанням сироваток для ORSV та CymMV. Процедура включала наступні кроки:

1. Додавання 100 мкл очищеного IgG в карбонатному буфері (pH 9,6) до кожної лунки планшета з подальшою інкубацією при 37 °C протягом 3 годин.
2. Промивання планшета тричі протягом 5 хвилин промивним буфером на шейкері.
3. Додавання в лунки по 100 мкл досліджуваних зразків.
4. Інкубація суміші протягом ночі при 4 °C.
5. Промивання планшета тричі протягом 5 хвилин промивним буфером на шейкері.
6. Додавання 100 мкл противірусного IgG, кон'югованого з лужною фосфатазою, в лунки в буфері для розведення кон'югату зазначеного складу. Суміш інкубували при 37 °C протягом 4 годин.

7. Промивання планшета тричі протягом 5 хвилин промивним буфером на шейкері.
8. Хромогенним субстратом для реакції був N-p-нітрофенілфосфат, а 3 М NaOH використовували як стоп-реагент.
9. Результати ІФА записували за допомогою рідера StatFax 2100 («SFRI», Франція) при довжині хвилі 405 нм.
10. Буфери, що використовувалися в процесі, включали: карбонатно-бікарбонатний буфер (рН 9,6), екстракційний буфер (рН 7,4), кон'югуючий буфер і субстратний буфер.
11. Буфери можна зберігати при 4 °С протягом двох місяців і перед використанням їх слід довести до кімнатної температури.
12. Позитивний результат вважався у 2-3 рази вищим за негативний контроль [36].

## 2.5. Електронно-мікроскопічні дослідження

Електронна мікроскопія є потужним методом, який можна використовувати для виявлення вірусів у рослинах, у тому числі в орхідеях. Цей метод передбачає використання електронного мікроскопа високої роздільної здатності для візуалізації вірусних частинок безпосередньо. Щоб виявити віруси в орхідеях за допомогою електронної мікроскопії, тканину орхідеї спочатку готують, подрібнюючи або подрібнюючи її в спеціальному буфері для вивільнення частинок вірусу. Потім екстракт поміщають на спеціальну сітку електронного мікроскопа і досліджують під мікроскопом.

Однією з переваг електронної мікроскопії є те, що її можна використовувати для виявлення широкого спектру вірусів, включаючи ті, які неможливо виявити за допомогою інших методів. Однак ця методика потребує спеціального обладнання та досвіду, і може бути недоступною чи практичною для рутинного тестування.

В останні роки нові методи, такі як секвенування наступного покоління та молекулярні методи, такі як ПЛР, стали більш поширеними для виявлення вірусів орхідей. Однак електронна мікроскопія залишається цінним інструментом для підтвердження присутності вірусів і ідентифікації нових або невідомих вірусів в орхідеях.

У дослідженні використовувалося електронно-мікроскопічні дослідження з використанням соку *Phalaenopsis sp.* та *Cymbidium sp.* Процедура включала наступні кроки:

1. Плівку-підкладку готували з 0,2% розчину формвару в хлороформі.
2. Відібрані рослини гомогенізували в 0,1 М PBS, рН 7,4, у присутності EDTA.
3. Потім гомогенізовані зразки піддавали низькошвидкісному центрифугуванню (4000 об/хв протягом 15 хвилин).
4. Отриману супернатантну рідину наносили на сітки-підкладки.
5. Уранілацетат, 2% водний розчин, використовували для контрастування зразків протягом 2 хвилин.
6. Зразки досліджували на просвічувальному електронному мікроскопі JEOL (JEM-1400) в Центрі колективного користування Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН з інструментальним збільшенням 60 тис.
7. Наявність вірусів у зразках визначали методом електронної мікроскопії [37].

## 2.6. Виділення тотальної РНК

Виділення загальної РНК є поширеним методом виявлення вірусів орхідей. Загальна РНК містить як РНК вірусу, так і РНК хазяїна, і її можна виділити з інфікованих рослинних тканин за допомогою різних методів,

таких як метод екстракції фенолом-хлороформом або комерційні набори для виділення РНК.

Одним із поширених підходів для виявлення вірусів орхідей за допомогою тотальної РНК є полімеразна ланцюгова реакція зворотної транскрипції (RT-PCR), яка передбачає перетворення РНК у комплементарну ДНК (кДНК) за допомогою ферменту зворотної транскриптази, а потім ампліфікацію кДНК за допомогою ПЛР із вірусоспецифічними праймерами. Потім ампліфіковані продукти можна аналізувати за допомогою гелелектрофорезу або інших методів виявлення, таких як секвенування ДНК або гібридизація з міченими зондами.

Виділення загальної РНК є поширеним методом виявлення вірусів орхідей. Загальна РНК містить як РНК вірусу, так і РНК хазяїна, і її можна виділити з інфікованих рослинних тканин за допомогою різних методів, таких як метод екстракції фенолом-хлороформом або комерційні набори для виділення РНК.

Загалом виділення загальної РНК є ключовим кроком у виявленні та діагностиці вірусів орхідей і часто використовується в поєднанні з іншими методами, такими як ELISA та електронна мікроскопія, щоб забезпечити комплексний аналіз вірусних інфекцій в орхідеях.

У дослідженні виділялася тотальна РНК з використанням комерційного набору для виділення рослинної РНК. Процедура включала наступні кроки:

1. 100 мг зразків листя гомогенізують в 1 мл буфера для лізису після попередньої гомогенізації зразків у рідкому азоті.

2. Гомогенат перемішують протягом 10-20 секунд та інкубують протягом 3 хвилин при 56°C, після чого центрифугують при 11 000 об/хв протягом 5 хвилин.

3. Зберіть 500 мкл супернатанту та перенесіть його в спеціальну колонку для екстракції з набору. Додайте етанол і центрифугуйте протягом 1 хвилини при 11000 об/хв, а потім викиньте осад.

4. Додайте 400 мкл «промивного буфера 1», центрифугуйте протягом 1 хвилини при 11 000 об/хв і викиньте осад.

5. Додайте 300 мкл «промивного буфера 2», центрифугуйте протягом 1 хвилини при 11 000 об/хв і викиньте осад. Повторіть цей крок.

6. Перенесіть колонку в нову пробірку Eppendorf, додайте 50 мкл води, вільної від РНКаз, і центрифугуйте протягом 1 хвилини при 11000 об/хв. Використовуйте отриману РНК негайно або зберігайте її в морозильній камері при  $-80^{\circ}\text{C}$  [38].

## 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 орхідеї.

Полімеразна ланцюгова реакція зі стадією зворотної транскрипції була проведена з використанням кіт SuperScript II (Invitrogen, США). Ампліфікацію ділянок капсидних білків (CP) CymMV та ORSV

CymMV-F – 5' АСААТААТТТGAAАТААТСАТGGGA-3',

CymMV-R – 5'-AAAACCACACGCCTTATTAAGTTTG-3';

(розмір продукту ампліфікації 720 по);

ORSV-F – 5'-ACGCACAАТСТGАТТСГТАТТGAA-3',

ORSV-R – 5'-ТАТСААСGTTАТТТТCCTAAАТАТ-3';

(розмір продукту ампліфікації 530 по) [39, 40, 41].

## 2.8. Електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі

1. Електрофорез в агарозному гелі - це метод, який використовується для розділення макромолекул на основі їх розміру та електричного заряду. Рух заряджених частинок під дією електричного поля називається електрофорезом.

2. Стандартним методом виділення, ідентифікації та очищення фрагментів нуклеїнових кислот є електрофорез в агарозному гелі. Цей спосіб простий і швидкий у виконанні. Етидій бромід, флуоресцентний інтеркалюючий барвник у низьких концентраціях, використовується для фарбування нуклеїнових кислот у гелі для подальшої візуалізації.

3. Для візуалізації результатів виділення тотальної РНК проводили електрофорез в агарозному гелі з використанням буферного гелю 1,5% агарози та 98,5% TBE з 10 мкл барвника броміду етидію.

4. Напруга, прикладена до електродів, розташованих на обох кінцях гелю, є рушійною силою електрофорезу. Швидкість міграції молекул через гель визначається їх характеристиками.

5. Для підготовки до електрофорезу налили гель, підготували електрофорезні камери та гребінці. Розчин маркера, який містить відому довжину фрагментів ДНК (GeneRuler 50bp DNA ladder від Fermentas), готували шляхом додавання 8 мкл ddH<sub>2</sub>O та 2 мкл маркера та барвника до зразків.

6. Після електрофорезу результати переглядали на транслюмінаторі, аналізували та фіксували на фотографіях.[42]

## 2.9. Виділення продукту ампліфікації з агарозного гелю

1. Після електрофорезу в агарозному гелі отримані продукти вирізали за допомогою стерильного скальпеля та перенесли в стерильну мікропіпетку.
2. Додати зв'язувальний буфер у співвідношенні 3:1 до гелю.
3. Інкубуйте суміш 10 хвилин при температурі 50-60 °С.
4. Перенести 800 мкл суміші в колонку.
5. Центрифугуйте колонку 1 хвилину зі швидкістю 12000 обертів за хвилину.
6. Додати 100 мкл буфера для зв'язування в колонку.
7. Повторити 5 етап.
8. Додати 700 мкл промивного буфера до колонки та центрифугуйте протягом 1 хвилини зі швидкістю 12 000 об/хв.
9. Перемістіть колонку в нову стерильну мікроцентрифужну пробірку та центрифугувати протягом 1 хвилини зі швидкістю 12 000 об/хв.
10. Додайте 50 мкл елюючого буфера до колонки та центрифугуйте протягом 1 хвилини зі швидкістю 12 000 об/хв. [37].

## 2.10. Сиквенс кДНК

1. Для проведення філогенетичного аналізу та порівняння нуклеотидних компонентів українських ізолятів із відомими ізолятами необхідно секвенувати амплікони гена капсидного білка, отримані методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).
2. Нуклеотидну послідовність гена капсидного білка можна застосувати після ампліфікації гена з подальшим очищенням продукту ампліфікації за допомогою колонок Mini Elute (Qiagen, UK).
3. Потім очищені ампліфіковані фрагменти секвенували в Оксфордському університеті (Оксфорд, Великобританія) за допомогою

аналізатора ДНК Applied Biosystems 3730x1, за допомогою термінатора Big Dye версії 3.1 (Applied Biosystems, США).

## 2.11. Побудова філогенетичних дерев

Щоб побудувати філогенетичне дерево для виявлення вірусів орхідей, дослідники можуть використовувати послідовності вірусних геномів, отримані за допомогою різних методів, таких як RT-PCR. Ці послідовності вирівнюються, а подібності та відмінності між ними аналізуються за допомогою різних алгоритмів і програмного забезпечення.

На основі цих аналізів будується філогенетичне дерево, яке може допомогти визначити зв'язок між різними штамми або підтипами вірусу, а також простежити походження та еволюцію вірусу. Дерево також може допомогти визначити наявність нових вірусних штамів або відстежити поширення вірусу з часом і в різних регіонах.

Загалом конструювання філогенетичних дерев є потужним інструментом для вивчення вірусів орхідей і може надати цінну інформацію про їх еволюцію та поширення, а також допомогти в розробці ефективних стратегій виявлення та контролю.

Для дослідження послідовностей українського ізоляту використовувався ресурс IQ-TREE за таким алгоритмом:

1. Перейдіть на сайт IQ-TREE: <http://www.iqtree.org/>.
2. Натисніть вкладку «Веб-сервер» у верхньому меню.
3. Виберіть тип аналізу, який ви бажаєте виконати, наприклад Maximum Likelihood.
4. Завантажте файл даних послідовності у форматі FASTA. Ви також можете завантажити кілька файлів або стиснутий файл у форматі ZIP.

5. Виберіть відповідні параметри для свого аналізу, такі як модель заміни, метод підтримки розгалужень і кількість повторів початкового завантаження.

6. Введіть адресу електронної пошти, щоб отримати результати після завершення аналізу.

7. Натисніть кнопку «Надіслати роботу», щоб розпочати аналіз.

8. Дочекайтеся завершення аналізу. Це може зайняти кілька хвилин або годин залежно від розміру набору даних і складності аналізу.

9. Після завершення аналізу ви отримаєте електронний лист із посиланням на сторінку результатів. Перейдіть за посиланням, щоб переглянути філогенетичне дерево та інші результати аналізу. [45, 46]

## 2.12. Статистична обробка отриманих даних

Статистичний аналіз є важливим аспектом досліджень, у тому числі при виявленні вірусів орхідей. Двома поширеними методами статистичного аналізу є метод найменших квадратів і аналіз сукупності.

Аналіз сукупності передбачає використання статистичних методів для аналізу всієї сукупності, а не лише вибірки. Це може бути корисним у дослідженнях виявлення вірусів, коли намагаються визначити поширеність певного вірусу в популяції орхідей. Аналізуючи всю популяцію, дослідники можуть зробити більш точні оцінки поширеності та захворюваності на вірус, що може допомогти в розробці стратегій боротьби з хворобами.

Загалом, статистичний аналіз є важливим інструментом у виявленні вірусів орхідей. Використовуючи такі методи, як метод найменших квадратів і аналіз популяції, дослідники можуть отримати уявлення про поширення та тяжкість вірусів орхідей і розробити ефективніші стратегії боротьби з хворобами.

Для статистичного опрацювання результатів були використані формули: середнього арифметичного:

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

Стандартного відхилення генеральної сукупності :

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

Процес пошуку найкращої моделі для побудови філогенетичних дерев передбачає оцінку та порівняння різних моделей на основі їх здатності відповідати даним послідовності та враховувати еволюційні процеси.

При пошуці найкращої моделі для побудови філогенетичних дерев використовувався вбудований статистичний функціонал ресурсу IQ-TREE. [45].

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Результати візуального обстеження насаджень

Для дослідження вірусів декоративних рослин родини *Orchidaceae* Juss. використовували зразки що були відібрані з міста Київ, Ботанічного саду ім. О.В. Фоміна: листки *Cymbidium hybridum*, *Phalaenopsis* sp., *Cymbidium* sp., *Laellia* sp., *Celogine* sp., *Phalaenopsis calicorne.*, *Miltoniopsis* (2019 рік) та зразки відібрані з міста Львів, Ботанічного саду імені І. Франка: листки *Zygopetalum* sp., *Cymbidium* sp. та cv., *Paphiopedium insigne*, *Cattlea hybridum*, *Phalaenopsis* cv., *Coelogyne flaccida*, *Stanhopea* (2023 рік).



**Рис.3.1.** Вірусоподібні симптоми (чорні плями) на листку фаленопсису (*Phalaenopsis* sp.) колекції Ботанічного саду саду ім. О.В. Фоміна КНУ імені Тараса Шевченка



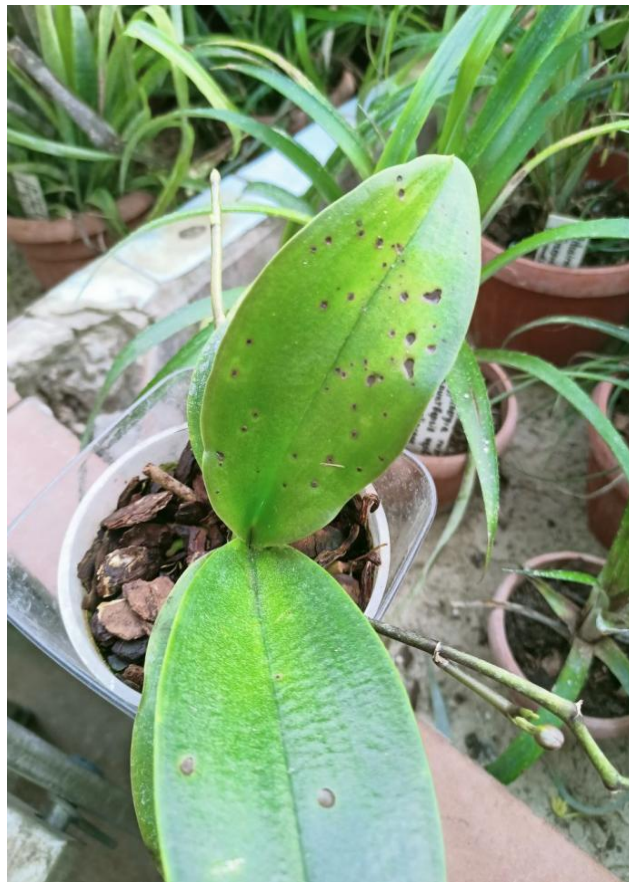
**Рис.3.2.** Вірусоподібні симптоми (чорні плями та мозаїка) на листках цимбідіуму (*Cymbidium* sp. ) колекції Ботанічного саду ім. О.В. Фоміна КНУ імені Тараса Шевченка

Вірусоподібні симптоми в орхідей, такі як чорні плями на листках фаленопсису, можуть відрізнятися за розміром і зовнішнім виглядом залежно від конкретного вірусу, який викликає симптоми. Однак, як правило, чорні плями можуть виглядати як округлі або неправильної форми з діаметром від кількох міліметрів до кількох сантиметрів.



**Рис.3.3.** Вірусоподібні симптоми (чорні плями та мозаїка) на листках станхопеї (*Stanhopea hernandesii*) колекції Ботанічного саду ЛНУ імені І. Франка

Поява плям також може залежати від віку листя, оскільки старе листя може проявляти більш запущені симптоми, ніж молоде листя. Окрім чорних плям, іншими симптомами вірусних інфекцій у орхідей можуть бути пожовтіння, в'янення, смуги та викривлення листя чи квітів. Ці симптоми можуть вплинути на ріст і загальний стан рослини і можуть призвести до зменшення кількості квітів або навіть до загибелі рослини, якщо їх не лікувати.



**Рис.3.4.** Вірусоподібні симптоми (чорні некрози) на листках фаленопсису (*Phalaenopsis* sp. ) колекції Ботанічного саду ЛНУ імені І. Франка

Важливо відзначити, що чорні плями або інші вірусні симптоми на орхідеї не обов'язково означають, що рослина заражена вірусом. Інші фактори, такі як грибкові або бактеріальні інфекції, фізичні пошкодження

або стрес навколишнього середовища, також можуть викликати подібні симптоми, візуальне обстеження є лише початковою ланкою комплексу методів для точної ідентифікації вірусних інфекцій.



**Рис.3.5.** Вірусоподібні симптоми (мозаїка) на листках цимбідіуму (*Cymbidium* sp. ) колекції Ботанічного саду ЛНУ імені І. Франка



**Рис.3.6.** Вірусоподібні симптоми (чорні плями) на листках цимбідіуму (*Zygotetulum* sp. ) колекції Ботанічного саду ЛНУ імені І. Франка

Отже, в 2019 році ми провели обстеження колекції захищеного ґрунту Ботанічного саду імені академіка О.В. Фоміна, а у 2023 році ми оглянули колекції Ботанічного саду імені І. Франка. Під час обстеження були відібрані рослини з характерними вірусоподібними симптомами, такі як мозаїка, некрози, чорна плямистість на листках та затримка розвитку рослин.

### 3.2. Результати біологічного тестування

Для визначення біологічних характеристик вірусів було проведено біологічне тестування з використанням рослин-індикаторів. Ми зібрали сік з рослин, що демонструють вірусоподібні симптоми, і використали його для зараження різноманітних рослин-індикаторів (табл. 3.1, 3.2). Використовували такі рослини-індикатори: *Nicotiana tabacum*, *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium*, *Petunia hybrida*, *Lycopersicon esculentum*, *Phaseolis vulgaris*. Очікуваними симптомами для всіх протестованих вірусів були локальний некроз.

Таблиця 3.1

#### Реакція рослин-індикаторів на інокуляцію соком відібраних рослин

Вид рослин, що досліджувалися	Рослини-індикатори	Симптоми на Рослинах-індикаторах
<i>Phalaenopsis</i> sp.	<i>Nicotiana tabacum</i> “Samsun”	Системні некрози
	<i>Petunia hybrida</i>	Симптоми відсутні
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Симптоми відсутні
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Симптоми відсутні
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Локальні некрози
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi-nc	Локальні некрози
	<i>Datura stramonium</i>	Локальні некрози
	<i>Chenopodium quinoa</i>	Локальні некрози

Таблиця 3.2

Ми також використовували рослини-індикатори, які не були чутливі до вірусів ORSV і CymMV, щоб підтвердити наявність саме цих вірусів в уражених рослинах. Симптоми, які ми спостерігали на рослинах-індикаторах, підтвердили наявність CymMV та ORSV у зразках, які були протестовані.

### Реакція рослин-індикаторів на інокуляцію соком відібраних рослин

Вид рослин, що досліджувалися	Рослини-індикатори	Симптоми на Рослинах-індикаторах
<i>Cymbidium</i> sp.	<i>Nicotiana tabacum</i> “Samsun”	Системні некрози
	<i>Petunia hybrida</i>	Симптоми відсутні
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Симптоми відсутні
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Симптоми відсутні
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Локальні некрози
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi-nc	Локальні некрози
	<i>Datura stramonium</i>	Локальні некрози
	<i>Chenopodium quinoa</i>	Локальні некрози

Базуючись на позитивній реакції рослин *Datura stramonium* на експериментальний сік рослини, що є індикатором для виявлення CymMV, і появі симптомів у *Chenopodium amaranticolor* і *Nicotiana glutinosa*, які вказують як на інфекцію CymMV, так і на ORSV, ми припустили, що *Phalaenopsis* sp. і *Cymbidium* sp. інфіковані як вірусами ORSV, так і CymMV. Для підтвердження цієї гіпотези необхідні подальший аналіз і підтвердження за допомогою молекулярних методів.

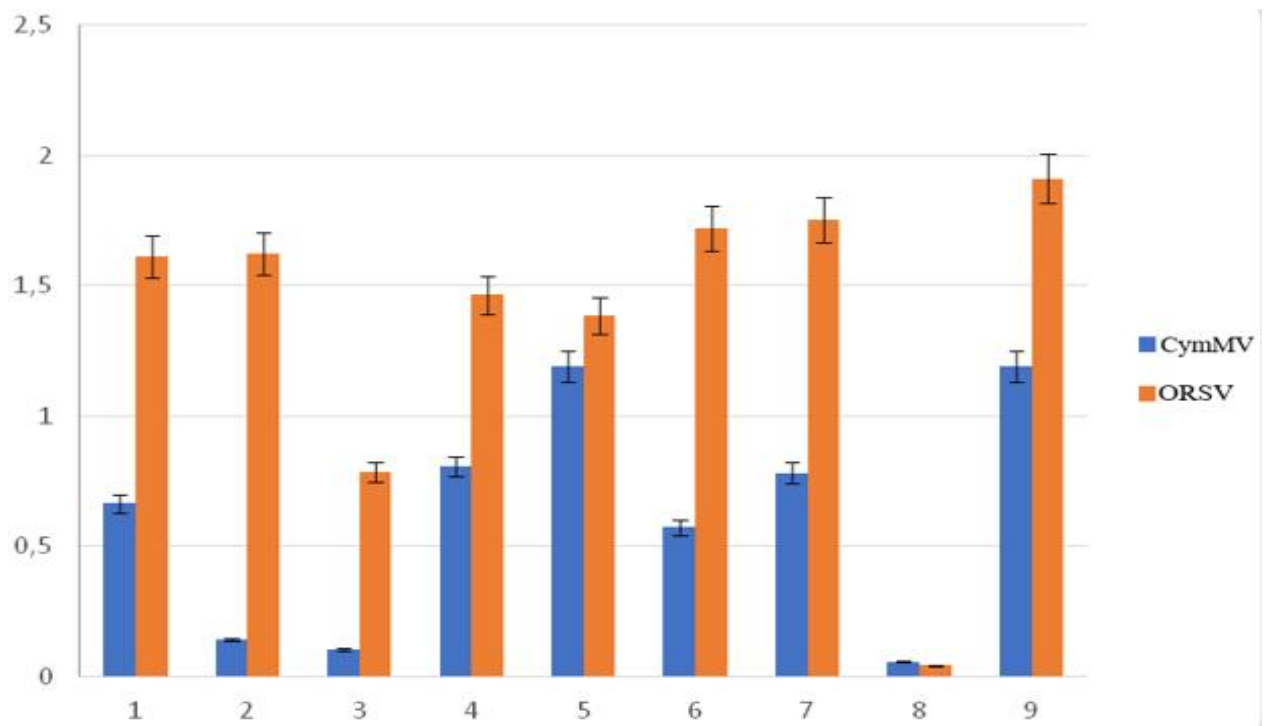


**Рис.3.7.** Через два тижні після інокуляції спостерігався локальний хлороз на листках *Chenopodium* sp. які були щеплені соком хворого *Phalaenopsis* sp. рослини.

Отже, наше дослідження мало на меті виявити віруси, відповідальні за характерні вірусоподібні симптоми в колекціях двох ботанічних садів. Проводячи біологічні дослідження з використанням рослин-індикаторів, вдалося встановити інфекційну природу хвороби орхідей у колекціях Ботанічних садів імені О. В. Фоміна та І. Франка. Отримані нами дані дозволяють припустити, що захворювання має вірусне походження, оскільки специфічні вірусні симптоми з'явилися на рослинах-індикаторах після зараження соком хворих рослин орхідей. Використання рослин-індикаторів є одним з методів ідентифікації вірусних захворювань у рослин, і наше дослідження підтверджує його корисність у ідентифікації вірусів ORSV та СумMV в орхідеях.

### 3.3. Виявлення уражених рослин орхідних методом імуноферментного аналізу

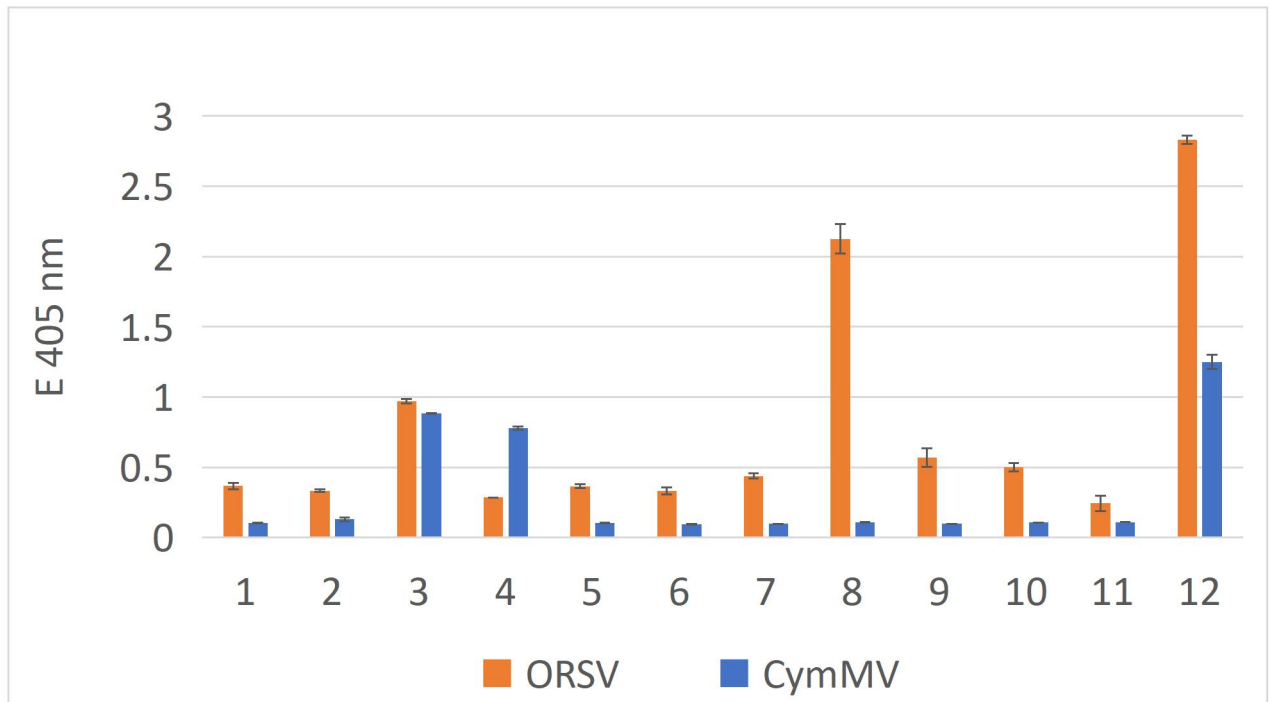
Був проведений імуноферментний аналіз із застосуванням сироваток на ORSV та CymMV («Prime Diagnostics», Нідерланди) у модифікації DAS-ELISA.



**Рис.3.8.** Результати тестування рослин родини *Orchidacea* колекції Ботанічного саду ім. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка: 1- *Cymbidium sp.* 2- *Cymbidium hybridum*, 3- *Laellia sp.*, 4- *Celogine sp.*, 5- *Phalaenopsis calicorne.*, 6- *Phalaenopsis sp.*, 7- *Miltoniopsis*, 8 - негативний контроль; 9 - позитивний контроль

Результати показали, що більшість зразків орхідей мали змішану інфекцію CymMV та ORSV (рис. 3.4). Крім того, у всіх досліджуваних зразках була виявлена висока концентрація антигенів ORSV. За результатами ELISA коінфекція обома вірусами не була підтверджена в листі *Cymbidium hybridum* і *Laellia sp.* У цих зразках були присутні лише антигени ORSV, тоді

як антигени CymMV були відсутні. Найвищу концентрацію обох антигенів спостерігали у зразку *Phalaenopsis calicorne*, що узгоджується з найсильнішими вірусоподібними симптомами, які спостерігаються на його листі.



**Рис. 3.9.** Результати тестування рослин родини *Orchidaceae* колекції Ботанічного саду Львівського національного університету імені ім. І. Франка : 1 - *Zygopetalum sp.*, 2 - *Cymbidium cv.*, 3 - *Cymbidium sp.*, 4 - *Paphiopedium incigne(1)*, 5 - *Coelogyne rochussenii*, 6 - *Paphiopedium incigne(2)*, 7 - *Cattlea hybridum*, 8 - *Phalaenopsis cv.*, 9 - *Coelogyne flaccida*. 10 - *Stanhopea hernandesii*, 11 - негативний контроль, 12 - позитивний контроль.

Результати показали кращий фітосанітарний стан колекції ЛНУ, в зразку *Phalaenopsis cv.* було виявлено найбільшу концентрацію антигенів ORSV, зразок *Cymbidium sp.* мав коінфекцію (CymMV та ORSV) і в *Paphiopedium incigne* виявили моноінфекцію (CymMV)

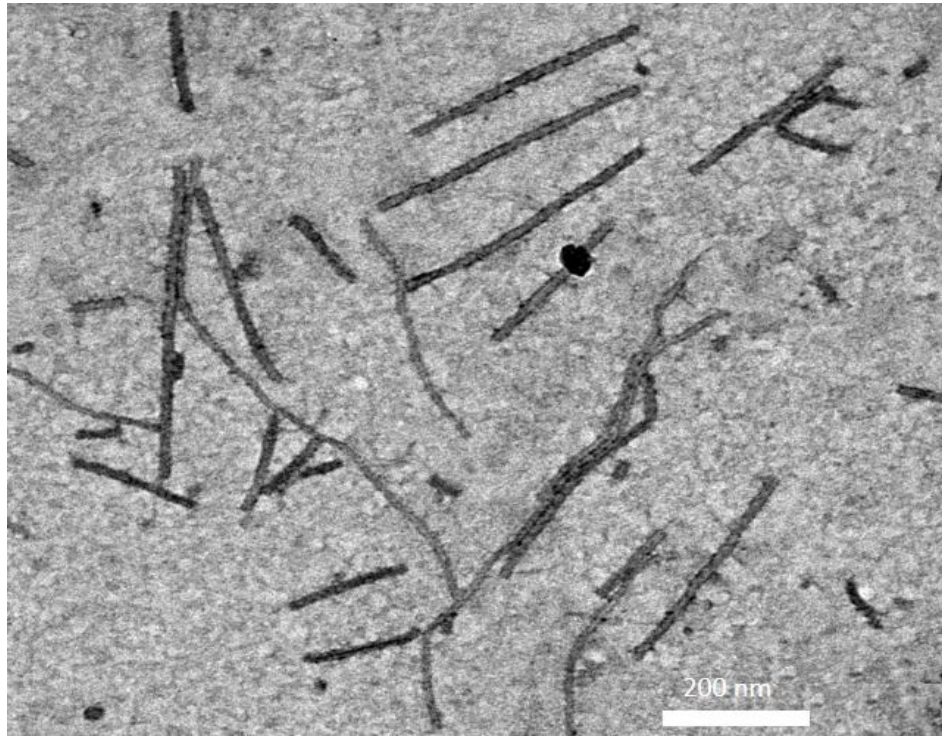
### 3.4. Дослідження соку інфікованих рослин за допомогою електронного мікроскопу

У зразках листків *Phalaenopsis sp.* було знайдено віріони. Морфологія віріонів: паличкоподібна - розмір 300 нм. (ORSV) та ниткоподібна (СумMV) – 470 нм (рис.3.5).



**Рис.3.9.** Електронно-мікроскопічне зображення віріонів. Морфологія – ниткоподібна. Виділені з соку *Phalaenopsis sp.* Лінійка – 200 нм.

У зразках листків *Cymbidium sp.* було знайдено віріони. Морфологія віріонів: паличкоподібна - розмір 300 нм. (ORSV) та ниткоподібна (СумMV) – 470 нм (рис.3.10).



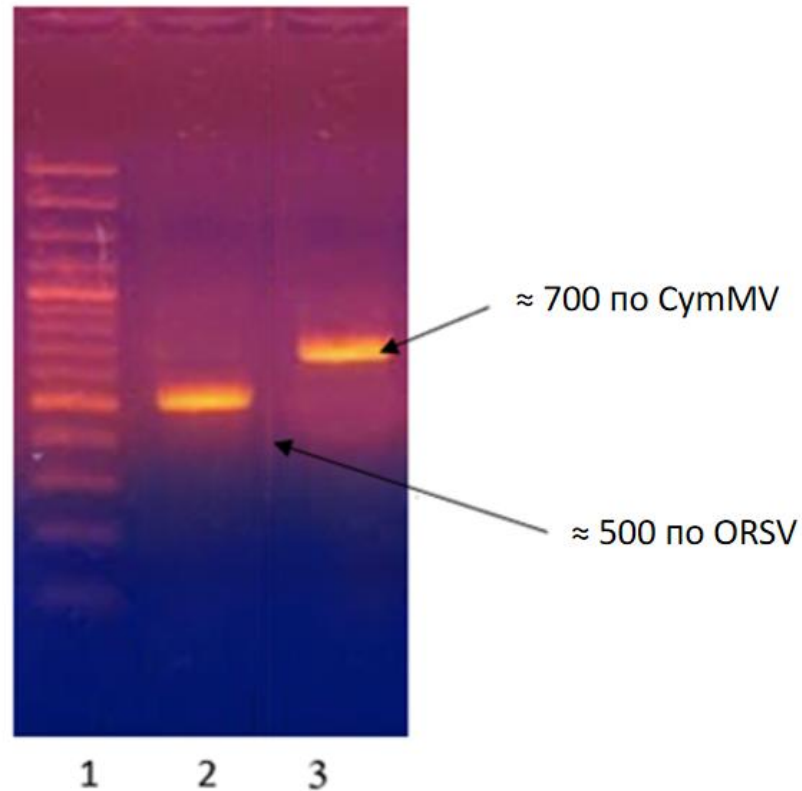
**Рис.3.10.** Електронно-мікроскопічне зображення віріонів. Морфологія – ниткоподібна. Виділені з соку *Cymbidium sp.* Лінійка – 200 нм.

Наявність віріонів ниткоподібної та паличкоподібної морфології, виявлена за допомогою електронної мікроскопії, є додатковим підтвердженням того, що хвороби орхідей у колекції Ботанічного саду імені О.В. Фоміна в КНУ імені Тараса Шевченка має вірусне походження.

### **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 вірусів CymMV та ORSV порівнювали за допомогою ресурсу IQ-TREE.

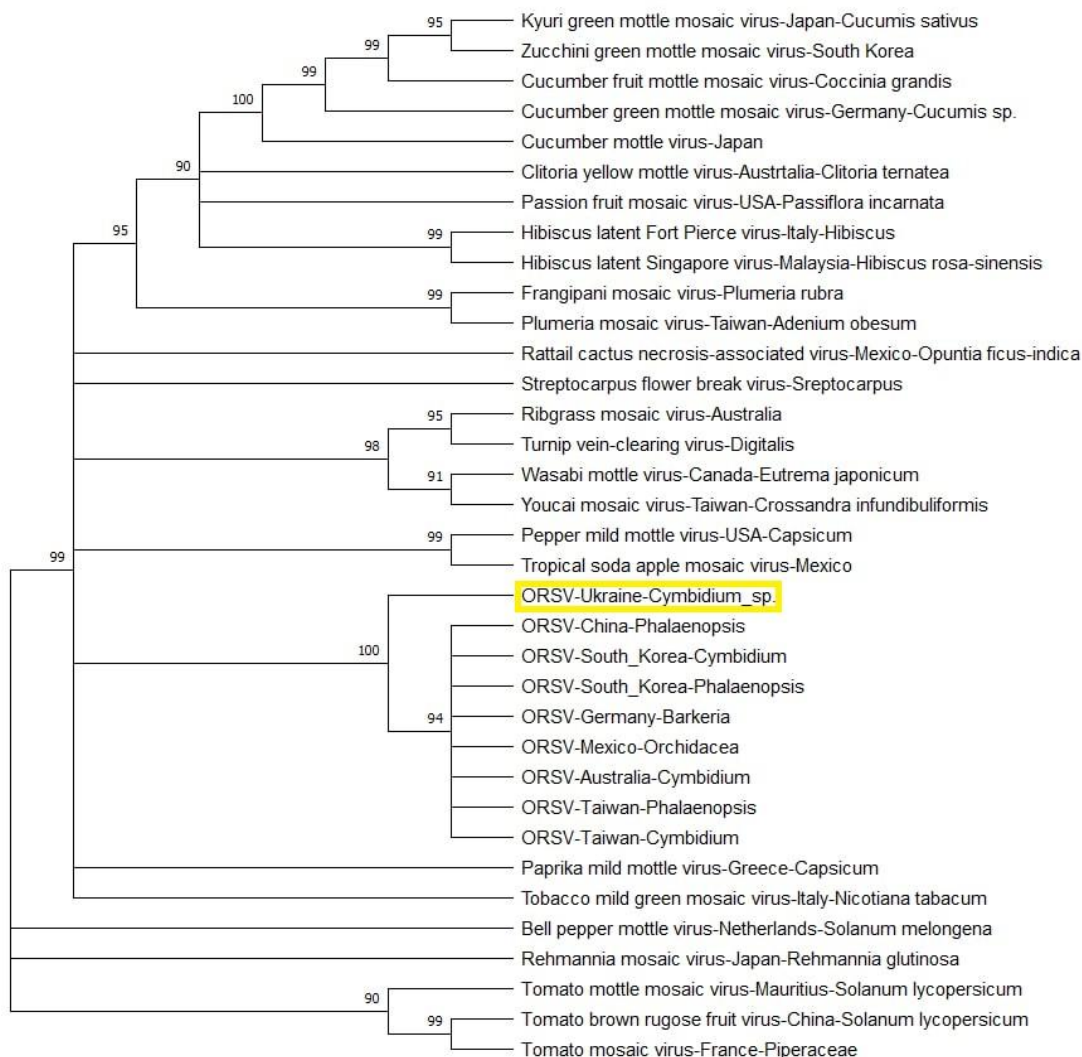


**Рис.3.11.** Електрофореграма продуктів RT-PLR в агарозному гелі – кДНК генів капсидних білків ORSV та CymMV: 1 – маркери (100 по, Fermentas), 2, 3– продукти ампліфікації

Отримані продукти генів капсидних білків ORSV та CymMV відповідають за довжиною очікуваним: 500 пар основ та 700 пар основ, відповідно (рис.3.6). Продукти, отримані за допомогою специфічних праймерів, підтверджують наявність ORSV та CymMV в зразках орхідних різних сортів та видів колекції Ботанічного саду ім. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

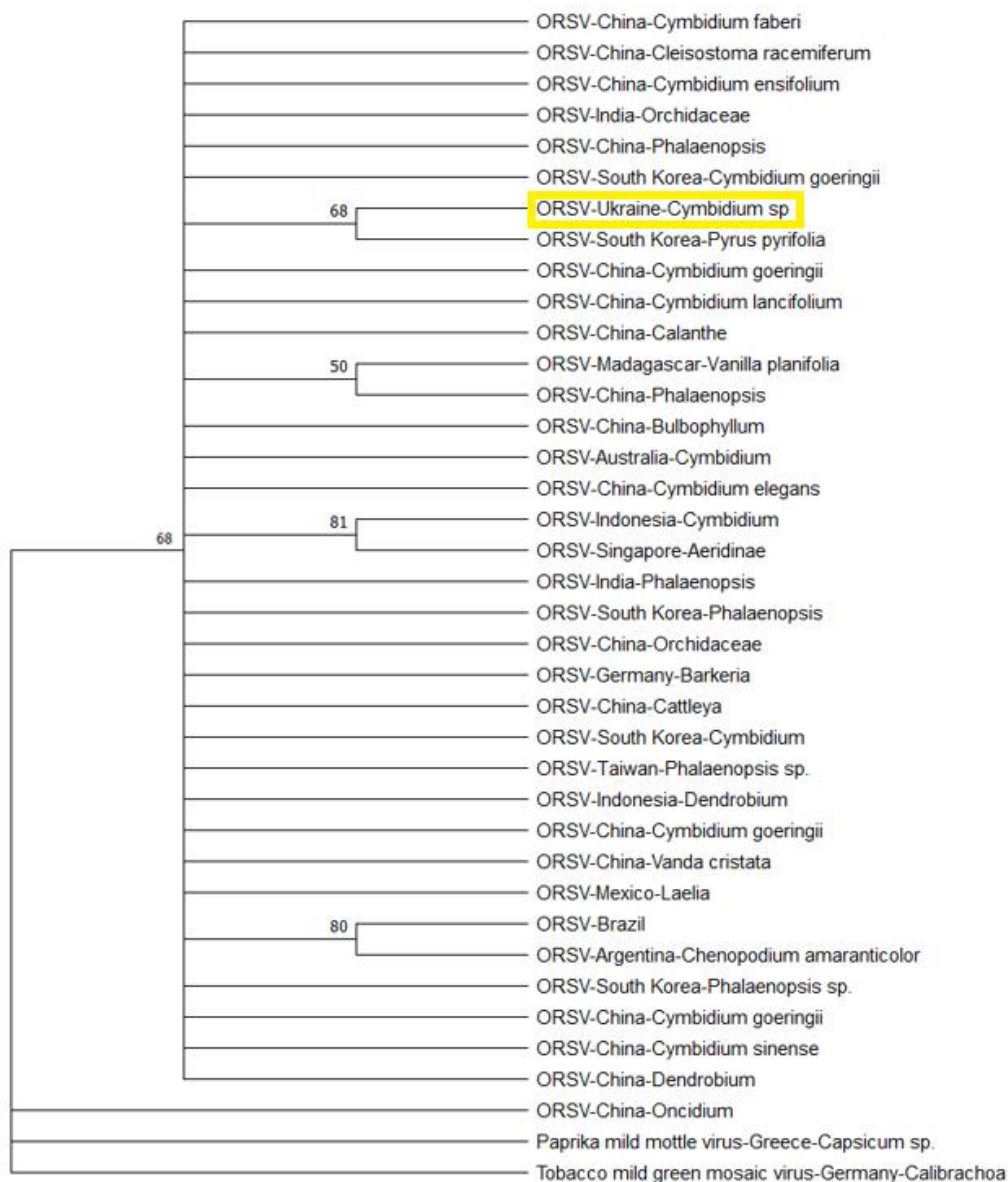
### 3.6 Штамова приналежність українського ізоляту ORSV

За допомогою ресурсу IQ-TREE були отриманні філогенетичні дерева, для встановлення спорідненості українських ізолятів ORSV, отриманих з рослин родини орхідних колекції Ботанічного саду ім. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка, з ізолятами з інших країн.



**Рис.3.12.** Філогенетичні відносини ізолятів ORSV. Дерево побудоване за нуклеотидною послідовністю гену полімерази методом Maximum likelihood. 10000 bootstrap replications (> 90%)

На основі філогенетичного аналізу, представленого на малюнках 3.7 і 3.8, ізолят ORSV, отриманий з *Phalaenopsis* sp. рослина в колекції Ботанічного саду імені О.В. Фоміна в Київському національному університеті імені Тараса Шевченка показали найбільш тісний зв'язок із ізолятами декоративних рослин родини кімнатних орхідних Індії, Південної Кореї та Китаю.



**Рис.3.13.** Філогенетичні відносини ізолятів ORSV. Дерево побудоване за нуклеотидною послідовністю гену капсидного білку методом Maximum likelihood. 10000 bootstrap replications (>50%)

Висока схожість між усіма послідовностями ORSV свідчить про те, що вірус переважно передається вегетативним і механічним шляхом.

Вірусні інфекції, спричинені ORSV і CymMV, відповідають за характерні вірусоподібні симптоми, які спостерігаються в колекціях орхідей у двох досліджуваних ботанічних садах. Це підкреслює важливість належних заходів санітарії рослин і ефективних стратегій боротьби з вірусами, щоб запобігти поширенню цих вірусів у колекціях орхідей.

Отримані дані дають підстави стверджувати, що вірус був завезений в колекцію з інших країн, оскільки Ботанічний сад отримував види з різних країн, включаючи Сінгапур, В'єтнам, Мадагаскар, Індонезію, Мексику та Венесуелу. Оскільки ORSV може передаватися механічним шляхом, навіть одна заражена рослина може заразити всю колекцію, тому необхідно періодично тестувати рослини, використовувати продезінфіковані інструменти для маніпуляцій з рослинами та дотримуватися карантинних умов для щойно імпортованих рослин. Ці заходи допоможуть запобігти занесенню та поширенню вірусних захворювань у колекції.

## ВИСНОВКИ

1. Проведено комплексне обстеження колекції рослин орхідних ботанічних садів України. За допомогою рослин-індикаторів підтверджено інфекційну природу хвороб орхідних.
2. За допомогою DAS-ELISA виявлено високу концентрацію антигенів вірусу кільцевої плямистості одонтоглосума та вірусу мозаїки цимбідіуму в зразках рослин орхідей.
3. Методом електронної мікроскопії в соці рослини *Phalaenopsis* sp. виявлено паличкоподібні вірусні частинки довжиною  $300 \pm 2$  нм (які відповідають ORSV) та ниткоподібні вірусні частинки довжиною  $470 \pm 2$  нм (які відповідають СумMV).
4. Ампліфіковано та секвеновано кДНК, які відповідають ділянкам генів капсидного білка та білка полімерази ORSV. Їх біоінформатичний аналіз у поєднанні з вивченням біологічних, серологічних та морфологічних властивостей підтвердив, що виявлений патоген є вірусом кільцевої плямистості одонтоглосума.
5. За результатами філогенетичного аналізу встановлено, що ізолят ORSV є найбільш подібним до ізолятів, ідентифікованих на декоративних культурах у Китаї, Індії, Сінгапурі, Мадагаскарі та Південній Кореї.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Енциклопедія рослин: Садові та кімнатні, Глорія Трейд. Available at:  
[https://shron1.chtyvo.org.ua/Anufriieva\\_Svitlana/Entsyklopediia\\_roslyn\\_sadovykh\\_ta\\_kimnatnykh.pdf](https://shron1.chtyvo.org.ua/Anufriieva_Svitlana/Entsyklopediia_roslyn_sadovykh_ta_kimnatnykh.pdf)
2. J. Engelmann, J. Hamacher, Plant Virus Diseases: Ornamental Plants, Encyclopedia of Virology (Third Edition), Academic Press (2008), p. 207-229. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00729-9>.
3. Orchidaceae Juss. in Döring M (2021). English Wikipedia - Species Pages. Wikimedia Foundation. Available at:  
<https://www.gbif.org/species/113566063>
4. Chia-Hwa Lee, You-Xiu Zheng and Fuh-Jyh Jan, CHAPTER 9: The Orchid-Infecting Viruses Found in the 21st Century, Orchid Biotechnology III, pp. 145-164 (2017). Available at: [https://doi.org/10.1142/9789813109223\\_0009](https://doi.org/10.1142/9789813109223_0009)
5. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Available at: <https://talk.ictvonline.org>
6. Meng-Shiou Lee, Meng-Ja Yang, You-Cheng Hseu, Guan-Hua Lai, Wen-Te Chang, Yau-Heiu Hsu, Ming-Kuem Lin, One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Cymbidium mosaic virus, Journal of Virological Methods, Volume 173, Issue 1 (2011), p. 43-48. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.01.005>.
7. Descriptions of Plant Viruses (DPV) Available at:  
<https://www.dpvweb.net>
8. Chen, J., Zheng, Y., Tian, Y., & Wang, J. (2016). Genetic diversity and molecular evolution of Cymbidium mosaic virus. Scientific Reports, 6, 19067. <https://doi.org/10.1038/srep19067>
9. Guan, Z., Lu, J., Xu, Y., He, C., & Xia, B. (2014). Complete genome sequence of a Cymbidium mosaic virus isolate from Phalaenopsis in China. Virus Genes, 48(2), 325–329. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-1021-7>

9. Huang, Y. T., Hsu, H. T., & Tsai, C. H. (2013). Complete genome sequence of an isolate of *Odontoglossum* ringspot virus from *Phalaenopsis* orchids. *Archives of Virology*, 158(5), 1155–1158. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1609-7>
10. Lee, M. H., & Ryu, K. H. (2012). First report of *Cymbidium* mosaic virus infecting *Phalaenopsis* in Korea. *Plant Pathology Journal*, 28(3), 346–349. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2011.0198>
11. Li, S. J., Chen, C. C., & Chen, T. C. (2016). Complete genome sequence of a novel isolate of *Cymbidium* mosaic virus from *Oncidium* orchids in Taiwan. *Genome Announcements*, 4(6), e01322-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01322-16>
12. Liu, J., Su, H. J., Zhang, C. L., & Li, J. J. (2010). Molecular characterization of a distinct isolate of *Cymbidium* mosaic virus from *Dendrobium*. *Archives of Virology*, 155(8), 1313–1316. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0713-y>
13. Wang, R. Y., Huang, Y. T., & Tsai, C. H. (2010). Complete genome sequence of an isolate of *Cymbidium* mosaic virus from *Oncidium* orchids. *Journal of General Virology*, 91(Pt 6), 1616–1620. <https://doi.org/10.1099/vir.0.020230-0>
14. Zhang, S., Xu, Y., Yang, J., Chen, J., & Xie, L. (2012). Complete genome sequence of a new isolate of *Cymbidium* mosaic virus from *Paphiopedilum* in China. *Archives of Virology*, 157(3), 561–564. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1172-2>
15. S.T. Lim, S.M. Wong, C.Y. Yeong, S.C. Lee, C.J. Goh, Rapid detection of *cymbidium* mosaic virus by the polymerase chain reaction (PCR), *Journal of Virological Methods*, Volume 41, Issue 1 (1993), p. 37-46. Available at: [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(93\)90161-J](https://doi.org/10.1016/0166-0934(93)90161-J).
16. M. N. Pearson, J. S. Cole, Further Observations on the Effects of *Cymbidium* Mosaic Virus and *Odontoglossum* Ringspot Virus on the Growth of *Cymbidium* Orchids, *Journal of Phytopathology*, Volume 131, Issue 3, p.193-198. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1991.tb01187.x>

17. Song-Yi Kuo, Chung-Chi Hu, Ying-Wen Huang, Chin-Wei Lee, Meng-Jhe Luo, Chin-Wei Tu, Shu-Chuan Lee, Na-Sheng Lin, Yau-Heiu Hsu, Argonaute 5 family proteins play crucial roles in the defence against Cymbidiummosaicvirus and Odontoglossumringspotvirus in Phalaenopsisaphrodite subsp. formosana, *Molecular Plant Pathology* Volume 22, Issue 6, p. 627-643. Available at: <https://doi.org/10.1111/mpp.13049>
18. Bratsch, Sara, Odontoglossum ringspot virus, 12 June 2015. Available at: <http://plantpathlesstraveled.com/odontoglossum-ringspot-virus/>
19. M.H.V. Van Regenmortel, Heinz Fraenkel-Conrat, *The Plant Viruses: The Rod-Shaped Plant Viruses*, Springer-Verlag US (1986), p.442. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7026-0>
20. J.S. Hu, S. Ferreira, M.Q. Xu, Detection of Cymbidium Mosaic Virus, Odontoglossum Ringspot Virus, Tomato Spotted Wilt Virus, and Potyviruses Infecting Orchids in Hawaii, Department of Plant Pathology, University of Hawaii, 3190 Maile Way, Honolulu (1993), p.464-468. Available at: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1993Articles/PlantDisease77n05\\_464.PDF](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1993Articles/PlantDisease77n05_464.PDF)
21. J. Engelmann, J. Hamacher, *Plant Virus Diseases: Ornamental Plants*, *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* (2008). Available at: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/cymbidium-mosaic-virus>
22. Cholthof, K.G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., & Foster, G.D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, Volume 12(9), p. 281-348. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
23. Sunpapao, A., Mochizuki, T., & Ohki, S.T. (2010), Relationship between viral distribution in the leaf primordia/young developing leaves and symptom severity in the fully expanded leaves of tobacco plants infected with

Cucumber mosaic virus, *Australasian Plant Pathology*, Volume 40, p. 215-221. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13313-010-0027-5>

24. Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Development of Reagents for the Effective and Rapid Indexing of Viral Pathogens in Orchids, 11 Feb. 2015. Available at: <https://www.tari.gov.tw/english/news/index-1.asp?Parser=9,15,79,,,1304>

25. García-Arenal, Fernando & Escribe, Fernando & Aranda, Miguel & Alonso-Prados, José & Malpica, José & Fraile, Aurora. (2000), Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus research*. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00183-0)

26. Palukaitis P., Roossinck M. J., Dietzgen R. G., Francki R. I. B. (1992), Cucumber mosaic virus. *Advanced in virus research*, Volume 41(c), p. 281-348. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60039-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60039-1).

27. Kumar, S., Gautam, K.K., & Raj, S.K. (2015), Sequence analysis and genetic diversity of five new Indian isolates of cucumber mosaic virus, *Acta Virologica*, Volume 59, p. 398-404. Available at: [http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=4481&category\\_id=123&option=com\\_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1](http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=4481&category_id=123&option=com_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1) [Accessed 06 Dec. 2015].

28. Hu, J.S., Li, H.P., Barry, K., Wang, M., & Jordan, R. (1995), Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. Available at: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1995Abstracts/PD\\_79\\_902.htm](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1995Abstracts/PD_79_902.htm)

29. Min, Dong-Joo & Park, Ji-Soo & Hong, Jin-Sung. (2020), First report of cucumber mosaic virus isolated from *Zinnia elegans* in Korea., *Journal of Plant Pathology*. Available at: <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00532-3>

30. Khaled, Abdelsabour & Wardany, Ahmed & Mahmoud, Sabry (2015), Coat protein gene of new isolate of cucumber mosaic virus infecting banana in Egypt, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*.

Virologica, p.177-181. Available at:  
[https://www.researchgate.net/publication/297682573\\_Coat\\_protein\\_gene\\_of\\_new\\_isolate\\_of\\_cucumber\\_mosaic\\_virus\\_infecting\\_banana\\_in\\_Egypt](https://www.researchgate.net/publication/297682573_Coat_protein_gene_of_new_isolate_of_cucumber_mosaic_virus_infecting_banana_in_Egypt)

31. Kelaniyangoda, DB & Madhubashini, LWM (2010), Indicator plants: Tools for Detecting Papaya Ring Spot Potyvirus and Cucumber Mosaic Cucumovirus, Journal of Food and Agriculture. Available at:  
[https://www.researchgate.net/publication/250362281\\_Indicator\\_plants\\_Tools\\_for\\_Detecting\\_Papaya\\_Ring\\_Spot\\_Potyvirus\\_and\\_Cucumber\\_Mosaic\\_Cucumovirus](https://www.researchgate.net/publication/250362281_Indicator_plants_Tools_for_Detecting_Papaya_Ring_Spot_Potyvirus_and_Cucumber_Mosaic_Cucumovirus).

32. Chikara M., Hideki T. (2018), Cucumber Mosaic Virus, Scientific Societies, p. 14. Available at:  
[https://issuu.com/scisoc/docs/flipbook\\_7a2bf8d419dc41](https://issuu.com/scisoc/docs/flipbook_7a2bf8d419dc41).

33. Jones, R.T. (1974), Purification, biological and physical properties and serology of bean yellow mosaic virus isolates from soybean, navy bean and clover. Available at:  
[https://etd.ohiolink.edu/!etd.send\\_file?accession=osu1486984189003077&disposition=inline](https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=osu1486984189003077&disposition=inline)

34. Lesemann, D.-E. and Koenig, R. (1985), Identification of bean yellow mosaic virus in Masdevallia, Acta Hortic, Volume 164, p. 347-354. Available at: [https://www.actahort.org/books/164/164\\_39.htmF](https://www.actahort.org/books/164/164_39.htmF)

35. D.-E. Lesemann, R. Koenig, Identification of Bean Yellow Mosaic virus in Masdevallia, ISHS Acta Horticulturae 164: VI International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants, 164, p. 347-354. Available at: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1985.164.39>

36. M. Grisoni, M. Moles, K. Farreyrol, L. Rassaby, R. Davis, M. Pearson, Blackwell Publishing Ltd Identification of potyviruses infecting vanilla by direct sequencing of a short RT-PCR amplicon, Plant Pathology (2006), 55, p. 523-529. Available at:  
<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3059.2006.01397.x>

37. Khattab E.A.H., Abdelkader H. (2015), Production of Polyclonal Antibodies to Bean Yellow Mosaic Virus Isolates Affecting Legumes and Ornamental Plants In Taif Province, International Journal of Agriculture and Crop Sciences, Volume 8, p. 149-159. Available at: [https://www.researchgate.net/figure/Symptoms-of-Bean-Yellow-Mosaic-Virus-BYMV-on-naturally-infected-plants-Mosaic-on-A\\_fig1\\_274080541](https://www.researchgate.net/figure/Symptoms-of-Bean-Yellow-Mosaic-Virus-BYMV-on-naturally-infected-plants-Mosaic-on-A_fig1_274080541)
38. Carlye Baker, David Davison and Carol Scoates, White Phalaenopsis Ringspots –Mystery Solved, Plant Pathology Circular No. 406 (2007). Available at: <https://www.fdac.gov/content/download/11412/file/pp406.pdf>
39. Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., & Wong, S. M. (1990). Viruses of orchids and their control. *Plant disease*, 74(9), 621-626.
40. Coebett, M. K. (1960). Purification by density-gradient centrifugation, electron microscopy, and properties of Cymbidium mosaic virus. *Phytopathology*, 50(5).
41. Dijkstra, J., & de Jager, C. (2012). Practical plant virology: protocols and exercises. Springer Science & Business Media.
42. Moles, M., Delatte, H., Farreyrol, K., & Grisoni, M. (2007). Evidence that Cymbidium mosaic virus (CymMV) isolates divide into two subgroups based on nucleotide diversity of coat protein and replicase genes. *Archives of virology*, 152(4), 705-715.
43. Chng, C. G., Wong, S. M., Mahtani, P. H., Loh, C. S., Goh, C. J., Kao, M. C. C., ... & Watanabe, Y. (1996). The complete sequence of a Singapore isolate of odontoglossum ringspot virus and comparison with other tobamoviruses. *Gene*, 171(2), 155-161.
44. Будзанівська І. Г. Філогенетичний аналіз та штамове різноманнітя РНК-вмісних вірусів рослин в Україні: автореф. дис. на здобуття ступеня доктор. біол. наук: 03.00.06 «вірусологія» / І.Г. Будзанівська. – Київ.-2012.– 43с.
45. Kundu, J. K. (2000). To the diagnosis and distribution of the Apple stem pitting virus in the Czech Republic. In XVIII International Symposium on

Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Top Fruit Diseases 550 (pp. 275-280).

46. 1. Hasegawa M., Kishino H., and Yano T. (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-174.

47. . Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

48. Енциклопедія рослин: Садові та кімнатні, Глорія Трейд. Available at:

[https://shron1.chtyvo.org.ua/Anufriieva\\_Svitlana/Entsyklopediia\\_roslyn\\_sadovykh\\_ta\\_kimnatnykh.pdf](https://shron1.chtyvo.org.ua/Anufriieva_Svitlana/Entsyklopediia_roslyn_sadovykh_ta_kimnatnykh.pdf)