

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

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

Протокол №\_\_\_\_\_ засідання кафедри

від “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ОГІРКОВОЇ МОЗАЇКИ  
ІЗ РОСЛИН ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю 091 Біологія

Незнанової Ірини Костянтинівни

Науковий керівник від кафедри

к.б.н., ас. Дуніч А.А.

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Київського національного університету імені Тараса Шевченка під  
керівництвом д.б.н., проф. Міщенко Л.Т.

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2024 р.**

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	3
<b>РОЗДІЛ 1. ВЛАСТИВОСТІ ВІРУСУ ОГІРКОВОЇ МОЗАЇКИ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА ВМІСТ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН В ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ</b> .....	5
1.1. Загальна характеристика вірус огіркової мозаїки .....	5
1.2. Симптоматика та поширення CMV .....	9
1.3. Вплив вірусу на вміст лікарських рослин .....	13
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b> .....	15
2.1. Візуальна діагностика рослин на наявність симптомів .....	15
2.2. Трансмисійна електронна мікроскопія.....	15
2.3. Імуноферментний аналіз .....	15
2.4. Виділення РНК із рослинного матеріалу .....	17
2.5. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією .....	18
2.6. Філогенетичний аналіз .....	18
2.7. Статистична обробка даних .....	19
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ</b> .....	20
3.1. Симптоми на рослинах ехінацеї пурпурової .....	20
3.2. Електронномікроскопічні дослідження зразків ехінацеї .....	24
3.3. Ідентифікація вірусу методом ІФА .....	25
3.4. Діагностика вірусу методом ЗТ-ПЛР .....	27
3.5 Філогенетичний аналіз .....	28
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	40
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	41

## ВСТУП

Вірусні захворювання рослин відіграють велику роль у сільському господарстві, причиняючи значні економічні збитки через зниження врожайності та якість продукції. Одним із найпоширеніших вірусів у рослинництві є вірус огіркової мозаїки (*Cucumber mosaic virus*, CMV), який впливає на широкий спектр культурних рослин, включаючи овочі, квіти та декоративні рослини (ICTV, 2023). Один із можливих резерваторів цього вірусу є ехінацея пурпура (*Echinacea purpurea*), яка є популярною лікарською рослиною та часто використовується у фітотерапії.

Ураження рослин ехінацеї пурпурової вірусом огіркової мозаїки зареєстровані у різних країнах світу: Німеччині, Новій Зеландії, Японії, Італії, США, Угорщині, Китаї та Болгарії (Dikova, 2009; Bellardi et al., 2001; Yamamoto et al., 1993; Beckerman 2001).

Історія досліджень вірусів огіркової мозаїки сягає 20-го століття, коли вперше було виявлено симптоми зараження у рослинах огірка. Протягом останніх десятиліть були зроблені значні кроки у розумінні біології, молекулярної структури та механізмів поширення цього вірусу. Згідно з оцінками, вірус огіркової мозаїки став одним із найважливіших вірусів, які впливають на рослинне виробництво.

Більш того, є дані, що вказують на вплив вірусу огіркової мозаїки на вміст важливих біологічно активних речовин у ехінацеї пурпуровій (Bellardi et al., 2001; Davino et al., 2012; Pellati et al., 2011). Тому дослідження ізоляти ВОМ з ехінацеї пурпурової не втрачає своє актуальності.

Метою роботи є характеристика ізолятів вірусу огіркової мозаїки із рослини ехінацеї пурпурової з метою розкриття їхньої морфологічних

особливостей, встановленню штамової приналежності та ймовірного походження ізолятів.

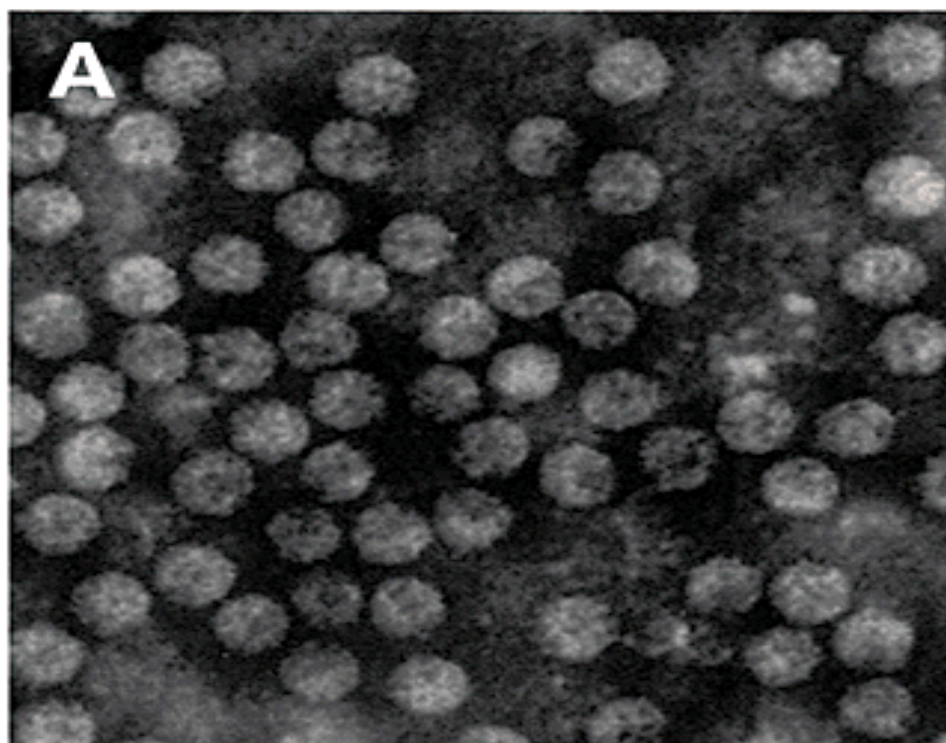
Наукова новизна роботи полягає в докладному аналізі ізолятів вірусу огіркової мозаїки, виділених із рослини ехінацеї пурпурової, що допоможе розширити наші знання про взаємодію між вірусом та господарськими рослинами. Крім того, практичне значення дослідження полягатиме у вдосконаленні методів діагностики та контролю за захворюванням в рослинництві.

# РОЗДІЛ 1

## ВЛАСТИВОСТІ ВІРУСУ ОГІРКОВОЇ МОЗАЇКИ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА ВМІСТ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН В ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВІЙ

### 1.1. Загальна характеристика вірус огіркової мозаїки

Вірус огіркової мозаїки (ВОМ, CMV), який належить до роду *Cuscutovirus* родини *Bromoviridae*, є сферичним вірусом рослин діаметром приблизно 28–30 нм (рис. 1.1).



**Рис. 1.1.** Електронномікроскопічне зображення віріонів CMV (Mochizuki et al., 2011)

Відкриття захворювання, викликаного CMV, датується приблизно 100 років тому. У 1916 році Doolittle і Jagger одночасно повідомили про перші приклади CMV-захворювань на огірках та інших гарбузових (Doolittle, 1916; Jagger, 1916). Відтоді було зареєстровано захворювання на CMV для понад 1200 видів та у більш ніж 100 родинях однодольних і дводольних, включаючи культурні, овочеві, декоративні та деревні рослини по всьому світі, особливо в помірних і тропічних зонах. У навколишньому середовищі CMV передається щонайменше 75-ма видами попелиць неперсистентним способом (Palukaitis et al., 1992). CMV також передається повитицею (*Cuscuta* spp.) і, в деяких випадках, через насіння (Palukaitis, García-Arenal, 2003). В експериментальних умовах інфекцію CMV часто викликали за допомогою механічної інокуляції, використовуючи сік, очищені віріони або вірусну РНК. CMV переважно спричиняє мозаїку. (рис. 1.2).



**Рис.1.2.** Мозаїчні симптоми CMV-інфікованої рослини тютюну (Mochizuki et al., 2011)

Також цей вірус викликає затримку росту в рослинах з родин *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Leguminosae*, *Brassicaceae* та *Gramineae*, а також у багатьох інших видів рослин. Симптоми захворювання варіюють і включають хлороз, системний некроз, карликовість і дефекти листя залежно від виду-хазяїна – штаму CMV.

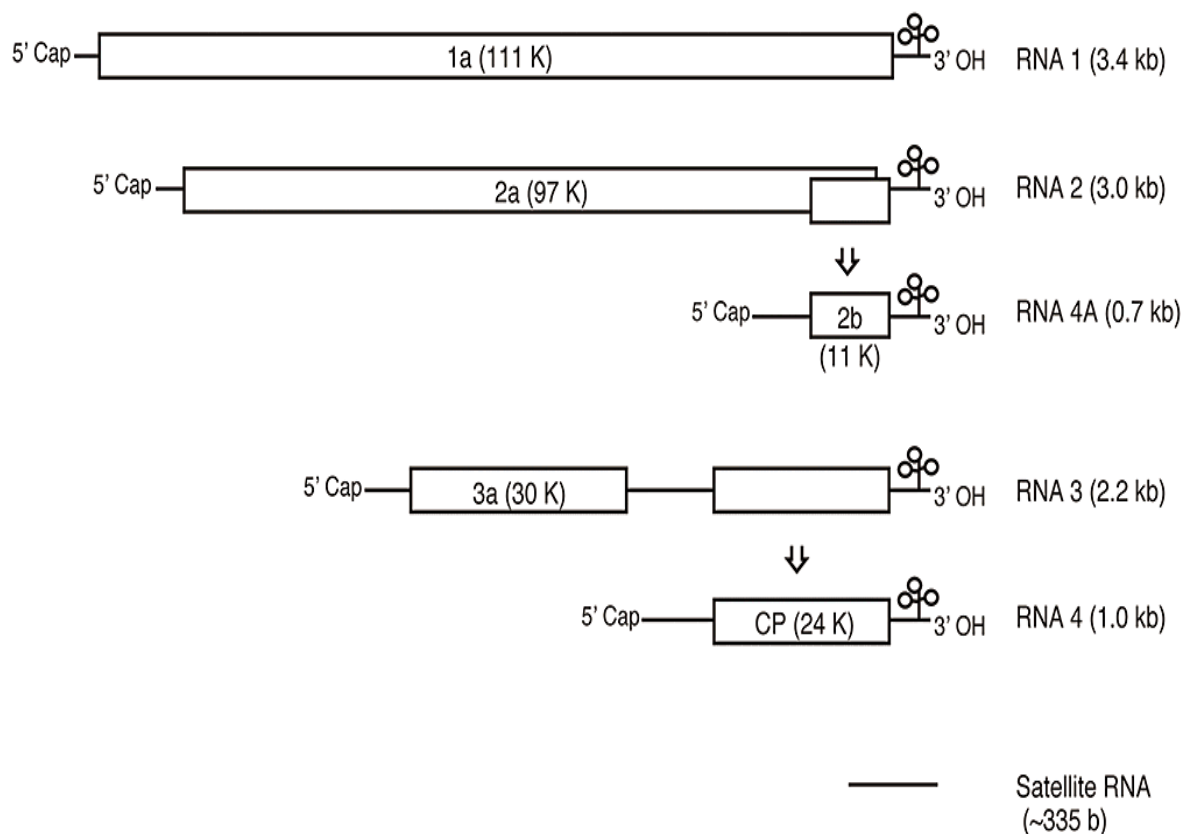
Ізоляти CMV в польових умовах часто містять сателітні (sat) РНК, які є некодуєчими малими лінійними РНК (Roossinck et al., 1992). Реплікація та поширення sat РНК у рослині повністю залежать від CMV, тому CMV називають допоміжним вірусом, навіть якщо послідовність цієї sat РНК не є гомологічною послідовності CMV РНК. Sat РНК часто змінює симптоми, викликані CMV, ослаблюючи або підсилюючи їх.

Існують різні штами CMV, що відрізняються біологічними властивостями, такими як серологія, спектр хазяїв, вірулентність, здатність викликати резистентність та передача попелиць. Штами CMV були поділені на три підгрупи: IA, IB та II, на основі послідовності 5' нетрансльованої області (UTR) геномної РНК 3. (Roossinck et al., 1999). Загальна подібність нуклеотидної послідовності в різних підгрупах становить 92–94 % (IA/IB), 74–78 % (IA/II) і 73–78 % (IB/II) (Roossinck, 2001). На даний момент визначено ряд послідовностей вірусного геному для штамів CMV, які присутні в базі даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Висока генетична різноманітність штамів CMV є важливим фактором, яка пояснює відмінності у їх біологічних властивостях. Ця різноманітність допомагає зрозуміти роль вірусних генів у вірулентності CMV. Загалом, штами підгрупи I є більш вірулентними, ніж штами підгрупи II. Штами підгрупи I зазвичай викликають серйозні симптоми, такі як мозаїка та затримка росту, тоді як штами підгрупи II найчастіше викликають дуже

легкі симптоми або протікають безсимптомно. У штамів підгрупи I також спостерігається різний ступінь вираженості симптомів захворювання.

Геном CMV складається з трьох одноланцюгових месенджерних сенсорних РНК, які називаються 1, 2 і 3, а також містить субгеномні РНК, відомі як РНК 4 і РНК 4А (рис. 1.3).



**Рис.1.3.** Організація геному CMV (Mochizuki et al., 2011)

Геном CMV кодує щонайменше п'ять відкритих рамок зчитування (ORF). Білки 1a (приблизно 111 кДа), 2a (приблизно 97 кДа) і 3a (приблизно 30 кДа) транлюються з геномних РНК 1, 2 і 3 відповідно, тоді як білки 2b (приблизно 15 кДа) і 3b (приблизно 25 кДа) транлюються з субгеномної РНК 4А та РНК 4 відповідно. Властивості та функціональні домени кожного білка детально описані в огляді Palukaitis і García-Arenal (2003). Білки 1a і 2a виконують роль вірусної реплікази; 1a містить домени

метилтрансферази та гелікази, а також блокує активність, що є важливим для трансляції, тоді як 2a має РНК-залежний домен РНК-полімерази і може синтезувати лише позитивні ланцюги РНК. І 1a, і 2a необхідні для синтезу негативних ланцюгів (Seo et al., 2009). Білок 2b діє як вірусний супресор глушіння РНК (VSR) (Béclin et al., 1998), запобігаючи поширенню сигналів на великі відстані (Guo, Ding, 2002). Білок 2b пригнічує діяльність малих інтерферуючих РНК (siRNA) і Argonaute (AGO) шляхом прямого зв'язування (Goto та ін., 2007; Zhang та ін., 2006). Крім того, білок 2b полегшує інгібування захисних шляхів як саліцилової кислоти (Ji and Ding, 2001), так і жасмонової кислоти (Lewsey et al., 2010), можливо, втручаючись у регуляцію експресії захисних генів через глушіння РНК. Білок 3a необхідний для міжклітинного руху вірусу (Canto et al., 1997). Він зв'язує, пригнічує та розриває F-актин, який, як було продемонстровано, є необхідним для збільшення межі виключення розміру плазмодесми (Su et al., 2010). Білок 3b є капсидним білком, єдиним білком, пов'язаним з віріонами, необхідним для міжклітинного пересування та пересування на великі відстані (Canto et al., 1997) і передачі попелиць (Perry et al., 1994).

## 1.2. Симптоматика та поширення CMV

ВММ поширений на ехінацеї пурпуровій в багатьох країнах світу. Симптоми, спричинені вірусом огіркової мозаїки на рослинах ехінацеї пурпурової різняться у різних країнах. Так, у Новій Зеландії це були симптоми жовтої плямистості на листках (Rangaau, 2001), в США – кільцева крапчастість та деформація листків (Beckerman, 2001), в Японії та Китаю – мозаїка на листках (Yamamoto et al., 1993; Guifen et al., 2007). В Італії на ехінацеї реєстрували різноманітні симптоми, такі як: жовта мозаїка та деформація листків, деформація пелюсток та плямистість на

них (Bellardi et al., 2001); затримка росту, жовта мозаїка на листках, кільцеві візерунки (Pellati et al., 2011).

У Болгарії симптомом ВОМ-ураження ехінацеї зареєстровано світло-зелену плямистість на листках (рис .1.4).



**Рис. 1.4.** Світло-зелена плямистість на листках ехінацеї пурпурової, вирощеної в Болгарії (Dikova, 2009)

Симптоми огіркової мозаїки можуть сильно відрізнятися залежно від виду і сорту хазяїна, часу зараження. Типові симптоми включають затримку росту цілих рослин, мозаїку або плямистість (тобто плямисті білі, жовті та світло-зелені ділянки) і кільцеподібні плями (тобто кільцеподібні ділянки знебарвленої тканини) на листках і плодах, а також різноманітні спотворення росту, такі як деформація та стоншення (тобто подовження та витончення) листя, а також бородавки на плодах. У екстремальних

ситуаціях частини ураженої рослини або навіть ціла рослина можуть загинути від хвороби.

CMV може зимувати у сприйнятливих дворічних або багаторічних бур'янах, а також у багаторічних сільськогосподарських культурах (наприклад, люцерні) і багаторічних трав'янистих і деревних декоративних рослинах. Насіння і навіть пилок деяких рослин-хазяїв можуть переносити вірус, і таким чином вірус може поширюватися через ці частини рослини. Частіше CMV поширюється попелицями, які можуть підхопити вірус із заражених рослин і передати його здоровим рослинам під час годування. Понад 80 видів попелиці можуть потенційно передавати CMV. Серйозність огіркової мозаїки часто залежить від розміру та активності популяції попелиці на території, а також від кількості заражених рослин на території, що є резервуаром для вірусу (Draeger, 2022).

У 2019 році в Болгарії проводили дослідження CMV на вирощеній ехінацеї пурпуровій та встановлено, що вірус викликає на молодих рослинах жовту плямистість (рис. 1.5).



**Рис.1.5.** CMV симптоми на молодих листках ехінацеї пурпуровій, Болгарія (Dikova, Djourmanski, 2019)

Симптомами на листках ехінацеї пурпурової є крапчастість листя, з'являються світлі та темно-зелені плями (рис.1.6). Іноді з'являються темно-зелені кільцеві плями або лінійні візерунки та травлення, утворені мертвою тканиною (Moogman, 2023).



**Рис. 1.6.** Ехінацея пурпурова уражена CMV (Phibbs, 2012)

Таким чином, симптоматика вірусу огіркової мозаїки на рослинах ехінацеї пурпурової відрізняється від мозаїки та плямистостей до деформації листків.

### 1.3. Вплив вірусу на вміст лікарських рослин

Крім значного впливу вірусів на врожайність ехінацеї пурпурової та інших лікарських рослин (Dikova et al., 2009), доведено, що ці збудники знижують вміст біологічно активних речовин у лікарських рослинах.

В Італії вірусологи показали, що CMV знижує вміст деяких ліпофільних сполук у рослинах ехінацеї пурпурової (Hudaib et al., 2002, Bellardi et al., 2001). Інфіковані матеріали з *Echinacea purpurea* забезпечували нижчий вміст олії та значні кількісні зміни в складі олії, коли рослини були заражені CMV (Hudaib et al., 2002). Показано, що CMV-інфекція призводила до зниження концентрації суми коричних кислот, кафтарової та цикорієвої кислот у рослинах ехінацеї інколи до рівня нижче норм, регламентованих Державною фармакопеею (Mishchenko et al., 2013). Вміст полісахаридів також значно знижений (Mishchenko et al., 2009). Pellati з колегами вивчили вміст вторинних метаболітів, таких як похідні кавової кислоти, алкаміди та ефірна олія в ехінацеї пурпуровій, ураженій CMV і фітоплазмою 16SrIX-C (Pellati et al., 2011). Відмічено, що в рослинах, уражених обома збудниками, концентрація цихоринової кислоти суттєво знижується. Вірусна інфекція знижує вміст алкамідів і деяких компонентів ефірної олії (Pellati et al., 2011). Щодо основного алкаміду, ізобутиламиду додека-2E,4E,8Z,10E / Z-тетраєнової кислоти, спостерігалось значне зниження вмісту цього вторинного метаболіту в уражених вірусом рослинах порівняно зі здоровими рослинами, тоді як у зразку, ураженому фітоплазмою, зміна цього вторинного метаболіту не була помітною.

Беззаперечний негативний вплив CMV на якість сировини виявлено і для деяких інших лікарських рослин. Наприклад, було показано, що CMV-інфекція значно знижувала кількісний вихід ефірної олії *Agastache anethiodora* і викликала зміни відносного складу основних компонентів:

пулегону, ментону, ізоментону, метилхавіколу та лімонену (Bruni et al., 2007).

Таким чином, дані світової наукової літератури свідчать про залежність між ураженням лікарських рослин вірусами та концентрацією фармакологічно цінних речовин у них. Зокрема, дослідження окремих авторів показали, що в інфікованих вірусами лікарських рослинах кількісний вміст основних біологічно активних сполук знижений, подекуди до рівня, який є нижчим допустимих норм, регламентованих Державною фармакопеею. Такі результати вказують на високу шкодочинність вірусів та потребу у вірусологічному моніторингу та розробці заходів захисту лікарських культур від патогенів вірусної етіології.

## **РОЗДІЛ 2**

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

#### **2.1. Візуальна діагностика рослин на наявність симптомів**

Для встановлення етіології захворювань проводили візуальні обстеження рослин на наявність на них симптомів вірусного ураження. Зразки рослин відбирали у Полтавській області. В результаті обстежень було відібрано чотири зразки рослин ехінацеї пурпурової із симптомами мозаїки, жовтої плямистості та деформації листків.

#### **2.2. Трансмійна електронна мікроскопія**

Для приготування препаратів для електронної мікроскопії наносили на сітки з плівкою-підкладкою (з 0,2% розчину формвара на дихлоретані) на 1-1,5 хв сік із рослин ехінацеї пурпурової із симптомами захворювання. Контрастування препаратів здійснювали з використанням 2% розчину фосфорно-вольфрамової кислоти протягом 1,5 хв (Салига, Снітинський, 1999). Препарати досліджували на трансмісійному електронному мікроскопі JEM 1400 (JEOL, Японія).

#### **2.3. Імуноферментний аналіз**

Методи ІФА поділяють на дві великі групи: твердофазний і гомогенний аналіз. У світовій літературі перший скорочено позначають “ELISA” (від англ. enzyme-linked immunosorbent assay).

Існує декілька модифікацій імуноферментного аналізу: прямий ІФА; непрямий ІФА; сендвіч-метод, послідовний або неконкурентний та конкурентний аналіз.

У роботі використовували варіант ІФА під назвою «повідійний сендвіч». Відомо два варіанти методу: прямий і непрямий. У прямому варіанті або double antibody sandwich (DAS) - подвійних антитіл сандвіч - досліджуваний антиген спочатку реагує з антитілами твердої фази, потім зв'язаний антиген виявляється за допомогою другого антитіла, міченого ферментом (Поліщук та ін., 2017; Engvall, 2010).

Аналіз проводили із застосуванням антитіл, специфічних до ВОР, фірми Loewe (Німеччина) згідно рекомендацій та протоколу виробника.

Аналіз проводили в 4 основних етапи:

1). Фізична сорбція перших антитіл у розведенні 1:200 у кількості 200 мкл у кожному лунку планшета;

2). Внесення у лунки гомогенатів із листків рослин ехінацеї, а також позитивного та негативного контролів згідно заздалегідь розпланованої схеми;

3). Додавання других антитіл, які кон'юговані з міткою (лужною фосфатазою). Розведення других антитіл та кількість аналогічна таким як для перших антитіл;

4). Ензиматична реакція: внесення субстрату, що сприяє появі забарвленого комплексу; інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену в лунках;

Після інкубації протягом 1 години при температурі 37°C здійснювали вирахування результатів за допомогою рідера Termo Labsystems Opsis MR (США), а саме вимірювання оптичної густини продукту ферментативної реакції при довжині хвилі 405 нм.

## 2.4. Виділення РНК із рослинного матеріалу

Виділення РНК із рослин ехінацеї здійснювали за допомогою набору GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Scientific, США) згідно рекомендацій виробника. Основні етапи зазначені нижче:

1. Гомогенізація наважки листків вагою 150 мг у фарфорових ступках.
2. Додавання 500 мкл Lysis Solution з наступним перемішуванням та водяною банею (3 хвилини при температурі 56 °C).
3. Низькошвидкісне центрифугування у режимі 13-14 тис. об/хв. протягом 5-6 хв.
4. Надосад перенести у чисті стерильні мікропробірки та додати 250 мкл 96%-го етанолу, перенести суміш до колонки з набору.
5. Низькошвидкісне центрифугування у режимі 11 тис. об/хв. протягом 1 хв.
6. До колонки додати 700 мкл розчину буферу відбивки 1.
7. Низькошвидкісне центрифугування у режимі 11 тис. об/хв. протягом 1 хв.
8. До колонки додати 500 мкл розчину буферу відбивки 2.
9. Низькошвидкісне центрифугування у режимі 11 тис. об/хв. протягом 1 хв.
10. Повторити пункти 8-9.
11. Замінити низ колонки на чистий та додати до колонки 50 мкл стерильної води із набору.
12. Низькошвидкісне центрифугування у режимі 11 тис. об/хв. протягом 1 хв.
13. Просушити колонки протягом 2-4 хв.
14. Перенести РНК у чисту стерильну мікропробірку

## 2.5. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

Полімеразну ланцюгову реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) проводили за допомогою набору реагентів фірми Thermo Scientific, США (кат номер EP 0441 та K1081) згідно протоколу, наданого виробником.

І для зворотної транскрипції, і для ПЛР застосовували праймери до гена капсидного білка вірусу огіркової мозаїки: CMV-f, 5'-TATGATAAGAAGCTTGTTCGCGCA-3'; and CMV-r, 5'-TTT TAGCCGTAAGCTGGATGGACAACCC-3' (Ahmed, Fath-Allah, 2011).

Режим ампліфікації включав в себе: 3 хв 95 °С; далі 30 циклів: 95 °С 30секунд, 56 °С 30 секунд, 72 °С 1 хв; та останній етап - 72 °С 5 хв.

Після проведення ампліфікації здійснювали електрофоретичне розділення продуктів ПЛР у агарозному гелі (з додаванням 0,5 мг\мл бромистого етидію) із використанням маркерів ДНК CSL-MDNA-100bp (Cleaver Scientific, Велика Британія). Наявність\відсутність продуктів спостерігали під УФ-світлом (Остапченко та ін., 2017).

## 2.6. Філогенетичний аналіз

Після проведення ПЛР продукти виділяли та очищали від агарозного гелю та інших компонентів за допомогою набору фірми Zymo research (США) Zymoclean Gel DNA Recovery Kit згідно протоколу виробника.

Після секвенування за Сенгером отримано файл з використанням програмного забезпечення Sequencing Analysis Software v5.2.0. з послідовністю досліджуваного ізоляту ВОМ, названого нами як CMV1.

Філогенетичний аналіз проводили із застосуванням програмного забезпечення MEGA (версія 11). Порівняння та вирівнювання

послідовностей, які були взяті для цього аналізу, проводили за допомогою Blast і Clustal W, відповідно. Обидві програми вбудовані в MEGA.

Філогенетичне дерево будували з використанням методу Neighbor-Joining method (Saitou, Nei, 1987), найкраща модель – Jukes-Cantor. Для утворення кореня філогенетичного дерева взято з Генбанка послідовність *Peanut stunt virus*, ізолят ER.

Аналіз амінокислотних послідовностей та наявність\відсутність амінокислотних заміщень проводили в MEGA. Порівняльний аналіз зроблено у програмному забезпеченні BioEdit.

## **2.7. Статистична обробка даних**

Статистична обробка результатів визначення розмірів віріонів та результатів ІФА проводилася з врахуванням стандартного відхилення.

При проведенні філогенетичного аналізу, а саме побудові філогенетичного дерева застосовували бутстреп тест із 1000 реплікаціями.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Симптоми на рослинах ехінацеї пурпурової

Проведено обстеження рослин ехінацеї пурпурової на наявність симптомів вірусного захворювання у Полтавській області. В результаті відібрано 4 зразки із симптомами жовтої мозаїки та плямистості, а також деформації листків (рис. 3.1-3.4).



**Рис. 3.1.** Симптоми мозаїки та плямистості на рослинах ехінацеї пурпурової с. Чарівниця (зразок № 1), Полтавська область: ліворуч – здоровий листок; праворуч – з симптомами



1



2

**Рис. 3.2.** Симптоми жовтої плямистості на листках ехінацеї пурпурової (зразок № 2) за умов вирощування у Полтавській області: 1 – контроль; 2 – хворі рослини



**Рис. 3.3.** Симптоми жовтої плямистості на листках ехінацеї пурпурової (зразок № 3) за умов вирощування у Полтавській області

Ці зразки із симптомами жовтої плямистості були відібрані для подальшого тестування на наявність вірусу огіркової мозаїки.



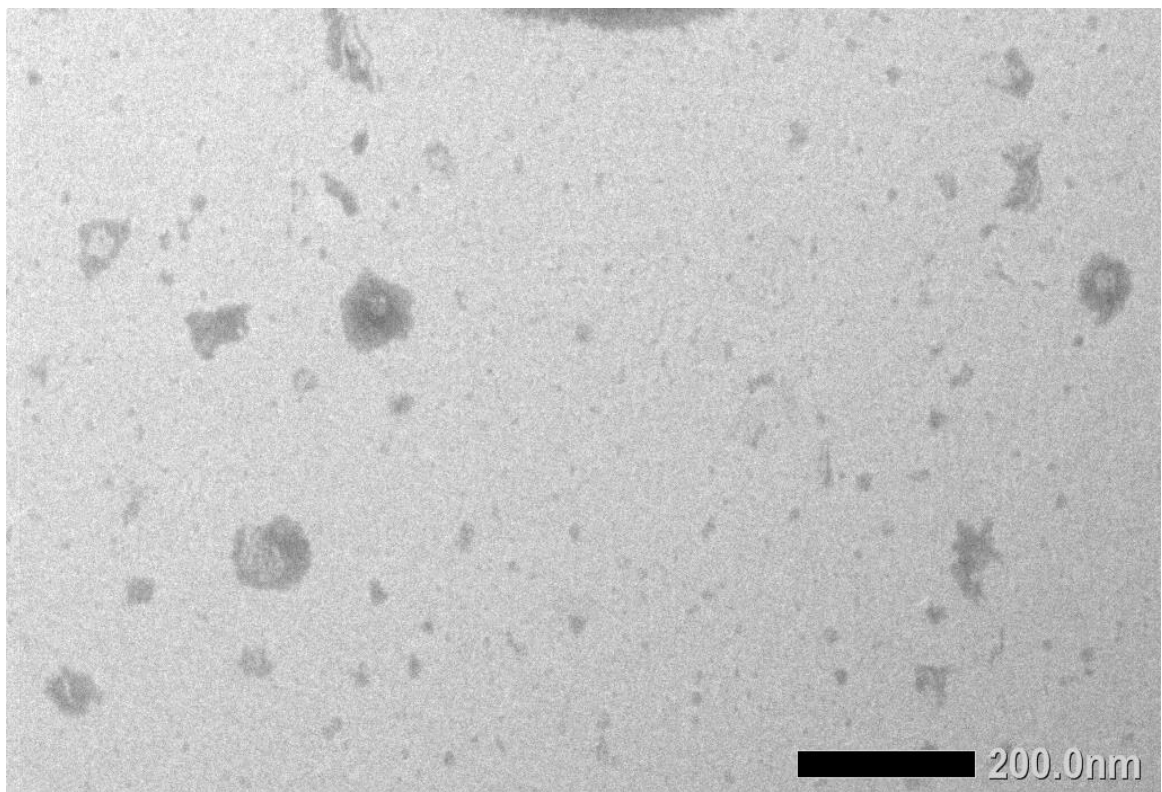
**Рис. 3.4.** Симптоми жовтої плямистості на листках ехінацеї пурпурової (зразок № 4) за умов вирощування у Полтавській області

Симптоми, спричинені вірусом огіркової мозаїки на рослинах ехінацеї пурпурової різняться у різних країнах. Так, у Новій Зеландії це були симптоми жовтої плямистості на листках (Rangahau, 2001), в США – кільцева крапчастість та деформація листків (Beckerman, 2001), в Японії та Китаю – мозаїка на листках (Yamamoto et al., 1993; Guifen et al., 2007). В Італії на ехінацеї реєстрували різноманітні симптоми, такі як: жовта мозаїка та деформація листків, деформація пелюсток та плямистість на них (Bellardi et al., 2001); затримка росту, жовта мозаїка на листках, кільцеві візерунки (Pellati et al., 2011). Аналіз наукової літератури показав, що симптоми, виявлені нами на ехінацеї в Україні, найбільше схожі до симптомів, описаних на ехінацеї у Болгарії (Dikova, 2009). Різноманітність симптомів може бути пов'язане як із сортом рослин, так і з властивостями ізоляту вірусу.

Отже, виявлено рослини ехінацеї пурпурової з різними симптомами захворювання, що за своїм проявом є схожими до вірусного. Рослини мали жовту хлоротичну плямистість на листках. Окрім хлоротичної плямистості, спостерігалась деформація листкової пластинки, зелена плямистість та стоншення листкової пластинки. Для підтвердження вірусної природи даних хвороб необхідним є використання таких методів як електронна мікроскопія та імуноферментний аналіз.

### 3.2. Електронномікроскопічні дослідження зразків ехінацеї

У соці з симптоматичних листків рослин ехінацеї пурпурової сорту Чарівниця (рис.3.1) встановлено наявність сферичних віріонів діаметром  $30\pm 1$  нм (рис. 3.5.).



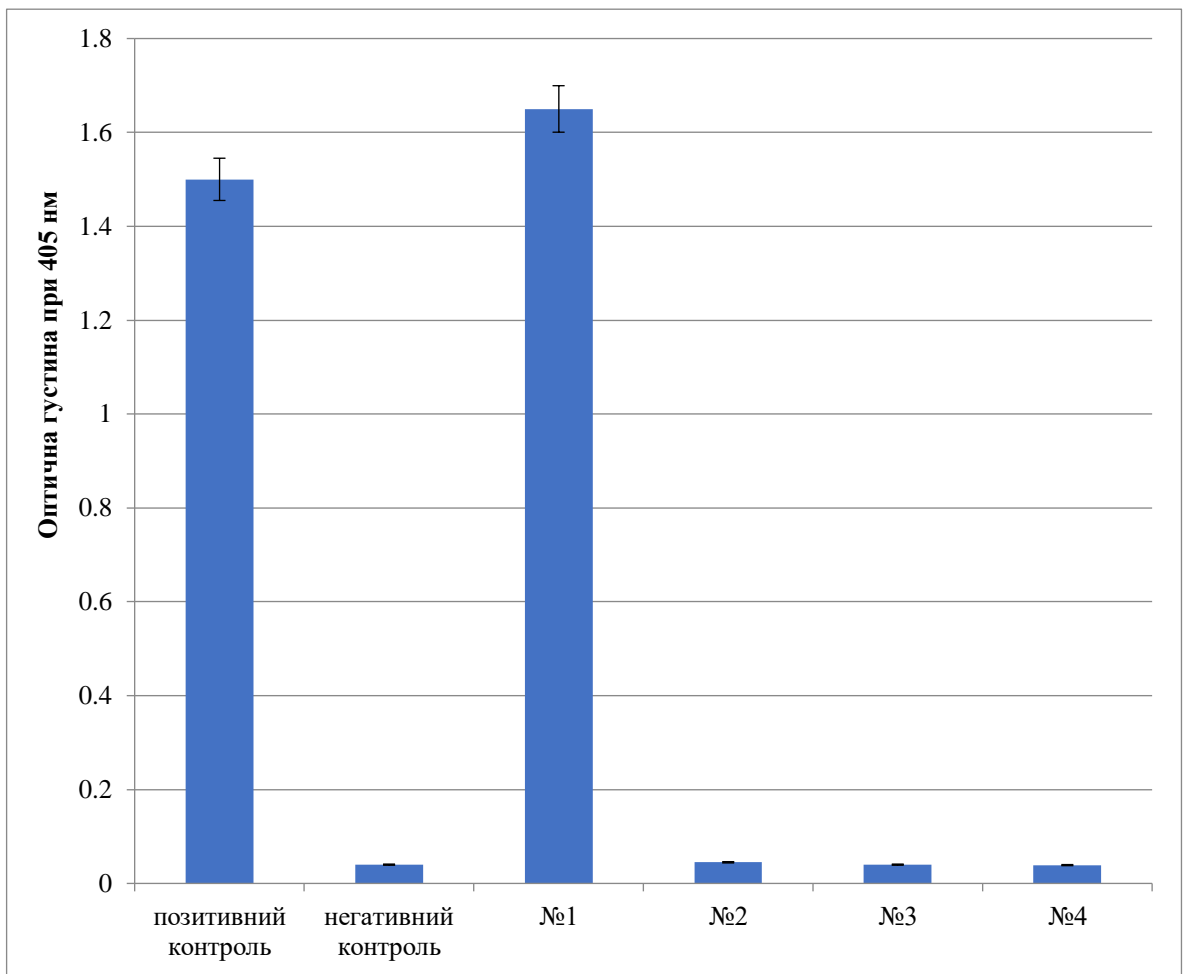
**Рис. 3.5.** Електронномікроскопічне зображення сферичних віріонів, виявлених у листках ехінацеї пурпурової сорту Чарівниця

Таким чином, за допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії встановлено, що вірусні частинки діаметром близько  $30\pm 1$  нм присутні у одному з досліджуваних зразків ехінацеї пурпурової. Такі розміри характерні для вірусів родини *Bromoviridae*, роду *Cucumovirus* (<https://ictv.global/report/chapter/bromoviridae/bromoviridae>).

### **3.3. Ідентифікація вірусу методом ІФА**

Виходячи з результатів електронної мікроскопії та даних наукової літератури щодо ураження рослин ехінацеї вірусами, для проведення імуноферментного аналізу було взято тест-систему до вірусу огіркової мозаїки.

Результати ІФА показали, що у зразку сорту Чарівниця (зразок № 1) наявні антигени ВОМ (рис. 3.6).

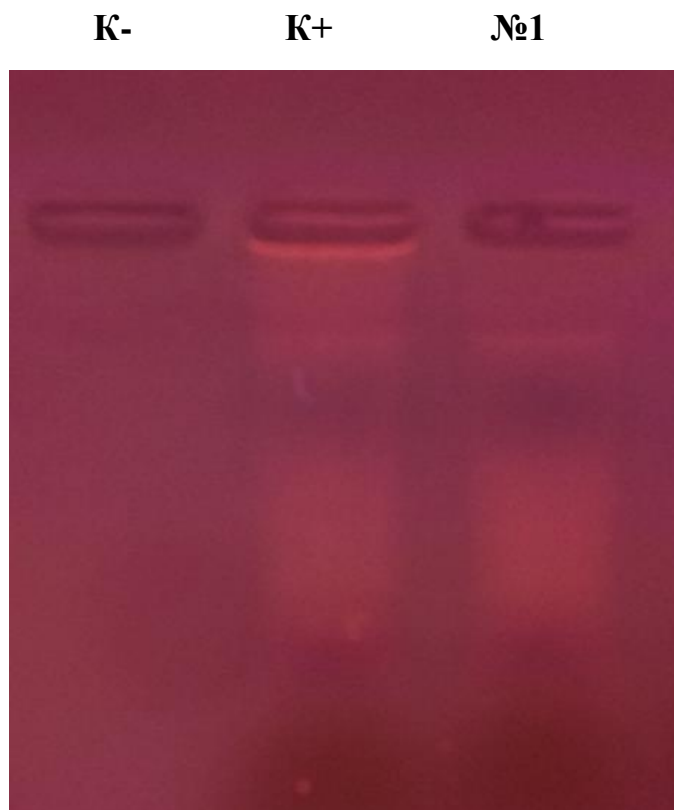


**Рис. 3.6.** Результати ІФА. Вміст антигенів ВОМ у досліджуваних зразках ехінацеї пурпурової

Антигенів ВОМ у інших трьох зразках виявлено не було. Такі результати щодо ураження рослин ехінацеї пурпурової вірусом огіркової мозаїки підтверджуються даними з різних країн (Німеччини, Нової Зеландії, Японії, Італії, США, Угорщини, Китаю та Болгарії), в яких у різні роки цей вірус реєструвався на ехінацеї (Dikova, 2009; Bellardi et al., 2001; Yamamoto et al., 1993; Beckerman 2001).

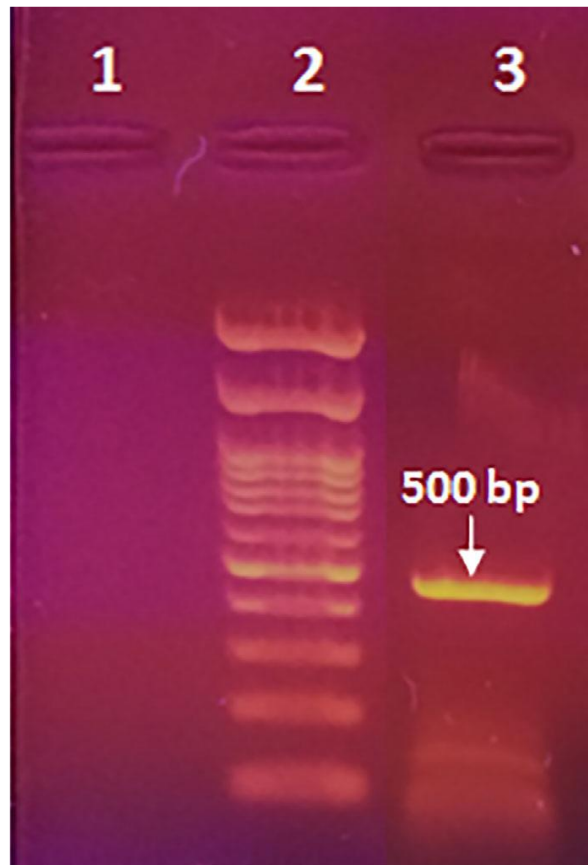
### 3.4. Діагностика вірусу методом ЗТ-ПЛР

Для проведення ЗТ-ПЛР попередньо було виділено тотальну РНК із зразка ехінацеї № 1 з симптомами ураження ВОМ (рис. 3.7).



**Рис. 3.7.** Електрофореграма тотальної РНК: 1 – негативний контроль; 2 - позитивний контроль ; 3 – зразок № 1

ЗТ-ПЛР проводили із використанням олігонуклеотидних праймерів, специфічних до гена капсидного біла ВОМ. Очікуваний розмір продукту 500 п.н. Результати аналізу показали наявність ампліфіконів розміром 500 п.н. у зразку з ехінацеї пурпурової № 1 (рис.3.8).

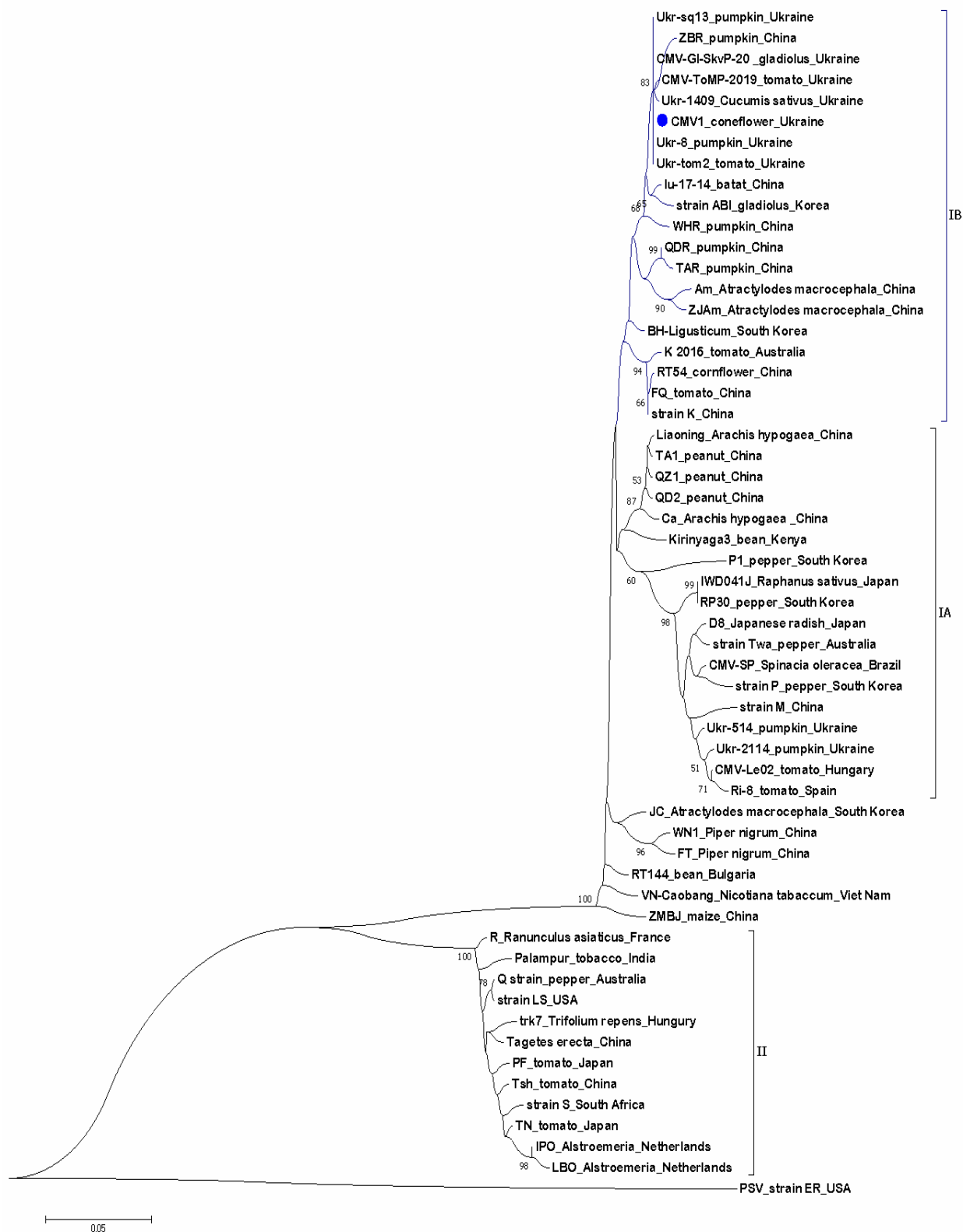


**Рис. 3.8.** Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами до гена СР ВОР: 1 – негативний контроль; 2 - маркер ДНК CSL\_MDNA-100bp (CLEAVER) ; 3 – зразок № 1

Таким чином, методом ЗТ-ПЛР отримано продукт ділянки гена капсидного білка ВОР розміром 500 п.н. Після цього було проведено секвенування за Сенгером.

### 3.5 Філогенетичний аналіз

Досліджуваний ізолят з ехінацеї пурпурової було названо як CMV1 та проведено філогенетичний аналіз, який показав, що CMV1 належить до філогенетичної групи ІВ (рис. 3.9).



**Рис. 3.9.** Філогенетичне дерево, побудоване методом зв'язування найближчих сусідів за нуклеотидними послідовностями ділянки гена CP розміром 403 п.н. ізолятів ВОМ. Ізолят CMV1 позначений синім колом. Ізолят PSV штам ER взятий для побудови кореня дерева

Ізолят CMV1 має ідентичність 93.7% to 99.7% за нуклеотидною послідовністю та від 86.4% до 99.2% за амінокислотною послідовністю ділянки гена капсидного білка з ізолятами групи (табл. 3.1). Найвищий відсоток ідентичності CMV1 має з українським томатним ізолятом CMV-ТоMP-2019 та гладіолусним ізолятом CMV-GI-SkvP-20 (99,8% за нт і 100% за ак), а також з українськими гарбузовими Ukr-8 (KT199742) та Ukr-sq13 (KJ921837) виявленими у 2011 році (99.7% нт, 99.2% ак), з Ukr-tom2 (KJ921838) виділеним з томатів у 2011 (99.2% нт, 98.3% ак), та з Ukr-1409 (KT199741) детектованим у *Cucumis sativus* у 2009 (99.0% нт, 97.5% ак) (табл. 3.1, 3.2.).

Таблиця 3.1

**Ідентичність нуклеотидних послідовностей гена капсидного білка ізолятів ВОМ, %**

п\п	Номер у Генбанку	Назва ізоляту	Хазяїн	Країна	Група	нт
1	OL505434	CMV-ТоMP-2019	томат	Україна	ІВ	99,8
2	MW847714	CMVGI-SkvP-20	гладіолус	Україна	ІВ	99,8
3	KT199742	Ukr-8	гарбуз	Україна	ІВ	99.7
4	KJ921837	Ukr-sq13	гарбуз	Україна	ІВ	99.7
5	KJ921838	Ukr-tom2	томат	Україна	ІВ	99.2
6	KT199741	Ukr-1409	<i>Cucumis sativus</i>	Україна	ІВ	99.0
7	KP710850	ZBR	гарбуз	Китай	ІВ	98.7

8	MK778781	lu-17-14	<i>Ipomoea batatas</i>	Китай	ІВ	98.4
9	L36525	strain ABI	гладіолус	Пд.Корея	ІВ	97.9
10	KP710851	WHR	гарбуз	Китай	ІВ	97.6
11	LC480455	BH- Ligusticu m	<i>Ligusticum chuanxiong</i>	Пд.Корея	ІВ	97.4
12	KP710852	QDR	гарбуз	Китай	ІВ	97.4
13	JX993912	FQ	томат	Китай	ІВ	97.0
14	AF127977	K	-----	Китай	ІВ	97.0
15	KP710853	TAR	гарбуз	Китай	ІВ	96.8
16	AJ810263	RT54	ехінацея	Китай	ІВ	96.8
17	MG182150	K 2016	томат	Австралія	ІВ	96.2
18	MH394190	Liaoning	<i>Arachis hypogaea</i>	Китай	ІВ	95.9
19	GQ228525	TA1	арахіс	Китай	ІВ	95.9
20	GQ228520	QZ1	арахіс	Китай	ІВ	95.9
21	GQ228519	QD2	арахіс	Китай	ІВ	95.9
22	AJ810262	RT144	квасоля	Болгарія	ІА	95.9
23	MK421103	ZJAm	<i>Atractylodes macrocephala</i>	Китай	ІВ	95.7
24	JX993911	An	<i>Atractylodes macrocephala</i>	Китай	ІВ	95.7
25	AY429432	Ca	<i>Arachis hypogaea</i>	Китай	ІВ	95.7
26	MH594046	JC	<i>Atractylodes macrocephala</i>	Пд.Корея	ІА	95.4
27	AM048830	VN-	<i>Nicotiana</i>	В'єтнам	ІА	95.4

		Caobang	<i>tabaccum</i>			
28	MH567354	Kirinyaga 3	квасоля	Кенія	ІВ	95.1
29	KC693009	ZMBJ	кукурудза	Китай	ІА	94.5
30	KT004544	WN1	<i>Piper nigrum</i>	Китай	ІА	94.2
31	KU255786	FT	<i>Piper nigrum</i>	Китай	ІА	93.7
32	LC066410	IWD041J	<i>Raphanus sativus</i>	Японія	ІА	94.5
33	KC527758	RP30	перець	Пд.Корея	ІА	94.5
34	AB004781	D8	японська редька	Японія	ІА	94.0
35	KY886411	CMV-SP	<i>Spinacia oleracea</i>	Бразилія	ІА	93.7
36	AJ585522	Strain Twa	перець	Австралія	ІА	93.2
37	KT199739	Ukr-514	гарбуз	Україна	ІА	93.0
38	AM114273	CMV- Le02	томат	Угорщина	ІА	92.6
39	KT199740	Ukr-2114	гарбуз	Україна	ІА	92.4
40	MN422335	Strain P1	перець	Пд.Корея	ІА	92.0
41	AB369272	Strain P	перець	Пд.Корея	ІА	92.0
42	AF268599	Strain M	-----	Китай	ІА	91.7
43	AM183119	Ri-8	томат	Іспанія	ІА	91.7
44	Y18138	R	<i>Ranunculus asiaticus</i>	Франція	ІІ	73.1
45	M21464	Q	перець	Австралія	ІІ	73.0
46	AF127976	strain LS	-----	США	ІІ	73.0
47	EU665002	--	<i>Tagetes erecta</i>	Китай	ІІ	72.3

48	EF202597	Tsh	tomato	-----	II	72.3
49	HG917910	Palampur	<i>Cucumis sativus</i>	Індія	II	72.3
50	AB368501	PF	томат	Японія	II	1.9
51	AB176847	Strain TN	томат	Японія	II	1.5
52	L15336	trk7	<i>Trifolium repens</i>	Угорщина	II	71.1
53	AF063610	Strain S	-----	Пд. Африка	II	71.1
54	AJ304399	IPO	<i>Alstroemeria</i>	Нідерланди	II	70.8
55	AJ304397	LBO	<i>Alstroemeria</i>	Нідерланди	II	70.0

Проведено визначення відсотка амінокислотних послідовностей ізолятів ВОМ (табл. 3.2).

**Таблиця 3.2**

**Ідентичність амінокислотних послідовностей гена капсидного білка ізолятів ВОМ, %**

п\п	Номер у Генбанку	Назва ізоляту	Хазяїн	Країна	Група	ак
1	OL505434	CMV- ToMP- 2019	томат	Україна	ІВ	100
2	MW847714	CMVG1- SkvP-20	гладіолус	Україна	ІВ	100
3	KT199742	Ukr-8	гарбуз	Україна	ІВ	99.2
4	KJ921837	Ukr-sq13	гарбуз	Україна	ІВ	99.2
5	KJ921838	Ukr-tom2	томат	Україна	ІВ	98.3

6	KT199741	Ukr-1409	<i>Cucumis sativus</i>	Україна	ІВ	97.5
7	KP710850	ZBR	гарбуз	Китай	ІВ	97.5
8	MK778781	lu-17-14	<i>Ipomoea batatas</i>	Китай	ІВ	96.6
9	L36525	strain ABI	гладіолус	Пд.Корея	ІВ	95.0
10	KP710851	WHR	гарбуз	Китай	ІВ	95.0
11	LC480455	BH-Ligusticum	<i>Ligusticum chuanxiong</i>	Пд.Корея	ІВ	95.8
12	KP710852	QDR	гарбуз	Китай	ІВ	95.0
13	JX993912	FQ	томат	Китай	ІВ	94.5
14	AF127977	K	-----	Китай	ІВ	94.5
15	KP710853	TAR	гарбуз	Китай	ІВ	95.0
16	AJ810263	RT54	ехінацея	Китай	ІВ	93.6
17	MG182150	K 2016	томат	Австралія	ІВ	93.6
18	MH394190	Liaoning	<i>Arachis hypogaea</i>	Китай	ІВ	92.7
19	GQ228525	TA1	арахіс	Китай	ІВ	91.8
20	GQ228520	QZ1	арахіс	Китай	ІВ	91.8
21	GQ228519	QD2	арахіс	Китай	ІВ	91.8
22	AJ810262	RT144	квасоля	Болгарія	ІА	91.8
23	MK421103	ZJAm	<i>Atractylodes macrocephala</i>	Китай	ІВ	94.5
24	JX993911	An	<i>Atractylodes macrocephala</i>	Китай	ІВ	93.6
25	AY429432	Ca	<i>Arachis</i>	Китай	ІВ	91.8

			<i>hypogaea</i>			
26	MH594046	JC	<i>Atractylodes macrocephal a</i>	Пд.Корея	IA	91.8
27	AM048830	VN- Caobang	<i>Nicotiana tabaccum</i>	В'єтнам	IA	90.9
28	MH567354	Kirinyaga3	квасоля	Кенія	IB	90.9
29	KC693009	ZMBJ	кукурудза	Китай	IA	90.0
30	KT004544	WN1	<i>Piper nigrum</i>	Китай	IA	87.3
31	KU255786	FT	<i>Piper nigrum</i>	Китай	IA	86.4
32	LC066410	IWD041J	<i>Raphanus sativus</i>	Японія	IA	88.2
33	KC527758	RP30	перець	Пд.Корея	IA	88.2
34	AB004781	D8	японська редька	Японія	IA	87.3
35	KY886411	CMV-SP	<i>Spinacia oleracea</i>	Бразилія	IA	86.4
36	AJ585522	Strain Twa	перець	Австралія	IA	83.8
37	KT199739	Ukr-514	гарбуз	Україна	IA	85.7
38	AM114273	CMV-Le02	томат	Угорщина	IA	84.7
39	KT199740	Ukr-2114	гарбуз	Україна	IA	84.0
40	MN422335	Strain P1	перець	Пд.Корея	IA	84.7
41	AB369272	Strain P	перець	Пд.Корея	IA	84.7
42	AF268599	Strain M	-----	Китай	IA	84.7
43	AM183119	Ri-8	томат	Іспанія	IA	83.8
44	Y18138	R	<i>Ranunculus</i>	Франція	II	56.3

			<i>asiaticus</i>			
45	M21464	Q	перець	Австралія	П	55.0
46	AF127976	strain LS	-----	США	П	55.0
47	EU665002	--	<i>Tagetes erecta</i>	Китай	П	55.0
48	EF202597	Tsh	tomato	-----	П	54.6
49	HG917910	Palampur	<i>Cucumis sativus</i>	Індія	П	54.6
50	AB368501	PF	томат	Японія	П	55.0
51	AB176847	Strain TN	томат	Японія	П	54.1
52	L15336	trk7	<i>Trifolium repens</i>	Угорщина	П	54.1
53	AF063610	Strain S	-----	Пд. Африка	П	54.1
54	AJ304399	IPO	<i>Alstroemeri a</i>	Нідерланди	П	54.1
55	AJ304397	LBO	<i>Alstroemeri a</i>	Нідерланди	П	54.1

Наступним етапом було дослідити амінокислотні послідовності для виявлення ймовірних мутацій. Проведено порівняння амінокислотних послідовностей досліджуваного ізоляту з іншими. Виявлено унікальне амінокислотне заміщення N→D у позиції 1 досліджуваної ділянки геному вірусу (рис. 3.10).



Варто відмітити, що усі українські ізоляти ВОМ групи ІВ, включаючи й CMV1, у позиції 9 мають однакове aa заміщення (Q→R). Ще таке заміщення мають китайські ізоляти з гарбуза ZBR і WHR, а також південнокорейський strain P із перцю. Позиція 78 – усі українські ізоляти, а також ABI з гладіолусу, китайські ZBR, QDR, WHR, TAR із гарбуза and lu-17-14 із батата, мають aa заміщення R→L або H→L (рис.3.10).

Таким чином, не зважаючи на велику кількість повідомлень про виявлення ВОМ на рослинах ехінацеї у різних країнах світу, на сьогодні у Генбанку NCBI, окрім українського, депоновано послідовності лише трьох ізолятів ВОМ, виділених із рослин ехінацеї: ізолят WA-CMV із США (EU677748), CMV-ECH із Італії (EU432180) (Davino et al., 2012) та 2-1-2 із Китаю (EF088683) (Zhang et al., 2007).

На жаль, до нашого філогенетичного аналізу вони не були включені, так як послідовність італійського ізоляту – це послідовність білка руху вірусу, а послідовності CP американського та китайського ізолятів дуже частково перетинаються з нашою послідовністю. Відомо, що італійський ізолят за геном білка руху відноситься до ІА, а ізоляти WA-CMV та 2-1-2 відносяться до філогенетичної групи І.

Багаточисленні філогенетичні дослідження ВОМ демонструють, що до групи ІВ в основному відносяться ізоляти ВОМ з Азії та Близького сходу, на відміну від групи ІА та ІІ, до яких входять ізоляти з різних країн та континентів, велику частку серед яких займають ізоляти з Європи. Так, наприклад, дослідження Davino et al. (2012) 15-ти ізолятів ВОМ, виділених із ароматичних, квітково-декоративних і лікарських рослин в Італії, показали, що більшість (14) належать до групи ІА, 1 – до групи ІІ, та жодного до групи ІВ.

На відміну, багато з українських ізолятів, включаючи і досліджуваний ВОМ із рослин ехінацеї, належать до групи ІВ. Це може свідчити про спільне походження українських та азіатських штамів ВОМ. На

користь цього свідчать однакові амінокислотні заміни українських ізолятів групи ІВ та китайських гарбузових штамів у позиціях 9 та 78 досліджуваної ділянки гена *CP*.

## ВИСНОВКИ

1. Проведено вивчення деяких властивостей ізоляту вірусу огіркової мозаїки (ВОМ), що уражує рослини ехінацеї пурпурової. Встановлено, що симптомом ураження є жовта мозаїка та плямистість на листках. Ідентифікацію вірусу здійснено за допомогою ІФА та ЗТ-ПЛР.
2. Досліджено, що віріони ізоляту вірусу огіркової мозаїки з ехінацеї пурпурової CMV1 мають типову для кукумовірусів морфологію та розміри – сферичні діаметром  $30\pm 1$  нм.
3. За результатами філогенетичного аналізу ізолят CMV1 належить до групи ІВ. Має ідентичність 93,7-99,7% за нуклеотидною послідовністю та 86,4% до 100% за амінокислотною послідовністю ділянки гена капсидного білка з ізолятами цієї групи.
4. Найвищий відсоток ідентичності CMV1 має з українським томатним ізолятом CMV-ТоMP-2019 та гладіолусним ізолятом CMV-Gl-SkvP-20 (99,8% за нт і 100% за ак), а також з українськими ізолятами з овочевих культур Ukr-8, Ukr-sq13, Ukr-tom2 і Ukr-1409.
5. Встановлено наявність однакових амінокислотних заміщень у досліджуваній ділянці гена капсидного білка для CMV1, українських ізолятів з овочевих та китайських гарбузових ізолятів ВОМ, що може свідчити про спільне походження українських та азіатських штамів вірусу.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Остапченко, Л. І., Драницина, А. С., Гребіник, Д. М. (2017). *Методичні вказівки до навчальної дисципліни “Основи молекулярної діагностики”*. Київ: ВПЦ "Київський університет"
2. Поліщук, В.П., Будзанівська, І.Г., Шевченко, Т.П., Андрійчук, О.М., Компанець, Т.А., Кондратюк, О.А., Коротеєва, Г.В., Молчанець, О.В., Харіна, А.В., Шевченко, О.В. (2017). *Вірусологія: навч. посібник*. Київ: ЦП “Компринт”.
3. Салига, Ю., Снітинський, В. (1999). *Електронна мікроскопія біологічних об’єктів*. Київ: Світ.
4. Ahmed, A.A., Fath-Allah, M.M. (2011). Double infection with Cucumber mosaic virus and Plum pox virus (sharka) in apricot trees. *Int J Virol.*, 8(1). pp. 50–60.
5. Beckerman, T. (2001). Cucumber mosaic virus. *Yard & Garden Line News*, 3(14). pp. 21–23.
6. Béclin, C., Berthomé, R., Palauqui, J.C., Tepfer, M. and Vaucheret, H. (1998). Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology*, 252. pp. 313–317.
7. Bellardi, M.G., Rubies Autonell, C., Hudaib, M., Biffi, S. (2001). *Echinacea purpurea* L. Influence of Cucumber mosaic virus (CMV) on the mother tincture. *Natural 1*, 12. pp. 74–77.
8. Bruni, R., Bianchi A., Bellardi, M.G. (2007). Essential oil composition of *Agastache anethiodora* Britton (*Lamiaceae*) infected by cucumber mosaic virus (CMV). *Flavour and fragrance journal*, pp. 53-56.
9. Canto, T., Prior, D.A.M., Hellwald, K.-H., Oparka, K.J. and Palukaitis, P. (1997). Characterization of Cucumber mosaic virus. IV. Movement

protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of Cucumber mosaic virus. *Virology*, 237. pp. 237–248.

10. Davino, S., Panno, S., Rangel, E.A., Davino, M., Bellardi, M.G. and Rubio, L. (2012). Population genetics of cucumber mosaic virus infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Arch. Virol*, 157 (4). pp. 739-745.

11. Dikova, B. 2009. Establishment of some viruses – polyphagues on economically important essential oil-bearing and medicinal plants in Bulgaria. *Biotechnol & Biotechnological Eqpmt*. 23(sup1), pp. 80–84.

12. Dikova, B., Djourmanski, A. (2019). Influence of Virus Diseases on the Yield of the Medicinal Plant *Echinacea purpurea*. *Acta microbiologica bulgarica*, 35(2), pp. 66-70.

13. Doolittle, S.P. (1916). A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, 6. pp. 145–147.

14. Draeger, K.R. UW-Madison Plant Pathology (2022), D0036, *Cucumber mosaic*. [online]. Available at: <https://hort.extension.wisc.edu/articles/cucumber-mosaic/>

15. Engvall, E. (2010). The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*, 56(2). pp. 319-20.

16. Goto, K. , Kobori, T. , Kosaka, Y. , Natsuaki, T. and Masuta, C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b *Cucumber mosaic virus* based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol*, 48. pp. 1050–1060.

17. Guifen, L., Shuifang, Z., Qun, Z., Zongwei, S., Yongjiang, Z., Mingfu, L. (2007). Identification of Cucumber mosaic virus isolated from *Echinacea purpurea*. *Plant protection*, 1.

18. Guo, H.-S. and Ding, S.-W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene-silencing signal. *EMBO J*, 21. pp. 398–407.

19. Hudaib, M., Fiori, J., Bellardi, M. G. (2002). GC–MS analysis of the lipophilic principles of *Echinacea purpurea* and evaluation of *Cucumber mosaic cucumovirus* infection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, №6, pp. 1053-1060.
20. <https://ictv.global/report/chapter/bromoviridae/bromoviridae>
21. Ji, L.H. and Ding, S.-W. (2001). The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *Cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant–Microbe Interact*, 14. pp. 715–724.
22. Lewsey, M.G., Murphy, A.M., Maclean, D., Dalchau, N., Westwood, J.H., Macaulay, K., Bennett, M.H., Moulin, M., Hanke, D.E., Powell, G., Smith, A.G. and Carr, J.P. (2010). Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. *Mol. Plant–Microbe Interact*, 23. pp. 835–845.
23. Mishchenko, L.T., Dunich, A.A., Sereda, A.V., Hovaka, V.V., Veselsky, S.P. (2001). Content of cichoric and caftaric acid in *Echinacea purpurea* plants infected with viruses. In: Proceedings of Scientific Conference «Biologically active substances: Fundamental and Applied Problems». (2011, May 23–28, Novy Svet, Ukraine). pp. 292.
24. Mishchenko, L.T., Hovaka, V.V., Koreneva, A.A., Torop, V.V., Taran, O.P. (2009). Content of biologically active substances in virus infected medicinal plants. In: Proceedings of Scientific Conference «Biologically active substances: Fundamental and Applied Problems» (2009, May 25–30, Novy Svet, Ukraine). pp. 132.
25. Moorman, G. W. (2023). *Echinacea Diseases*. [online]. Available at: <https://extension.psu.edu/echinacea-diseases>
26. Mochizuki, T., Onki, S. T. (2011). Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants. [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00749.x>
27. Palukaitis, P. and García-Arenal, F. (2003a). Cucumber mosaic virus. *Descr. Plant Viruses*, 400.

28. Palukaitis, P. and García-Arenal, F. (2003b). *Cucumoviruses*, *Adv. Virus Res*, 62. pp. 241–323.
29. Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Francki, R.I. (1992). *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res*, 41. pp. 281–348.
30. Pellati, F., Epifano, F., Contaldo, N., Orlandini, G., Cavicchi, L., Genovese, S., Bertelli, D., Benvenuti, S., Curini, M., Bertaccini, A., Bellardi, M.G. (2011). Chromatographic Methods for Metabolite Pro-filing of Virus- and Phytoplasma-Infected Plants of *Echinacea purpurea*. *J Agric Food Chem.*, 59. pp. 10425–34.
31. Perry, K.L., Zhang, L., Shintaku, M.H. and Palukaitis, P. (1994). Mapping determinants in Cucumber mosaic virus for transmission by *Aphis gossypii*. *Virology*, 205. pp. 591–595.
32. Rangahau, M.K. (2001). *Echinacea – The purple coneflowers*. *Crop & Food Research*, 33. pp. 12–13.
33. Roossinck, M.J. (2001). Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Mol. Plant Pathol*, 2. pp. 59–63.
34. Roossinck, M.J., Sleat, D. and Palukaitis, P. (1992). Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiol. Rev*, 56. pp. 265–279.
35. Roossinck, M.J., Zhang, L. and Hellwald, K.H. (1999). Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of Cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J. Virol.* 73. pp. 6752–6458.
36. Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, 4(4). pp. 406–425.
37. Seo, J.K., Kwon, S.J., Choi, H.S. and Kim, K.H. (2009). Evidence for alternate states of Cucumber mosaic virus replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis. *Virology*, 383. pp. 248–260.

38. Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X.C. and Yuan, M. (2010). Cucumber mosaic virus movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell*, 22. pp. 1373–1387.
39. Yamamoto, T., Ishii, M., Sasaya, T., Iwasaki, M. (1993). Mosaic disease of Echinacea *Echinacea purpurea*, *Compositae Proc. Assoc. Pl. Protec. Shikoku*, 28. pp. 49–53.
40. Zhang, X. , Yuan, Y.-R. , Pei, Y. , Lin, S.-S. , Tuschl, T. , Patel, D.J. and Chua, N.-H. (2006). *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev*, 20. pp. 255–3268.
41. Zhang, Y.-J., Li, G.-F., Zhu, S.-F., Shi, Z.-W., Li, M.-F. (2007). The analysis on the characteristics of the coat protein genes of Cucumber mosaic virus isolated from *Echinacea purpurea* Moench. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 1, pp. 34–7.