

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол №__ засідання кафедри

від «__» _____ 2025 р.

**ПОШИРЕННЯ ВІРУСІВ РОДІВ *ALFAMOVIRUS* ТА
CUCUMOVIRUS В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ**

Випускна кваліфікаційна робота
денної форми навчання
за спеціальністю Біологія
Харчук Ольги Андріївни
Науковий керівник від кафедри
д.б.н, доц. Шевченко Т.П

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ «Інституту біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом д.б.н, доц. Шевченко Т.П

Оцінка захисту роботи

Київ – 2025 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ – антиген

АТ – антитіло

РНК – рибонуклеїнова кислота

АМV – alfalfa mosaic virus

СМV – cucumber mosaic virus

ТАV – tomato aspermy virus

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика представників родини <i>Bromoviridae</i>	6
РОЗДІЛ 2. Характеристика представників родини <i>Bromoviridae</i> по родам.....	15
2.1. Характеристика роду <i>Alfavirus</i>	15
2.2. Характеристика роду <i>Anulavirus</i>	20
2.3. Характеристика роду <i>Bromovirus</i>	23
2.4. Характеристика роду <i>Cucumovirus</i>	25
2.5. Характеристика роду <i>Ilarvirus</i>	29
2.6. Характеристика роду <i>Oleavirus</i>	30
РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи досліджень.....	35
3.1. Візуальна діагностика вірусних хвороб.....	35
3.2. Імуноферментний аналіз.....	37
3.3. Метод виділення нуклеїнових кислот.....	39
3.4. Метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією.....	40
3.5. Метод проведення горизонтального електрофорезу.....	41
3.6. Статистична обробка результатів.....	42
РОЗДІЛ 4. Результати досліджень та їх обговорення.....	43
4.1. Візуальна оцінка симптомів вірусного ураженні овочевих культур.....	43
4.2. Ідентифікація вірусів родини <i>Bromoviridae</i> на овочевих культурах.....	48
ВИСНОВКИ	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	55

ВСТУП

Вірусні хвороби є однією з найсерйозніших загроз для аграрного сектору України, завдаючи значних економічних і виробничих збитків. Вони вражають широкий спектр сільськогосподарських культур — зокрема плодові дерева, овочеві та зернові культури. Інфіковані рослини демонструють помітне зниження продуктивності, що проявляється у зменшенні обсягів урожаю, погіршенні його якості, зниженні товарних характеристик продукції, а також у скороченні термінів зберігання зібраного врожаю.

Окрім прямої втрати врожайності, вірусні інфекції значно знижують стійкість рослин до дії стресових факторів — таких як посуха, перепади температур, забруднення довкілля та інші несприятливі умови. Це підвищує вразливість насаджень до вторинних уражень грибковими, бактеріальними хворобами та шкідниками, що ще більше посилює загрозу для врожаю та прибутковості агровиробництва.

Поширення вірусів у сільському господарстві також ускладнюється тим, що ефективні методи боротьби з ними обмежені. На відміну від грибкових або бактеріальних хвороб, вірусні інфекції неможливо вилікувати хімічними засобами. Тому запобігання зараженню, застосування здорового насіннєвого матеріалу, своєчасна діагностика, контроль векторів (наприклад, попелиць, кліщів, цикадок), а також впровадження стійких сортів — є ключовими елементами стратегії захисту.

У контексті змін клімату, інтенсифікації сільського господарства та глобалізації ринків зростає ризик поширення нових вірусних штамів, що потребує активізації наукових досліджень, підвищення фітосанітарного контролю та удосконалення національної політики щодо біозахисту аграрного сектору.

В умовах пришвидшення науково-технічного прогресу з розвитком нових молекулярних методів і можливостей біотехнологічної науки біологічна безпека стає невід'ємною складовою екологічної безпеки, а отже, і національної безпеки загалом. Протягом останніх років вірусні хвороби овочевих культур стали об'єктом інтенсивного вивчення майже в усіх країнах світу, що зумовлено їх широким розповсюдженням та високою шкодочинністю. Проте поза увагою залишається актуальність питання фітовірусології в аграрному виробництві України, поширення, накопичення, поява нових видів та резистентних форм вірусів (зокрема представників родини Bromoviridae) в агроценозах[43].

Середні втрати врожаю на території України від вірусних інфекцій можуть сягати: зернових культур від вірусу жовтої карликовості — 60 – 96%, пшениці від вірусу смугастої мозаїки — 20 – 63%; бобових культур від вірусу мозаїки сої — 26 – 67%, сої від вірусу карликовості — 11 – 46%. Урожайність овочевих культур від ураження вірусами огіркової мозаїки знижується на 3 – 80%, тютюнової мозаїки — на 39 – 57%; урожайність картоплі від ураження Y-вірусом — на 4 – 80%, X-вірусом картоплі — на 40 – 52%. Плодові культури уражує вірус шарки сливи, який є карантинним видом на території України, втрати врожаю від нього становлять 30 – 53%, від вірусу кільцевої плямистості вишні — 25 – 44%, вірусу коротковузля винограду — 20 – 41% [42]

Отже, метою наших досліджень є вивчення вірусних хвороб овочевих культур спричинених представниками родини Bromoviridae в агроценозах України та аналіз видового складу вірусних збудників.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ BROMOVIRIDAE

Родина вірусів рослин *Bromoviridae* є однією з найважливіших у вірусології сільськогосподарських культур і представлена вірусами, що мають одноланцюгову РНК позитивної полярності (+РНК). Її представники характеризуються геномом загального розміру приблизно 8 кілобаз (кб), який розділений на кілька сегментів. Кожна з цих сегментованих РНК молекул зазвичай упакована в окремі віріони, що забезпечує гнучкість та варіативність у структурній організації частинок. Крім основних геномних РНК, віріони можуть також містити субгеномні, дефектні або навіть сателітні РНК, які можуть мати як модулюючий вплив на життєвий цикл вірусу, так і впливати на патогенність.

Морфологічно, віруси родини *Bromoviridae* є безоболонковими, тобто не мають зовнішньої ліпідної мембрани, що властива багатьом іншим вірусам. Капсид має ікосаедричну або бацилоподібну симетрію, що є типовою ознакою їх віріонної структури. Діаметр віріонів коливається в межах 26–35 нанометрів, залежно від виду та типу РНК, яку він містить [1].

Механізми передачі цих вірусів є різноманітними. Вони можуть передаватися механічним шляхом (наприклад, через пошкодження рослин тканин під час агротехнічних операцій), через пилок або запилення, а також за допомогою переносників-комах, таких як попелиці або трипси, які відіграють важливу роль у природному поширенні інфекції. Це значно ускладнює заходи контролю та профілактики поширення інфекції.

Реплікація вірусу відбувається у цитоплазмі клітини-господаря і має лізогенний характер, тобто не супроводжується негайною деструкцією клітини.

Як і більшість вірусів з позитивною одноланцюговою РНК, реплікація відбувається відповідно до моделі, притаманної таким вірусам: геномна РНК одночасно виконує функцію матриці для трансляції вірусних білків і реплікації вірусної РНК.

Природними господарями для вірусів цього сімейства є виключно рослини, причому спектр чутливості до окремих представників родини може суттєво відрізнятися. Наприклад, деякі роди, як-от *Bromovirus* і *Oleavirus*, мають дуже вузький діапазон господарів, тобто заражають лише обмежену кількість видів рослин. Водночас віруси роду *Cucumovirus* здатні інфікувати надзвичайно широкий спектр видів, включаючи як культурні, так і дикорослі рослини [2].

Через таку біологічну різноманітність і широкий спектр господарів, віруси родини *Bromoviridae* є причиною масових епідемій рослинних хвороб, що вражають важливі плодові, овочеві та кормові культури. Найбільш економічно значущими культурами, які потерпають від цих вірусів, є томати, огірки, гарбузи, банани, люцерна та інші. Захворювання, спричинені цими вірусами, призводять до суттєвого зниження врожайності, погіршення якості продукції, а також сприяють поширенню супутніх хвороб та ослабленню загального стану рослин.

Морфологія

Віріони бувають сферичними або квазісферичними (Рис. 1.1,1.2), мають ікосаедральну симетрію та діаметр 26–35 нм (роди *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus* та *Parvivirus*) Деякі представники (роди *Alfamovirus*, *Parvivirus* та *Oleavirus*) бацилоподібні, та мають постійні діаметри 18–26 нм і довжину від 30 до 85 нм. Геномні РНК упаковані в окремі віріони, які також можуть містити субгеномні РНК, або сателітні РНК[4].

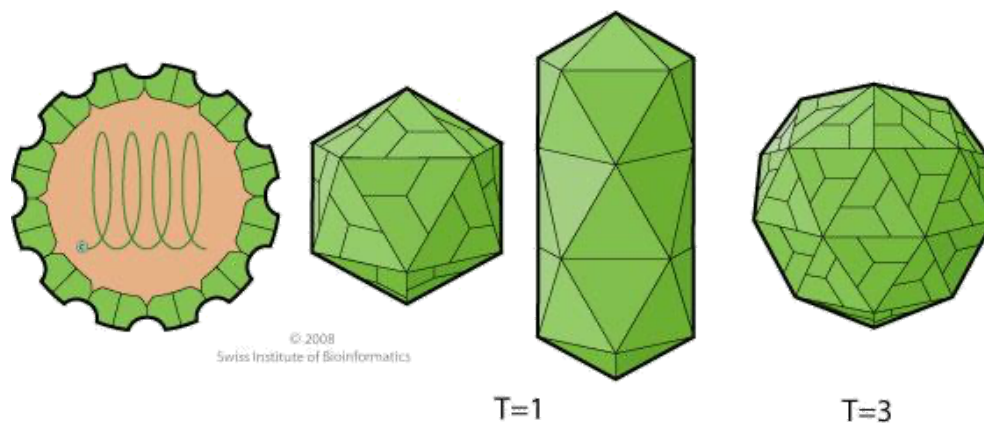


Рис. 1.1 Деякі з форм віріонів Bromoviridae [3]

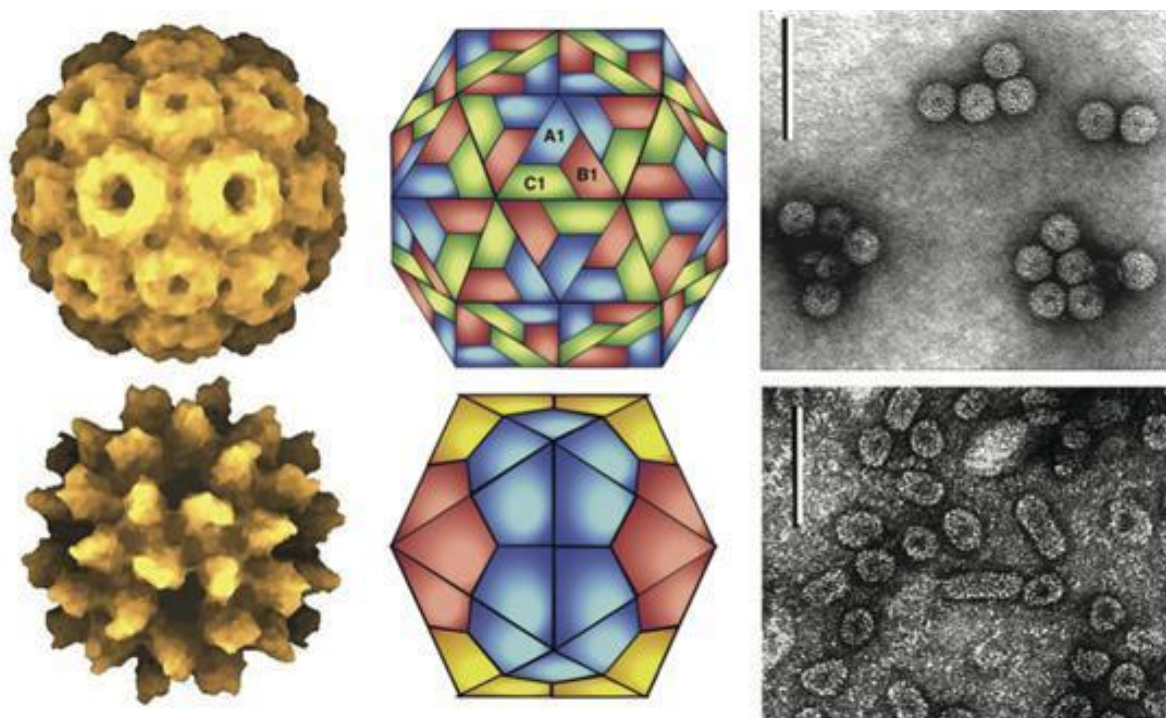


Рис. 1.2 Вгорі ліворуч: Реконструкція віріону вірусу ССМV (рід Bromovirus), що показує групування пентамерів і гексамерів у квазіікосаедрі; Вгорі посередині: схематичне зображення часток віріону ССМV; Вгорі праворуч: електронна мікрофотографія віріонів вірусу огіркової мозаїки СМV (рід Cucumovirus); Внизу зліва: Електронна щільність віріона вірусу мозаїки

люцерни (AMV) (рід Alfamovirus); Внизу посередині: Схематичне зображення віріона вірусу мозаїки люцерни; Внизу праворуч: Електронна мікрофотографія часток вірусу чорносливу PDV (рід Parvivirus). Лінії представляють довжину 100 нм[5].

Фізико-хімічні властивості

Молекулярна маса віріонів коливається від 3,6 до $6,9 \times 10^6$ залежно від вмісту нуклеїнових кислот. Молекулярна маса віріонів є постійною серед представників роду Bromovirus, Cucumovirus та деяких представників Parvivirus, але змінюється серед інших представників родини [5]. Плавуча густина віріонів, фіксованих формальдегідом, коливається від 1,35 до 1,37 г/см³ у CsCl. Коефіцієнт седиментації варіюється від 63S до 99S. Цілісність віріону залежить від взаємодії РНК та білка, і РНК віріону чутлива до деградації РНКаз при нейтральному рН. Теплова інактивація відбувається при 60 °С для деяких родів, інші ще не були досліджені. У деяких випадках віріони нестабільні в присутності двовалентних катіонів [2]. Віріони зазвичай стабільні в присутності хлороформу, але не в присутності фенолу. Також віріони нестабільні в присутності сильних аніонних детергентів, таких як SDS (додецилсульфат натрію), але можуть переносити низькі концентрації м'яких миючих засобів, таких як Triton X-100%.

Нуклеїнові кислоти

Загальна довжина геномів становить приблизно 8 кб. Тип нуклеїнової кислоти-сегментована, лінійна ssРНК(+), становить 14-25 % маси віріону. Складається з трьох сегментів: РНК1(3.4 kb), РНК2 (3.1 kb), РНК3 (2.2 kb). Всі

сегменти РНК на 5'-кінці мають кеп, а 3'-кінець має тРНК-подібну аміноацильовану структуру[8]. 3' кінці не є поліаденілованими, але, як правило, високо консервативні в межах виду і утворюють сильні вторинні структури. Вони або подібні до тРНК і можуть бути аміноацильованими (роди *Bromovirus* та *Cuscutovirus*) або утворювати інші структури, які не є аміноацильованими (роди *Alfamovirus*, *Anulavirus*, *Parvivirus* та *Oleavirus*)[5].

Геном кодує 4 білки (у *BOM* та деяких ін. представників - 5). РНК 1 та РНК 2 мають по одній рамці зчитування – ORF1a та ORF2a (у *BOM* РНК2 має дод. ORF2b), та виступають як матричні РНК. РНК 3 містить гени 2 білків – СР і МР, причому МР транслюється з РНК 3 (2.2 kb), а СР – з субгеномної РНК 4 (1 kb), яка є транскриптом нон-сенс копії РНК 3. Геном реплікується в цитоплазмі, цикл звичайний для (+)РНК вірусів[8].

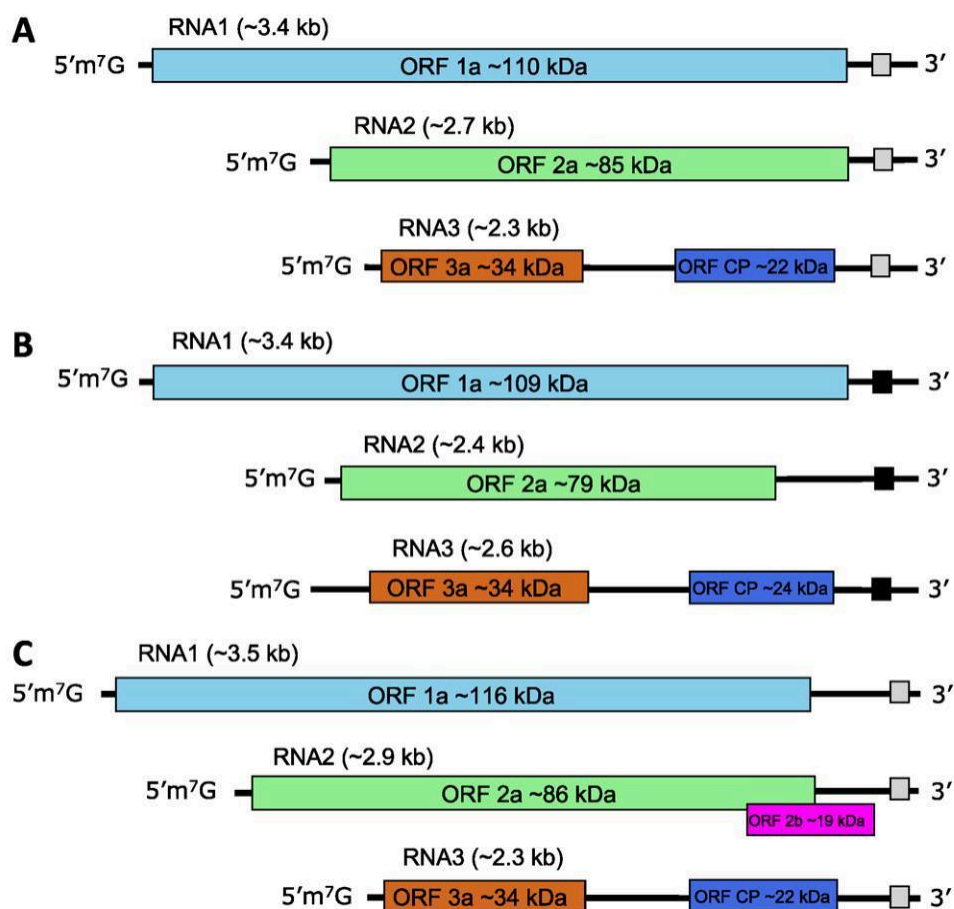


Рис. 1.3 Bromoviridae. Схематична організація геному представників родини Bromoviridae: (A) роди Alfamovirus, Bromovirus, Parvivirus та Oleavirus; (B) рід Anulavirus; (C) роди Cucumovirus та Parvivirus. 3'-кінці утворюють або тРНК-подібні (B), або складні структури (A, C), показані у вигляді чорних або сірих квадратів[2].

Білки

Віріон складається з чотирьох білків(Табл.1.1). Структурний білок СР масою 20– 24 кДа експресується з субгеномної РНК. СР, як правило, необхідний для системного переміщення, а в деяких випадках може знадобитися для поширення від клітини до клітини. Також відомі випадки участі СР для експресії та реплікації вірусу (рід *Alfavirus*) або активації реплікації (рід *Parvivirus*). Інтригуючою особливістю СР альфавірусу є його накопичення в ядрі та ядерці [6].

Не структурний білок 1А, має розміри 94 кДа. Складається з двох доменів: один має геліказну активність(участь у реплікації), інший – метилтрансферазну (приєднує кеп до 5'-кінця).

Не структурний білок 2А (94 кДа) - РНК-залежна РНК-полімераза.

МР (Movement protein, 30 кДа), виконує транспорт вірусу через плазмодесми.

У деяких видів є білок 2В (11 кДа), що є продуктом RNA2 (ORF2b) і виступає супресором посттранскрипційного сайленсингу генів. Унікальна властивість білка 2В полягає в тому, що він безпосередньо взаємодіє як з РНК, так і з білковими компонентами механізму глушіння РНК. На додаток, білок 2В, як відомо, виконує багато різних ролей у вірусному патогенезі, наприклад, системне переміщення та вираження симптомів [7].

Білок	Маса, кДа	РНК	Функція
1a	102.7– 125.8	РНК1	Метилтрансфераза, геліказа
2a	78.9– 96.7	РНК2	РНК-залежна РНК-полімераза
2b	12.7- 21.0	РНК2	Міжклітинний транспорт, супресія посттранскрипційного гена, індукція симптомів симптомів
3a	30.5– 36.5	РНК3	Міжклітинний транспорт
CP	19.8– 26.2	сгРНК4	Інкапсидація, транспорт

Табл. 1. 1. Білки вірусів *Bromoviridae* та їх функції

Епідеміологія представників родини Bromoviridae

Bromoviridae є однією з найважливіших родин РНК-вірусів рослин, деякі представники якого широко поширені у світі. В цілому родина має широкий спектр господарів (більше 10 000 видів), а деякі члени спричиняють серйозні та агрономічно вагомні хвороби. Однак діапазон господарів представників окремих родів коливається від значно вузького (роди Bromovirus, Oleavirus) до надзвичайно широкого (рід Cucumovirus). Деякі з цих вірусів викликають серйозні епідемії захворювань овочів, кормових і плодкових культур, наприклад, томатів, гарбузів, бананів або люцерни, а також плодкових дерев (іларвіруси). Різні види вірусів передаються механічно, через пилок/трипси, через насіння або комахами-переносниками, такими як тля чи жуки.

РОЗДІЛ 2

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ BROMOVIRIDAE ПО РОДАМ

2.1 Характеристика роду *Alfavirus*

Вірус мозаїки люцерни (*Alfalfa mosaic virus*, AMV), також відомий як вірус картопляного ситцю, є одним із найпоширеніших та найвивченіших фітопатогенних вірусів, що має глобальне поширення. Він здатен інфікувати широкий спектр видів рослин, охоплюючи понад 600 представників з понад 70 родин, серед яких є як дикорослі рослини, так і численні сільськогосподарські культури, що мають важливе економічне значення. Ураження цим вірусом призводить до серйозного зниження врожайності, погіршення якості продукції, порушення фізіологічних процесів у рослинах та зниження їх стійкості до стресових умов довкілля.

AMV є єдиним представником роду *Alfavirus*, що належить до родини *Bromoviridae*. Геном вірусу складається з трьох сегментів одноланцюгової позитивної РНК, які кодують життєво необхідні для вірусу білки, зокрема білки репліказного комплексу, руховий білок і капсидний білок. Структура віріону має ікосаедричну симетрію, а діаметр частинок становить приблизно 30 нм. Незважаючи на морфологічну подібність до інших представників родини *Bromoviridae*, AMV демонструє унікальні молекулярні та біологічні особливості, що виправдовують його віднесення до окремого роду.

Вперше цей вірус був виявлений і описаний у 1931 році американським фітопатологом Веймером Дж. Л., який спостерігав типові симптоми мозаїчної хвороби на рослинах люцерни (*Medicago sativa*). Саме ця рослина дала назву вірусу, хоча згодом було встановлено, що вона не є його єдиним або головним природним господарем.

Основними шляхами передавання AMV є фітофаги, зокрема попелиці (рослинні воші). Найбільш ефективним переносником є *Acyrtosiphon pisum*,

але також встановлено роль інших видів попелиць. Передача вірусу є нестійкою (нестійкий тип переносу) — комаха переносить вірус швидко, але не зберігає його тривалий час у тілі. Окрім комах, важливими шляхами поширення є інфіковане насіння та пилок, що особливо ускладнює контроль над вірусом у багаторічних культурах та під час зберігання і висівання насіннєвого матеріалу [9][10].



Рис. 2.1 Альфамовірус на конюшині [11]

Віріони, як правило, мають бацилоподібну форму, структура яких заснована на ікосаедрічній симетрії $T = 1$, що має постійний діаметр 18 нм і змінюється від 30 до 57 нм в довжину, залежно від розміру нуклеїнової кислоти, що інкапсидується[12].

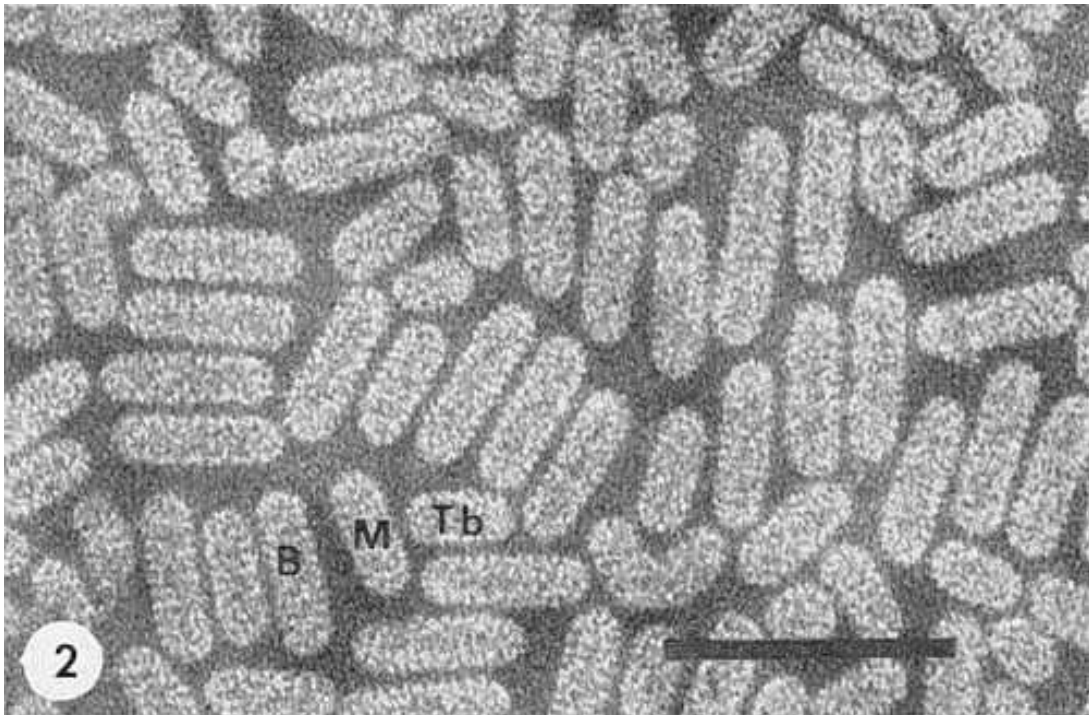


Рис. 2.2 Електронна мікрофотографія очищеного препарату Альфамовірусу.
Смужка становить 100 нм.

Молекулярні маси в віріонів становлять $3,5\text{--}6,9 \times 10^6$. Віріони можна розділити на шість компонентів за градієнтами щільності сахарози. Три більші компоненти, названі нижній (В), середній (М) і верхній b (Тb) (Рис.2.2), є важливими для зараження, тоді як два або три додаткові верхні компоненти (Та, То і Тz) складаються із сферичних частинок і не є необхідними для інфікування[13].

Геном вірусу мозаїки люцерни поділено на три види лінійної, позитивної РНК. Частка 3,2 kb (РНК1) інкапсидована у компоненті В, частка 2,6 kb (РНК2), інкапсидована у компоненті М, та 2,1 kb (РНК3) інкапсидована в компоненті Тb. Субгеномна РНК4 (0,8 kb), що кодує ORF, пакується окремо в компонент Та. РНК1 і РНК2 кодують субодиниці реплікази Р1 і Р2 відповідно, тоді як РНК3

кодує руховий білок (MP) і служить матрицею для синтезу субгеномної РНК4, що не реплікується (сРНК4), яка кодує СР.

Вірус мозаїки люцерни (AMV) є надзвичайно поліфагним патогеном, що уражає широкий спектр рослин, серед яких зустрічаються як дикорослі, так і численні культурні види, що мають велике аграрне значення. На сьогодні відомо, що цей вірус здатен інфікувати понад 600 видів рослин, що належать до щонайменше 70 різних родин. Такий широкий діапазон господарів робить AMV особливо небезпечним для агроecosystem, оскільки інфекція легко зберігається в природному середовищі та може швидко поширюватися між культурами.

Серед найбільш чутливих та часто уражуваних культур виділяють:

1. Картоплю (*Solanum tuberosum*), яка при інфікуванні AMV демонструє мозаїчні зміни, хлороз листя, а також нерівномірний розвиток бульб;
2. Горох (*Pisum sativum*), у якого вірус викликає пожовтіння жилок, викривлення листя та зменшення урожайності;
3. Тютюн (*Nicotiana tabacum*), що слугує однією з модельних систем для вивчення вірусної інфекції — проявляє типовий мозаїчний малюнок на листках та пригнічення росту;
4. Помідори, у яких спостерігаються світлі плями, хлороз, мозаїка, а також деформація листків і плодів [14].

Симптоматика захворювання

Прояви вірусної інфекції, спричиненої AMV, є вкрай варіативними та залежать від ряду чинників, таких як:

1. вид і сорт рослини-господаря,
2. фаза розвитку рослини на момент зараження,
3. умови навколишнього середовища (особливо температура),
4. наявність змішаних інфекцій з іншими патогенами.

Типові симптоми включають:

1. в'янення листя, особливо в умовах підвищеної температури або вологозабезпечення;
2. утворення білих або хлорозних плям різної форми на листках;
3. мозаїчне забарвлення, що проявляється як чергування темно- та світло-зелених ділянок;
4. карликовість (затримка росту), особливо у молодих рослин;
5. кільцеві плями, які є характерною ознакою для деяких господарів;
6. некроз тканин, що проявляється у вигляді загибелі окремих ділянок листків або пагонів;
7. скручування і деформація листя.

Ці симптоми можуть бути транзиторними, тобто з'являтися лише на ранніх стадіях розвитку інфекції та зникати з часом, або ж зберігатися впродовж усього вегетаційного періоду. У деяких випадках рослина може виглядати практично здоровою, проте все одно бути джерелом інфекції.

AMV здатен проникати та розмножуватися в усіх частинах рослини-господаря — листках, стеблах, коренях, квітках, насінні та навіть у пилку. Така системна інфекція ускладнює боротьбу з вірусом і значно підвищує ризик його подальшого поширення в посівах.

На клітинному рівні вірус локалізується переважно в цитоплазмі інфікованих клітин, де формує специфічні структури — включення, які можна виявити за допомогою електронної мікроскопії. Ці тільця включення є скупченням віріонів або проміжних продуктів реплікації та можуть бути корисними для діагностики інфекції [15].

Ураховуючи всі ці аспекти, AMV є складним і небезпечним патогеном, здатним спричинити значні втрати в сільському господарстві. Його контроль вимагає комплексного підходу, включаючи діагностику, моніторинг векторів, санітарні заходи та селекцію на вірусостійкість.

2.2 Характеристика роду *Anulavirus*

Другим із шести встановлених родів родини *Bromoviridae* є рід *Anulavirus* — відносно нова, але важлива з еволюційної та агрономічної точки зору таксономічна група вірусів. Рід *Anulavirus* включає патогени, що мають схожі морфологічні, структурні та молекулярні характеристики з іншими представниками родини *Bromoviridae*, зокрема ікосаедричну форму віріонів, наявність позитивної одноланцюгової РНК (+РНК), сегментовану геномну структуру, а також цитоплазматичну реплікацію. Проте, внаслідок певних молекулярних та біологічних особливостей, ці віруси виділені в окремий рід.

Станом на 2021 рік відповідно до оновленої класифікації Міжнародного комітету з таксономії вірусів (ICTV) у складі роду *Anulavirus* було зареєстровано три визнаних види [17]:

1. Вірус кільцевої плямистості пеларгонії (*Pelargonium zonate spot virus*, PZSV) — один із найкраще вивчених представників роду. Він уражує переважно декоративні та овочеві рослини, включаючи пеларгонії та томати, і може викликати характерні кільцеві плями на листках, некрози та інші симптоми.
2. Вірус м'якої плямистості амазонської лілії (*Amazon lily mild mottle virus*, ALiMMV) — менш поширений, але вражає представників роду *Eucharis* (амазонська лілія), проявляючи симптоми плямистості та мозаїки на листках.
3. Вірус виноградної лози (*Grapevine line pattern virus*, GLPV) — вірус, пов'язаний з ураженням виноградної лози, який може викликати лінійні зміни в пігментації листя, порушення фотосинтезу та зниження якості врожаю.

Анулавіруси демонструють широкий спектр механізмів передавання, що забезпечує їхню ефективну циркуляцію в природі та агроекосистемах. Основним способом передачі є переносники з ряду *Hemiptera*, зокрема комахи-сисуни, такі як попелиці, трипси або цикадки. Ці комахи здатні інфікувати рослини під час живлення, переносачи вірусні частинки разом зі слиною.

Окрім цього, доведено, що *Anulavirus* здатні передаватися і механічним шляхом, тобто через пошкодження тканин рослин під час агротехнічних процедур або контакту з інфікованим інструментом. Такий шлях є поширеним при лабораторних дослідженнях, коли здійснюється механічна інокуляція.

У ряді випадків спостерігається і вертикальна передача вірусу через насіння та пилок. Це підтверджено, зокрема, для ізраїльського штаму PZSV, який може зберігатися та передаватися нащадкам інфікованих томатних рослин як через пилок, так і через насіння. Дослідження Lapidot та співавт. (2010) стали важливим кроком у розумінні епідеміології PZSV, оскільки показали здатність вірусу ефективно зберігатися в популяції навіть за відсутності активних переносників [16].

Інфекція, спричинена вірусами роду *Anulavirus*, супроводжується вираженими цитопатологічними змінами в інфікованих клітинах. Уражені клітини демонструють порушення нормальної ультраструктури: руйнуються мембрани, виникають аномальні включення, часто спостерігаються розростання ендоплазматичної сітки та мітохондрій. Такі зміни негативно впливають на обмін речовин, фотосинтез і загальну життєздатність рослини. Це призводить не лише до видимих симптомів, таких як кільцеві або мозаїчні плями, некрози та деформації, але й до зниження продуктивності культур, що уражені вірусом.

Отже, рід *Anulavirus* представляє собою важливу та потенційно небезпечну групу вірусів рослин, які здатні завдавати значних збитків декоративним і сільськогосподарським культурам. Їх поширення вимагає уваги як з боку наукової спільноти, так і з боку фітосанітарних служб, оскільки

різноманітні шляхи передачі та стійкість у рослинному матеріалі створюють серйозні труднощі в боротьбі з інфекцією.

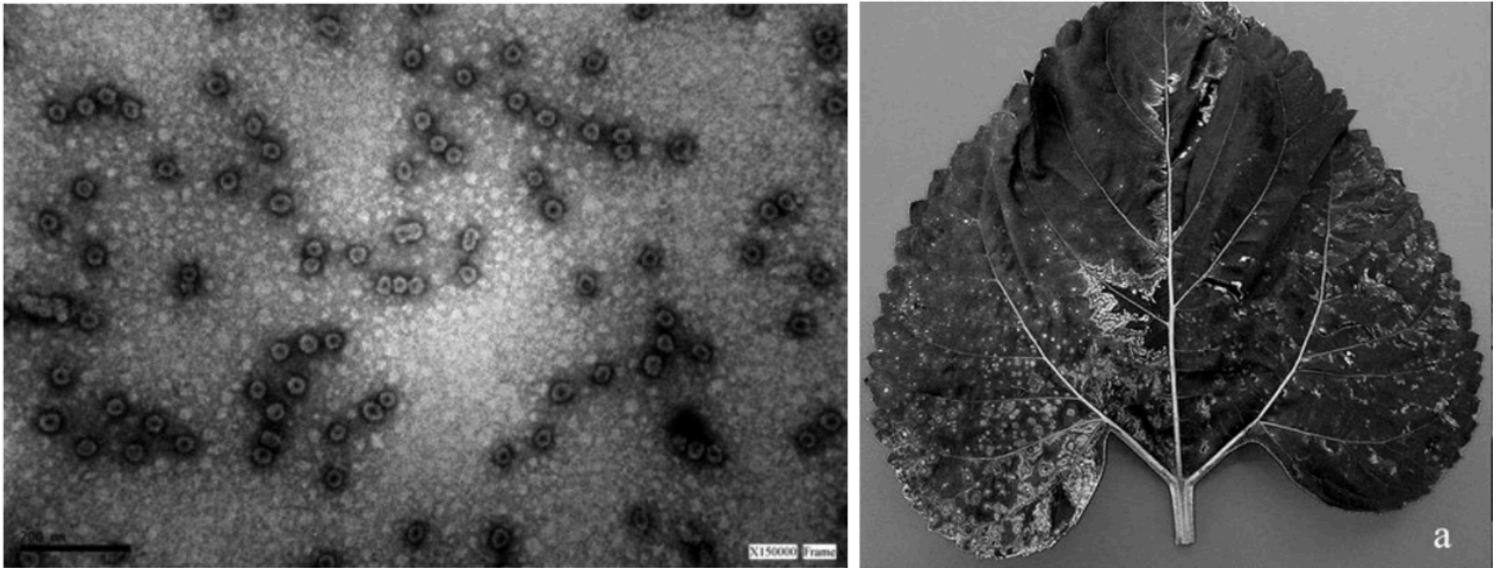


Рис. 2.3 Негативно забарвлені віріони PZSV із тканин листа соняшнику, інфікованого природньо. Лінія = 200 нм. (Зліва); PZSV на соняшнику в Аргентині (праворуч)[18].

Вірусні частинки мають квазісферичну форму з діаметром від 25 до 35 нм.

Геноми лінійні та сегментовані. Геном вірусу плямистості пеларгонії (PZSV) містить 8477 нуклеотидів, розподілених між трьома лінійними, позитивними олРНК, які кодують чотири білки - 1а, 2а, 3а і СР (білок оболонки).

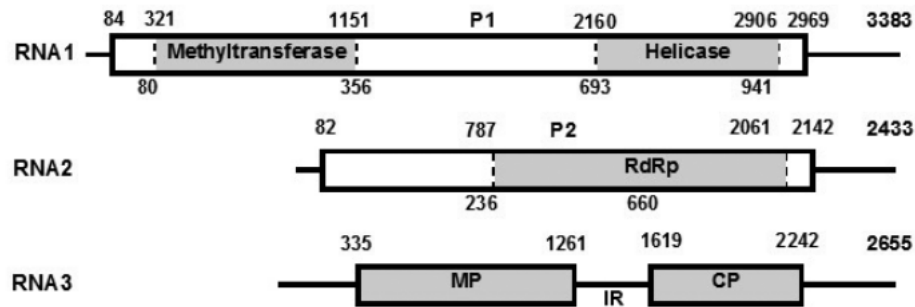


Рис. 2.4 Схематичне зображення геномної організації трьох РНК PZSV-Arg[18]. ORF відображаються у вигляді квадратів, а сірі області представляють кодовані білки (метилтрансфераза, геліказа, RdRp, MP і CP). Цифри над квадратами вказують нуклеотиди, в яких починається і закінчується кожен фрагмент, а цифри під квадратами – амінокислота, на якій починається і закінчується кожен білок.

2.3 Характеристика роду Bromovirus

Бромовіруси — це рід ікосаедричних вірусів із позитивною РНК, які вражають рослини. Незважаючи на те, що бромовіруси не є причиною великих економічних втрат, бромовіруси широко вивчалися як експериментальні моделі для базових досліджень реплікації вірусів та експресії генів, взаємодії вірус-господар, збірки віріонів та загальної молекулярної біології вірусів.

Типовим і найбільш вивченим представником бромовірусів є вірус бромової мозаїки (BMV). BMV вражає ряд зернових злаків та інших трав і поширений у більшій частині світу, за винятком Австралії. Інші відомі бромовіруси включають вірус хлоротичної плямистості вігні (CCMV), вірус широкої kwasолі (BBMV), вірус жовтої плями меландрію, латентний вірус весняної краси (spring beauty latent virus) та вірус жовтої плямистості касії[19].

Віріони бромовірусу не мають оболонки, мають ікосаедричну симетрію $T = 3$, мають діаметр близько 28 нм і складаються із 180 молекул білка оболонки

(CP) масою 20 кДа, згрупованих у 12 пентамерів і 20 гексамерів[20]. Три типи ікосаедричних частинок ідентичних діаметрів (28 нм) і подібних коефіцієнтів седиментації (близько 85 S) інкапсидують різні компоненти РНК: РНК1, РНК2 і РНК3 плюс сРНК4. Структура ССМV служить модельною структурою бромовірусу(Рис.8).

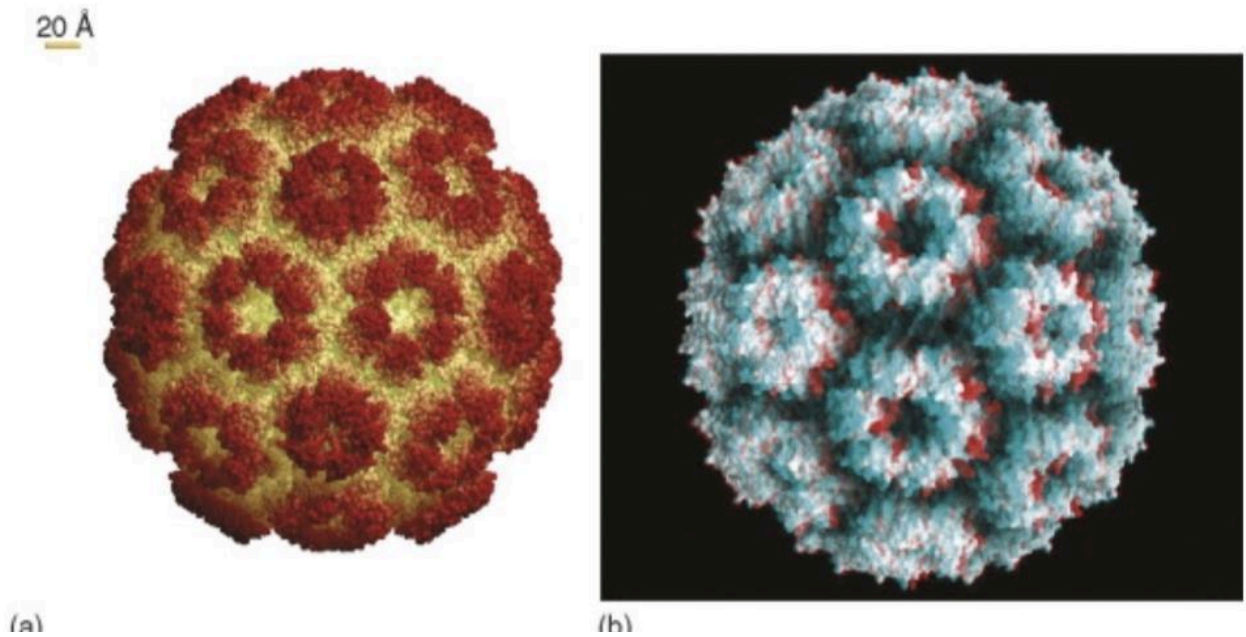


Рис. 2.5 Структура поверхні капсидів (a) BMV та (b) ССМV. Видно гексамерний і пентамерний структурні елементи[20].

Геномна РНК представлена чотирма фрагментами(Рис. 2.5): РНК1 і РНК2 кодують відповідно білки 1a і 2a, обидва залучені в реплікацію геному і внутрішню транскрипцію. З РНК3 і сРНК4 транслюються відповідно в білки руху та капсиду.

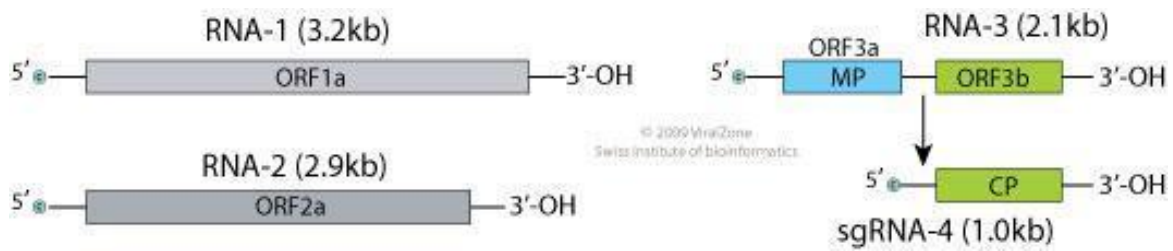


Рис. 2.6 Геном представників роду Bromovirus[21].

2.4 Характеристика роду Cucumovirus

Кукумовіруси — це ікосаедричні віруси родини Bromoviridae, діаметром близько 29 нм. Вони складаються з РНК (близько 18%) і білка, з 180 сегментів оболонки на капсид. Вони не містять ні ліпідів, ні глікопротеїнів. Внутрішній діаметр віріона становить приблизно 16,5 нм. Цілісність капсиду підтримується за рахунок електростатичних взаємодій РНК-білок, а перетравлення інкапсидованої РНК рибонуклеазою призводить до повної деградації частинки.

Віріони містять геномні РНК, інкапсидовані окремо, а також принаймні одну субгеномну РНК (буває більше однієї у деяких видів). Крім того, сателітні РНК, якщо вони присутні, інкапсидовані у віріоні. Усі частинки мають подібні властивості седиментації, тому їх неможливо розділити фізичними способами. Віріон не піддається детальному структурному аналізу за допомогою рентгенівської кристалографії. Це може бути пов'язано з сумішшю частинок схожого, але не ідентичного розміру, що призводить до утворення недосконалих кристалів. Частинки трьох видів Cucumovirus неможливо розрізнити за допомогою електронної мікроскопії[19].

Віріони можуть бути легко дисоційовані на їх складові білки та РНК за допомогою буферів з високою іонною силою. Ці асоціації можуть бути відновлені шляхом зниження іонної сили, і білок оболонки вірусу може інкапсидувати ряд інших видів РНК *in vitro*[19].

Рід *Cuscutovirus*, є членом «супергрупи» альфавірусів, до якої входять віруси як рослин, так і тварин. Два домени в білку 1a дуже схожі на метилтрансферазно- та геліказоподібні домени всередині групи. Третій домен, у білку 2a, дуже схожий на РНК-залежні РНК-полімерази альфавірусів. Таким чином, вважається, що ці віруси мають спільного предка, і вважається, що вони походять від вірусу комах і були передані та пристосовані як до рослин, так і до тварин[20].

До роду відносять такі види[22]:

1. Вірус огіркової мозаїки
2. Вірус легкої плямистості ліатрису (GMMV)
3. PSV (Peanut stunt virus)
4. Вірус аспермії томатів (TAV)

Типовим, найбільш вивченим та найбільш вагомим для людської діяльності представником роду є вірус огіркової мозаїки(ВОМ). Вперше був описаний в 1916 році як хвороба гарбузів у США. ВОМ поширений у всьому світі та уражує понад 1200 видів рослин[23]. Вірус огіркової мозаїки є одним з найважливіших агрономічних патогенів на овочевих і декоративних рослинах, а також деяких важливих плодкових культурах. Вірус передається горизонтально приблизно 80 видами попелиці непостійним і нециркуляційним способом. У деяких рослин ВОМ також передається вертикально через насіння[24].

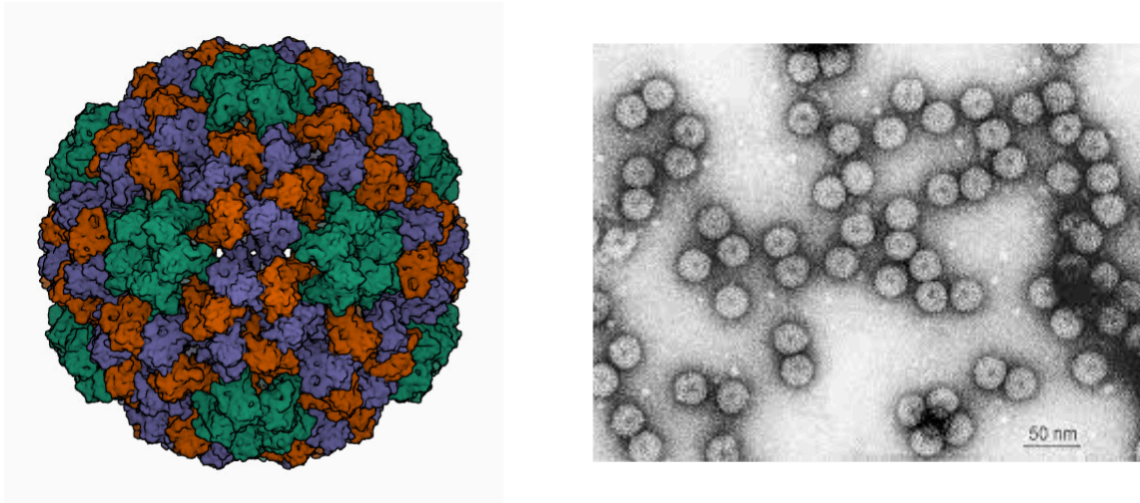


Рис. 2.7 Модель вірусу огіркової мозаїки (ліворуч); електронна мікрофотографія (праворуч) [27].

Розмір геному становить 8,623 kb, він розділений на РНК1 (3357 bp), РНК2 (3050 bp) і РНК3 (2216 bp) [25], всі мають структуру, подібну до тРНК [26]. Ці три РНК кодують п'ять білків, білки 1a, 2a, 2b, білок руху (MP) і білок оболонки (CP). У той час як білки 1a і 2a відповідають за реплікацію вірусу, білок 2b є супресором, що глушить РНК господаря.[26] РНК оточена білковою оболонкою, що складається з 32 копій єдиного структурного білка, які утворюють ізометричні частинки.



Рис. 2.8 Огірки, вражені вірусом огіркової мозаїки[23].

Понад 100 років досліджень цього агрономічно важливого патогена дали багато знань з різних аспектів біології вірусу, від епідеміології, екології та еволюції до молекулярних механізмів, задіяних у взаємодії вірус-хазяїн. Вірус легко поширюється і його можна знайти по всьому світу. У рослині-господарі ВОМ може спричинити серйозні пошкодження, які часто призводять до економічних втрат, вірус спричиняє до 10-20% втрати врожаю[23]. Боротьба з ЦМВ в основному базується на санітарній селекції, профілактичних заходах та використанні стійких сортів рослин[26].

2.5 Характеристика роду Parvivirus

Іларвіруси — це група вірусів родини Bromoviridae, які поширені по всьому світу і вражають багато важливих для сільського господарства трав'янистих і деревних хазяїв, включаючи фруктові дерева, овочі та декоративні рослини.

Довгий час економічне значення іларвірусів недооцінювалося, оскільки їх часто розглядали як латентні патогени, особливо коли вони вражають плодові дерева.

З 1990-х років було ідентифіковано велику кількість іларвірусів, і цій групі вірусів приділяється все більше уваги.



Рис.2.9 Симптоми вірусу яблуневої мозаїки ArMV.

Як найбільший рід родини Bromoviridae, Parvivirus складається з 22 видів. Як і інші віруси цієї родини, іларвіруси мають одноланцюговий трьохсигментний +РНК-геном загальним розміром близько 8 кб. Кожен

геномний сегмент обгорнутий білком оболонки (CP) для утворення квазіізотричних частинок, хоча деякі види також утворюють бацилоподібні віріони. Геномні РНК іларвірусів не мають справжніх структур, подібних до т-РНК, у 3' нетрансльованій області (UTR). Іларвірусний CP необхідний для активації геному. Він зв'язується з 3' UTR, і взаємодія CP-РНК індукує конформаційні зміни вторинних структур 3' UTR для регулювання трансляції/реплікації вірусної РНК та асиметричного (+)/(-) біосинтезу РНК[24].

Іларвіруси вражають різноманітні рослини-господарі, такі як овочі та кормові культури. Іларвіруси вражають переважно деревні рослини, у тому числі кісточкових. Віруси присутні в/на пилку і можуть передаватися, коли пилок, що розноситься вітром, і популяції переносників трипсів збігаються на чутливому хазяїні[28]. Віруси також передаються через насіння, щеплення, та механічну інокуляцію. Зараз іларвіруси в основному контролюються за допомогою програм санітарії, знищення переносників.

2.6 Характеристика роду *Oleavirus*

Oleavirus — це шостий і наразі найменш вивчений рід родини *Bromoviridae*, до складу якого входить лише один офіційно визнаний вірусний вид — латентний вірус оливи 2 (*Olive latent virus 2*, скорочено OLV-2). Попри обмежене представництво, цей вірус має велике значення як для розуміння еволюційного різноманіття родини *Bromoviridae*, так і для вивчення вірусних інфекцій, що можуть перебігати в латентній (прихованій) формі без явних симптомів у господаря.

OLV-2 був вперше виявлений у південній частині Італії, де його ідентифікували на оливкових деревах (*Olea europaea*), які не проявляли зовнішніх ознак захворювання. Подальші дослідження зафіксували присутність цього вірусу також на грецьких островах Родос та Каstellорізо, що розташовані в східній частині Егейського моря. Там його виявили вже не лише на оливках, а й на зовсім іншому виді рослин — рицині (*Ricinus communis*), що входить до родини молочайних (Euphorbiaceae) (Grieco et al., 2002).

OLV-2 демонструє різну патогенність залежно від виду рослини-господаря. У оливки інфекція проходить повністю безсимптомно, тобто латентно — звідси й назва вірусу. Такі латентні форми особливо небезпечні, адже вірус може залишатися непоміченим протягом тривалого часу, поширюючись між рослинами за допомогою агротехнічних методів, зокрема вегетативного розмноження. Натомість у рицині, яка, ймовірно, є менш толерантним господарем, спостерігаються чіткі симптоми вірусного ураження — зокрема:

1. жовтувата сіточка прожилок, що вказує на порушення у транспортуванні поживних речовин та пігментів;
2. плями на листках, які можуть бути результатом локалізованого некрозу або хлорозу.

Ці ознаки свідчать про активну реплікацію вірусу в клітинах рослини та наявність системної інфекції.

Що стосується механізмів передачі, то на сьогодні доведено, що OLV-2 ефективно передається при щепленні, тобто через прищеплювання інфікованого рослинного матеріалу на здорові підщепи. Це типовий шлях

розповсюдження багатьох вірусів у персистентних рослинах, таких як дерева та кущі.

Окрім цього, OLV-2 також може передаватися механічно — шляхом інокуляції соку з інфікованих рослин на здорові. Такий спосіб можливий як у природних умовах (наприклад, при пошкодженні листя), так і в експериментальних дослідженнях.

Натомість комахи-переносники (вектори) для цього вірусу досі не виявлені, що вирізняє його серед багатьох інших представників родини *Bromoviridae*, які зазвичай мають специфічних переносників із ряду *Hemiptera*. Це може свідчити або про низьку ефективність горизонтальної передачі в природі, або про ще недостатній рівень дослідженості екології цього вірусу.

Хоча OLV-2 не спричиняє видимих втрат урожаю у основному господарі — оливці, його присутність становить потенційну загрозу, оскільки:

1. латентні інфекції можуть сприяти поступовому ослабленню імунітету рослин;
2. можливе перехресне зараження інших культур, менш толерантних до інфекції;
3. поширення вірусу з безсимптомного рослинного матеріалу ускладнює його діагностику та контроль;
4. вірус може мутувати або рекомбінувати з іншими вірусами, змінюючи патогенність.

Таким чином, хоча рід *Oleavirus* наразі представлений лише одним видом, латентний вірус оливи 2 заслуговує на подальше вивчення. Це стосується як його поширення та діапазону господарів, так і потенційного ризику для сільського господарства в разі зміни його біологічних властивостей.

Вірусні частинки мають різну форму і розмір, від квазісферичних до бацилоподібних, довжиною 37, 43, 48 і 55 нм відповідно, і діаметром близько 18 нм (Рис.2.10). Віріони не містять ліпідів або вуглеводів [29].

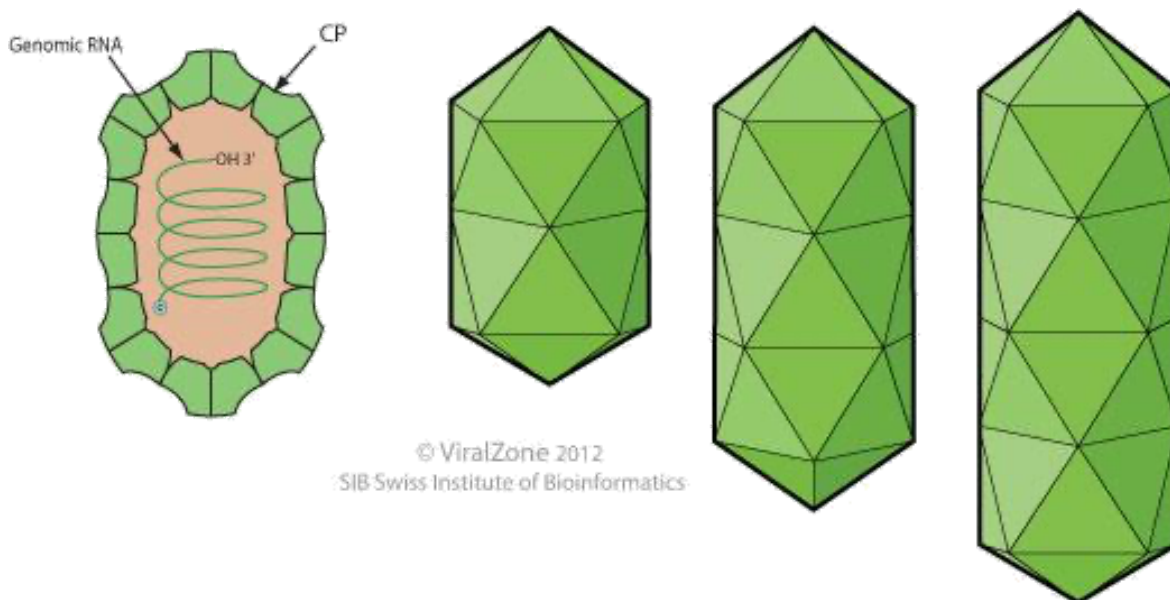


Рис. 2.10 Віріони *Oleavirus* [30].

РНК віріону відрізняється за розміром від інших членів сімейства, інкапсидуючи три геномні РНК і субгеномну РНК розміром приблизно 2 kb. У віріонах також присутні три додаткові РНК довжиною від 200 до 550 нуклеотидів. 3'-кінці РНК подібні до вірусів, що належать до родів

Alfavirus та Parvivirus, але не взаємодіють із CP для активації реплікації [24].

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Візуальна діагностика вірусних хвороб

Одним з найпоширеніших та найпростіших методів дослідження вірусів, є візуальна діагностика.

Хоча в ряді випадків і вдається достовірно встановити вірусну природу захворювання за його зовнішніми ознаками (наприклад, кільцеві або лінійні хлоротичні візерунки на молодому листі), їх ідентифікація покладена частим безсимптомним характером розвитку хвороб. Так, більшість промислових сортів суниць є прихованими носіями вірусної інфекції[31]. З іншого боку, вірусні симптоми подібні до симптомів неінфекційних хвороб, викликаних нестатком (надлишком) макро- та мікроелементів (азота, магнію, заліза, міді, хлору). Дія гербіцидів, регуляторів росту на рослини при неправильному застосуванні також може бути подібною до симптоматики з вірусними хворобами. Тому візуальна діагностика потребує додаткових методів досліджень.

При діагностиці вірусних захворювань необхідно встановити інфекційність захворювання. Для цього вірус слід передати на здорову рослину. Щоб визначити віруси, що розповсюджуються контактним-механічним способом, проводять інокуляцію соком хворої рослини. Для цього рослинний матеріал розтирають у ступці, з розтертої маси віджимають сік, фільтрують та обережно втирають у лист молоді здорові рослини. Через певний час спостерігають за розвитком симптомів. Універсальний метод передачі вірусної інфекції - щеплення, коли хворий щеп (черешок листа, верхівка

пагона) щеплять на здорову підщепу. Рідко для передачі вірусів використовують комах-переносників та рослини-паразити .

Метод індикаторних рослин - поширений метод візуальної діагностики вірусних хвороб та ідентифікації вірусів. Він заснований на використанні тест-рослин (індикаторних рослин), що дають чіткі, часто строго специфічні по відношенню до певного виду вірусу симптоми. Зараження трав'янистих рослин-індикаторів здійснюють механічною інокуляцією соком. Симптоми виявляються місцевими некрозами, рідше системною реакцією (зміною забарвлення, пригніченням зростання). Для вірусу аспермії томату як індикатор можна використовувати молоді рослини тютюну (*Nicotiana glutinosa*), для діагностики X-вірусу картоплі – амарант кулястий (*Gomphrena globosa*). У поодиноких випадках для зараження використовують окреме ізольоване листя рослин-індикаторів[31].

Незважаючи на те, що це досить тривалий, економічно витратний та трудомісткий метод ідентифікації вірусу (потрібні теплиці, насіння багатьох рослин та ін.), кінцевий результат (характер симптомів) є досить точним і є одним із основних критеріїв відмінності вірусів один від одного за біологічним властивостям.

В контексті цього дослідження візуальна діагностика використовувалась для відбору експериментальних зразків з метою їх подальшого вивчення. Рослинні зразки відбирали шляхом візуального обстеження рослин на наявність вірусних симптомів [35] з агроценозів: Полтавської, Черкаської, Вінницької, Житомирської, Київської та Херсонської областей. Для досліджень відбирались рослини огірків, кабачків, цукіні, патисонів, кавунів, гарбузів, томатів та перцю.

Прояви системної інфекції рослин у всіх господарствах були: мозаїка та деформація листової пластинки, зупинка росту рослин та інколи деформація плодів.

3.2. Імуноферментний аналіз

Метод серологічних досліджень, який також був використаний в ході експерименту. Імуноферментний аналіз (скорочено ІФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) - лабораторний імунологічний метод якісного або кількісного визначення різних низькомолекулярних сполук, макромолекул, вірусів та ін., в основі якого лежить специфічна реакція антиген-антитло[33].

До теперішнього часу розроблено велику кількість різних варіантів проведення ІФА, що мають як ключові, так і другорядні відмінності. Серед них можна виділити прямий, непрямий, "сендвіч", гомогенний та інші процеси[34].

Для виявлення антитіл до вірусів (на прикладі варіанту "сендвіч") вірусні антитіла зв'язують із пластиковою підкладкою, а потім додають клінічний зразок. Якщо в зразку присутні ангени вірусу, вони зв'яжуться з антитілом. Зв'язані антигени потім виявляють за допомогою комплексу другого антитіла з мікою, що також зв'язується з антигеном.

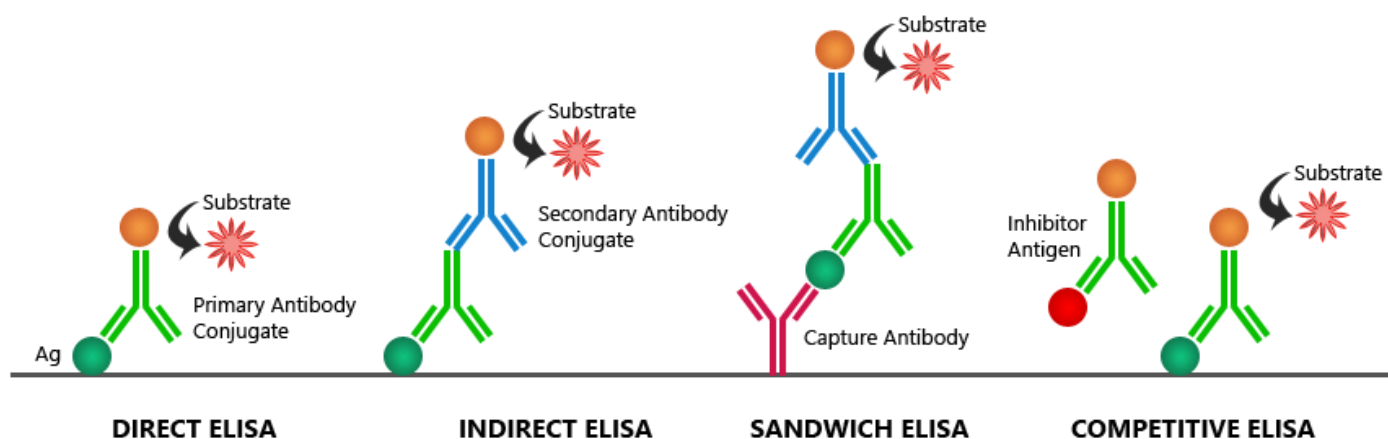


Рис. 3.1 Різні види імуноферментного аналізу (зліва направо): прямий, непрямий, ”сендвіч”, конкурентний.

ІФА використовується як в експериментальній, так і в діагностичній вірусології. Це дуже чутливий аналіз, який може виявляти білки в діапазоні від пікомолярного до наномолярного.

Підготовка зразків до ІФА включала гомогенізацію листків рослин з видимими симптомами вірусного ураження в карбонатному буфері у співвідношенні 1:5 (г/мл). Отриманий сік рослини перенесли в центрифужні пробірки та центрифугували в режимі 4000 об/хв. протягом 20 хв. Для аналізу використовували надосад.

Схема проведення “сендвіч” ІФА:

1. Наносили у пластикові плашки для ІФА антитіла 1 (АТ1) на карбонатному буфері (рН 9, 6) специфічні до AMV, CMV, TAV у розведенні 1:200. Інкубація 2 години при 37 о С.
2. Відмивка - 3 рази по 5 хв. (0, 1 М PBS +0,2% tween – 20)

3. Наносили антиген (АГ)- сік досліджуваних рослин в 0,1 М фосфатному буфері, що містив 0, 1% сухе молоко та 0,05% tween-20.

Інкубація 2 години при 37 °С.

4. Відмивка - 3 рази по 5 хв. (0, 1 М PBS + tween – 20).

1. Наносили АГ₂ мічені лужною фосфатазою специфічні до AMV, CMV, TAV у розведенні 1: 200.

Інкубація - ніч при 4 °С.

2. Відмивка - 3 рази по 5 хв. (0, 1 М PBS + tween – 20); 1 раз 5 хв. (0, 1 М PBS).

3. Наносили субстратний буфер для лужної фосфатази з хромогеном (97 мл dietanolamin довести до 1 л. H₂O, Hcl до рН 9,8.). В якості субстрата використовували N-n-нітрофенілфосфат, C=1мг/мл.

4. Результати реєстрували на рідері Dynatech при довжині хвилі 405 нм [36].

3.3. Метод виділення нуклеїнових кислот

Виділення тотальної РНК із рослинного матеріалу (Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific, США) проводили згідно рекомендацій виробника:

1. Гомогенізували 100 мг рослинної тканини у ступці з додаванням рідкого азоту.

2. Додавали до ступки 400 мкл lysis solution, гомогенізація 5 хв.

3. Відібирали гомогенат зі ступки та помістити до 1,5 мл стерильного епандорфу.

4. Епандорф поміщали на водяну баню – 65 °С 10 хв.

5. Вносили до епандорфу 600 мкл хлороформу, м'яко перемішували 3-5 разів.
6. Центрифугування 10 000 rpm 2 хв.
7. Готували у новому чистому епандорфі precipitation solution: 720 мкл стерильної дист. води + 80 мкл концентрованого (10 x) precipitation solution.
8. Переносили верхню водну фазу, яка містить РНК, з епандорфу після ншц (пункт 6) до епандорфу з приготованим precipitation solution (пункт 7), перемішували при кімнатній температурі 1-2 хв.
9. Центрифугування 10 000 rpm 2 хв.
10. Виливали супернатант, а до цього ж епандорфу додавали 100 мкл NaCl solution, ресуспендували осад РНК зі стінок чи дна епандорфу.
11. Додавали 300 мкл холодного етанолу.
12. Екстракція РНК ніч при – 20 °С
12. Центрифугування 10 000 rpm 3-4 хв.
13. Відібирали етанол та розводили РНК у 20 мкл стерильної дистильованої води.

3.4. Метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією

Полімеразна ланцюгова реакція зворотної транскрипції (RT-PCR) — це лабораторна методика, що поєднує зворотну транскрипцію РНК в ДНК та ампліфікацію специфічних ДНК-мішеней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)[40].

Дана методика дозволяє здійснювати полімеразно-ланцюгову реакцію з РНК-вмісними збудниками, зчитуючи інформацію з РНК і створюючи подібну до неї ДНК. Виконання цього процесу можливе при використанні спеціальних ферментів, що мають зворотно-транскрипційні властивості і

дезоксинуклеотидфосфатів [37].

Спочатку синтезувалась кодуюча ДНК (кДНК): суміш 1 мкл кожного з праймерів, 8,25 мкл води, 2 мкл РНК тримали 5 хв. за 65 °С, потім додавалось 4 мкл п'ятикратного буферу, 2 мкл dNTP, 1 мкл транскриптази. Отримана суміш ампліфікувалась 60 хвилин за температури 42 °С.

Наступним етапом досліду була постановка звичайної ПЛР: змішувались 2 мкл кДНК, 2,5 мкл десятикратного буферу, 0,5 мкл 10ММ dNTP, по 1 мкл праймерів, 0,25 мкл полімерази DreamTaqPol, 17,75 мкл води.

При ампліфікації CMV, використовувались праймери до ділянки гену капсидного білка. Очікувана довжина продукту ампліфікації становила ~ 500 п.н.

Ампліфікацію ділянки гену капсидного білку вірусу реєстрували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі на транслюмінаторі (Bio-Rab, USA) з використанням стандартних маркерів Gene Ruller 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas, USA) з подальшим фотографуванням гелю в ультрафіолетовому світлі.

3.5. Метод проведення горизонтального електрофорезу

Гель-електрофорез — аналітичний метод в хімії та біології для розділення різних видів молекул. Суміш молекул пропускається через гель, який являє собою молекулярне сито, яке легше пропускає дрібніші молекули, аніж великі. Рушійну силу задає електричне поле, тому молекули мають бути заряджені[41].

Електрофорез в агарозному гелі є стандартним методом, який використовується для розподілу, ідентифікації та очищення фрагментів ДНК. Ця метод простий, швидкий у виконанні. Локалізація ДНК в гелі

може бути визначена шляхом фарбування бромистим етидієм - флуоресцентним інтеркалюючим барвником в низьких концентраціях [37].

Електрофорез виділеної зі зразків тотальної РНК та ампліфікованих продуктів ПЛР ми проводили в агарозному гелі, за режиму 80 А, провідником струму служив ТВЕ буфер, рН = 7,4.

Гель готувався шляхом розчинення у 20 мілілітрах ТВЕ-буфера 300 міліграм агарози. ТВЕ буфер готувався із суміші 5,4 г Tris- HCl, 2,75 г борної кислоти, 0,372г EDTA та доводився до об'єму 500 мл дистильованою водою.

3.6. Статистична обробка результатів

Статистична обробка результатів проводилася з допомогою комп'ютерної бази даних з вирахуванням стандартного відхилення [38]:

$$E = \bar{E} \pm \sigma$$

$$\bar{E} = (E_1 + E_2 + \dots + E_i) / i$$

$$\sigma = |E_{\max} - \bar{E}| = |E_{\min} - \bar{E}|,$$

де E – це достовірне значення екстинкції, \bar{E} – середнє арифметичне виміряних значень екстинкції $E_1 \dots E_i$; σ - стандартне відхилення [39].

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

4.1. Візуальна оцінка симптомів вірусного ураження овочевих культур

Серед вірусів, що викликають значні втрати врожаю овочевих культур є представники родини Bromoviridae, а саме AMV (Alfalfa mosaic virus), CMV (Cucumber mosaic virus) та TAV (Tomato aspermy virus).

CMV один з найбільш поширених у природі вірусів. Він уражує до 200 видів рослин, що належать до 60 родин, але найбільшої шкоди завдає огіркам відкритого ґрунту. Найчастіше симптоми захворювання спостерігаються через місяць-півтора після сівби, в період бутонізації. Перші ознаки хвороби проявляються на молодих листках у вигляді жовтуватих плям та посвітління тканини вздовж головних жилок. На деяких рослинах спостерігається пожовтіння тканини між жилками, а біля самих жилок листок залишається зеленим. Внаслідок нерівномірного розвитку жовтих і зелених тканин більш темні ділянки здуваються, листок стає зморшкуватим, деформується, поступово закручуючись донизу. Ріст огудини затримується, міжвузля вкорочуються і рослина набуває кущоподібного вигляду .

Для проведення досліджень відбирались зразки рослин з 5-ти агроценозів: Вінницької, Житомирської, Київської, Полтавської та Чернігівської областей. Для досліджень з тепличних господарств відбирались рослини огірків, а з агроценозів - рослини огірків, кабачків, цукіні, патисонів, кавунів, гарбузів та динь.

В умовах відкритого ґрунту на рослинах спостерігалась мозаїка у вигляді темнозеленого забарвлення листової пластинки та темно-зелених прижилкових смуг, деформація листової пластинки та на плодах (рис.4.1,

4.2, 4.3).



А

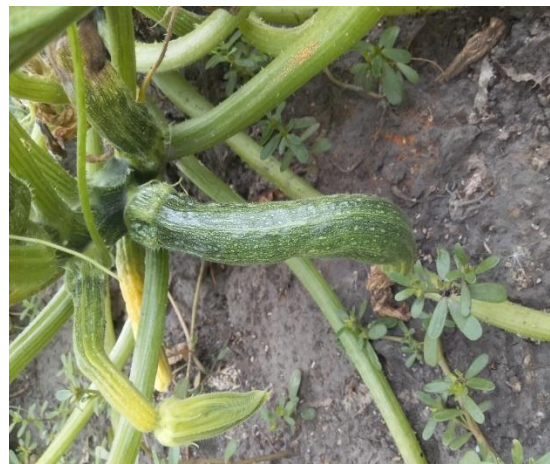


Б

Рис 4.1. Симптоми на листках гарбуза (А) та патисона (Б)



A



B

Рис. 4.2 Симптоми на листках (А) та плодах (В) кабачка



A



В

Рис. 4.3 Симптоми на листках дині (А) та огірка (В)

На рослинах родини *Solanaceae* симптоми захворювання спостерігали через місяць – півтора після сівби, у період бутонізації. Перші ознаки хвороби проявлялися на молодих листках у вигляді жовтуватих плям та просвітління тканини вздовж головних жилок. У подальшому на рослинах розвивалися симптоми жовтої або зеленої системної мозаїки, з'являлися хлорози та точкові некрози. На листових пластинках спостерігались різні типи мозаїк як за забарвленням (світло-зелена та жовто-зелена), так і за розміщенням (прижилкова та міжжилкова мозаїка), також спостерігались хлорози та деформації (рис. 4.4, 4.5).



Рис. 4.4 Симптоми на листках перцю



Рис. 4.5 Симптоми у вигляді некрозів на листках томату.

Крім того, хлоротичні або некротичні кільця, також можуть з'являтися на плодах деяких представників родини Solanaceae.

4.2. Ідентифікація вірусів родини Bromoviridae на овочевих культурах

Для перевірки на наявність вірусних АГ відбиралися листя, плоди та насіння огірків, гарбузів, кабачків, цукіні та кавунів, що мали типові симптоми вірусного ураження: мозаїка, плямистість, деформація плодів, скручування листової пластинки, некрози і т. д.. Збір матеріалу проводився на території 4 областей України: Київської, Черкаської, Полтавської та Вінницької.

Для проведення дослідження на території України збиралися листя, насіння та плоди кабачків, гарбузів, перцю, томату, що мали чіткі симптоми вірусного ураження: некрози, хлорози, темні та світлі мозаїки, деформацію плодів та листової пластинки, і т.д.. Зібрані зразки були запаковані в паперові пакети та заморожені до подальших досліджень.

За допомогою ІФА у модифікації «сендвіч» з тест-системами виробництва Loewe (Німеччина) було проведено ідентифікацію антигенів вірусів у відібраних зразках рослин овочевих культур. У результаті було встановлено наявність трьох вірусів (табл.4.1).

Вірус	Зразки	Cucurbitaceae	Solanaceae
AMV	Загальна к-сть зразків	19	27
	Кількість позитивних зразків	0	2
	Ураженість у %	0	7
CMV	Загальна к-сть зразків	63	58
	Кількість позитивних зразків	17	14
	Ураженість у %	27	24
TAV	Загальна к-сть зразків	19	27
	Кількість позитивних зразків	0	3
	Ураженість у %	0	11

Табл. 4.1

Таким чином, на овочевих культурах України зустрічається три представника родини Bromoviridae, а саме Alfalfa mosaic virus, Cucumber mosaic virus та Tomato aspermy virus, але у різному співвідношенні на

різних культурах. Найбільш поширеним виявився *Cucumber mosaic virus*, він був детектований у 27% зразках рослин родини Cucurbitaceae та 24% зразках рослин родини Solanaceae. Крім того, тільки на рослинах родини Solanaceae зустрічались *Alfalafa mosaic virus* (7%) та *Tomato aspermy virus* (11%) (Рис 4.6).

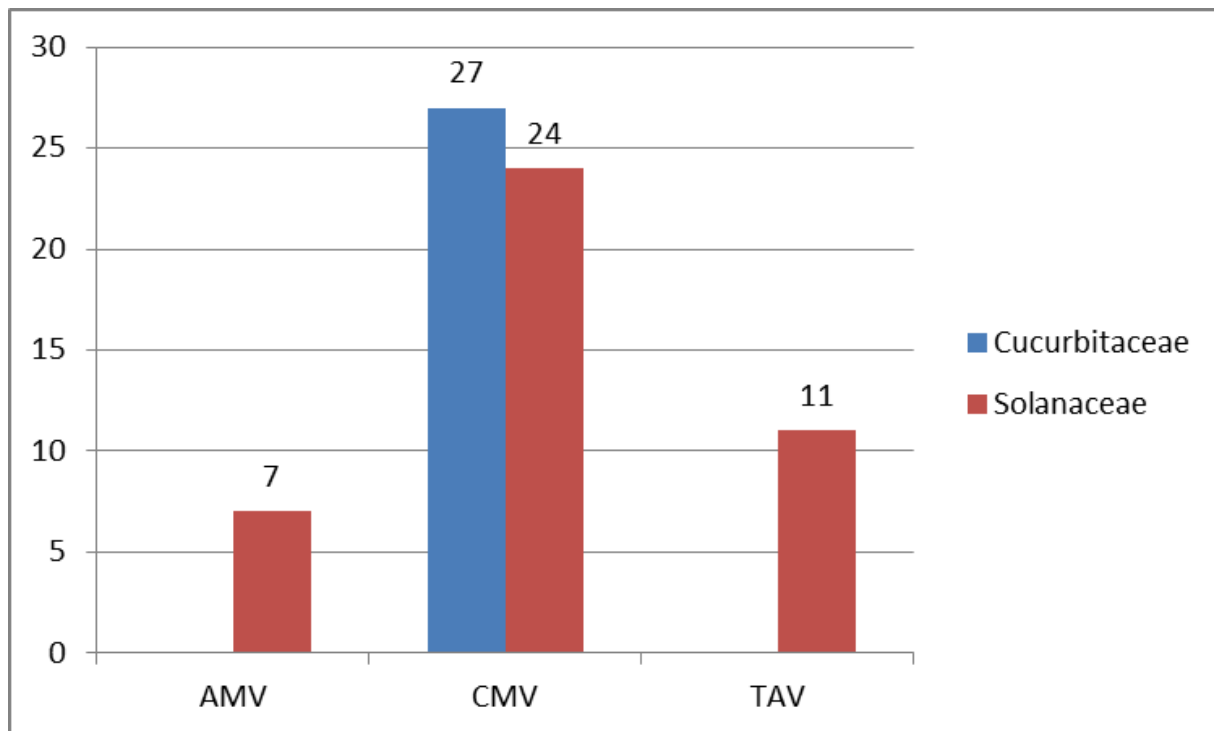


Рис. 4.6 Видовий склад вірусів родини Bromoviridae у відібраних зразках.

Для подальшої постановки ЗТ-ПЛР, зразки, які зберігалися в холодильнику при -20°C , були відібрані для виділення з них тотальної РНК. Успішність виділення тотальної РНК була підтверджена шляхом постановки горизонтального електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. Для приготування гелю, агароза розчинялась в 20 мл підігрітого TBE буферу ($\text{pH}=7,4$) з додаванням 10 мкл для візуалізації результатів (Рис 4.7).

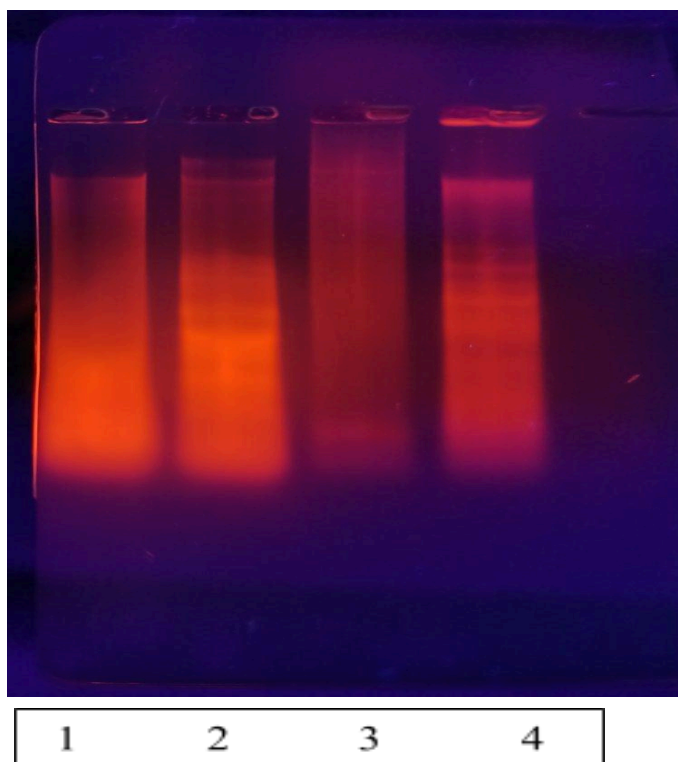


Рис. 4.7. Електрофорез тотальної РНК чотирьох зразків
Надалі, отримана тотальна РНК відбиралась для отримання кДНК, яка
власне і ампліфікувалась при постановці ПЛР.

Для ЗТ-ПЛР були використані відомі з літературних даних
праймери, специфічні до гену капсидного білка CMV (продукт 500 п.н):
Для візуалізації продуктів ПЛР був проведений горизонтальний
електрофорез капсидного білку в 1% агарозному гелі (рис. 4.8)

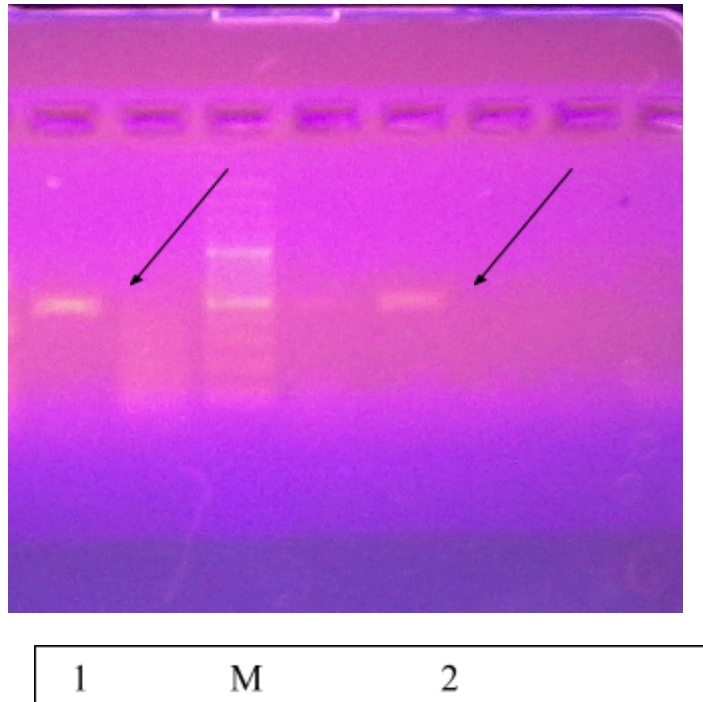


Рис. 4.8 Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР: М – маркери (100 bp, Fermentas),

1 – кДНК гену капсидного білка CMV виділеного з рослин родини Cucurbitaceae, 2 – кДНК гену капсидного білка CMV виділеного з рослин родини Solanaceae. Розмір продукту – 500 bp

Отже, видовий склад вірусів родини Bromoviridae, що викликають захворювання овочевих культур в Україні, представлений трьома вірусами: AMV (Alfalfa mosaic virus), CMV (Cucumber mosaic virus) та TAV (Tomato aspermy virus). Ці віруси мають кілька шляхів передачі, а саме механічно, насінням та попелицями, тому аналіз рослин овочевих культур на їх присутність є актуальним для обмеження їх розповсюдження в агроценозах.

Вірусні захворювання є одним з основних обмежуючих чинників у вирощуванні якісної сільськогосподарської продукції. Кількість вірусів, які

інфікують культурні рослини, невпинно зростає через адаптацію нових сільськогосподарських практик, поширення векторів, а також глобалізацію, що супроводжується масовим і швидким обміном насіння та по садковим матеріалом між різними регіонами країни.

Дієвими заходами протистояння вірусним інфекціям є вчасна та регулярна діагностика та проведення упереджувальних профілактичних заходів щодо ліквідації переносників і джерел інфекції, упровадження стійких сортів рослин та отримання безвірусного посадкового матеріалу. Таким чином, головною метою агропромислового комплексу на даний момент є переведення його на безвірусну основу.

ВИСНОВКИ

1. Визначено, що видовий склад вірусів родини Bromoviridae, які викликають захворювання овочевих культур в Україні, представлений трьома вірусами: AMV (Alfalfa mosaic virus), CMV (Cucumber mosaic virus) та TAV (Tomato aspermy virus).
2. Найбільш поширеним виявився Cucumber mosaic virus, він був детектований у 27% зразках рослин родини Cucurbitaceae та 24% зразках рослин родини Solanaceae. Крім того, тільки на рослинах родини Solanaceae зустрічались Alfalfa mosaic virus (7%) та Tomato aspermy virus (11%).
3. Враховуючи, що віруси AMV, CMV та TAV мають кілька шляхів передачі, а саме механічно, насінням та попелицями, аналіз рослин овочевих культур на їх присутність є актуальним для обмеження їх розповсюдження в агроценозах України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bromoviridae family. Available at :
<https://en.wikipedia.org/wiki/Bromoviridae>
2. Bujarski et al., (2019):ICTV Virus Taxonomy Profile: *Bromoviridae*, Journal of General Virology, 100, 1206–1207. Available at:
https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae
3. Structure of Bromoviridae visions.<https://viralzone.expasy.org/31>
4. Lucas et al. (2001). Bromoviridae. *Journal of Molecular Biology*, 28(1), pp. 1–17.
5. ICTV 9th Report (2011)
https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/252/bromoviridae-figures
6. Herranz et al., (2012). Multifunctional roles for the N-terminal basic motif of Alfalfa mosaic virus coat protein: nucleolar/cytoplasmic shuttling, modulation of RNA-binding activity, and virion formation. Available at:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22746826/>
7. Zhang et al.,(2012). Cucumber Mosaic Virus 2b Protein Subcellular Targets and Interactions: Their Significance to RNA Silencing Suppressor Activity. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/41396890>
8. Бромовіруси. Вікіпедія. <https://uk.wikipedia.org/wiki/Бромовіруси>
9. ICTVdB Management (2006). "Alfalfa mosaic virus". In: ICTVdB—The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
10. Bisby, Roskov, Orrell, Nicolson, Paglinawan, Bailly, Kirk, Bourgoin, van Hertum J, eds. (2008). "Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2008 Annual Checklist". Reading, U.K.

11. Alfalfa mosaic virus. Wikipedia. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Alfalfa_mosaic_virus
12. Kumar A.; Reddy V. S.; Yusibov V.; Chipman P. R.; Hata Y.; Fita I.; Fukuyama K.; Rossmann M. G.; Loesch-Fries L. S.; Baker T. S.; Johnson J. E. (1997). "The structure of alfalfa mosaic virus capsid protein assembled as a T=1 icosahedral particle at 4.0-Å resolution". Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9311881/>
13. ICTV. Alfamovirus genus. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae/1105/genus-alfamovirus
14. Kudo A.; Misawa T. (1971). "Some phenomena observed in systemic infection of alfalfa mosaic virus: the influences of air temperature and shading on symptom appearance". *Tohoku Journal of Agricultural Research*. **22**: 199–206.
16. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy history. Published on the Internet: <https://talk.ictvonline.org/>, consulté le 14 février 2021
15. Yardımcı N; Eryiğit H; Erdal I (2007). "Effect of alfalfa mosaic virus (AMV) on the content of some macro- and micronutrients in alfalfa" *JOURNAL OF CULTURE COLLECTIONS* Volume 5, 2006-2007, pp. 90-93
17. ICTV. Anulaviruses. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae/1106/genus-anulavirus
18. F. Giolitti, N. Bejerma, C. Nome, G. Visintin, S. de Breuil and S. Lenardon (2016) "BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF AN ISOLATE OF *PELARGONIUM ZONATE SPOT VIRUS* INFECTING SUNFLOWER IN ARGENTINA" *Journal of Plant Pathology*, Vol 96, No 1
19. Paul Ahlquist, (1999). *Encyclopedia of Virology (Second Edition)*, pp. 1330–1348.

20. J.J. Bujarski, (2008). "Bromovirus - an overview" Encyclopedia of Virology (Third Edition), Pages 386-390
21. Structure of Bromovirus virions. Available at: https://viralzone.expasy.org/134?outline=all_by_species
22. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). March 2021. Retrieved 14 May 2021.
23. Zitter, T. A., and J. F. Murphy (2009). Cucumber mosaic. *The Plant Health Instructor*. Available at: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/Cucumbermosaic.aspx>
24. Judith Hirsch, Benoît Moury, (2021) Encyclopedia of Virology (Fourth Edition), 2021 Volume 3, 2021, Pages 132-142
25. Boccard, Frédéric; Baulcombe, David (1993). "Mutational Analysis of Cis-acting Sequences and Gene Function in RNA3 of Cucumber Mosaic Virus". *Virology*. 193 (2): 563–578.
26. Plant Viruses Online:Cucumber mosaic host range Archived 2008-12-15 at the Wayback Machine
27. Chase, E., Schmidt, T., Perry, K.L.(2000) *Cucumber Mosaic Virus*. Journal of Virology Aug; 74 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10906212/>
28. Ilavirus Genus ICTV. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae/1109/genus-ilarvirus
29. Oleavirus. ICTV. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae/1110/genus-oleavirus
30. Oleavirus virion structure. Available at: "Viral Zone". ExPASy. Retrieved 15 June 2015.

31. Григоровская П.И. (2020) "Методы диагностики вирусов и вирусных болезней". Available at: https://studref.com/594066/agropromyshlennost/metody_diagnostiki_virusov_virusnyh_bolezney
32. Господарик А. В., К. М. Удовиченко, В. П. Поліщук. (2005). Діагностика вірусів плодкових культур в умовах України. Наукові записки НаУКМА. Т. 43 : Біологія та екологія. С. 51-53.
33. Engvall, E (1972). "Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa". *The Journal of Immunology*. 109 (1): 129–135. ISSN 0022-1767. PMID 4113792.
34. S. de Breuil,(2020). "What is an ELISA?". *R&D Systems*. Available at: <https://www.rndsystems.com/resources/what-is-an-elisa-and-elisa-types>
35. Пересипкін В.Ф., Марков І.Л., Шелестова. В.С. (2000). Практикум із основ наукових досліджень у захисті рослин, сс. 164
36. Hussain, R. (1995). ELISA: Theory and Practice. John R Crowther.,115(3), pp.624-624
37. Поліщук В.П., Будзанівська І. Г., Шевченко Т.П. та ін.(2017) Вірусологія. Навчальний посібник для лабораторних занять.- К.:ТОВ "Центр поліграфії "КОМПРИНТ", 262с
38. Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) Gel electrophoresis of DNA .259 p
39. Лакин Г. Ф. (1990) Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд. М.: Высш. Шк.
40. Rabinow, Paul (1996). *Making PCR: A Story of Biotechnology*. Chicago: University of Chicago Press.
41. Berg JM, Tymoczko JL Stryer L (2002). *Molecular Cell Biology* (5th ed.). WH Freeman.
42. Дем'яненко Ф.П., Будзанівська І.Г., Поліщук В.П., Головенько О.Л. Використання математичних моделей для оцінки розповсюдженості фі-

товірусів в деяких регіонах України. 2-га Міжнар. конф. «Біоресурси та віруси». Київ, 1998. С. 79.

43. Бойко А.Л. Безпека і віруси. Екологічна безпека агропромислового виробництва; за ред. О.І. Фурдичка, А.Л. Бойка. Київ: ДІА, 2013. С. 18–44.