

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЩЕТИНІНА ГАННА СЕРГІЇВНА

УДК 578.85/86

ДИСЕРТАЦІЯ

**МОЛЕКУЛЯРНО - БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ДЛЯ
УКРАЇНИ X-ВІРУСУ ХОСТИ**

03.00.06 – ВІРУСОЛОГІЯ

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Науковий керівник: Будзанівська Ірина Геннадіївна, доктор біологічних наук,
професор

КИЇВ – 2018

АНОТАЦІЯ

Щетиніна Г.С. Молекулярно-біологічна характеристика нового для України X-вірусу хости. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Для первинної ідентифікації ХВХ в Україні використовувались рослини *Hosta tratt* Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України.

Для детального дослідження зразки листя *Hosta tratt* відбиралися за візуальними симптомами, такими як: системний, прожилковий та міжжилковий хлорози, знебарвлення, скручування, гофрування та некротизація листків. Загалом було відібрано п'ять зразків хости чотирьох різних сортів: *Hosta Sum and substance* (1), *Hosta Sum and substance* (2), *Hosta Striptease*, *Hosta Lady Guinevere*, *Hosta X*.

В результаті серологічного дослідження методом ІФА з використанням Ат до X-вірусу картоплі було детектовано серологічний вірусний агент у зразку *Hosta Sum and substance* (зразок 2).

За допомогою електронно-мікроскопічного дослідження були візуалізовані вірусні частки з морфологією характерною для представників роду *Potexvirus*.

Для подальшої ідентифікації виявленого вірусу була проведена оптимізація та постановка ЗТ-ПЛР з використанням специфічної пари праймерів до ділянки гена капсидного білка ХВХ. В результаті був отриманий продукт ампліфікації відповідного розміру 706 п.о., який в подальшому був секвенований та депонований до Генбанку.

Послідовність гена капсидного білка українського ізоляту ХВХ була проаналізована за допомогою програми BLAST на онлайн ресурсі NCBI. Результати аналізу послідовностей вказують на майже 100% подібність з послідовностями ХВХ різних ізолятів представленими в Генбанку.

Український ізолят Х-вірусу хости був використаний для отримання специфічної антисироватки. Вірус був виділений з рослин хости сорту *Sum and substance*, очищений та сконцентрований методом диференційного центрифугування

Концентрація вірусу у препараті склала 3,1 мг/мл. Чистоту препарату встановлювали співвідношенням коефіцієнтів поглинання для амінокислот та для нуклеїнової кислоти (E_{260}/E_{280}), що склала 1,09.

Отриманий вірусний препарат використовувався для отримання антивірусної сироватки. Результати перевірки антисироватки методом імуноблоттингу підтвердили її специфічність, на це вказує утворення чіткої смуги при взаємодії ізоляту ХВХ із гомологічними Ат та відсутність реакцій Ат із рослинними білками з соку здорових рослин. Якість перевірили визначенням титру, робоче розведення антитіл склало 1:8000 при титрі 1:16000.

Була розроблена та апробована модифікація ЗТ-ПЛР з імунним захопленням з використанням власної діагностичної сироватки. Суть модифікації полягала у виділенні субгеномної РНК замість тотальної РНК. Адсорбовані специфічні антитіла утворювали комплекси антиген-антитіло з вірусними частками, після прогрівання препаратів отримували геномну вірусну РНК.

Для проведення ЗТ-ПЛР з імунним захопленням були відібрані 18 зразків рослин хости з Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка Національної академії наук України.

Візуалізація продуктів ампліфікації методом електрофорезу засвідчила наявність очікуваного продукту розміром 706 п.о. в 5-ти зразках. В

подальшому з метою встановлення динаміки поширення ХВХ в колекції ботанічних садів Києва проводився скринінг колекцій.

Розширений скринінг колекції рослин хости НБС ім. М.М. Гришка НАНУ у 2016 році встановив 18 ХВХ інфікованих сортів та видів. Однак серед зразків, в яких був детектований ХВХ, налічувалось 9 сортів рослин хости, які щойно надійшли до колекції ботанічного саду.

Результати скринінгу 5 видів рослин хости, представлених у колекції Київського ботанічного саду імені академіка Фоміна О.В. вказують на відсутність ХВХ у рослинах. Це пояснюється тим, що дана колекція не оновлюється імпортованими рослинами.

Проведений аналіз колекцій ботанічних садів міста Києва продемонстрував ефективність антивірусної сироватки до ХВХ.

За результатами дослідження спектру рослин індикаторів встановили, що український ізолят ХВХ спричинювати прояв системних хлоротичних симптомів на рослинах тютюну (*Nicotiana benthamiana*) та некротичні на рослинах перцю овочевого (*Capsicum annuum*). Методом ІФА встановлена наявність антигенів ХВХ тільки в зразках рослин тютюну (*Nicotiana benthamiana*) та перцю овочевого (*Capsicum annuum*).

Результати дослідження шляхів передачі визначили здатність Х-вірусу хости передаватися насінням.

Аналіз нуклеотидних послідовностей Х-вірусу хости виявив, що український ізолят має найвищий відсоток подібності (понад 99% за нуклеотидними послідовностями та біля 100% за амінокислотними послідовностями) з новозеландським, польським та американськими ізолятами.

Аналіз філогенетичних зв'язків вияв, що український ізолят утворив гілку з ізолятом з Чеської Республіки, вочевидь, вони мають спільного предка. Також було встановлено, що угруповання ізолятів ХВХ не

демонструють чітких географічних зв'язків, а також залежності від сортової приналежності рослин, з яких був ізольований патоген.

Методом *Next generation sequencing* вперше у Європі була отримана повногеномна послідовність ХВХ.

Аналіз повногеномної послідовності українського ізоляту ХВХ (6430 bp) (GenBank: KX033798.1) з іншими ізолятами продемонстрував 99% ідентичності з американським ізолятом HVX-37 та 97,5% подібності з ізолятом з Кореї, HVX-Kr. Усі ізоляти ХВХ утворили окрему кладу, відокремившись від ізолятів ХВК при 100% значенню бутстреп підтримки.

Була виявлена заміна амінокислоти у старт-кодоні ORF4 гена білка руху. Наявність неконсервативного старт-кодону підтвердилося додатковим секвенуванням за Сенгером. В українському ізоляті ініціація відбувається з кодона UUG, як і в ізолята зі Сполучених Штатів (U.S. isolate; JQ911698, однак у ізолята з Кореї такої заміни виявлено не було (Korean isolate; AJ620114).

Ключові слова: Х-вірус хости, повногеномна послідовність вірусу, насіннева передача вірусу хости, мутація канонічного стартового кодону трансляції.

SUMMARY

Shchetynina G. S. Molecular-biological characteristics of Hosta Virus X, which is new for Ukraine. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences, speciality 03.00.06 - virology. –Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

Dissertation describes results of a five-year study of the Ukrainian isolate of Hosta Virus X.

A serological viral agent has been detected in the sample of *Hosta Sum and substance* as a result of a serological study by ELISA using antibodies to potato Virus X.

Electron microscopy helped visualize viral particles with the morphology that is typical of the genus *Potexvirus*.

To further identify the detected virus, RT-PCR was optimized and performed using a specific primer pair to the area of the gene of the HVX capsid protein. As a result, an amplification product was obtained of the appropriate size of 706 b. p., which was subsequently sequenced and deposited in GenBank.

The sequence of the capsid protein gene of the Ukrainian HVX isolate was analyzed using the BLAST program on the NCBI online portal. The analysis results of the sequences indicate almost a 100% similarity to the HVX sequences of different isolates presented in the GenBank.

The Ukrainian isolate of Hosta Virus X was used to obtain a specific antiserum. The virus was isolated from hosta plants of the *Sum and substance* variety, it was purified and concentrated using differential centrifugation.

The virus concentration in the specimen was 3.1 mg/ml. The purity of the specimen was determined by the ratio of absorption coefficients for amino acids and for nucleic acid (E_{260} / E_{280}), which was 1.09.

The resulting virus preparation was used to obtain an antiviral serum. The results of checking the antiserum using immunoblotting confirmed its specificity, which is indicated by the formation of a clear strip when the HVX isolate interacts with homologous antibodies and the absence of antibodies reactions with the plant proteins from the sap of healthy plants. The quality was checked with a titre test, and the working dilution of the antibodies was 1:8000 with a titre of 1:16000.

A modification of RT-PCR with immune capture using own diagnostic serum was developed and tested. The essence of the modification was to isolate a

subgenomic RNA instead of a total RNA. The adsorbed specific antibodies formed antigen-antibody complexes with viral particles and obtained a genomic viral RNA after preparing the agents.

In order to carry out RT-PCR with immune capture, 18 samples of plants were selected from the M. M. Hryshko National Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine.

The visualization of the amplification products by electrophoresis showed the presence of the expected product in the size of 706 b. p. in 5 samples. Further, in order to establish the dynamics of the distribution of HVX in the collection of the botanical gardens of Kiev, screening of the collections was carried out.

An advanced screening of the plant collections of hosta of the M. M. Hryshko National Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine in 2016 detected 18 varieties and species infected with HVX. However, among the specimens with the detected HVX, there were 9 hosta plant varieties, which had appeared in the botanical garden collection just recently.

The results of screening of 5 hosta plant species presented in the collection of the Kyiv Botanical Garden named after Academician O.V. Fomin indicate that HVX is absent in these plants. This is due to the fact that no imported plants were introduced to this collection.

The analysis of the collections of the botanical gardens of Kyiv demonstrated the effectiveness of the antiviral serum to HVX.

Based on the results of the study of the plant indicators spectrum, it was discovered that the Ukrainian HVX isolate caused systemic chlorotic symptoms in tobacco plants (*Nicotiana benthamiana*) and necrotic symptoms in the vegetable pepper plants (*Capsicum annuum*). The ELISA method detected the presence of HVX antigens only in samples of tobacco plants (*Nicotiana benthamiana*) and vegetable pepper (*Capsicum*). The virus transmission capacity by seeds of infected plants was ascertained.

Total RNA was extracted from plant material and a 706-bp fragment corresponding to nt position 5722–6448 in HVX-Kr was amplified in RT-PCR from the samples of 'Sum and Substance', 'Ultraviolet Light', 'Gold Standard', 'Halcyon', 'Great Expectations' and 'Crispula'.

All isolated RNA samples were pooled to synthesize a cDNA library for the next generation sequencing using TruSeq siRNA kit (Illumina) in order to identify all possible viruses. Sequencing was carried on HiSeq2500 rapid flow-cell with 50 bp single reads (Illumina). Reads were subsequently trimmed to remove kit-derived adaptor sequences using Fast X toolbox. De novo contig assembly was done using Oases 0.2.08. The assembled contigs were analysed using BLASTn program 2.2.28+. The ends of the HVX genome were verified by RACE using RNA purified from virus particles as a template.

The assembled sequence representing the complete genome of HVX-Ukr (Ukrainian isolate) was deposited in GenBank (KX033798). In complete genome ClustalO alignments, HVX-Ukr presented 99 % homology to HVX-37 and 97.5 % homology to HVX-Kr. Notably, HVX-Ukr genome 5' end showed some differences from other two isolates. Also, the region of movement protein start codon was additionally analysed by Sanger sequencing to confirm the presence of nonconventional start codon (UUG) previously identified in HVX-37 (U.S. isolate; JQ911698) but not in HVX-Kr (Korean isolate; AJ620114).

This is the first complete genome sequence of HVX isolate from Europe and the first evidence of HVX occurrence in Ukraine.

Key words: Hosta Virus X, genomic HVX sequence, HVX seed transmission, translation start codon mutation.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. First detection of Hosta Virus X in Ukraine / Shchetynina G., Budzanivska I., Kharina A., Pereboychuk O. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2012. – №62. – С. 48-50. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі літературних джерел та узагальнені результатів досліджень).*
2. Phylogenetic analysis of Hosta Virus X in Ukraine / Shchetynina G., Budzanivska I., Kharina A., Pereboychuk O. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2013. – №65. – С. 68-71. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі літературних джерел та узагальнені результатів досліджень).*
3. Серологічна діагностика X вірусу Хости в рослинах роду Hosta tratt. / Щетиніна Г.С., Харіна А.В., Перебойчук О.П., Будзанівська І.Г. Агроекологічний журнал. – 2015. – №3. – С. 98-101. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі літературних джерел та узагальнені результатів досліджень).*
4. X - вірус хости – небезпечний рослинний патоген / Щетиніна Г.С., Косенко Ю.А., Будзанівська І.Г. // Карантин та захист рослин – 2016. – №1 – С.17-19*(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі літературних джерел та узагальнені результатів досліджень).*
5. The host range for Ukrainian isolate for hosta virus X (HVX) / G.A. Shchetynina, I.I. Prokopenko, I.G Budzanivska // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України, – 2016 – № 1 (58). – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2016_1/4.pdf. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі літературних джерел та узагальнені результатів досліджень).*
6. First report of Hosta virus X infecting hosta plants in Ukraine / Shchetynina A., Budzanivska I., Pereboychuk O., Somera M., Truve. E. // Acta virologica. –

2017 – № 61 – Р: 498 – 499 (*Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі літературних джерел та узагальнені результатів досліджень*).

7. Diagnostics of Hosta virus X in Ukraine/ Щетиніна Г.С., Харіна А.В., Будзанівська І.Г. // Вірусологія: минуле, сьогодення, майбутнє: 12 квітня 2012 р.: збірник тез. – К., 2012. – С. 85.
8. Молекулярно біологічна характеристика Х-вірусу хости виділеного з колекції Національного ботанічного саду М.М. Гришка НАНУ / Щетиніна Г.С., Стахурська О.В., Харіна А.В., Будзанівська І.Г. // «Біоресурситавіруси»: VII Міжнародна конференція, 10-13 вересня 2013 р.: збірник тез. – К., 2013. – С. 102.
9. Detection of Hosta virus X in Ukraine / Shchetynina A., Budzanivska I. // Global Virus Network conference of virologists for the Scandinavia-Baltic-Ukraine region: June 11th - 13th 2014.: Abstracts book. – E., 2014. – P. 145.
10. Monitoring of Hosta virus X in Ukraine/ Shchetynina G., Kharina A., Budzanivska, Polishuk V. // 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology «Healthy plant – healthy people»: September 8 th -13 th, 2014.: Abstracts book. – C., 2014. – P. 228.
11. Dynamics of spread of HVX in Hosta plants collection of Gryshko' National Botanical Garden / Shchetynina G., Pereboychuk O., Budzanivska I. // «Bioresources and viruses»: VIII Міжнародна конференція, 12-14 вересня 2016р.: збірник тез. – К., 2016. – С. 116-118.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	13
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1 Загальна характеристика хости (<i>Hósta spp</i>)	21
1.2 Шкідники та патогени хости	25
1.3 X-вірус хости – небезпечний патоген	26
1.4 Механізми поширення та симптоми ХВХ	27
1.5 Характеристика геному, фізико-хімічні властивості віріонів та стратегія реплікації ХВХ	34
1.6 Філогенетични зв'язок між різними ізолятами ХВХ	37
1.7 Методи детекції ХВХ	43
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	
2.1 Матеріали дослідження	45
2.2 Метод візуальної діагностики рослин хости	51
2.3 Імуноферментний аналіз	52
2.4 Виділення тотальної РНК	54
2.5 Виділення вірусної РНК методом імунного захопленням	55
2.6 Зворотньоотранскрипційна полімеразна ланцюгова реакція	55
2.7 Електрофорез в агарозному гелі	56
2.8 Виділення, очистка та концентрація вірусу методом диференційного центрифугування	57
2.9 Метод електронної мікроскопії. Підготовка сіточок-підкладинок.	58
2.10 Спектрофотометричне визначення концентрації та чистоти вірусного препарату	59
2.11 Електрофорез в поліакриламідному гелі за Леммлі	59
2.12 Імуноелектроблотинг	60
2.13 Імунізація лабораторних тварин. Отримання	

та приготування антивірусної сироватки	61
2.14 Титрування антивірусної сироватки	62
2.15 Визначення спектру рослин-індикаторів методом біотестування	63
2.16 Дослідження здатності Х-вірусу хости до насінневої передачі	64
2.17 Виділення субгеномної РНК (18s & 28s)	65
2.18 Приготування ДНК-бібліотек	66
2.19 Філогенетичний аналіз	69
2.20 Визначення впливу добору	70
2.21 Статистична обробка	70
РОЗДІЛ 3 ПЕРВИННА ДЕТЕКЦІЯ ХВХ ХОСТИ В УКРАЇНІ	72
РОЗДІЛ 4 ОТРИМАННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АНТИСИРОВАТКИ ДО ХВХ	78
РОЗДІЛ 5 СКРИНІНГ КОЛЕКЦІЙ ХОСТИ	84
РОЗДІЛ 6 БІОЛОГІЧНЕ ТЕСТУВАННЯ УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ ХВХ, ВСТАНОВЛЕННЯ СПЕКТРУ РОСЛИН-ІНДИКАТОРІВ ТА МОЖЛИВИХ ШЛЯХІВ ПЕРЕДАЧІ	93
РОЗДІЛ 7 ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ Х - ВІРУСУ ХОСТИ АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	98 114
ВИСНОВКИ	119
СПИСОК ПОСИЛАНЬ	121
ДОДАТКИ А	131

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Аг	Антиген
Ат	Антитіло
Ат2	Антивидові антитіа
ЕМ	Електронний мікроскоп
ЗТ - ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотньою транскрипцією (RT- PCR - reverse transcription polymerase chain reaction)
ІФА	Імуноферментний аналіз
КБК	Карбонатний буфер
ПЕГ	Поліетиленгліколь
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція
ТТІ	Точка температурної інактивації
ХВХ	Х-вірус хости (HVX - Hosta Virus X)
ArMV	Вірус мозаїки резухи (<i>Arabidopsis mosaic virus</i>)
AltMV	Вірус мозаїки альтернантерії (<i>Alternanthera mosaic virus</i>)
BLAST	Базова програма порівняльного пошуку послідовностей (Basic Local Alignment Search Tool)
CLUSTALW	Функція для вирівнювання послідовностей
СР	Білок оболонки (Coat protein)
CsCMV	Вірус мозаїки маніюки (<i>Cassava common mosaic virus</i>)
CLBV	Вірус плямистості цитрусового лисття (<i>Citrus leaf blotch virus</i>)
CVX	Х-вірус кактусу (<i>Cactus virus X</i>)
EPPO	Європейська організація захисту рослин (European and Mediterranean Plant Protection Organization)
FEL	метод визначення ймовірності фіксованих ефектів (the fixed-effects likelihood method)
FUBAR	метод визначення швидкої природної апроксимації Баєса (the fast unconstrained Bayesian approximation method)

HdRSV	Вірус кільцевої плямистості гортензії (<i>Hydrangea ringspot virus</i>)
HVX-Kr	Корейський ізолят ХВХ (<i>Hosta virus X, Korea</i>)
HVX - 37	Американський ізолят ХВХ (<i>Hosta virus X, USA</i>)
IFEL	Метод визначення внутрішньо фіксованих ефектів (the internal branch fixed-effects likelihood method)
INSV	Вірус некротичної плямистості бальзаміну (<i>Impatiens necrotic spot virus</i>)
MEGA7	Молекулярно еволюційно генетичний аналіз (molecular evolutionary genetics analysis)
MEME	Метод визначення впливу добору при змішаній моделі еволюції (the mixed effects model of evolution method)
NJ	Метод об'єднання найближчих сусідів (Neighbor-Joining)
ML	Метод максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood)
MUSCLE	Функція для вирівнювання послідовностей
NCBI	Національний центр біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information)
ORF	Відкрита рамка зчитування (open reading frame)
PBS	Натрій-фосфатний буфер (Phosphate buffered saline)
PiAMV	Азіатський вірус мозаїки подорожника (<i>Plantago asiatica mosaic virus,</i>)
PapMV	Вірусом мозаїки папайї (Versatile papaya mosaic virus)
PuTTY	Вільно розповсюджуваний клієнт для різних протоколів віддаленого доступу
RDRP	РНК залежна РНК полімераза (RNA-dependent RNA polymerase)
sgRNA	single guide RNA
SDS	Лаурилсульфат натрія (sodium lauryl sulfate)
SLAC	Метод визначення ймовірності одного спільного предка (the single-likelihood ancestor)

TBE	Тріс-боратний буфер (Tris/Borate/EDTA buffer)
TGB	Потрійний блок генів (<i>Triple gene block</i>)
TRV	Вірус брязкотіння тютюну (<i>Tobacco rattle virus</i>)
TSWV	Вірус плямистого зів'янення томатів (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)
TRSV	Вірус кільцевої плямистості тютюну (<i>Tobacco ringspot virus</i>)
ToRSV	Вірус кільцевої плямистості томатів (<i>Tomato ringspot virus</i>)
TVX	X-вірус тюльпана (<i>Tulip virus X</i>)

ВСТУП

Актуальність теми. X-вірус хости (ХВХ) – небезпечний патоген, що належить до родини *Alphaflexiviridae*, рід *Potexvirus*, та інфікує хосту. *Hosta tratt* – це трав'яниста багаторічна тіневитривала рослина – яскравий представник родини *Liliacea*. В Україні рослини хости використовують в декоративному квітникарстві, озелененні і створенні ландшафтних композицій. На світовому ринку садових культур рослини хости посідають перше місце за обсягом збуту [1-3]. Така популярність сприяє збільшенню кількості нових сортів, яких на сьогодні налічують більше 12 тисяч [4,5].

У комерційних розплідниках є актуальною проблема первинного інфікування рослин X-вірусом хости [6]. Масове інфікування рослин зумовлене механічною трансмісією патогена. Вчасному діагностуванню збудника перешкоджає тривала безсимптомна персистенція вірусу в уражених рослинах. З часом на уражених рослинах розвиваються локальні та системні вірусні симптоми: мозаїка, хлороз, скручування, гофрування, знебарвлення чи зміна кольору лисття, карликовість. X-вірус хости був детектований в багатьох Європейських країнах, на території Південної Америки, Австралії, Нової Зеландії. Саме тому Європейська організація захисту рослин (EPPO) внесла X-вірус хости до переліку потенційно карантинних збудників [7].

На сьогоднішній день не існує ефективних методів оздоровлення інфікованих X-вірусом хости рослин. Досвід західних дослідників демонструє неефективність хімічних препаратів для боротьби з вірусною інфекцією. Їх використання приносить шкоду як рослині, знижуючи її природну здатність протидіяти вірусу, так і здоров'ю людини за рахунок токсичності та канцерогенності певних її компонентів [1,2,6].

Найбільш перспективним методом боротьби з Х-вірусом хости є попередження його поширення. Рання діагностика дозволить вилучати інфіковані рослини і вчасно зупинити епідемію [8, 9].

Зважаючи на це, актуальним є вирішення наступних завдань: встановлення наявності ХВХ в Україні та його циркуляції, вивчення молекулярно-біологічних характеристик і філогенетичних зв'язків українського ізоляту з іншими світовими ізолятами, отримання специфічної антисироватки для ідентифікації збудника.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота виконувалась у межах науково-дослідницької роботи кафедри вірусології ННЦ «Інституту біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за темою «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій». Номер держреєстрації: 0111U004649.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було вивчення молекулярно-біологічних властивостей українського ізоляту Х-вірусу хости, встановлення його філогенетичних зв'язків з іншими ізолятами ХВХ, вивчення особливостей будови геному українського ізоляту ХВХ.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

1. Детектувати Х-вірус хости.
2. Отримати специфічну антисироватку для подальшої діагностики Х-вірусу хости методом ІФА та ЗТ-ПЛР з імунним захопленням.
3. Провести скринінг колекцій хост ботанічних садів на наявність ХВХ.
4. Дослідити біологічні властивості українського ізоляту ХВХ.
5. Отримати повногеномну послідовність українського ізоляту ХВХ.
6. Провести філогенетичний аналіз та встановити походження українського ізоляту ХВХ. З'ясування можливих шляхів потрапляння вірусу в Україну

Об'єкт дослідження: Х-вірус хости.

Предмет дослідження: молекулярно-біологічні властивості та філогенетичний аналіз українського ізоляту Х-вірусу хости.

Методи дослідження: візуальне обстеження колекцій хости, біологічне тестування, твердофазний імуноферментний аналіз в модифікації «непрямий», електронна мікроскопія, спектрофотометричне визначення концентрації та чистоти вірусного препарату, екстракція тотальної РНК, електрофорез в поліакридамідному гелі за модифікацією Лемлі, імуноелектроблоттинг, полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією, електрофорез у агарозному гелі, створення ДНК-бібліотек, визначення нуклеотидних послідовностей гена білка оболонки (секвенування), філогенетичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. На території України Х-вірус хости був детектований вперше. Проведено скринінг ХВХ найбільших колекцій ботанічних садів України. Були визначені та зареєстровані в NCBI нуклеотидні послідовності гена білка оболонки українського ізоляту ХВХ (GenBank KJ406186.1). Філогенетичний аналіз ХВХ показав низький рівень дивергенції та високий рівень ідентичності ділянки капсидного білка. Встановлено високий відсоток гомології послідовностей українського ізоляту з новозеландським, іранським та американським ізолятами, що вказує на можливі шляхи потрапляння в Україну Х-вірусу хости.

Практичне значення одержаних результатів.

В ході роботи було отримано високоякісну діагностичну сироватку для діагностики Х-вірусу хости методом ІФА. Також було запропоновано ефективну методику діагностики ХВХ у тканинах хости методом ІФА. Отримана повногеномна послідовність ХВХ дозволила вивчити особливості геному українського ізоляту вірусу. Встановлено еволюційні зв'язки українського ізоляту з представниками виду та роду вірусу. Розроблено методичні рекомендації для постановки ЗТ-ПЛР, які будуть

використовуватися в навчальному процесі кафедри вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною роботою автора. Всі етапи роботи, в тому числі пошук інформації, опрацювання літературних джерел, розробка схем експерименту, отримання експериментних даних, їх узагальнення та інтерпретація автором дисертації, були здійснені особисто.

Формування основних положень і висновків дисертаційної роботи, а також підготовка публікацій на основі отриманих результатів проведені за участю наукового керівника д.б.н., професора І.Г. Будзанівської.

Частина досліджень виконано на базі лабораторії Талліннського технічного університету, Естонія (зав. лабораторії Ерркі Труве, с.н.с. Меріке Сомера): виділення субматричних РНК, створення ДНК-бібліотек, повногеномне секвенування. Автор висловлює щире подяку естонським колегам за корисні поради і допомогу в плануванні, проведенні експерименту та обговоренні результатів.

Апробація результатів

The Conference dedicated to 50-th Anniversary of the Virology Department «Virology: the past, the present, the future», Kyiv, Ukraine, April 12th, 2012: Diagnostics of Hosta virus X in Ukraine.

VIIth International Conference Bioresources and viruses, September 10-13th, Kyiv, Ukraine 2013.

Global Virus Network conference of virologists for the Scandinavia-Baltic-Ukraine region. 11th - 13th of June in Laulasma, Estonia.

11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology. September 8-13th in Cracow, Poland, 2014.

VIII International conference «Bioresources and viruses», 12-14th September, Kyiv, Ukraine, 2016.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 11 робіт, які входять до переліку фахових журналів, з них 6 статей, 5 – тези в матеріалах конференцій. Права співавторів не порушені.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційну роботу викладено на 132 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи», розділу власних досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку літератури (104 посилань), додатків. Фактичний матеріал дисертації подано у вигляді 45 рисунків і 3-ох таблиць.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика хости (*Hosta spp.*)

Хоста (лат. *Hosta spp.*), або функія, це багаторічна трав'яниста рослина, що належить до порядку *Liliaceae*, родина *Hostaceae* (*Hosta Family*), названа на честь австрійського лікаря і ботаніка Ніколауса Хоста. Інша її назва – функія, під якою раніше був відомий цей рід, була дана на честь німецького вченого Генріха Функа [1, 10].

Вологолюбиві хости у диких умовах ростуть на берегах річок та струмків, на схилах гір та лісових галявинах. Історичний ареал хости – Східна Азія (Корея, Китай, Японія), Далекий Схід, Сахалін та Курильські острови. В Європу хоста була завезена саме з Японії ще в XVIII столітті. Коли хоста з'явилася в Англії, спочатку вона не привернула особливої уваги, утім після потрапляння до Нового Світу, вона дуже швидко стала популярною рослиною. Сьогодні у США існує велика кількість асоціацій хостолюбителів. Крім того, США посідає перше місце за об'ємом виробництва та продажем рослин хости у світі [11].

Велика кількість сортів та видів хости обумовлена розмаїттям розмірів та форм рослин. Хости бувають карликові, мініатюрні, від 20 см заввишки, та гігантські, висота яких сягає одного метра. Листя в прикореневій розетці росте на коротких стеблах, численне та різноманітне за формою, від вузьколанцетовидних до широкояйцевидних. Забарвлення буває світло-зеленим, салатовим, синьо-зеленим, яскраво-золотим, жовтим, синім, фіолетовим, бузковим, нерідко зустрічається ряболисте забарвлення. Текстура листка теж різна, листя може бути гладким або злегка гофрованим, блискучим або покритим матовим нальотом. Квітоноси високі, до ста сантиметрів, з незначною кількістю листя; суцвіття китичковидне, зазвичай однобоке; оцвітина шестинадрізна, лійчаста або дзвонovidна, забарвлення

бузкове або фіолетове, рідше біле. Плід – тригранна шкіряста коробочка; насіння чорне, плоске, крилате. [12].

Номенклатурна класифікація рослин хост виглядає наступним чином: порядок *Liliacea*, родина *Hostaceae* (*Hosta Family*), рід *Hosta*, *Hosta spp.* Родина налічує близько 23 видів, серед яких:

- *H. albofarinosa*
- *H. capitata*
- *H. clausa*
- *H. gracillima*
- *H. hypoleuca*
- *H. jonesii*
- *H. kikutii*
- *H. kiyosumiensis*
- *H. longipes*
- *H. longissima*
- *H. minor*
- *H. plantaginea*
- *H. Japonica*
- *H. pulchella*
- *H. pycnophylla*
- *H. rectifolia*
- *H. rupifraga*
- *H. shikokiana*
- *H. sieboldiana*
- *H. sieboldii*
- *H. tsushimensis*
- *H. ventricosa*

- *H. venusta*
- *H. yingeri*

Кількість сортів рослин хости за визначником Зіліса сягає 7000 штук [1]. Щороку нові сорти створюються в результаті схрещування рослин різних видів та сортів. У випадку подальшого розмноження через насіння сортова приналежність втрачається, тому рослини хости розмножують вегетативним шляхом.

Хоста – не лише краса квітника, а й лікарська рослина. Так, наприклад, у листі та квітках *H. plantaginea* та *H. lancifolia* містяться в значній кількості флавоноїди, які проявляють широкий спектр біологічної дії [13].

В Україні цю невибагливу та тіневитривалу рослину уподобали як професійні ландшафтні дизайнери, так і садівники-любителі. Хоста здобула таку популярність завдяки розмаїттю форм та кольорів (Рис 1.1 – 1.4).



Рис 1.1 Зовнішній вигляд *Hosta Patriot*, *Hosta Golden Tiara*, *Hosta Lemon Lime*, *Hosta Gracillima* [14]



Рис 1.2 Зовнішній вигляд *Hosta Creed 400*, *Hosta Frances Williams* [15]



Рис. 1.3 Зовнішній вигляд *Hosta Albo Marginata*, *Hosta Big Deddy*, *Hosta Golden Tiara* [15]



Рис. 1.4 Зовнішній вигляд *Hosta Fortunei Mineteman*, *Hosta Undulata*, *Hosta Undugata Variegata* [14]

Рослини хости використовують для озеленення в багатьох містах нашої країни, нерідко можна зустріти її і в приватних квітниках. Однак найбільшу колекцію різних видів та сортів рослин хости зібрав Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України.

1.2 Шкідники та патогени хости

Тривалий час існувала думка про те, що рослини роду *Hosta* стійкі до ураження хворобами і шкідниками. Натомість, протягом останнього десятиріччя деякі з виробників посадкового матеріалу відмічали появу незвичних візерунків на листках рослин і помилково виділяли ці рослини як представників окремих сортів [16].

Незважаючи на стійкість хости, її уражує низка шкідників. Зокрема, антракноз (*Anthracnose*) – захворювання яке викликається грибами роду *Colletotrichum*, збудник спричинює появу великих рясних плям, деформацію і розшарування листкової пластинки [17]. Для боротьби з антракнозом рекомендують помірне зрошування рослини, уникання перегріву рослини та видалення уражених листків. Також для боротьби з мікозами використовують фунгіцидні препарати, дія яких ефективна протягом всього періоду вегетації у випадку оброблення рослини на початку сезону. Інформації щодо стійких до ураження грибами сортів хости немає, а от одним з найчутливіших видів хости є *Hosta Tokudama* [18].

Існує перелік інших, менш поширених грибкових збудників, що уражують листя хости: *Cercospora*, *Botrytis* і *Phytophthora*.

Sclerotium rolfsii та *Sclerotium delphinii* призводить до гниття черешків. Цим грибковим збудникам важко протидіяти: при вологій та теплій погоді відбувається швидке розростання міцелію, активні грибкові ферменти розщеплюють коріння хости, що призводять до в'янення листя та загибелі рослини. Для попередження хвороби перед висадкою у землю рекомендується оглядати коріння рослини на наявність склеротій [17].

Подібні симптоми здатен викликати *Fusarium hostae*. Гриб виживає у ґрунті протягом тривалого часу. Карликовість, недорозвинена коренева система та знебарвлення у середині розетки рослини головні симптоми фузаріозу. Інфіковану рослину слід знищити, а для попередження

подальшого інфікування слід обробляти садовий інвентар дезінфікуючими та протигрибковими розчинами.

Серед шкідників, які уражують рослини хости, є білокрилки, попелиці, мурашки. Тварини, такі як олені, миші і полівки, можуть обгризати листя рослини. Після дощів на листках хости можна спостерігати дірки, утворені слимаками і равликами.

Рослини хости можуть бути інфіковані низкою вірусних агентів родів *Tospovirus*, *Nepovirus*, *Tobravirus* та *Potexvirus* [18]. Представники цих родів уражують рослини за допомогою переносників. Однак X-вірус хости, представник роду *Potexvirus*, є єдиним збудником, який не має здатності до векторної передачі. Так, *Impatiens necrotic spot virus (INSV)* та *Tomato spotted wilt virus (TSWV)*, які належать до роду *Tospovirus*, передаються трипсами [19]. *Tobacco ringspot virus (TRSV)*, *Tomato ringspot virus (ToRSV)*, та *Arabidopsis mosaic virus (ArMV)*, що є представниками роду *Nepovirus* та представник роду *Tobravirus*, *Tobacco rattle virus (TRV)*, передаються нематодами *Xiphinema americanum* [20 -22].

Віруси *INSV* та *TSWV* спричиняють появу кільцевих плям різного розміру на листках інфікованої хости. *ToRSV* та *TRSV* спричиняють появу маленьких та великих хлоротичних плям. [23] Ці віруси були виявленні випадково, як компоненти змішаної інфекції при детектуванні ХВХ. *ArMV* вперше був виявлений садівниками в Міннесоті [24]. *ArMV* спричиняє появу симптомів, подібних до тих, що спричиняють *ToRSV* та *TRSV* [25, 26]. Перше повідомлення про інфікування хости *TRV* – датується 1996 роком і не має постійного характеру, на відміну від X вірусу хости [27].

1.3 X-вірус хости – небезпечний патоген

ХВХ був вперше описаний в США у 1996 році Софією Куррі та Беном Логхартом [28]. Збудник був детектований у штатах Міннесота, Іллінойс, Іова та Індіана. На рослинах, з яких був виділений збудник, спостерігали

розвиток різних симптомів: системний, прижилковий, міжжилковий хлорози, знебарвлення листкової пластинки, скручування та гофрування листка, некроз.

З роками популярність рослин хости зумовила і швидко поширеність Х-вірусу хости у світі. Почали з'являтися все нові і нові повідомлення про детекцію збудника. Інфіковані рослини були знайдені в усьому Середньому заході США та в Канаді. У 2007 році опубліковано повідомлення про детекцію ХВХ у Польщі [29]. У 2011 році ХВХ був детектований у Італії [30]. У 2012 році – у Новій Зеландії [31, 32], у 2013 році повідомлення про детекцію ХВХ надійшло з Китаю [33].

За останніми даними ХВХ виявили у таких регіонах світу: країни Європейської організації захисту рослин: Чеська Республіка, Фінляндія, Франція, Італія, Нідерланди, Польща, Україна [30]; Азія: Китай та Республіка Корея. Північна Америка: Канада (Британська Колумбія, Квебек, Онтаріо); США (штати Коннектикут, Іллінойс, Індіана, Іова, Канзас, Мериленд, Массачусетс, Мічіган, Міннесота, Огайо, Пеннсильванія, Теннессі, Вірджинія, Вісконсін); Океанія: Нова Зеландія (Північний острів) [34, 35].

1.4 Механізми поширення та симптоми ХВХ

Проблема розповсюдження Х-вірусу хости обумовлена високою швидкістю поширення збудника. Дослідження механізмів розповсюдження ХВХ у природних умовах продемонстрували здатність вірусу до механічної передачі із соком, через пошкодженні ділянки рослини. Такий тип поширення вірусу у природних умовах можна спостерігати при сильних вітрах, що можуть призводити до пошкодження рослин та їх органів, однак випадки такого інфікування вважаються спорадичними та не несуть системного характеру.

ХВХ передається механічним шляхом, через сік рослин, корінням в ґрунті, через рослинні рештки, а також шляхом вегетативного розмноження, [36].

Слід зазначити, що сама людина сприяє активному поширенню Х-вірусу хости. Як правило це відбувається при проведенні різноманітних агротехнічних заходів за умови механічного пошкодження хворої рослини. Так, при пересаджуванні, прополюванні, пасинкуванні сік потрапляє на руки, одяг або знаряддя праці, садовий інвентар і переноситься у такий спосіб на поранені здорові рослини. Також це може траплятися при поливі рослин [8].

Під час роботи з хостами необхідно враховувати, що інфікований рослинний матеріал має свій термін зберігання. Сік інфікованої рослини при кімнатній температурі зберігає свою інфекційність впродовж декількох тижнів, при температурі +4°C вірусні частки у рослинному матеріалі зберігають інфекційність протягом десяти тижнів, свіжий рослинний матеріал завжди інфекційний, у сухому листі інфекційна здатність зберігається впродовж декількох місяців, в замороженому – до чотирьох років. У природних умовах ХВХ «зимує» в коренях у ґрунті [38].

Пора року відіграє важливу роль при інфікуванні хости. Так, найбільш ймовірний розвиток продуктивної інфекції при інокуляції припадає на весну і майже не можливий пізньою осінню, що пов'язано з природними життєвими циклами рослини. Вік рослин також впливає на розвиток захворювання: вірус набагато швидше проникає та розповсюджується у молодих рослинах [39].

Тип вірусних симптомів при продуктивній інфекції та ступінь їх вираженості залежить від сорту рослини. Інфекція може залишатися не проявленою впродовж років після моменту інокуляції. Інфекційність вірусу залежить від стадії розвитку рослин та не залежить від його концентрації в рослинному матеріалі. Бланшетт і Локхарт класифікували реакцію рослин хости різних сортів на інфікування ХВХ за п'ятьма

категоріями: дуже сприйнятливі, помірно чутливі, злегка чутливі, стійкі та імунні [37].

Симптоми ХВХ поділяють на такі типи в залежності від характеру проявлення:

1) пригнічення росту рослини – можливе вираження загальної затримки росту рослини; скорочення міжвузля; пригнічення зростання коротких пагонів, на яких формуються квітки та плоди, з одночасним утворенням видовжених, безплідних пагонів;

2) зміна забарвлення – листя набуває мозаїчного забарвлення, що викликано чергуванням світло- і темнозелених ділянок різної форми;

3) деформація органів – відбувається з причини нерівномірного зростання окремих ділянок тканин листя, квіток, плодів;

4) локальні некрози – зазвичай сірого, бурого, коричневого, чорно-коричневого кольору, округлої і витягнутої форми, іноді з обляміркою;

5) порушення репродуктивних функцій рослин при вірусному захворюванні може проявлятися у вигляді стерильності квіток, безнасічних плодів, опадання цвіту і зав'язей;

б) різні нарости, пухлини, потовщення і ямкуватість.

Вірусний збудник здатний викликати прояв декількох типів симптомів одночасно [36].

Інфіковані рослини хости тривалий час можуть не демонструвати жодних симптомів або проявляти їх широкий спектр [16]. Характерними симптомами при ХВХ інфекції є мозаїка та хлороз. Мозаїка характеризується світлозеленими, жовтими чи білими смугами. В залежності від інтенсивності чи штрихуватості цих зон, мозаїчні симптоми розділяють на штрихуваті, крапчаті, кільцеві, міжжилкові та хлоротичні. Хлоротичні симптоми проявляються в результаті активного розмноження вірусу в середині рослинних клітин, що спричиняє порушення утворення хлорофілу в листках. При цьому листкова пластина жовтіє та знебарвлюється, а прожилки

залишаються зеленими. Малюнок хлорозу схожий на зигзаги. Симптоми типу *Ink-bleed* («розпливання чорнил») локалізовані головним чином вздовж жилок листя.

Розвиток вірусної інфекції провокує затримку росту рослин, карликовість, зморшкуватість, скручування листя, некротизацію і відмирання рослини або її частин (Рис. 1.5 -1.7). [39].



Рис. 1.5 Вірусоподібні симптоми на *Hosta Gold Standart* [42]



Рис. 1.6 Мозаїчні симптоми на *Hosta Gold Standart* [42]



Рис 1.7 Хлоротичні кільця на листках рослини *Hosta Royal Standard* [42].



Рис 1.8 Синьо-зелена плямистість на *Hosta Sum and Substance*. [43]



Рис. 1.9 Прижилковий хлороз на листках *Hosta tratt*. [43]



Рис. 1.10 Міжжилковий зигзаговидний хлороз листкової пластинки на *Hosta Gold Standard* [43]



Рис 1.11 Деформація, гофрування та пожухлість листя на *Hosta Climax* [43].



Рис 1.12 Некротичні кільця на *Hosta Albomarginata* [43].

Слід зауважити, що з року в рік прояв симптомів у інфікованої рослини прогресує. Наприклад, якщо у минулому році реакція рослини була

незначною, то у наступному сезоні вірусні симптоми можуть активно проявитися у вигляді системного хлорозу та висихання (Рис 1.13).



Рис 1.13 Системний хлороз, крапчасті симптоми, гофрування листової пластинки, висихання та пожухлість листя [41]

В цілому зовнішні прояви вірусної інфекції характерні для кожного сорту хости і можуть варіювати. Іноді інфіковані рослини демонстрували незвичайний прояв вірусних симптомів, що сприймався садівниками як нові гібридні види. Таким чином, в результаті активного схрещування між інфікованими рослинами утворилися “нові сорти”, такі як *Hosta Leopard Frog*, *Hosta Blue Freckles*, *Hosta Lunacy*, *Hosta Eternal Father*, *Hosta Kiwi Watercolours*, *Hosta Breakdance*. “Нові” сорти користувалися попитом на ринку і таким чином зумовили швидке розповсюдження вірусу Сполученими Штатами Америки [40].

В результаті селекційного схрещування «золотих» сортів хости була створена низка сприйнятливих до X-вірусу хости рослин, тобто таких, які не здатні чинити опір інфекції та на яких одразу проявляються вірусні симптоми: *Hosta Sum and Substance*, *Hosta Golden Tiara*, *Hosta Gold Standard*. Слід зазначати, що всі три представники є рекордсменами з продажів.

1.5 Характеристика геному, фізико-хімічні властивості віріонів та стратегія реплікації ХВХ.

Х-вірус хости має типову морфологію, характерну для представника роду *Potexvirus* (Рис 1.14). Віріони мають форму звивистих ниток довжиною 470-580 нм та 13 нм в діаметрі [35].



Рис 1.14 Мікрофотографія ХВХ [29].

Точка температурної інактивації (ТТІ) складає 68-74°C. Інфекційність зберігається при температурі 20°C упродовж чотирьох днів та втрачається після декількох циклів заморожування та розморожування. Вірус зберігає інфекційність при розведенні $1 \cdot 10^{-5}$ - 10^{-7} [37].

Маса віріону складає $\sim 3,5 \cdot 10^{-6}$ г; значення седиментації S_{20} – 115-130, плавуча щільність в CsCl – 1.31 г/см³. Спектр УФ поглинання для вірусного нуклеопротеїну становить максимум 260 нм та мінімум 245 нм. Співвідношення оптичних густин при 260 нм та 280 нм ($A_{260/280}$) в спектрі поглинання, скорегованого з урахуванням світлорозсіювання, дорівнює 1,2. Коефіцієнт екстинції $E_{260}^{0,1\%}$ для вірусу – 2,7. Вихід вірусу складає 250-300 мг/кг.

Геном Х-вірусу хости представляє собою одноланцюгову інфекційну (+) РНК довжиною приблизно 6400 вр (Рис. 1.15), довжина геному залежить від ізоляту ХВХ.

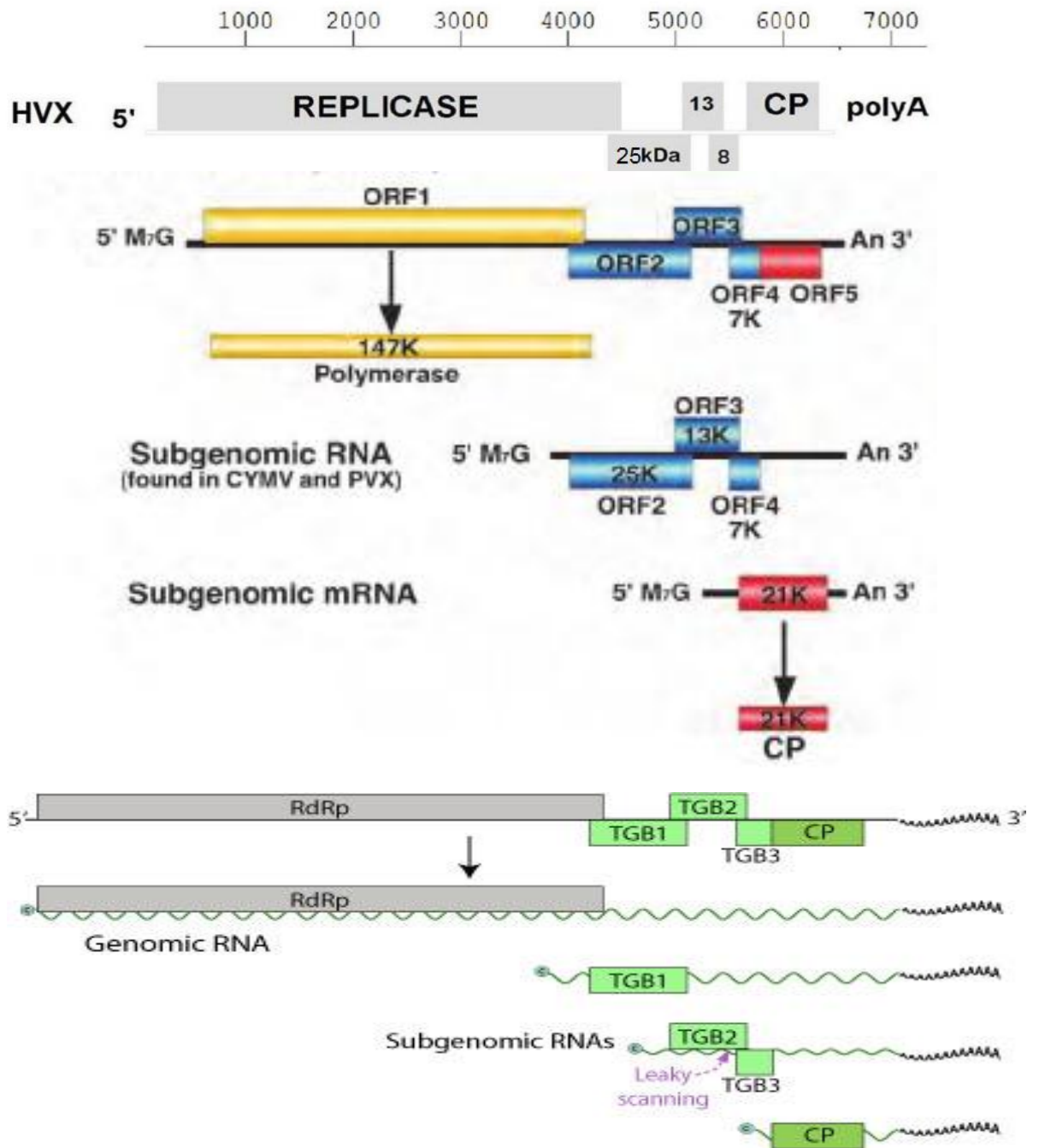


Рис.1.15 Генетична карта ХВХ [37].

Геном ХВХ є кепованим на 5'-кінці та поліаденельованим на 3'-кінці. Геном має п'ять відкритих рамок зчитування, чотири з яких перекриваються, і кодує чотири неструктурні та один структурний білок.

На 5'-кінці, з 1 по 102 нуклеотид, розташована нетрансляційна область - UTR ділянка. З 103 по 4526 нуклеотид слідує перша і найбільша відкрита

рамка зчитування – ORF1, яка кодує РНК-залежну РНК-полімеразу (RDRP). Три наступні відкриті рамки зчитування, що кодують потрійний блок генів TGB 1-3. Таким чином, ORF2, яка розташована в межах ділянки з 4492 по 5284 нуклеотид кодує TGB1. ORF3 розташована в межах з 5250 по 5600 нуклеотидів та кодує TGB2. ORF4 розташована в межах послідовностей нуклеотидів 5488 по 5712 та кодує TGB3. Ці гени кодують різні білки, одним з яких є трансляційний білок руху, що забезпечує переміщення вірусу від клітини до клітини [44]. Крім того, потрійний блок генів має функцію РНК-сайленсингу та геліказну активність [45]. Послідовність білка оболонки розташована на 3'-кінці геному. Остання рамка зчитування – ORF5 – розташована на 3'-кінці геному, в межах 5757-6419 нуклеотидів та кодує білок оболонки СР. 3'-UTR ділянка розташовується між 6420 та 6528 нуклеотидами.

РНК-полімераза має масу 150-181 кДа. Три наступні неструктурні білки, що заковані в послідовності TGBp, мають масу 26 кДа (TGB1, послідовність довжиною 693 bp., що кодує 230 амінокислот), 13 кДа (TGB2, послідовність довжиною 351 bp., що кодує 116 амінокислот), та 8 кДа (TGB3, послідовність довжиною 225 bp., що кодує 74 амінокислот) відповідно. Продукт гена, який синтезується з ORF2 масою 26 кДа, містить NTP-азно-геліказний домен, який не бере участі в реплікації РНК. Продукти генів ORF3 та ORF4 – білки масою 13 та 8 кДа – це комплекси незаряджених мембраносоціюваних білків [46-48]. Вірусний капсид складається з 1000-1500 білкових субодиниць одного поліпептиду, масою 25 кДа.

Синтез вірусного геному починається з послідовності 5'-UTR, яка підвищує ефективність транскрипції. РНК-залежна РНК-полімераза транслюється безпосередньо з геномної вірусної РНК. Інші ORF транскрибуються, імовірно, як моноцистронні субгеномні мРНК. Наприкінці ділянки, яка кодує TGB2, знаходиться так звана «пливуча» послідовність, що

є причиною явища «пливучого сканування», (*leaky scanning*), з якого почитається синтез TGB3 як субгеномної мРНК [49].

Стратегія реалізації генетичної інформації ХВХ полягає у проникненні вірусу до клітини хазяїна, роздяганні та реплікації вірусного РНК геному у цитоплазмі клітини. Вірусна РНК транслюється як моноцистронна матрична РНК, що синтезує РНК-залежну РНК-полімеразу. Реплікація відбувається у вірусних фабриках, що локалізуються у хлоропластах у вигляді сферул, які утворюються за допомогою продуктів гена TGB. Подвійна спіраль РНК синтезується з геномної одноланцюгової інфекційної РНК. В подальшому внутрішніх субгеномних промоторах ініціюють синтез sgRNA білків оболонки та білків руху, після чого відбувається самозбірка віріонів. Продукти гена TGB забезпечують міжклітинний рух на досить довгу відстань [50].

1.6 Філогенетичний зв'язок між різними ізолятами ХВХ

Х-вірус хости є одним з 35 видів роду *Potexvirus* [51]. Деякі представники роду можуть інфікувати рослини, що належать до різних родин. Так наприклад, *Alternanthera mosaic virus* (AltMV) може інфікувати Флокс столононосний (*Phlox stolonifera*), Портулак крупноквітковий (*Portulaca grandiflora*), Левиний зів великий (*Antirrhinum majus*), Соняшник (*Helianthus annuus*), Аморант хвостатий (*Amaranthus caudatus*) та Ангелонію вузьколисту [52 -54]. Не зважаючи на це, ХВХ інфікує лише рослини хости. Це було підтверджено експериментальним ураженням 23 видів рослин і отриманням негативного результату на присутність ХВХ [55].

Перша повногеномна послідовність ХВХ, що була зареєстрована в світовому генному банку, була ізольована в Кореї, HVX-Kr (GenBank код доступу AJ620114), довжина якої склала 6,4 кб. Філогенетичний аналіз геному корейського ізоляту ХВХ з іншими послідовностями вірусів роду *Potexvirus*, продемонстрували тісні зв'язки з азіатським вірусом мозаїки

подорожника (*PIAMV*), X-вірусом тюльпана (*TVX*) і вірусом мозаїки маніюка (*CsCMV*) [56,57]. Грунтуючись на результатах досліджень 2012 року, ХВХ вважається членом родини *Alphaflexiviridae*, роду *Potexvirus* [58]. Однак, генетична мінливість вірусу не вивчена.

Результати дослідження філогенетичної спорідненості послідовностей гена білка оболонки, різних ізолятів ХВХ, відібраних з різних географічних регіонів штату Теннессі (США) демонструють співпадіння за нуклеотидними послідовностями 98.3 – 100% та 98.6 – 100% ідентичність за амінокислотними послідовностями [59]. Амінокислотні послідовності ХВХ ізолятів з Кореї, Польщі та семи ізолятів з Огайо, мали високу ступінь подібності один з одним. Порівняння послідовностей ізолятів з Теннессі із представленими послідовностями гена білка оболонки у GenBank показав 98.3 – 100% подібності за нуклеотидними послідовностями, а відсоток гомології за амінокислотними послідовностями 98.2 – 100% [60].

Аналіз послідовностей потрійного блока генів TGB1 продемонстрував відмінність у довжині між послідовностями різних ізолятів. Так ізолят з Теннесі мав у довжину 696 нуклеотиди, що на три нуклеотиди довше, ніж корейський ізолят ХВХ [61]. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей ізолятів з Кореї та Теннесі виявили делеції в корейському ізоляті в позиціях 264, 265 і 273. Це призвело до втрати проліну в положенні 89 і декількох суміжних амінокислот. Амінокислотна послідовність TGB1 ХВХ з Теннесі містить 231 амінокислоту, що на одну більше, ніж у ізоляті з Кореї. Аналіз порівняння нуклеотидних послідовностей усіх ізолятів з Теннесі показав, що потрійний блок генів ХВХ має рівень подібності в межах 98.1-100%, а за амінокислотними послідовностями корелює в межах 98.3-100%. Порівняння TGB ізоляту ХВХ з Кореї демонструє діапазон гомології за нуклеотидними послідовностями в межах 97.4-100%, а за амінокислотними послідовностями 97-100% [62, 63]. Отже, послідовності TGB1 регіону різних ізолятів ХВХ виявився більш варіабельним, рівень дивергенції склав 3%, на відміну від

нижчого значення дивергенції послідовностей ділянки білка оболонки, яка склала 1,8% [64].

Філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей генів капсидного білка та потрійного блока генів всіх відомих ізолятів ХВХ, в тому числі ізолятів з Теннесі, демонструє монофілетичні звязки, що підтверджує їх приналежність до одного класу, тобто ізоляти мають спільного предка.

Аналіз амінокислотних послідовностей представників родини *Flexiviridae* методом найближчих сусідів (*neighbor-joining*) продемонстрував утворення 9 кластерів [65]. Отримані філогенетичні дерева демонструють, що саме вірус плямистості цитрусового листа (*CLBV*) є спільним предком ХВХ [66]. Проте, в залежності від характеру послідовностей, що використовуються для порівняння з членами інших родів, результат трохи відрізняється. Філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей білка оболонки показав зв'язок ХВХ з ізолятами азійського вірусу мозаїки подорожника (*PIAMV*), Х-вірусом тюльпана (*TVX*) і вірусом мозаїки маніюки [67]. Проте, філогенетичний аналіз TGB1 виявив спорідненість з вірусом мозаїки папайї (*PapMV*), вірусом мозаїки альтернантери (*AltMV*), Х-вірусу кактусу (*CVX*), *PIAMV* і *TVX*.

Угрупування ізолятів ХВХ не показали будь-якої географічної кореляції, також було виявлено відсутність залежності між ізолятами і сортами рослин хости. Комбінований аналіз виявив спорідненість ХВХ з *PIAMV*, *TVX*, *CsCMV*, *PapMV*, *AltMV* та *CVX* (Рис 1.16) [38].

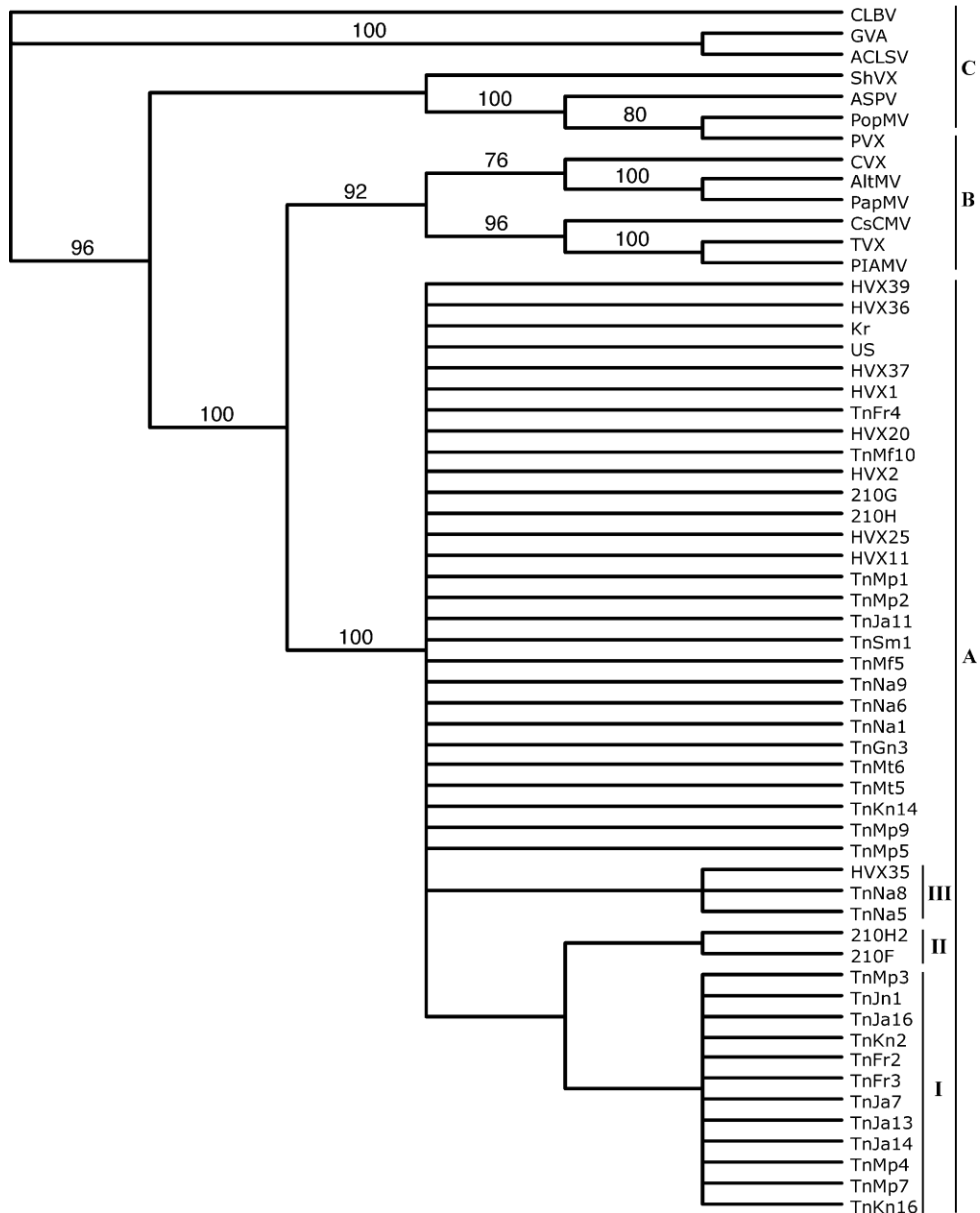


Рис.1.16 Філогенетичне дерево аналізу послідовностей генів капсидного білка та потрійного блока генів. Група А включає в себе всі ХВХ ізоляти, в група В – інші віруси родини *Potexvirus*. До групи С увійшли послідовності представників інших родів в родині *Flexiviridae*. [38] Значення Bootstrap вказане у відсотках.

Філогенетичний аналіз комбінованих нуклеотидних послідовностей CP та TGB згрупував ХВХ ізоляти в п'ять кластерів (Рис.1.17), незалежно від географічної кореляції чи сортової приналежності [38].

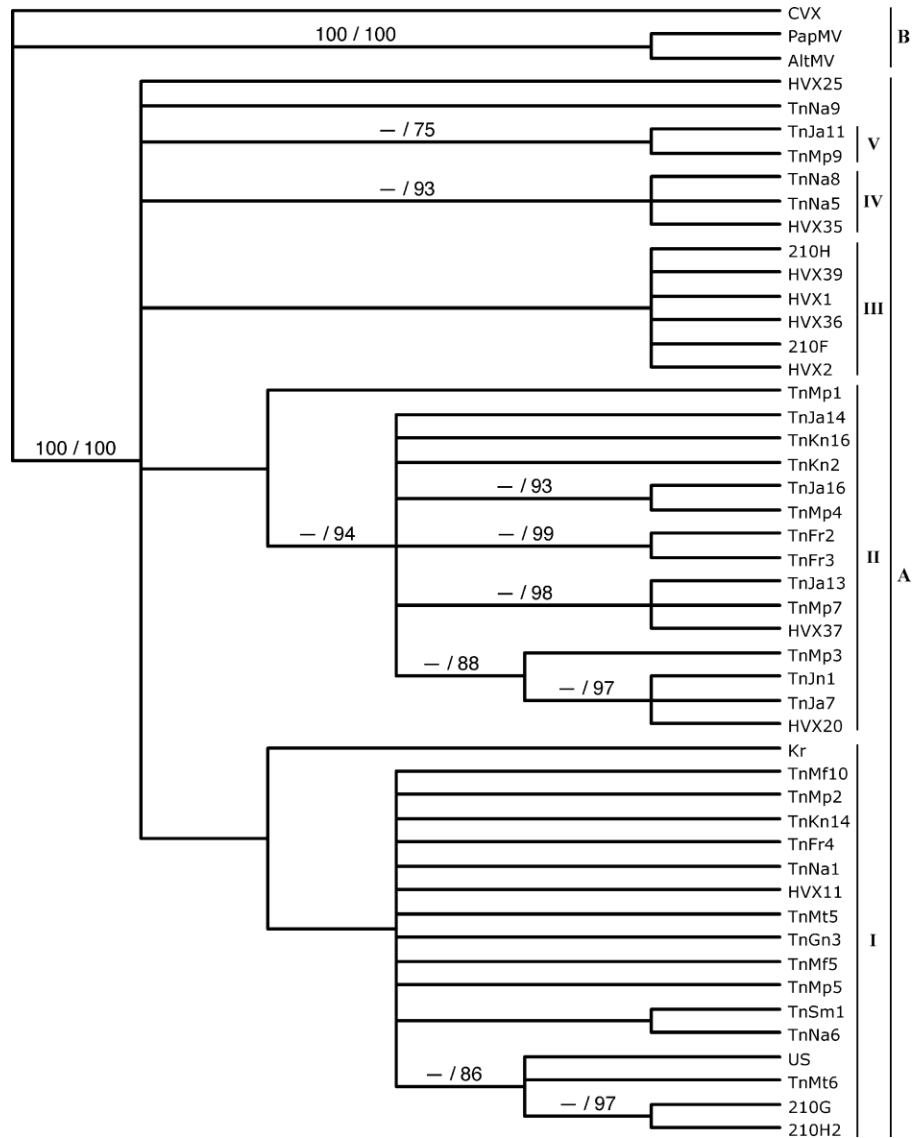


Рис.1.17 Філогенетичне дерево аналізу послідовностей генів капсидного білка та потрійного блока генів. Група А включає в себе всі ХВХ ізоляти, група В – інші віруси рід *Potexvirus* [68, 69]. Значення Bootstrap вказане у відсотках.

Аналіз результатів порівняння послідовностей білка реплікази ХВХ із ізолятами різних представників *Potexvirus* продемонстрував високий рівень подібності в межах доменів метилтрансферази, гелікази і РНК-залежної РНК-полімерази та нижчий рівень подібності між регіонами метилтрансферази та хелікази (Рис. 1.18) [70 -72].

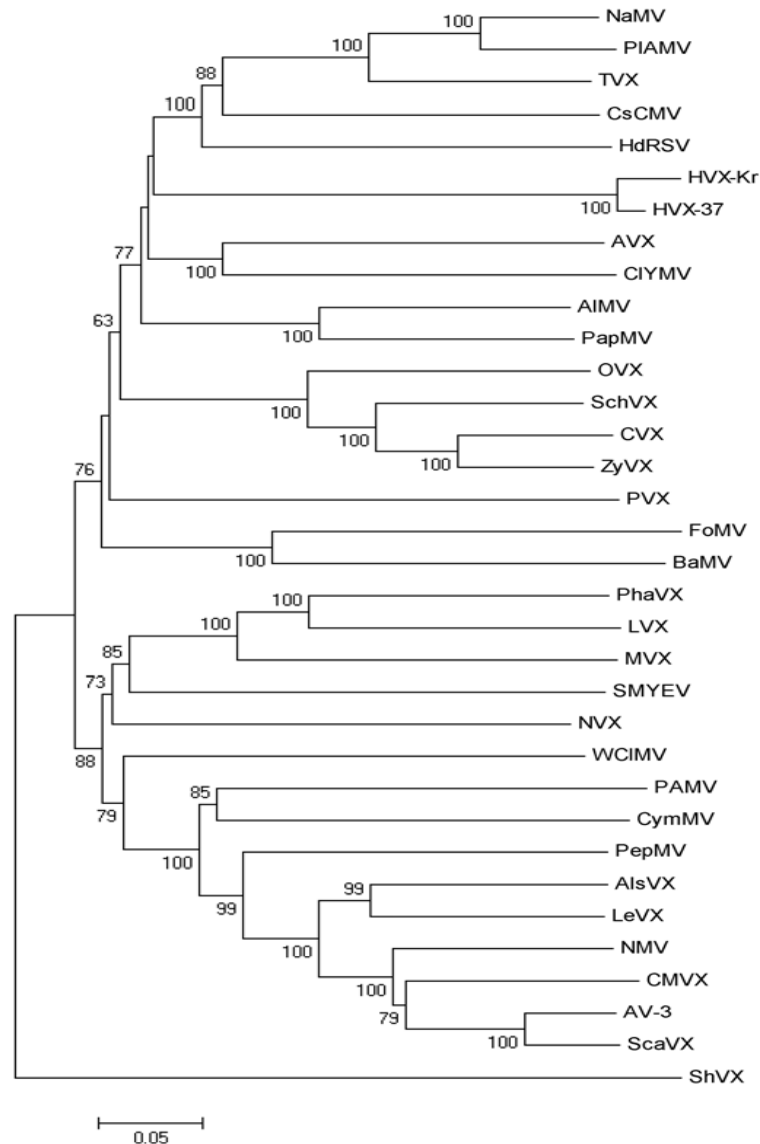


Рис.1.18 Філогенетичне дерево аналізу послідовностей білка реплікази ізолятів ХВХ та 31го ізоляту різних представників родини *Potexvirus* [68] Значення Bootstrap вказане у відсотках [73].

Характер отриманого філогенетичного дерева, побудованого на основі множинного вирівнювання послідовностей білків вірусної реплікази вказує

на те, що ХВХ має тісні філогенетичні зв'язки з *Tulip virus X (TVX)*, *Plantago asiatica mosaic virus (PLAMV)*, *Hydrangea ringspot virus (HdRSV)*, *Cassava common mosaic virus (CsCMV)* [74].

1.7 Методи детекції ХВХ

Найефективнішим методом боротьби з Х-вірусом хости є його вчасна діагностика, виявлення в інфікованій рослині та знищення джерела інфекції.

В якості попередньої діагностики ХВХ проводять візуальне спостереження за потенційно інфікованими рослинами. Як вже було згадано раніше, ХВХ є не єдиним вірусним агентом, що інфікує рослини хости, однак Х-вірус хости спричиняє розвиток низки характерних симптомів на листках рослин хости. Одним з таких є хлоротичний симптом типу *Ink-bleed* (розпливання чорнил), який локалізується головним чином вздовж жилок листя [8]. Для попереднього висновку щодо інфікування рослини проводять порівняльний аналіз зовнішнього вигляду здорової та інфікованої рослини. У роботі Марка Зіліса «*The Hostapedia: An Encyclopedia of Hostas*» зібрана повна інформація стосовно різних сортів та видів рослин хости, їх опис та зображення [75].

Для підтвердження наявності вірусного патогена застосовують серологічні методи діагностики, зокрема метод ІФА в різних модифікаціях з використанням антисироватки до ХВХ. Даний метод є дуже зручним, простим та відносно недорогим. Чутливість методу є досить високою: виявлення патогена в соці інфікованих тканинах рослин відбувається при розведенні від 1 : 270 до 1 : 810. При довжині хвилі 405 нм значення оптичної густини, в залежності від титру вірусу в тестованих зразках, корелює у межах 0,900 - 3,000 одиниць [76 - 79].

Також в якості методу попередньої діагностики використовують експрес-метод «*HVX ImmunoStrips*» (*Agdia, Inc.*) [39]. Суть методу полягає у тому, що на тест-смужку з антитілами до ХВХ наносять декілька краплин з

соку рослини: при наявності вірусу з'являються дві смужки. Однак слід зауважити, що цей метод є чутливим лише у випадку високої концентрації вірусу у рослині, тобто під час активної вірусної інфекції. Метод є зручним для використання у комерційних розплідниках, час проведення реакції до моменту отримання результатів складає 30 хвилин [80].

У разі виділення нового ізоляту Х-вірусу хости необхідно проводити додаткові дослідження. Так, для візуалізації вірусних часточок використовують метод електронної мікроскопії (ЕМ), який дозволяє визначити морфологію та розмір вірусного капсиду. Також за допомогою ЕМ можливо визначити наявність та локалізацію кристалів Івановського, включень у клітині, місця агрегування вірусних часточок, що мають відмінності залежно від збудника [81].

Метод електрофорезу білків дозволяє визначити деякі молекулярні властивості білка та особливості його будови. Молекулярні методи детекції мають найбільшу чутливість і специфічність та ідеально підходять для дослідження штамової приналежності вірусу.

Для детекції ХВХ використовують специфічну пару праймерів до ділянки білка оболонки [55]. Використання праймерів обумовлена низьким значенням її девиргенції, тобто є менш варіабельною, на відміну від послідовностей неструктурних білків [82].

Візуалізація отриманих продуктів ампліфікації проводиться методом електрофорезу у агарозному гелі з додаванням бромістого етидію, під ультрафіолетовим опроміненням він яскраво флюоресцує в червоно-оранжевому діапазоні. Отримані амплікони в подальшому можуть використовуватися для більш детального дослідження, наприклад для секвенування послідовностей.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали дослідження

Український ізолят Х-вірусу Хости.

Матеріалом слугували зразки сортів хости, відібрані в Національному ботанічному саду імені М.М. Гришка НАН України: *Hosta Sum and Substance*, *Hosta Striptease*, *Hosta Lady Guinevere*, *Hosta X*, *Hosta Venticosa*, *Hosta Udulata*, *Hosta Halcyon*, *Hosta Crispula Maek*, *Hosta Gold Standart*, *Hosta Great Expectation*, *Hosta Ultraviolet light*, *Hosta Mediovariegata*, *Hosta cv. Brim Cup*, *Hosta cv. Sun Power*, *Hosta cv. Night before Christmas*, *Hosta cv. Lakeside Cupcake*, *Hosta udulata (Otto & Dietr.) L. H. Bail. cv. Alba*, *Hosta cv. August Moon (Golden Wafen)*, *Hosta cv. June*, *Hosta cv. Fringe Benefit*, *Hosta cv. Fragrant Blue*, *Hosta cv. Pilgrim*, *Hosta cv. Cherry Berry*, *Hosta longipes var. Latifolia*, *Hosta cv. One Man's Treasure*, *Hosta udulata "Alba"*, *Hosta fortunei (Bak.) L. H. Bail. var. hyacinthiana Hylander*, *Hosta fortunei (Bak.) L. H. Bail. cv. Albopicta*, *Hosta cv. Halcyon*, *Hosta fortunei (Bak.) L. H. Bail*, *Hosta cv. Gold Standart*, *Hosta Night before Christmas*, *Hosta cv. Blue Angel*, *Hosta cv. Pacific Blue Edger*, *Hosta cv. Oriana*, *Hosta cv. Guacamole*, *Hosta cv. Brim Cup*, *Hosta cv. Kiwi Full Monty*, *Hosta Fransee*, *Hosta cv. Cherry Berry*, *Hosta cv. Striptease*, *Hosta siboldiana cv. Northern Exposure*, *Hosta siboldiana cv. Frances Williams*, *Hosta cv. Patriot*, *Hosta cv. Christmas Tree*, *Hosta cv. Knockout*, *Hosta cv. Lacy Bella*, *Hosta cv. Guacamole*, *Hosta udulata*, *Hosta clausa*, *Hosta cv. Wide Brim*, *Hosta Sum Tub*, *Hosta longipes*, *Hosta cv Sum Tub*, *Hosta fortunei (Baker) Bailey. cv. Sharman*, *Hosta cv. Captains Adventure*, *Hosta cv. Abigua Drinking Gourd*, *Hosta cv. Trime Tunnel*, *Hosta cv. Feather Boa*, *Hosta cv. Midwest Magic*, *Hosta cv. Paul's Glory*, *Hosta cv. Phyllis Campbell*, *Hosta cv. Robert Frost*, *Hosta cv. Antioch*, *Hosta cv. Lakeside Cha Cha*, *Hosta cv. Autumn Frost*, *Hosta cv. Alvatine Taylor*, *Hosta cv. Whirlwind*, *Hosta cv. Abigua Moonbeam*, *Hosta undulata cv. Mediovariegata*, *Hosta Fragrant bouquet*, *Hosta cv. Wide Brim*, *Hosta siboldiana*,

Hosta fortunei cv. *Albopicta*, *Hosta plantaginea* (Lat.) Aschers, *Hosta ventricosa* Stearn, *Hosta rectifolia* Nakai, *Hosta* cv. *Antioch*.

А також зразки видів хости з ботанічного саду ім. акад. О.Б. Фоміна КНУ імені Тараса Шевченка: *Hosta plantaginea*, *Hosta stolonifera*, *Hosta lancefolia*, *Hosta fortunea gigantea*, *Hosta undulata*.

В роботі використовували насіння рослин хости таких сортів *Hosta Sieboldiana*, *Hosta August Moon*, *Hosta Sum & Substance*, *Hosta Gold Standard*, *Hosta Golden Tiara*, *Hosta Paul's Glory*.

Також в роботі використовували рослини: Кабачок цуккіні, сорт «Цукіша» (*Cucurbita pepo* ssp. *pepo*), Момордіка (*Momordica charantia*), тютюн, махорка (*Nicotiana rustica*), Томат їстівний (*Lycopersicon esculentum*), Перець овочевий товстий (*Capsicum annuum* ssp. *grossum* Fil.), Диня посівна (*Melo sativus*), Дурман індійський (*Datura metel* L.), Тютюн Бентхама (*Nicotiana benthamiana*).

У роботі використовувалися такі розчини:

Карбонатний буфер /КБК/ Coating buffer pH 9,6

На 1 літр дистильованої води наважували:

- 1,59 г Na_2CO_3 ;
- 2,93 г NaHCO_3 .

Натрій-фосфатний буфер (PBS) / Буфер для відмивання; pH 7,4 - на 1 л
дистильованої води наважували:

- 8,00 г NaCl ;
- 0,20 г KCl ;
- 1,44 г Na_2HPO_4 ;
- 0,24 г KH_2PO_4 .

Буфер для блокування:

- PBS;
- Сухе молоко 1%

- 0,05 % tween 20.

Буфер для Ат - див. буфер для блокування.

Хромогенний субстрат (диетаноламін). Робочий розчин 4-нітрофенілфосфата готували на 10% діетиловому буфері:

- 97 мл діетаноламіну;
- 800 мл дистильованої води;
- 0,5 мл азида натрію.

Значення рН доводили розчином 7% ої соляної кислоти до 9,8; загальний об'єм доводили дистильованою водою до 1000 мл. Зберігали в темному місці при t 20°C. Безпосередньо перед використанням 5 мг субстрату розчиняли в 5 мл 10% -го діетилового буфера.

Натрієво цитратний буфер, рН 8.3:

- 20,1 г $C_6H_8O_7$ (лимонна кислота);
- 8,0 г NaOH (натрій гідроксид);

Розчиняли у воді і доводили об'єм розчину дистильованою водою до 1000 мл. Значення рН доводили за допомогою HCl.

ТВЕ (тріс-боратна кислота-ЕДТА). Робочий або однократний (1x) розчин ТВЕ містив:

- 89 мМ тріс (рН 7.6);
- 89 мМ борної кислоти;
- 2 мМ ЕДТА.

10x ТВЕ із розрахунку на 1000 мл:

- 600 мл дистил. Води;
- 108 г тріс ($M_r = 121$);
- 55 г борної кислоти ($M_r = 61.8$);
- 40 мл 0.5 М ЕДТА (рН 8.0).

Після повного розчинення доводили об'єм до 1000 мл.

Бромістий етидій - робочий розчин етидію броміду (EtBr) мав концентрацію від 0.5-1 мг/мл.

Концентрований розчин бромістого етидію (10х) для зберігання містив 10 мг/мл фарбника. Для більш швидкого приготування розчину фарбник спочатку розчиняли у невеликій кількості етилового спирту (у 10% від загального об'єму), а потім доводили до необхідного об'єму дистильованою водою. Фарбник зберігали у темному місці при кімнатній температурі.

Буфер зразку:

- 50% гліцерину;
- 0,25% бром феноловий синій;

Доводили до 100 % об'єму однократним буфером для електрофорезу.

0,5М калійфосфатний буфер, рН 7,4:

- 36,48 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$;
- 5,44 г KH_2PO_4 .

Після повного розчинення доводили об'єм до 400 мл.

Формваровий розчин для приготування сіточок підкладинок для ЕМ.

Полівінілформальдегід (0,1%) розчинили у хлороформі. Отриманий розчин зберігали у скляному посуді з притертою кришкою. Суміш готувалася за одну- дві доби до використання.

Контрастуюча рідина для ЕМ (2%):

Для приготування 10 мл контрастуючої рідини наважували:

- Ураніл ацетат 200 мг
- Спирту етиловий (96 %) 10 мл.

Електрофорез в поліакриламідному гелі за модифікацією Лемлі

При виконанні роботи були використані наступні реактиви:

кумассі блакитний R-250, додецилсульфат натрію, набір маркерних білків *LMW* ("Pharmacia", Швеція), тріс, гліцин, акриламід, біс-акриламід ("BDH", Англія), неорганічні компоненти буферних систем вітчизняного виробництва марок "хч" та "чда".

Розчини для електрофорезу:

1. Концентрований розчин поліакриламідну (ПАА)

- 29,2 г акриламиду;
 - 0,8 г бісакриламиду;
 - H₂O до 100 мл.
2. 1,4М тріс-НСІ буфер, рН 8,8:
- 17 г тріс;
 - H₂O до 100 мл;
 - НСІ до рН 8,8.
3. 0,5М тріс-НСІ буфер, рН 6,8:
- 3,02 г тріс;
 - H₂O до 50 мл;
 - НСІ до рН 6,8.
4. 10% водний розчин додецилсульфату натрія: 1 г на 10 мл
5. 10% водний розчин персульфату амонія: 50 мг на 500 мкл
6. Електродний буфер, рН 8,3:
- 2,7 г тріс;
 - 12,96 г гліцин;
 - 0,9 г додецилсульфат натрію ;
 - 900 мл H₂O.
7. Буфер зразку:
- дист. H₂O;
 - 0,2 мл 0,5М тріс-НСІ буфер, рН 6,8;
 - 0,4 мл гліцерин;
 - 0,4 мл 10% додецилсульфат натрію;
 - 0,028 мл 2β-меркаптоетанол ;
 - 0,01 мл 1% бромфеноловий блакитний.
8. Розділяючий гель 14%:
- 6 мл / 4 мл H₂O;
 - 5 мл / 3,4 мл 1,4М тріс-НСІ буфер, рН 8,8;

- 0,2 мл / 0,14 мл 10% в/р додецилсульфату натрія;
- 0,067 мл / 0,1 мл 10% в/р персульфату амонія;
- 9,4 мл / 6,3 мл концентрований розчин поліакриламідю;
- 10 мкл / 15 мкл TEMED.

9. Стартовий гель 5%

- 2,8 мл H₂O;
- 1,25 мл 0,5М тріс-НСІ буфер, рН 6,8;
- 0,05 мл 10% в/р додецилсульфату натрія ;
- 0,05 мл 10% в/р персульфату амонія;
- 0,85 мл концентрований розчин поліакриламідю;
- 7 мкл TEMED.

10. Набір маркерних білків LMW (“*Ferments*”)

11. Розчин для фарбування гелю:

- 100 мг кумасі блакитний R-250;
- 50 мл метанол;
- 10 мл оцтова кислота;
- 40 мл H₂O.

12. Розчин відмивки після фарбування гелю

- 70 мл концентрована оцтова кислота;
- 930 мл H₂O.

Імуноелектроблотинг:

Комерційний апарат для вертикального електрофорезу (“Хійу Каллур”, Латвія), блок живлення ПЕФА-1, камера для блотингу, водяна баня, автоматичні піпетки (20-200 мкл, 200-1000 мкл), пластикові накінецьники, конічні пробірки з пробками для інкубації зразків, 2 штатива, термостат, 6 стаканів по 100 мл, 2 стакани по 700 мл, 10 пеніцилінових флаконів, пластмасова ванночка, 2 чашки Петрі. Торсіонні терези, товстий ватман, 2

маленькі лійки, 4 скляні палички, 2 малі біологічні пробірки, пінцет, лінійка, 2 олівці, нітроцелюлозна мембрана (0,2мкм), 4 маркера, міліметровий папір, 4 пробірки фірми «еппендорф», мірні циліндри: 50 мл, 1000 мл, 250 мл.

Розчини для імуноелектроблотингу:

Буфери для ЕФ: буфер зразку, 10% SDS, персульфат амонія.

Сухе молоко, тріс, гліцин, трітон x100, метанол, фосфатний буфер (PBS), дистильована вода.

Електроблотинг проводили в **буфері для переносу:**

- 3 г тріс;
- 1,45 г гліцину;
- 200 мл метанолу.

Доводили до 100 % об'єму однократним буфером для електрофорезу

Буфер зразку:

- 50 мМ Tris-HCl, рН 8.0;
- 25% гліцерин;
- 5 мМ ЕДТА;
- 0.2% бромфеноловий синій;
- 0.2% ксилен цианол.

Для отримання робочого розведення суміш розводили у 5 чи 10 разів.

Буфер інкубації:

100 мл буферу переносу;

1 мл triton.

2.2 Метод візуальної діагностики рослин хости

Досвідченому спеціалістові визначити вірусну природу хвороби не важко. Перш за все її визначають за зовнішніми ознаками, симптомами, такими як хлоротичні або кільцеві візерунки на листі. Однак віруси мають латентний період, що супроводжується безсимптомним розвитком

інфекційного захворювання. Симптоматика залежить від стану рослини до ураження, агресивності штаму патогена, зовнішніх умов і тривалості перебування вірусу в клітинах хазяїна. Наприклад, симптоми захворювання чітко виражені у рослин, що зростали на яскравому світлі і при помірній температурі, при високій температурі і недостатньому освітленні симптоми захворювання можуть бути зовсім невираженими. Просвітлення жилок молодого листа нерідко є одним з перших ознак системної вірусної інфекції. Жилки стають жовтими і напівпрозорими. Листя, що проростає пізніше, може мати мозаїчні, крапчасті або хлоротичні симптоми. Слід зазначити також, що прояв симптомів може бути спричинений фітоплазмами або бактеріальними збудниками. До появи симптомів, схожих з вірусною інфекцією, часто призводять порушення мінерального живлення, пов'язані, наприклад з дефіцитом заліза. Регулятори росту і гербіциди можуть викликати деформації органів.

Тому з огляду на вищевикладену інформацію візуальне спостереження за симптомами на рослинах хости можна виділити, як метод попередньої діагностики збудника, який завжди потребує подальших досліджень.

Для первинного вивчення українського ізоляту X-вірусу хости відбирали зразки листа за результатами візуального спостереження у три етапи. На першому етапі було відібрано рослини тих сортів, в яких за літературними даними частіше детектують ХВХ та мають типові симптоми. На другому етапі було відібрано рослини інших сортів, які демонстрували нехарактерне їм кольорове забарвлення та структуру листової пластинки. На третьому етапі були відібрані рослини, що не демонструють жодних візуально помітних проявів вірусної інфекції.

2.3 Імуноферментний аналіз

В роботі застосовували твердофазний імуноферментний аналіз в модифікації «непрямий» з використанням 96 лункових полістеролових

планшетів та Ат до серологічно спорідненого Х-вірусу картоплі та Ат до українського ізоляту ХВХ. В якості антигена (Аг) використовувалися сік із з листя рослин хости, що тестувалися. Методика проведення імуноферментного аналізу була наступна:

1. Наносили Аг у розведенні 1:5 в карбонатному буфері, рН 9,6. У загальному об'ємі 100 мкл в лунку. Інкубували протягом ночі (12 годин) при $t + 4^{\circ}\text{C}$.

2. Планшет промивали буфером для відмивання тричі по 5 хв на шейкері.

3. Блокували розчином 1%-го сухого молока, PBS та 0,05 % tween 20. Інкубація тривала 2 години при $t + 37^{\circ}\text{C}$.

4. Планшет промивали у буфері для відмивання тричі по 5 хв на шейкері.

5. Наносили Ат першого порядку у робочому розведенні у буфері для Ат. Інкубували протягом ночі при $t + 4^{\circ}\text{C}$.

6. Планшет промивали буфером для відмивання тричі по 5 хв на шейкері.

7. Наносили антикролячі Ат, кон'юговані з лужною фосфатазою, в робочому розведенні у буфері для Ат. У загальному об'ємі 100 мкл в лунку. Інкубували протягом 1,5 години при $t + 37^{\circ}\text{C}$.

8. Планшет промивали буфером для відмивання тричі по 5 хв на шейкері та ще один раз дистильованою водою.

9. Для проявлення реакції, як хромогенний субстрат використовували диетаноламін, а як стоп-реагент – 3 М NaOH.

10. Облік результатів ІФА проводили за допомогою рідера марки "Multiscan" MCC, модель 340 P, при довжині хвилі 405 нм. За позитивний результат приймали значення, що вдвічі перевищувало значення негативного контролю (сік здорової рослини).

2.4 Виділення тотального РНК

Виділення тотальної РНК проводили за допомогою кіта *RNeasyPlantMinikit* (Qiagen, Велика Британія), до набору входили: протокол виконання, необхідні розчини, колонки з мембранами та пробірки. Виділення РНК проводили за наступним алгоритмом:

1. В порцеляновій ступці гомогенізували 100 мг листя в рідкому азоті. Отриману суміш переносили до стерильної пластикової пробірки.
2. Додавали 500 мкл RTL буферу та 5 мкл меркаптоетанолу, інкубували протягом 2 хвилин на водяній бані при температурі 56°C. Основним компонентом буферу RTL був гуанідин тіоціанат.
3. Отриманий лізат центрифугували при 13000 об/ хв протягом 2 хв.
4. 440 мкл супернатанту переносили в пластикову пробірку об'ємом 2 мл та додавали 220 мкл етанолу 96%.
5. Піпетували та переносили 650 мкл до RNeasy міні колонки. Осаджували центрифугуванням при 10000 об/хв протягом 15 секунд.
6. Додавали 700 мкл буферу RW1 до колонки та центрифугували знову при 10000 об/ хв протягом 15 с. Основним компонентом буферу RW1 був спирт.
7. Переносили колонку до нової пластикової пробірки об'ємом 2мл і додавали 500 мкл буферу RPE. Центрифугували при 10000 об/ хв протягом 15 секунд.
8. Додавали знову 500 мкл буферу RPE до колонки та центрифугували при 13000 об\ хв протягом 1 хвилини.
9. Колонку переносили до нової 1,5 мл пластикової пробірки та додавали 35 мкл стерильної води. Естрагували центрифугуванням при 10000 об/хв 1 хв.
10. Колонку видаляли. РНК знаходилась у пробірці. Зразок викладали на лід для подальшого використання або зберігали при температурі -18°C.

2.5 Виділення вірусної РНК методом імунного захоплення

1. У чисті пластикові пробірки об'ємом 1,5 мл вносили 100 мкл специфічних Ат до ХВХ в буфері для антитіл у робочому розведенні. Інкубація тривала впродовж ночі (12 годин) при температурі + 4°C.

2. Пробірки промивали у буфері для відмивання шляхом внесення 1 мл буферу, обережним струшуванням та видаленням буферу та його залишків піпеткою.

4. Вносили чистий вірусний препарат у 50 mM натрієво цитратному буфері, рН 8.3, у загальному об'ємі 100 мкл. Інкубація тривала протягом ночі при температурі + 4°C.

5. Пробірки промивали у буфері для відмивання, вносили 1 мл буферу, обережно струшували та видаляли буфер та його залишку піпеткою.

6. До пробірки з утвореним комплексом антиген-антитіло додавали 50 мкл стерильної води.

8. Зразок інкубували на водяній бані 5 хвилин при температурі 65°C, після чого струшували 30 секунд у руці.

10. Проводилося центрифугування при 10 тис. об./хв протягом 15 секунд.

Для подальших досліджень РНК-вмісний зразок викладали на лід. Для тривалого зберігання зразки утримували при температурі - 20°C.

2.6 Зворотньо-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція з використанням праймерів до гена білка оболонки ХВХ

У роботі використовувався набір *SYPERSKRIPT-II* (Invitrogen, USA) та послідовності праймерів до ділянки білка оболонки Х-вірусу хости [55]:

P1: 5'-3' AGT CTC GAA CTA ACT AAC AGG

P2: 5'-3' TCG GTG GAG CCT TGT TTA TTG

Реакцію проводили за рекомендацією виробника, брали:

16 мкл води;

- 25 мкл 2^x кратної реакційної суміші;
- 2 мкл – суміш ферментів;
- 2 мкл – сенсовий праймер;
- 2 мкл – антисенсовий праймер;
- 3 мкл – тотальна РНК.

Додавання всіх реагентів до пробірки проводили на холоді. Об'єм реакційної суміші 50 мкл

Ампліфікацію проводили у наступному режимі

60°C – 30 хв

94°C – 2 хв

94°C – 45 сек

94°C – 50 сек

50°C - 40 сек

68°C - 45 сек

} 30 циклів

5 хв при 68°C - фінальна добудова

2.7 Електрофорез в агарозному гелі

У роботі використовували розчин 1,5% розчину агарози (*Sigma*) у буфері для електрофорезу (TBE).

1. Суспензію нагрівали в мікрохвильовій печі до повного плавлення агарози (t плавлення 95°C). Потім суміш охолоджували до 50°C та додавали бромистий етидій у кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл.

2. Розчин агарози заливали в форму із зафіксованим гребенем. Після того як гель застигав, тримали 20-25 хвилин при кімнатній температурі, потім обережно видаляли гребінку. Форму з агарозою поміщали в прилад для електрофорезу та додавали достатню кількість буфера, так щоб гель був покритий ним.

Приготування зразків для електрофорезу проводили наступним чином:

3. До 12 мкл кожного зразку додавали по 3 мкл буфера зразку.

Маркер (*Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder*) наносили без додавання буфера зразку.

4. Зразки вносили по 15 мкл в кожну лунку гелю.

Блок живлення вмикали до мережі. Час для повного розділення продуктів ампліфікації та маркерів склав 45 хв при напрузі електричного поля 60 В. Результати візуалізували на транслюмінаторі, де спостерігали помаранчеву флюоресценцію в УФ світлі при довжині хвилі 302 нм. Гель фотографували.

2.8 Виділення, очистка та концентрація вірусу

Для виділення Х-вірусу хости використовували листя рослин з чітко вираженими симптомами мозаїчності.

1. Листя рослин заморожували в умовах морозильної камери (t 18 °С) впродовж доби (24 години).
2. Вірусмісний матеріал гомогенізували у міксері з додаванням 10 Мм калійфосфатного буфера.
3. Для відділення соку від решток фільтрували через капроновий фільтр.
4. Освітляли розчин хлороформом у співвідношенні 1:4 протягом 20 хвилин у колбі з притертою кришкою (у руках). Після чого, щоб розділити суміш соку та хлороформу її ставили до холодильника на 20 хв, температурі + 4°С. Суміш розшаровувалася, верхній шар – хлороформ, видаляли за допомогою автоматичної піпетки.
5. Центрифугували гомогенат при 5 тис. об/хв протягом 40 хвилин при температурі 4°С. Відбирали водну фазу.
6. До водної фази додавали NaCl (1,2 %) та ПЕГ 6000 (5%). Суміш змішувалась на магнітній мішалці впродовж ночі (12 годин) при температурі 4°С.

7. Суміш центрифугували при 5 тис об/хв протягом 40 хвилин при температурі +4°C. Видаляли надосад.
 8. Осад ресуспендували в 10 мл буфера (10 Мм калійфосфатного буферу з 0,5М KN₂PO₄ рН 7,4).
 9. Далі проводили один цикл високошвидкісного центрифугування при 36 тис. об/хв протягом 2 годин на центрифусі фірми *Beckman* з використанням бакет ротору. Надосад видаляли.
 10. Осад ресуспендували в 10 мл буфера.
 11. Центрифугували суспензію при 5 тис. об/хв протягом 40 хвилин при температурі 4°C.
 12. Відбирали надосад.
- Вірус зберігався в пластикових пробірках в морозильній камері до подальшого використання.

2.9 Метод електронної мікроскопії. Підготовка сіточок-підкладинок.

1. Чисте предметне скельце занурювали у формвар на 5-10 секунд, виймали та давали просохнути.
2. Отриману плівку зрізали по краям скельця, потім повільно занурювали скельце у воду та за рахунок поверхневого натягу води знімали плівку. На отриману плівку викладали сіточки та знімали за допомогою фільтрувального паперу. Висушували
3. На сіточку-підкладинку наносили вірусомісний зразок, витримували до 60 секунд, виймали з каплі та промочували фільтрувальним папером.
4. Потім наносили краплю контрастуючої рідини на 1 хвилину, видаляли краплю, просушували препарати.
5. Електронно мікроскопічне дослідження проводили на трансмісійному електронному мікроскопі SEO-TEM (лабораторний корпус ННЦ «Інститут біології та медицини») та на трансмісійному електронному

мікроскопі JEM-1400 (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Визначали розміри вірусної часточки за допомогою отриманих знімків.

2.10 Спектрофотометричний метод визначення концентрації та чистоти вірусного препарату

Визначення кількості білка за Едельгохом [75, 76].

Досліджувані зразки розводили в співвідношенні 1:100 у PBS(загальний об'єм суміші 3 мл). Коефіцієнт екстинкції визначали при довжині хвилі 260 нм.

Концентрацію білка розраховуємо за формулою:

$$C = A_{260} * N / K_e,$$

де C – концентрація вірусу в мг/мл,

A_{260} – екстинція при довжині хвилі 260 нм,

N – розведення вірусного препарату,

K_e – коефіцієнт екстинкції, що для ХВХ становить 2,7.

Дослідження чистоти вірусних препаратів.

Визначали значення поглинання білка при довжині хвилі 260 нм та 280 нм та розраховували відношення E_{260}/E_{280} .

2.11 Електрофорез в поліакриламідному гелі за модифікацією Лемлі

Постановка аналізу:

1. Приготували та залили розділяючий гель на 2 см нижче верхнього краю скляної пластинки. Нашарували ізобутанол, насичений водою для рівномірної полімеризації поверхні. Після полімеризації видаляли ізобутанол та промивали гель дистильованою водою.

2. Приготували та залили стартовий гель і вставили гребінку для утворення лунок. Після полімеризації гребінку видалили.

3. Підготували зразки для електрофорезу. У конічні пробірки внесли досліджуваний матеріал та маркерні білки об'ємом 30 мкл, додали до кожної пробірки по 10 мкл буфера зразку та інкубували їх при 100°C на водяній бані протягом 3 хв.

4. Вставили камеру у прилад для електрофорезу, залили електродний буфер, щоб він покривав залитий стартовий гель на 2 мм.

5. У лунки стартового гелю нанесли маркерні білки та відповідні зразки по 40 мкл.

Режим проведення ЕФ: напруга 60 В, сила струму 40 мА на пластинку.

6. Коли барвник досяг нижнього краю скляних пластинок електрофорезної камери струм вимикали. Злили електродний буфер та обережно зняли гель із скляних пластинок.

7. Занурили гель у 100 мл розчину для фарбування на 1-2 години.

8. Злили розчин для фарбування та залили гель 100 мл розчину відмивки, інкубували при 37°C впродовж 1 години. Гель відмивали 5-6 разів до досягнення повної прозорості.

2.12 Імуноелектроблотинг

Перед переносом гелю після електрофорезу занурювали в буфер інкубації для відмивки залишків SDS та часткової ренатурації білка. Час інкубації склав 20 хвилин. Гель разом із мембраною викладали на робочу поверхню між подвійним шаром фільтрувального паперу. Після чого підключали катод та анод, режим ЕБ 1 година, при напрузі 60 В, силі струму 40 мА.

Після ЕБ нітроцелюлозну мембрану відмивали і проявляли, а гель дофарбовували розчином кумасі.

Після фарбування блотограму занурювали на ніч у розчин бичачого альбуміну (BSA, Bovine serum albumin) (2 %) при $t +4^{\circ}\text{C}$. В подальшому її

тричі промивали у дистильованій воді, висушували та зберігали у паперовому конверті.

2.13 Імунізація лабораторних тварин. Отримання та приготування кролячої антивірусної сироватки

Для отримання антивірусної сироватки у дослід відбирались однорічні самці кролів породи шиншила, вагою 2-3 кг.

Імунізацію самця кроля проводили чотирьох разово, підшкірно, між лопатками, вздовж хребта, вірусним препаратом в концентрації: 3,25 мг/мл, з кінцевою масою 0.16 мг.

Перша імунізація проводилася 1 мл суспензії, що складалась з:

- 500 мкл Повного адьюванта Фрейнда;
- 450 мкл фізіологічного розчину;
- 50 мкл вірусного препарату в концентрації 3,25 мг/мл.

Через кожні сім днів проводили три наступні імунізації з неповним адьювантом, в об'ємі 1 мл у такій кількості:

- 250 мкл Мантонід ISA;
- 700 мкл фізіологічного розчину;
- 50 мкл вірусного препарату в концентрації 3,25 мг/мл.

Через сім днів після останньої імунізації проводили прижиттєвий забір крові об'ємом 20 мл у кроля з крайової вушної вени. Шприц з кров'ю інкубували при температурі 37°C впродовж 30 хвилин для утворення згустку. Потім шприц переносили до холодильної камери та інкубували протягом ночі при температурі 4°C. Після чого відбирали сироватку та центрифугували її при 1,5 тис. об/хв впродовж 5 хвилин. Титр сироватки встановлювали методом імуноферментного аналізу у модифікації “непрямий”.

2.14 Титрування антивірусної сироватки

В роботі застосовували твердофазний імуноферментний аналіз у модифікації «непрямий». Титрування сироватки проводили в трьох повторностях. В якості позитивного контролю використовували очищений вірусний препарат. Контроль буфера, сироватки, та 2Ат проводили у двох повторностях. Також титрували здоровий сік та нормальну сироватку кроля в однократному повторенні. Методика проведення імуноферментного аналізу була наступна:

1. У вісім лунок вносили по 100 мкл КБК.
2. В першу лунку вносили 100 мкл розведеної сироватки.
3. З першої лунки, що містять 100 мкл КБК та 100 мкл сироватки, проводили титрування, рідину набирали піпеткою та переносили аліквоту у наступну, піпетували та переносили у наступні лунки. З останньої, восьмої, видаляємо аліквоту об'ємом 100 мкл.
4. У вісім наступних лунок вносили по 100 мкл здорового соку.
5. У вісім наступних лунок вносили по 100 мкл Аг, розведеного у КБК.
6. Вносили контролю. Перший контроль містить 100 мкл буферу, другий та третій по 100 мкл Аг.
7. Інкубували протягом ночі при температурі 4 °С.
8. Планшет промивали у буфері для відмивки тричі по 5 хв на шейкері.
9. Блокували розчином сухого молока (1%) та PBS та з додаванням 0,05 % tween 20. Інкубували впродовж 2 годин при 37 °С.
10. Планшет промивали у буфері для відмивки тричі по 5 хв на шейкері.
11. Титрування Ат першого порядку у буфері для блокування вносили за наступною схемою:

В першу лунку вносили 100 мкл концентрованих Ат.

З лунки 2 по 8 вносили по 100 мкл буфера.

До лунки 2 вносили 100 мкл концентрованих Ат, піпетували, та переносили 100 мкл розчину до лунки 3.

Повторювали процедуру до кінця ряду.

З останньої лунки видаляли аліквоту в об'ємі 100 мкл.

В кінці титрування у кожній лунці має міститися розчин Ат в об'ємі 100 мкл.

Інкубували впродовж ночі при температурі 4 °С.

12. Планшет промивали у буфері для відмивки тричі по 5 хв на шейкері.

13. Наносили Ат₂, антикролячі антитіла, кон'юговані з лужною фосфатазою в робочому розведенні в PBS з 1% сухим молоком з додаванням 0,05% Tween-20.

14. Вносили по 100 мкл в лунку та інкубували 1,5 години при 37° С.

15. Відмивали 3 рази по 5 хвилин.

16. Для проявлення реакції як хромогенний субстрат використовували диетаноламін, а як стоп-реагент – 3 М NaOH.

17. Облік результатів ІФА проводили за допомогою рідера марки «Multiscan» MCC, модель 340 P при довжині хвилі 405 нм. За позитивний результат приймали показник, що вдвічі перевищував значення негативного контролю (сік здорової рослини).

2.15 Визначення спектру рослин індикаторів методом біотестування

Матеріалом для інокуляції слугував препарат вірусу українського ізоляту ХВХ, виділеного з хости сорту *Sum and substance*, що був відібраний в Національному ботанічному саду імені М.М. Гришка НАН України.

В роботі використовувався спектр рослин-індикаторів, таких як:

1. Кабачок цуккіні, сорт «Цукіша» (*Cucurbita pepo ssp. pepo*);
2. Момордіка (*Momordica charantia*);

3. Тютюн, махорка (*Nicotiana rustica*);
4. Томат їстівний (*Lycopersicon esculentum*);
5. Перець овочевий товстий (*Capsicum annuum ssp. grossum* Fil.);
6. Диня посівна (*Melo sativus*);
7. Дурман індійський (*Datura metel* L.);
8. Тютюн (*Nicotiana benthamiana*).

Рослини вирощували в марлевих боксах на удобреному ґрунті, який раніше не використовувався. Горщики були продезінфіковані протягом доби в 5% розчині марганцевокислого калію. Висаджені рослини зростали з додатковим освітленням (12 годин на добу). На стадії розвитку 2-3 справжніх листків провели експериментальне інокулювання вірусним препаратом шляхом втирання 1-2 крапель інокулюма у попередньо опудрені карборундом листя рослин-індикаторів.

За допомогою стерильної оплавленої скляної палички разом з порошком інокулюма рівномірно розподіляли на поверхні листка, який інфікували. Надлишок вірусного препарату і абразивного порошку змивали з поверхні листка дистильованою водою. Листя контрольних рослин подібним чином обробляли буфером.

Для оптимального росту рослини розміщували в спеціальній освітлюваній камері з постійною температурою 22° С. Через 20 діб після інфікування рослин періодично проводили спостереження за їх станом і відмічали появу ознак захворювання.

2.16 Дослідження здатності Х-вірусу хости до насіневої передачі

У досліді використовували наступні матеріали: чашки Петрі, фільтвальний папір, вода для поливу рослин, ґрунт універсальний із вмістом торфу, пластикові горщики для висаджування рослин, 5% розчин перманганату калія.

Насіння хости пророщували на зволоженому фільтрувальному папері у чашках Петрі при кімнатній температурі. Після проростання перших пагонів, які з'явилися на 13 добу, чашки з насінням переносили до боксів з регульованим освітленням. Після чого пророщене насіння було висаджене у ґрунт. Горщик перед використанням оброблялися 5% розчином розчин перманганату калія. Рослини отримували додаткове освітлення, температура повітря 20-23° С при вологості 70%. Після того, як сходи рослин хости були сформовані справжніми листками, їх було повністю видалено з ґрунту з корінцями для подальшого дослідження на наявність Х-вірусу хости методом ІФА в модифікації “непрямий”.

2.17 Виділення субгеномної РНК (18s & 28s RNA)

Виділення РНК вірусу проводили з використанням *TRIzol* реагенту за стандартною методикою.

50 мг рослинного зразка перетирали у порцеляновій ступці з додаванням рідкого азоту.

Отриманий гомогенізатор змішували з 1 мл реагенту *TRIzol*[®], після перемішування його переносили до стерильних пластикових пробірок. Інкубували 5 хвилин при кімнатній температурі.

Додавали 200 мкл хлороформу, перемішували 15 секунд. Інкубували 2-3 хв при кімнатній температурі.

Осаджували шляхом центрифугування при температурі 4°С при прискоренні 12,000 g протягом 15 секунд.

Переносили супернатант до нових пробірок, додавали 750 мкл ізопропанолу. Струшували.

Інкубували 10 хв при кімнатній температурі.

Центрифугували 10 хв при температурі 4°С при прискоренні 12000 g.

Видаляли водну фазу.

Отриманий осад білого кольору промивали 1 мл 75%-го етанолового спирту. Ретельно перемішували до повного розчинення осаду у спирті.

Центрифугували 5 хв при температурі 4°C при прискоренні 7500 g.

Видаляли водну фазу. Давали просохнути при кімнатній температурі чи під витяжною шафою. Осад розчиняли у 50 мкл стерильної води.

2.18. Приготування ДНК-бібліотек

Приготування зразків проводилася за протоколом *TruSeq Small RNA Sample Preparation. Kit*.

Лігування 3' адаптера

Для лігації в роботі використовувалися стерильні пластикові пробірки об'ємом 200 мкл. Весь процес лігації проводився на льоду.

1. 1 мкл RNA3'Adapter змішували з 5 об'ємами 1 μ g Total RNA in Nuclease-free Water .
2. Обережно пермішували 6-8 разів для повного розчинення, осаджували коротким циклом центрифугування.
3. Поміщали пробірку в підігрітий термоциклер.
4. Закривали кришку та інкубували пробірку протягом 2 хв при 70°C після чого швидко викладали на лід.
5. Понижували температуру термоциклера до 28°C.
6. Готували розчин з лігуючого буфера (HTL) 2 мкл, РНКазного інгібітора 1 мкл, T4 РНК лігази 1 мкл, та переносили отриманий розчин до пробірок по 200 мкл.
7. Обережно пермішували 6-8 разів для гарного розчинення, осаджували коротким циклом центрифугування
8. У кожену пробірку додавали 4 мкл розведеного 3'-адаптера при загальному об'ємі 10 мкл.
9. Обережно пермішували 6-8 разів для повного розчинення, осаджували коротким циклом центрифугування.

10. Пробірки поміщали у термоциклер на 1 годину при 28°C.
11. Додавали 1 мкл стоп-реагенту *Stop Solution (STP)*.
12. Обережно пермішували 6-8 разів для повного розчинення.
13. Пробірки поміщали у термоциклер на 15 хвилин при 28°C.
14. Переносили пробірки на лід.

Лігування 5' адаптера

1. Встановлювали температуру 70°C на термоциклері.
2. Вносили до пробірок 1 мкл RNA 5' Adapter та 1 мкл зразку.
3. Переносили пробірки до термоциклера на 2 хв при 70°C.
4. Переносили пробірки на лід.
5. Встановлювали температуру 28°C на термоциклері.
6. Додавали 1 мкл 10mM АТР.
7. Обережно пермішували 6-8 разів для гарного розчинення.
8. Додавали в ці самі пробірки 1 мкл Т4 РНК лігази.
9. Обережно перемішували 6-8 разів для гарного розчинення.
10. Пробірки поміщали у термоциклер на 1 годину при 28°C.
11. Переносили пробірки на лід.

Зворотня транскрипція та ампліфікація

1. 6 мкл *5' and 3'Adapter-ligatedRNA* та 1 мкл *RNARTPrimer (RTP)* змішували у нових пробірках.
2. Обережно пермішували 6-8 разів для гарного розчинення.
3. Встановили температуру 70°C на термоциклері.
4. Переносили пробірки до термоциклера на 2 хв при 70°C.
5. Переносили на лід.
6. Встановили 50°C температуру на термоциклері.
7. Готували розчин у нових пробірках, всі маніпуляції виконували на льоду.

5X FirstStrandBuffer 2 мкл

12.5 mMdNTPmix 0.5 мкл

100mM DTT 1мкл

RNase Inhibitor 1мкл

SuperScriptIIReverse Transcriptase 1 мкл

Загальний об'єм кожного зразку склав 5.5 мкл.

8. Обережно пермішували 6-8 разів для повного розчинення.
9. Додавали 5,5 мкл розчину з пункту 1-5.
10. Обережно пермішували 6-8 разів для гарного розчинення.
11. Переносили пробірки до термоциклеру на 1 годину при 50°C.
12. Переносили на лід.

Приготування розчину для ПЛР

1. Готували розчин та переносили до нових пробірок

UltraPure Water 8.5 мкл

PCRMix(PML) 25 мкл

RNAPCRPrimer (RP1) 2 мкл

RNAPCRPrimer Index(RPIX) 2 мкл

Загальний об'єм кожного зразку склав 37.5мкл

2. Обережно перемішували 6-8 разів для повного розчинення.
3. Додавали 37,5 мкл ПЛР розчину у зразки з пункту 8-12 (Зворотня транскрипція та ампліфікація). Загальний об'єм склав 50 мкл.
4. Переносили пробірки до термоциклера. Вмикали підігрів кришки на 100°C.

Проводили ПЛР ампліфікацію при режимі:

98°C – 30 секунд

98°C – 10 секунд

60°C – 30 секунд

72°C – 15 секунд

72°C – 10 хвилин

4°C hold

} 12 циклів

Отриманий зразок є готовим для проведення повногеномного секвенування.

Секвенування проводилося в естонському геном-центрі, місто Тарту. На апараті *Illumina HiSeq Series*.

2.19 Філогенетичний аналіз

Для проведення філогенетичного аналізу (встановлення філогенетичної спорідненості) X-вірусу хости ми застосували підходи та методи молекулярної філогенії. Щоб визначити філогенетичні взаємовідносини між українськими ізолятами та вірусами, виявленими у інших країнах, нами були побудовані філогенетичні дерева, що являють собою проекцію у двомірному просторі складних багатомірних співвідношень між послідовностями біологічних молекул.

Секвенування виділених нами ізолятів X-вірусів хости проводилось у лабораторії Оксфордського університету, Велика Британія та у *Estonian genome centre*, місто Тарту, Естонія. Отримані результати порівнювались з вибіркою послідовностей отриманих за допомогою програми BLAST аналізу (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Вирівнювання послідовностей проводили за допомогою програми *CLUSTALW* або *MUSCLE*, які вбудовані в *MEGA7* (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 7). Цю ж програму використовували для побудови філогенетичних дерев. Оптимальною моделлю для побудови філогенетичних дерев з даними нуклеотидними послідовностями виявилася модель *General Time Reversible*. Обрання оптимальної моделі для побудови філогенетичних дерев за нуклеотидними послідовностями методом максимальної правдоподібності (ML) є модель GTR+I (General Time Reversible).

Для статистичної оцінки значущості отриманих результатів застосовували метод бутстреп-аналізу (Bootstrap) з числом реплікацій 1000 та 3000.

2.20 Визначення впливу добору

Дослідження позитивного добору було проведено за бази серверу *Datamonkey* [53]. В роботі використовували методи підрахунку ймовірності одного спільного предка (*the single-likelihood ancestor - SLAC*), ймовірності фіксованих ефектів (*fixed-effects likelihood - FEL*), ймовірності внутрішньо фіксованих ефектів (*internal branch fixed-effects likelihood - IFEL*), змішаної моделі еволюції (*mixed effects model of evolution - MEME*) та швидкої природньої апроксимації Баєса (*fast unconstrained Bayesian approximation - FUBAR*). Також було визначено рівень dN/dS за допомогою методів максимальної достовірності кодонів SLAC та FEL (codon based maximum likelihood approaches). SLAC визначає кількість несинонімічних заміщень на кожний несинонімічний сайт (dN) та проводить тестування на наявність достовірної різниці між кількістю синонімічних замін на кожний синонімічний сайт (dS). FEL оцінює співвідношення несинонімічних до синонімічних заміщень для кожного сайту послідовності [83]. Метод IFEL подібний до методу FEL, проте добір сайт за сайтом тестується лише для внутрішніх гілок філогенетичного дерева. Щоб уникнути хибнопозитивного результату, сайти, отримані методами SLAC, FEL, IFEL та MEME із значеннями $p < 0,1$ та методом FUBAR, де апостеріодна ймовірність більша 0,90, вважаються кандидатами, що знаходяться під впливом добору.

2.21 Статистична обробка результатів

Для статистичної достовірності аналіз кожної проби в ІФА проводився у 3-х повторях. Статистична обробка даних, отриманих при проведенні імуноферментного аналізу, проводилась з урахуванням стандартного відхилення:

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

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

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

де E – достовірне значення екстинкції; \bar{E} – середнє арифметичне виміряних значень екстинкції $E_1 \dots E_i$; σ – стандартне відхилення.

Для вирішення питання про значимість вибірових показників та оцінки вірогідних відмінностей між одержаними показниками, результати були оброблені статистичним методом [84, 85].

1. Для визначення величин, виражених у відсотках, визначали середню похибку відсоткового відношення за формулою:

$$m_p = \frac{\sqrt{P(100-P)}}{n} \%, \text{ де}$$

m_p - середня похибка у %;

P - одержана частота ознаки, у %;

n - число спостережень у досліді.

2. Середнє арифметичне значення розраховували за формулою:

$$X_{cp} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum X_i}{n} .$$

Розмах варіації характеризує ступінь варіації даної ознаки:

$$R = X_{max} - X_{min}.$$

3. Для розрахунку ступеня відхилення середнього значення отриманої вибірки, визначали середньоквадратичне відхилення за формулою:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{cp})^2}{n-1}}, \text{ де}$$

X_i — значення варіантів вибірки;

X_{cp} — середнє значення;

n — розмір вибірки.

4. Середню похибку середньої величини розраховували за формулою:

$$m = \frac{S_x}{\sqrt{n}}.$$

Крім цих методів було використано можливості програмного забезпечення *Microsoft Excel* та *MEGA 7* [86 -88].

РОЗДІЛ 3 ПЕРВИННА ДЕТЕКЦІЯ ХВХ В УКРАЇНІ

3.1 Візуальне обстеження колекцій хости

Європейська організація захисту рослин звертає увагу дослідників на динаміку поширення ХВХ у світі. За літературними джерелами ХВХ є патогеном, що поширюється від рослини до рослини вегетативним та механічним шляхом. Вірусна інфекція спричиняє появу ряду симптомів.

Для виявлення Х-вірусу хости у Україні було проведено діагностику колекції рослин *Hosta tratt* Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України, колекція якого є найбільшою в Україні та щорічно оновлюється рослинами нових видів та сортів.

Нами були відібрані зразки листя *Hosta tratt* за візуальними симптомами, такими як системний, прижилковий, міжжилковий хлорози, знебарвлення листкової пластинки, скручування та гофрування листка, некроз. За такими симптомами було відібрано п'ять зразків хости чотирьох різних сортів: *Hosta Sum and substance* (Рис. 3.1 «а»), *Hosta Striptease* (Рис. 3.1 «б»), *Hosta Lady Guinevere* (Рис. 3.1 «с»), *Hosta X*.

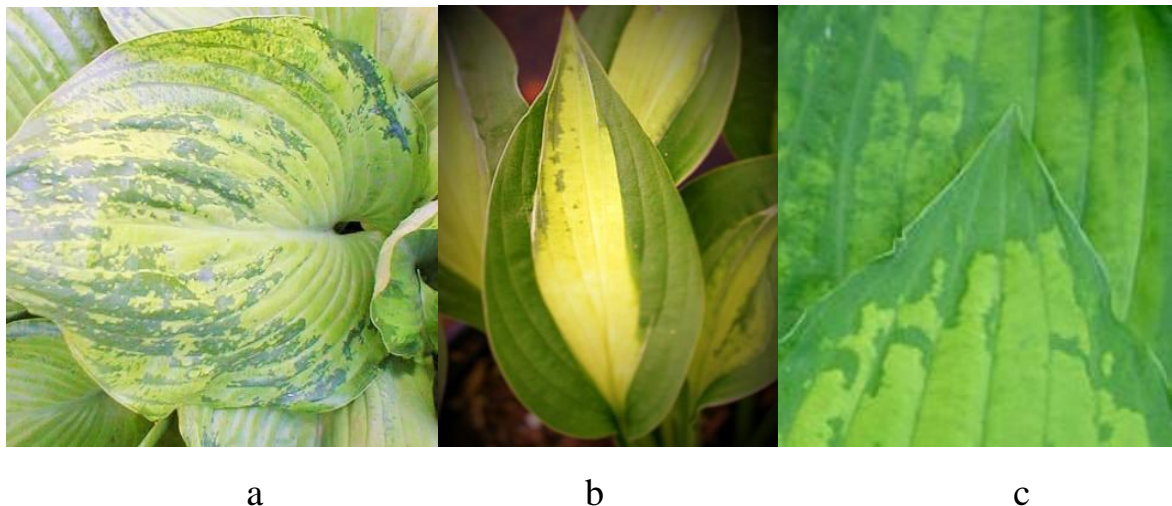


Рис. 3.1 Хлоротичні симптоми на листках рослин *Hosta Sum and substance* (a), *Hosta Striptease* (b), *Hosta Lady Guinevere* (c).

Результати візуального аналізу відібраних зразків вказували на вірусну природу симптомів, що дозволило нам припустити наявність Х-вірусу хости.

Візуальне спостереження та аналіз зовнішніх симптомів є методом попередньої діагностики та допомагає досліднику сформувати повну картину перебігу захворювання. Візуальний огляд завжди супроводжує наступні дослідження. В подальшому збудник детектували серологічними та електронно-мікроскопічними методами.

3.2 Дослідження зразків хости на наявність ХВХ

До 2012 року у літературних джерелах не існувало згадок про детекцію ХВХ в Україні, тому було прийняте рішення провести первинний скринінг із застосування антисироватки до Х-вірусу картоплі, як серологічно спорідненого до Х-вірусу хости.

Відібрані зразки використовувалися для проведення імуноферментного аналізу в модифікації непрямий, з використанням Ат до серологічно спорідненого ХВК.

Зі зразків були отримані препарати шляхом гомогенізації у карбонатному буфері та були очищені від рослинних решток шляхом низькошвидкісного центрифугування (5 тис. об/ хв, 15 хв, при температурі +4С).

Як видно з діаграми (Рис.3.2), побудованої за результатами ІФА, у зразках *Hosta Sum and substance №1*, *Hosta Striptease*, *Hosta Lady Guinevere* та *Hosta X* значення коефіцієнту поглинання не перевищує позначки 0,1, що свідчить про відсутність вірусного антигена.

0

Рис. 3.2 Результати тестування рослин хости різних сортів на наявність ХВК.

Натомість у зразку *Hosta Sum and substance* №5 показник поглинання перевищив значення 0,2, отже містить вірусного Аг. Для точного підтвердження зразки піддавалися електронно мікроскопічному дослідженню та ЗТ-ПЛР.

Для детекції збудника та встановлення морфології вірусних часточок використовувався препарат, отриманий зі зразку хости сорту *Sum and substance* №5, виділений, очищений та сконцентрований за загальноприйнятою методикою для вірусів роду *Potexvirus* [55].

Завдяки проведеній електронній мікроскопії зразків вірусні частки були візуалізовані (Рис. 3.3.)

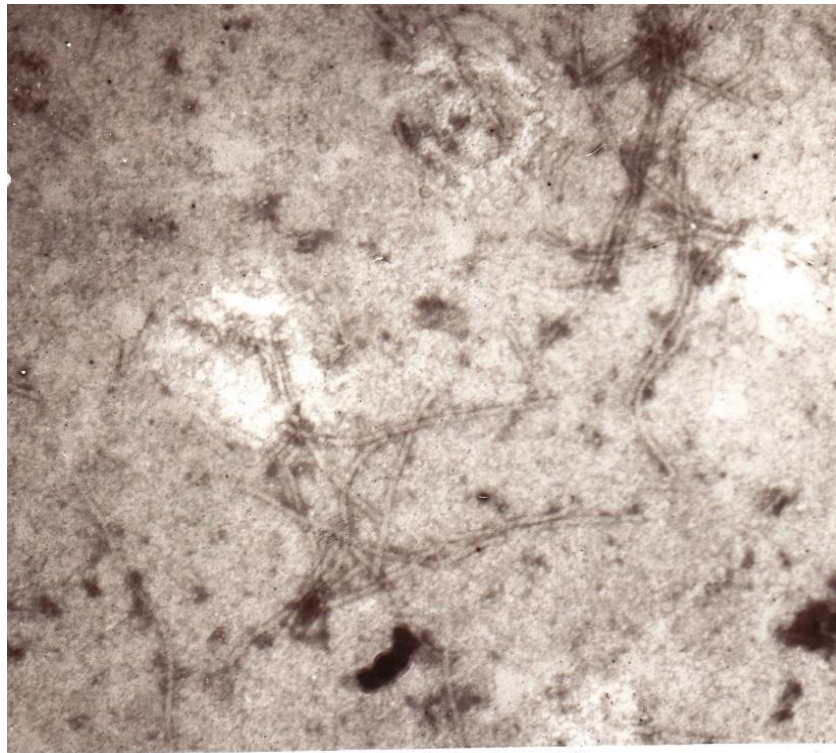


Рис.3.3 Електронно-мікроскопічне зображення вірусу (Інструментальне збільшення 20000).

Отримані мікрофотографії були в подальшому проаналізовані. Для достовірності отриманих результатів нами було проведене вимірювання більше 100 вірусних частинок. Результати вивчення зображених вірусних

часточок дозволи встановити розміри та морфологію збудника, яка склала 470-580 \pm 5нм в довжину та 13нм в діаметрі. Морфологія чітка, гнучкі нитковидні віріони. Дана морфологія є характерною для представників роду *Potexvirus* [8].

3.3 Оптимізація та постановка ЗТ-ПЛР зі специфічною парою праймерів до ХВХ

Для встановлення, який саме представник родини *Potexviridae* був виділений із зразків рослини *Hosta Sum and Substance №5* та представлений на мікроскопічному зображенні нами було проведено ЗТ-ПЛР з використанням специфічної пари праймерів до Х-віруса хости.

При постановці ЗТ-ПЛР використовували набір SuperScript® II (Invitrogen, USA), та специфічну пару праймерів до ділянки білка оболонки ХВХ, що кодують продукт довжиною 706 bp [68].

Постановка реакції була модифікована. На першому етапі проводили виділення вірусу, а не тотальної РНК. Після чого, вірусний препарат прогрівали при температурі $t+60$ С впродовж 5 хв, під час прогрівання відбувалася руйнація капсидної оболонки та вивільнення вірусної РНК. В подальшому зразки використовувалися для постановки ЗТ-ПЛР. Метою даної модифікації було запобігання можливої втрати вірусної РНК в результаті її екстракції.

Методом електрофорезу в 1,5% агарозному гелі було візуалізовано продукт ампліфікації відповідної молекулярної маси (рис. 3.4).

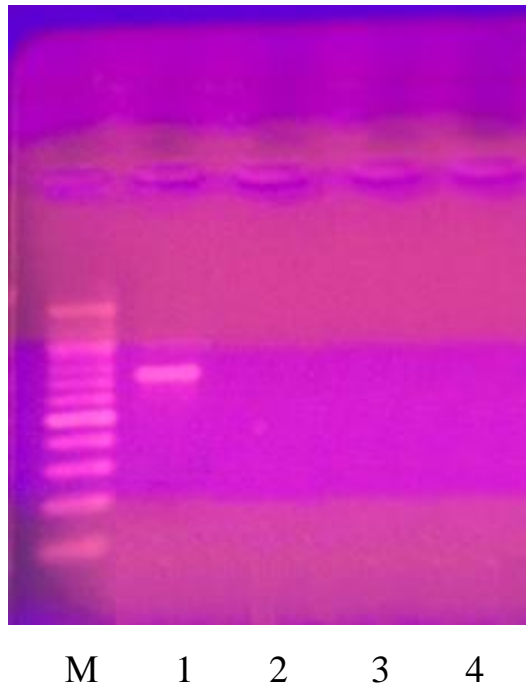


Рис. 3.4 Електрофореграма продуктів з праймерами до гену капсидного білка ХВХ: М – маркери, 100 bp, 1- *Hosta Sum and substance №5*, 2 – *Hosta Striptease*, 3 – *Hosta Lady Guinevere*, 4 – *Hosta X*.

В результаті був отриманий продукт гена відповідної довжини (706 bp), який в подальшому був використаний для секвенування.

Підготовка зразків та секвенування проводили в Оксфордському університеті (Велика Британія).

Отримана послідовність була проаналізована за допомогою програми BLAST, на онлайн ресурсі NCBI. Результати аналізу послідовностей вказують на майже 100% подібність з послідовностями ХВХ різних ізолятів, що представлені в NCBI.

3.4 Результати первинної детекції ХВХ

Таким чином, в результаті проведення візуального спостереження колекції рослин хости Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України (м.Київ) були відібрані зразки з вірусними симптомами. Результати ІФА з антитілами до ХВК показали наявність вірусу серологічно

спорідненого до X-вірусу хости (роду *Potexvirus*) в сорті *Hosta Sum and substance* №5. Методом електронної мікроскопії було виявлено вірусні частки з типовою морфологією для ХВХ.

Модифіковано полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією. Праймери до ділянки білка оболонки ХВХ ампліфікували продукт розміром 706 бр. Результати аналізу послідовностей вказують на присутність ХВХ в Україні.

Отже, у 2012 році в Україні був вперше виділений ХВХ [89].

РОЗДІЛ 4 ОТРИМАННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АНТИСИРОВАТКИ ДО Х-ВІРУСУ ХОСТИ

4.1. Отримання препарату ХВХ

Специфічні вірусні антисироватки широко використовуються для проведення серологічної діагностики. Наприклад для проведення ІФА – ефективного методу діагностики фітовірусів. Саме з метою розробки надійної та доступної тест-системи для діагностики ХВХ в Україні була проведена робота по отриманню та апробації специфічної антисироватки до українського ізоляту ХВХ.

Зі зразків *Hosta Sum and substance*, в якому було попередньо встановлено наявність Х- вірусу хости, виділили вірус з використанням хлороформу, який очистили та сконцентрували методом диференційного центрифугування [55].

Спектрофотометрично (за формулою Едельгоха) визначали концентрацію вірусу та його чистоту. Концентрація отриманого нами вірусу склала 3,1 мг/мл. Чистоту визначили співвідношенням значень E_{260}/E_{280} , де E_{260} – це коефіцієнт поглинання для амінокислот, а E_{280} – для нуклеїнових кислот. Отримане значення склало 1,09 [55].

Для підтвердження присутності збудника та перевірки чистоти досліджуваного зразку використовувався метод електронної мікроскопії. Вірусний препарат був адсорбований на підготовлених сіточках-підкладенках та контрастований розчином ураніл ацетату (2 %).

Як видно з рисунку 4.1, отриманий препарат є вільним від рослинних решток, відсутні залишки клітинних органел. Чітко видно вірусні віріони з центральним каналом.

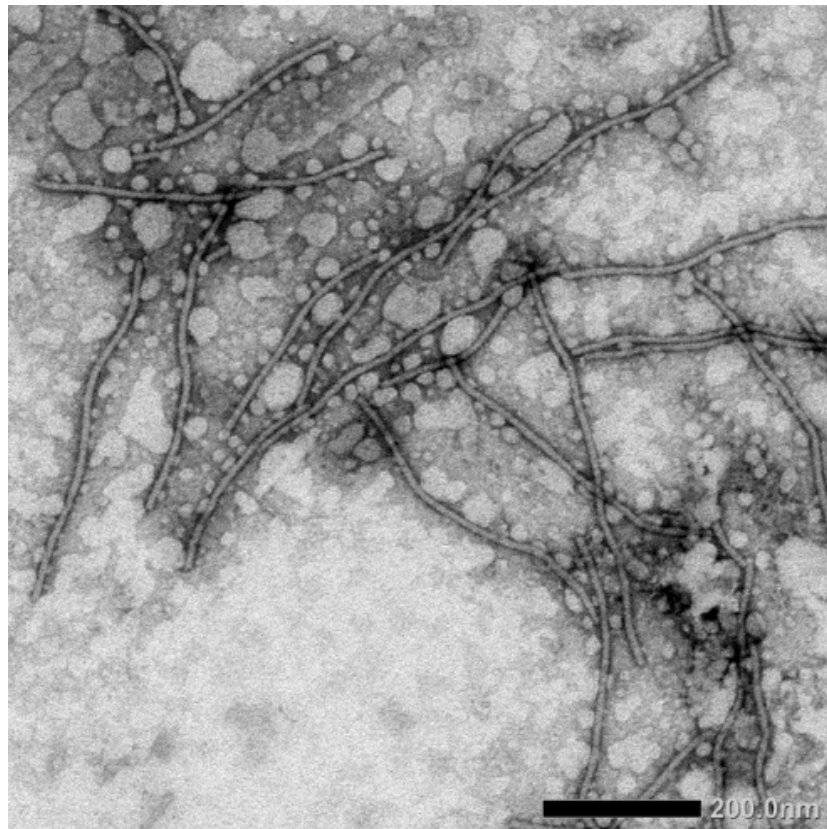


Рис.4.1 Електронно-мікроскопічне зображення ХВХ.

Аналіз отриманих мікрофотографій дозволив встановити розміри та морфологію вірусних часточок. Для статистичної достовірності було проведене вимірювання більше 100 окремих часточок. Розмір вірусних частинок склав 470-580 нм, в діаметрі – 13 ± 0.5 нм, за морфологією – гнучкі нитковидні частинки.

В подальшому очищений вірусний препарат використовували для отримання специфічної антисироватки.

4.2 Перевірка якості антисироватки

Якість отриманої антисироватки перевіряли визначенням титру і специфічності до відповідних антигенів. Титр – це найменше розведення сироватки при якому ще спостерігається реакція взаємодії антигену з антитілом. Робоче розведення визначається на колібрувальній кривій та

відповідає титру сироватки при значенні поглинання, що дорівнює одиниці. Специфічність – це здатність антитіл вступати в взаємодію тільки із тим антигеном, у відповідь на введення якого вони утворились. Титр та робоче розведення антисироваток встановлювали методом ІФА в модифікації «непрямий». Так, робоче розведення складало 1 : 8000 при титрі 1 : 16000 (Рис. 4.2.).

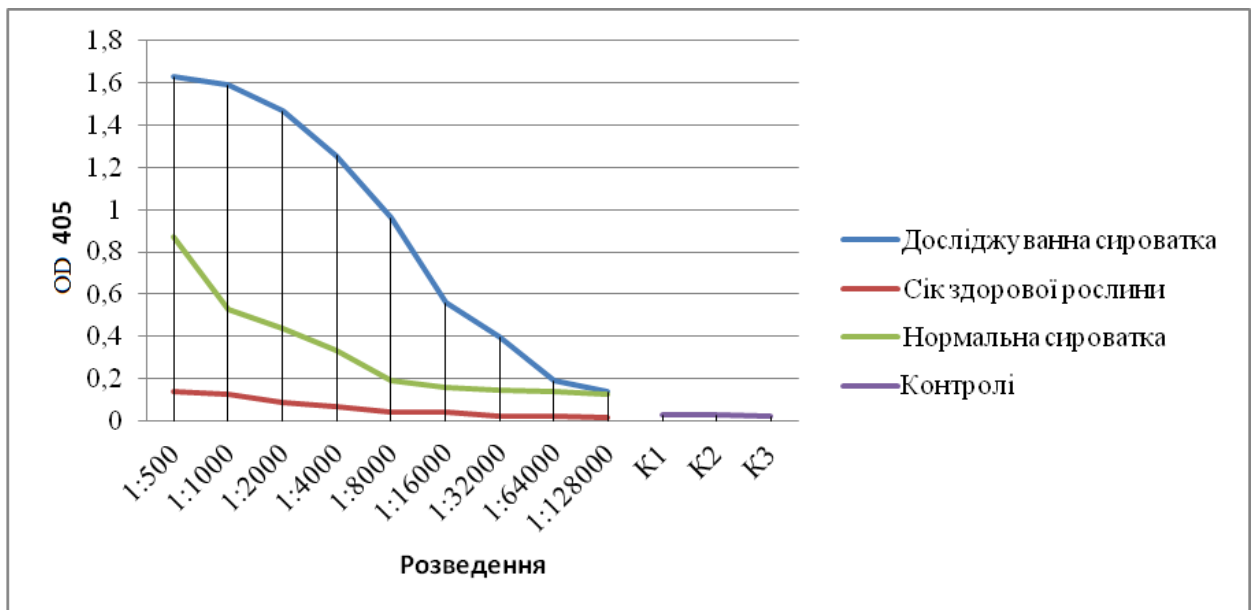


Рис. 4.2 Визначення титру отриманої сироватки до ХВХ

Результати ІФА візуалізовані на діаграмі (Рис. 4.2.), демонструють те, що значення коефіцієнту поглинання досліджуваної сироватки більше ніж вдвічі перевищило значення для нормальної сироватки, що свідчить про відсутність хибно-позитивного результату.

Специфічність отриманих антисироваток визначали за допомогою методу електроімуноблотинга. При взаємодії ізоляту ХВХ із гомологічними АТ на нітроцелюлозній мембрані спостерігалася чітка смуга, маса якої складала 25 кДа (Рис. 4.3.).

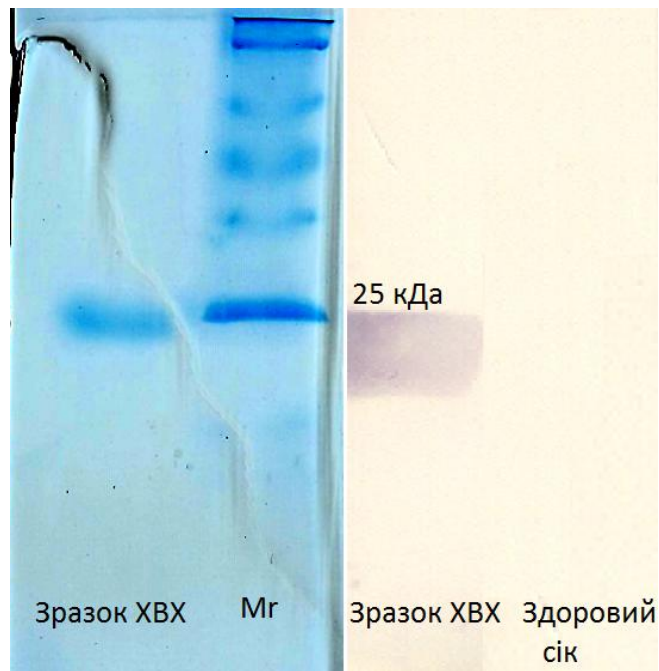


Рис. 4.3 Специфічність отриманої антисироватки визначена методом імуноелектроблотингу.

При взаємодії здорового соку хости із антитілами не спостерігалось утворення смуг, що свідчить про відсутність специфічної реакції з рослинними білками. Отже, перевірка отриманої антисироватки встановила її специфічність.

4.3 ЗТ-ПЛР з імунним захопленням із отриманою сироваткою до ХВХ

Отримання діагностичних антитіл у достатній кількості дозволило нам провести роботу у напрямку модифікації виділення РНК для подальших досліджень ХВХ. Це було зроблено з метою зменшення собівартості аналізу одного зразку.

Для детекції використовували ЗТ-ПЛР *SuperScript® II* (Invitrogen, USA) та пару праймерів до ділянки білка оболонки ХВХ, в основі модифікації є принципом ІФА взаємодії антигену з чутливими антитілами. А в якості

досліджуваних зразків використовувалися РНК, виділенні методом імунного захоплення.

В подальшому візуалізували продукти ампліфікації методом електрофорезу у 1,5% агарозному гелі (рис. 4.4).

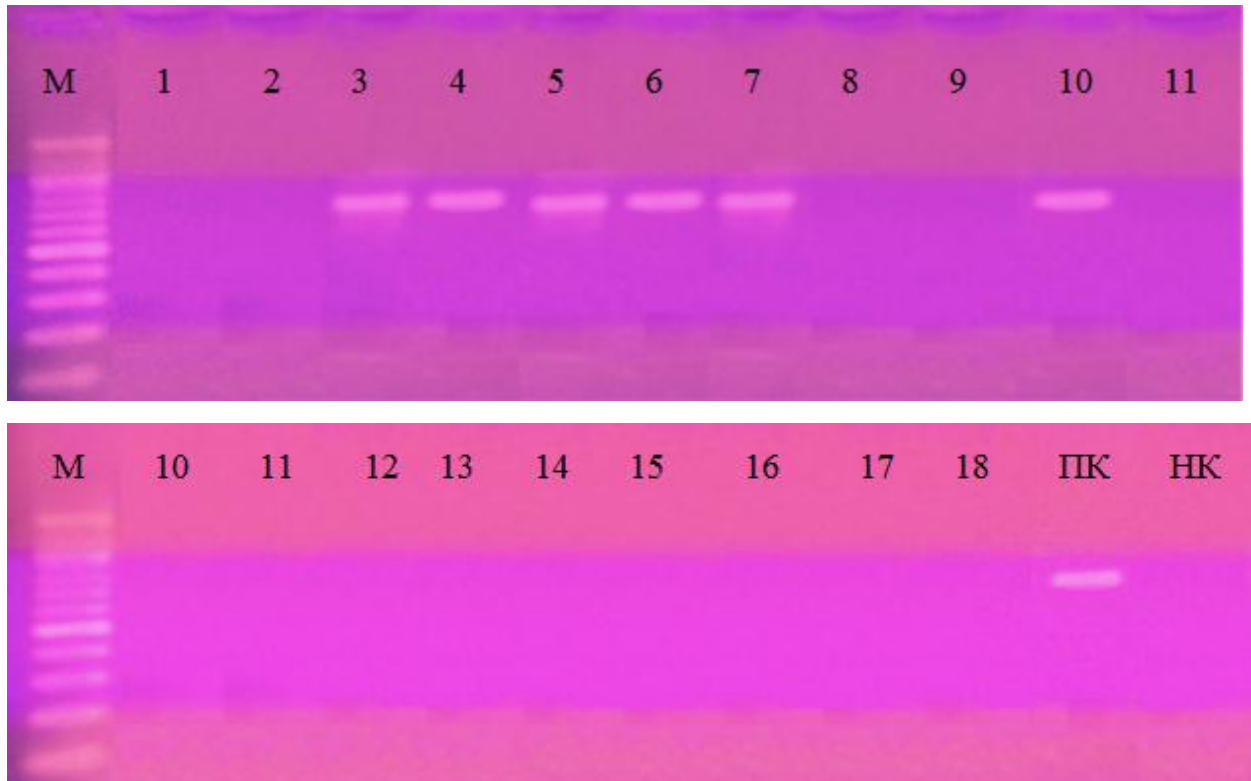


Рис. 4.4 Електрофорез продуктів ампліфікації в агарозному гелі: М – маркери, 1 – *Hosta Venticosa*, 2 – *Hosta Udulata*, 3 – *Hosta Halcyon*, 4 – *Hosta Crispula Maek*, 5 – *Hosta Gold Standart*, 6 – *Hosta Great Expectation*, 7 – *Hosta Ultraviolet light*, 8 – *Hosta Mediovariegata*, 9 – *Hosta X* ряд 24, 10 – *Hosta X* ряд 16, 1 та 2 кущ, 11 – *Hosta August Moon*, 12 – *Hosta Twilight*, 13 – *Hosta X* ряд 18, 14 – *Hosta Paul Glory*, 15 – *Hosta Siboldiana*, 16 – *Hosta Whirlwind*, 17 – *Hosta Abigua*, 18 – *Hosta. Wide Brim 25* ряд, ПК- позитивний контроль, НК - негативний контроль

За результатами ЗТ-ПЛР з імунним захопленням було детектовано продукт ампліфікації розміром 706 бп в 6 зразках з 18 досліджуваних.

4.4 Результати досліджень отриманої антисироватки

Отже, в результаті нашої роботи була отримана специфічна антисироватка до українського ізоляту ХВХ з робочим розведенням 1 : 8000 при титрі 1 : 16000 для подальшого скринінгу Х вірусу хости серологічними методами [90].

Була розроблена та апробована модифікація ЗТ-ПЛР з імунним захопленням для детекції Х-вірусу хости. Скринінг колекції рослин хости НБС імені М.М. Гришка НАНУ у 2013 році методом ЗТ-ПЛР з імунним захопленням детектував збудник в рослинах таких сортів: *H. Halcyon*, *H. Crispula Maek*, *H. Gold Standart*, *H. Great Expectation*, *H. Ultraviolet ligh*, *Hosta X*, з 18 досліджуваних.

РОЗДІЛ 5 СКРИНІНГ КОЛЕКЦІЙ ХОСТИ

Європейська організація захисту рослин разом з департаментом патології рослин університету штату Міннесоти упродовж третього десятиліття проводить моніторинг поширення ХВХ та висловлює занепокоєння ситуацією, яка склалася в зв'язку з швидким поширенням збудника. Щороку з'являються нові повідомлення про детекцію ХВХ у Європі, Океанії та США [34]. Причини такого стрімкого поширення вірусу вбачають у популярності рослин *Hosta tratt*, яка з року в рік набирає обертів.

З метою встановлення динаміки поширення Х-вірусу хости в колекції ботанічних садів Києва проводився скринінг колекцій рослин.

5.1 Візуальне обстеження колекції рослин

З літературних джерел відомо, що ХВХ інфекція може протікати як безсимптомно, так і супроводжуватися проявом ряду симптомів [36]. Для проведення скринінгу колекції хост Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України та Ботанічного саду імені О.Б. Фоміна відбирали зразки, що демонстрували різні симптоми: системний, прижилковий, міжжилковий хлорози, знебарвлення листкової пластинки, скручування та гофрування листка, некроз.

На рослинах сорту *Hosta Undulata* спостерігалось збільшення прожилок (Рис.5.1.). За літературними даними рослини цього сорту є дуже сприйнятливими до вірусної інфекції і яскраво реагують на збудник.



Рис. 5.1 Збільшення прожилок на *Hosta Undulata*.

На рослинах *Hosta Crispula Maek* спостерігалось гофрування, особливо на краях листках та деформація листкової пластини (Рис.5.2).



Рис. 5.2 Деформація листкової пластини *Hosta Crispula Maek*

Рослини *Hosta Great Expectations* демонстрували гофрування листкової пластини (Рис. 5.3). На рослинах *Hosta Venticosa* спостерігався міжжилковий хлороз (Рис. 5.4).



Рис. 5.3 Гофрування листкової пластини на рослинах *Hosta Grea Expectations*.



Рис. 5.4 Міжжилковий хлороз *Hosta Venticosa*.

На листках рослин *Hosta Halcyon* (Рис.5.5) спостерігався системний хлороз, знебарвлення та просвітління жилок листка.



Рис.5.5 Системний хлороз на листках рослин *Hosta Halcyon*.

Прижилковий хлороз спостерігався на рослинах *Hosta Udulata*. На рослинах *Hosta Wide Brim* спостерігалось збільшення прожилок. Зразок рослин *Hosta X* (ряд 18) демонстрував деформацію листкових пластинок та прижилковий хлороз. *Hosta Ultraviolet light* та *Hosta Gold Standart* так само демонстрували гофрування листків. Листки *Hosta Paul Glory* мали значну деформацію листкової пластинки. На листках *Hosta Abigua moonbeam* та *Hosta August Moon* спостерігався міжжилковий хлороз. (Рис.5.6).



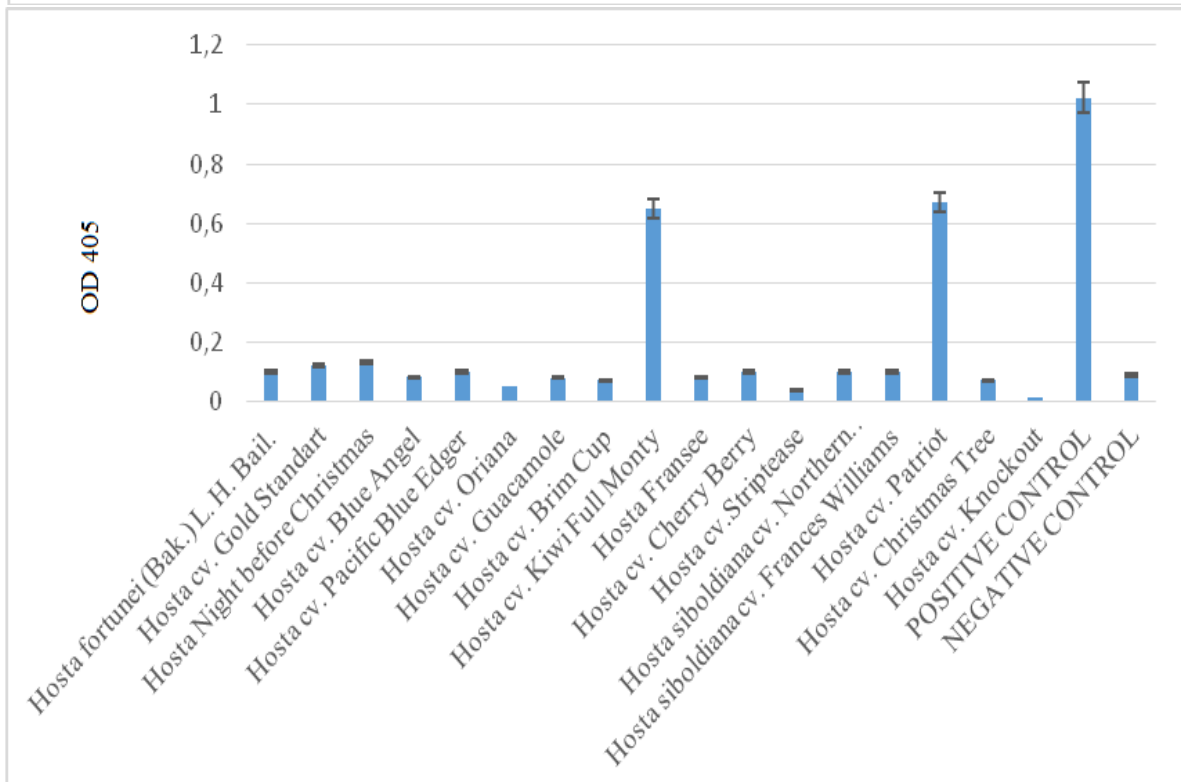
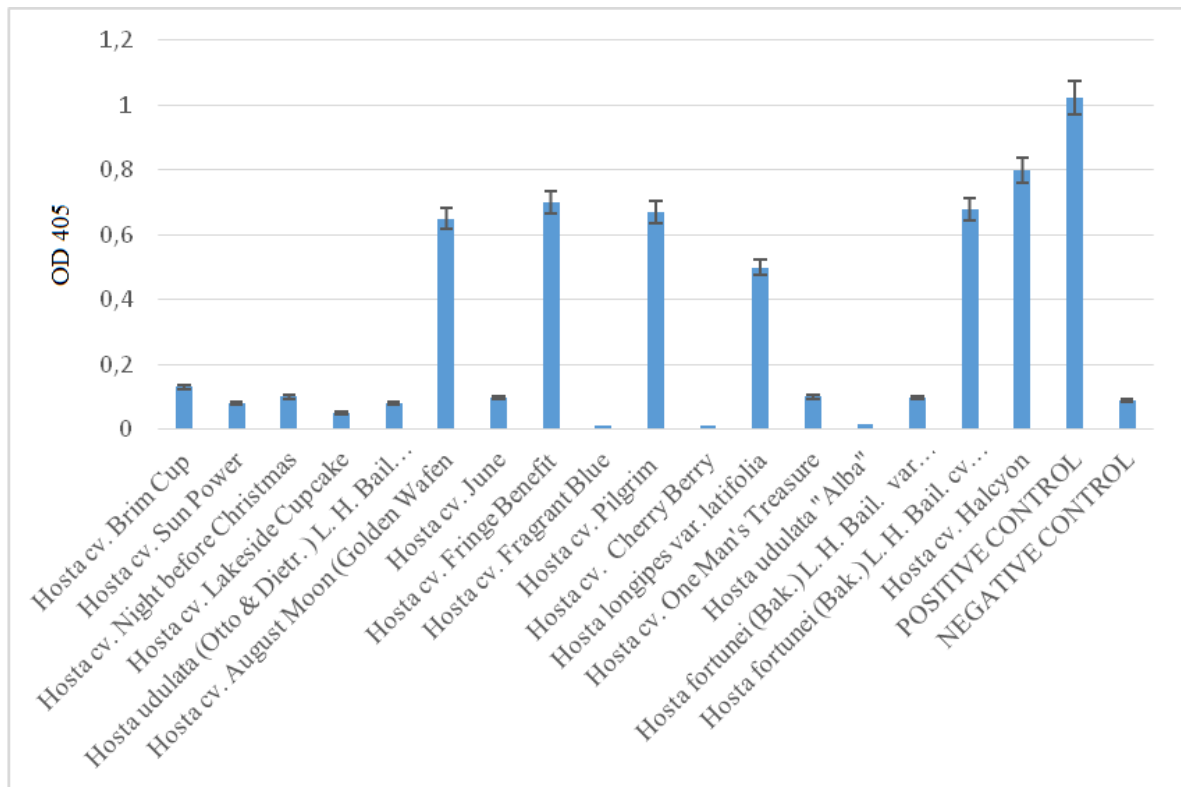
Рис.5.6 Міжжилковий хлороз на *Hosta August Moon*.

На рослинах *Hosta Siboldiana* спостерігалась деформація листової пластинки. На *Hosta Whirlwind* спостерігався міжжилковий хлороз. Листя *Hosta Twilight* демонструвало системний хлороз.

Для встановлення походження вірусоподібних симптомів на рослинах хости різних сортів проводилася постановка ІФА в модифікації «непрямий» з використанням отриманої нами антисироватки до ХВХ.

5.2 Серологічний моніторинг колекцій хост на наявність ХВХ

Результати дослідження колекції хост Ботанічного саду імені М.М. Гришка НАНУ у 2016 методом ІФА в модифікації «непрямий» (Рис 5.7 – 5.8) продемонстрували наступні результати: серед 68 продіагностуваних зразків у 18 виявили Х-вірус хости.



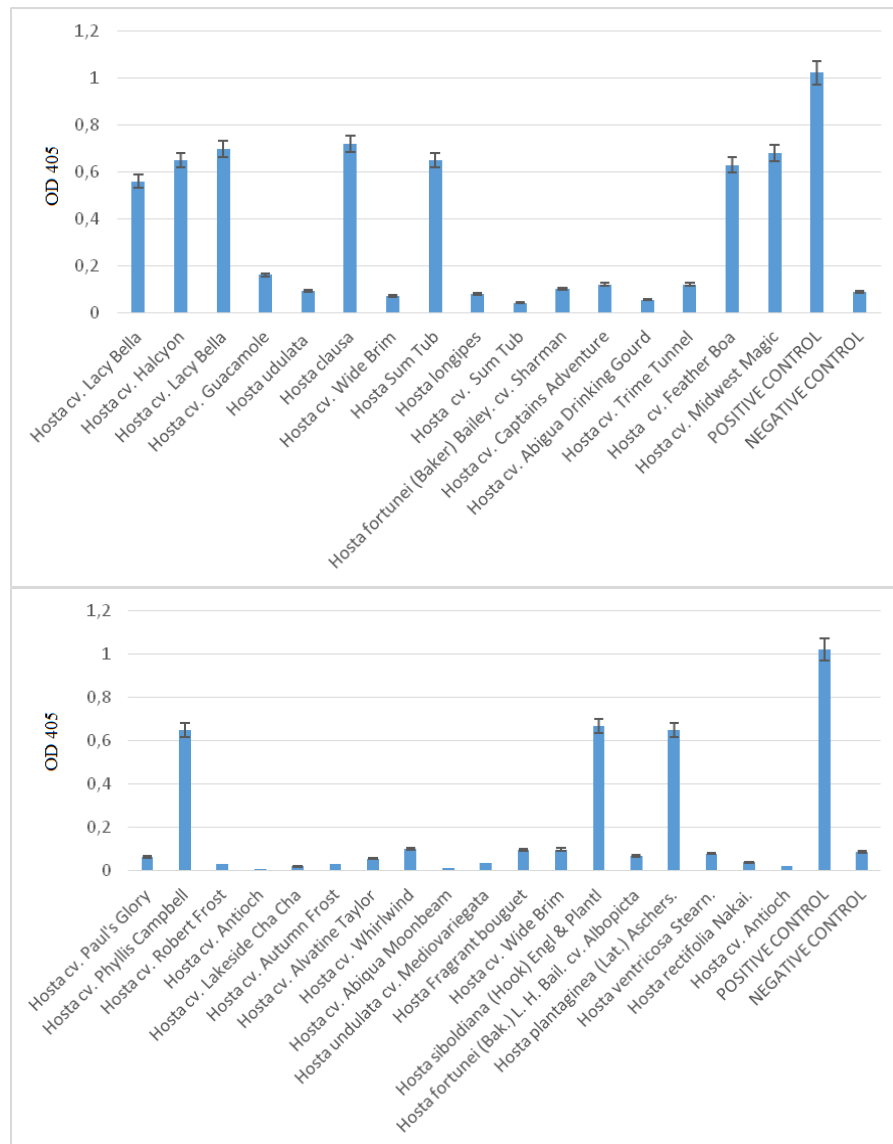


Рис. 5.7 Результати ІФА скринінгу колекції рослин хости НБС імені М.М. Гришка НАНУ за 2016 рік

ХВХ був детектований у таких сортах та видах хости: *Hosta cv. Halcyon*, *Hosta cv. August Moon*, *Hosta cv. Pilgrim*, *Hosta longiper var. latifolia*, *Hosta fortune cv. Albopicta*, *Hosta cv Kiwi*, *Hosta cv. Patriot*, *Hosta cv. Phyllis Campbell*, *Hosta siboldiana*, *Hosta plantaginea Aschers*, *Hosta cv. Midwest Magic*, *Hosta cv Feather Boa*, *Hosta Sum Tub*, *Hosta clausa*, *Hosta cv. Lacy Bella*.

На базі Ботанічного саду імені О.Б. Фоміна були відібрані 5 наявних зразків рослин хости різних видів: *Hosta plantaginea*, *Hosta stolonifera*, *Hosta lancifolia*, *Hosta fortunei gigantea*, *Hosta undulata*.

Результати перевірки зразків рослин хости продемонстрували, що показники поглинання всіх 5 зразків не перевищили значення негативного контролю, що свідчить про відсутність вірусу (Рис. 5.8).

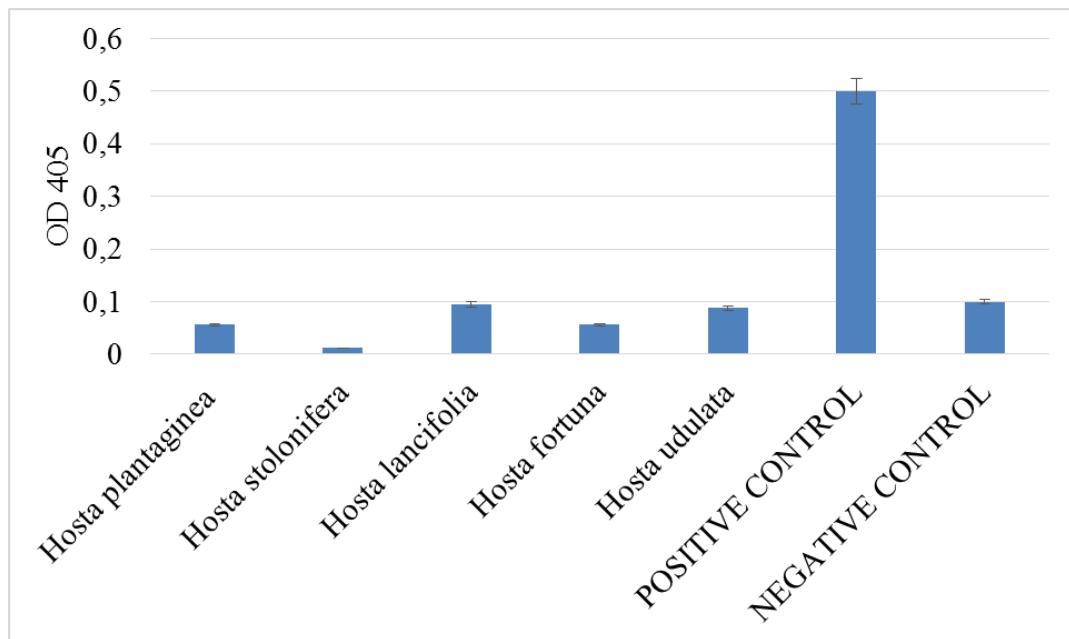


Рис. 5.8 Результати ІФА скринінгу колекції рослин хости Ботсаду ім. Олександра Фоміна.

Проведений скринінг колекцій Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАНУ та Ботсаду ім. Олександра Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка продемонстрував ефективність сироватки до ХВХ. Щодо виявлення збудника у колекціях НБС ім. М.М. Гришка НАНУ у 2013 році методом ЗТ-ПІР з імунним захопленням аналіз встановив 5 інфікованих зразків рослин хости таких сортів: *Hosta Ultraviolet light*, *Hosta Stiletto*, *Hosta Sum and substance*, *Hosta Great Expectations*, *Hosta Gold Standar*.

Повторний скринінг колекції у 2016 році виявив 15 інфікованих зразків рослин хости таких сортів: *Hosta cv. Halcyon*, *Hosta cv. August Moon*, *Hosta cv. Pilgrim*, *Hosta longiper var. latifolia*, *Hosta fortune cv. Albopicta*, *Hosta cv Kiwi*, *Hosta cv. Patriot*, *Hosta cv. Phyllis Campbell*, *Hosta Siboldiana*, *Hosta plantaginea Aschers*, *Hosta cv. Midwest Magic*, *Hosta cv Feather Boa*, *Hosta Sum Tub*, *Hosta clausa*, *Hosta cv. Lacy Bella*.

Зважаючи на широке використання рослин *Hosta sp.* в озелененні та ландшафтному дизайні та присутність ХВХ в екологічних умовах України, необхідно проводити контроль за посадковим матеріалом та зупинити розповсюдження вірусу за допомогою використовуючи ранньої діагностики методом ІФА [90].

РОЗДІЛ 6. БІОЛОГІЧНЕ ТЕСТУВАННЯ КРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ ХВХ, ВСТАНОВЛЕННЯ СПЕКТРУ РОСЛИН-ІНДИКАТОРІВ.

Рослини-індикатори – це рослини, що демонструють чітку та специфічну реакцію на інфікування певним патогеном. Даний метод дозволяє встановити спектр чутливих до вірусу рослин. З метою визначення біологічних властивостей українського ізоляту ХВХ було проведене біотестування на різних рослинах.

Результати експериментального ураження продемонстрували наявність симптомів лише у рослин Томату їстівного (*Lycopersicon esculentum*), Перцю овочевого (*Capsicum annuum ssp. grossum* FiL.) та Тютюну (*Nicotiana benthamiana*). На листках Помідора їстівного (*Lycopersicon esculentum*) були зафіксовані великі (1-1,5 мм) некрози світло-коричневого кольору, на перці (*Capsicum annuum. grossum* FiL.) – великі (0,5-1,5 мм) некрози світло-коричневого кольору, на тютюні (*Nicotiana benthamiana*) – симптоми мозаїки. На інших тест-рослинах не було зафіксовано жодних видимих симптомів (Таблиця 6.1).

Таблиця 6.1

Реакція рослин-індикаторів на ураження ХВХ

№п/п	Індикаторні рослини	Типи реакцій рослин на вірус ХВХ
1.	Кабачок цуккіні, сорт «Цукіша» (<i>Cucurbita pepo ssp. pepo</i>)	На поверхні інокульованих листків не спостерігалися видимі симптоми, наступні листки, що вирости, також не мали симптомів.
2.	Момордіка (<i>Momordica charantia</i>)	На поверхні інокульованих листків не спостерігалися видимі симптоми, наступні листки, що вирости, також не мали

		СИМПТОМІВ.
3.	Тютюн махорка (<i>Nicotiana rustica</i>)	Збільшення розміру листкових пластинок.
4.	Томат їстівний (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Спостерігалися великі (1-1,5 мм) некрози світло-коричневого кольору на 7-му добу після інфікування. Наступні листки, що вирости, демонстрували симптоми мозаїки.
5.	Перець овочевий товстий (<i>Capsicum annuum ssp. grossum</i> FiL.)	Спостерігалися некрози (0,5-1,5 мм) світло-коричневого кольору на 7-гу добу після інфікування. Наступні листки, що вирости, були більші за розміром.
6.	Диня посівна (<i>Melo sativus</i>)	На поверхні інокульованих листків не спостерігалися видимі симптоми, наступні листки, що вирости, також не мали симптомів.
7.	Дурман індійський (<i>Datura metel L.</i>)	На поверхні інокульованих листків не спостерігалися видимі симптоми, наступні листки, що вирости, також не мали симптомів.
8.	Тютюн (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	На інокульованих листках спостерігалися хлоротичні плями.

Як видно з даних наведених в таблиці 6.1, тільки у рослин Томату їстівного (*Lycopersicon esculentum*), Перецю овочевого товстого (*Capsicum annuum ssp. grossum* FiL.) Тютюну (*Nicotiana benthamiana*) спостерігалися вірусні симптоми.

Методом ІФА в модифікації «непрямий» з використанням антисироватки до ХВХ був детектований Х-вірус хости у зразках рослин Тютюну (*Nicotiana benthamiana*) (Рис.6.2).

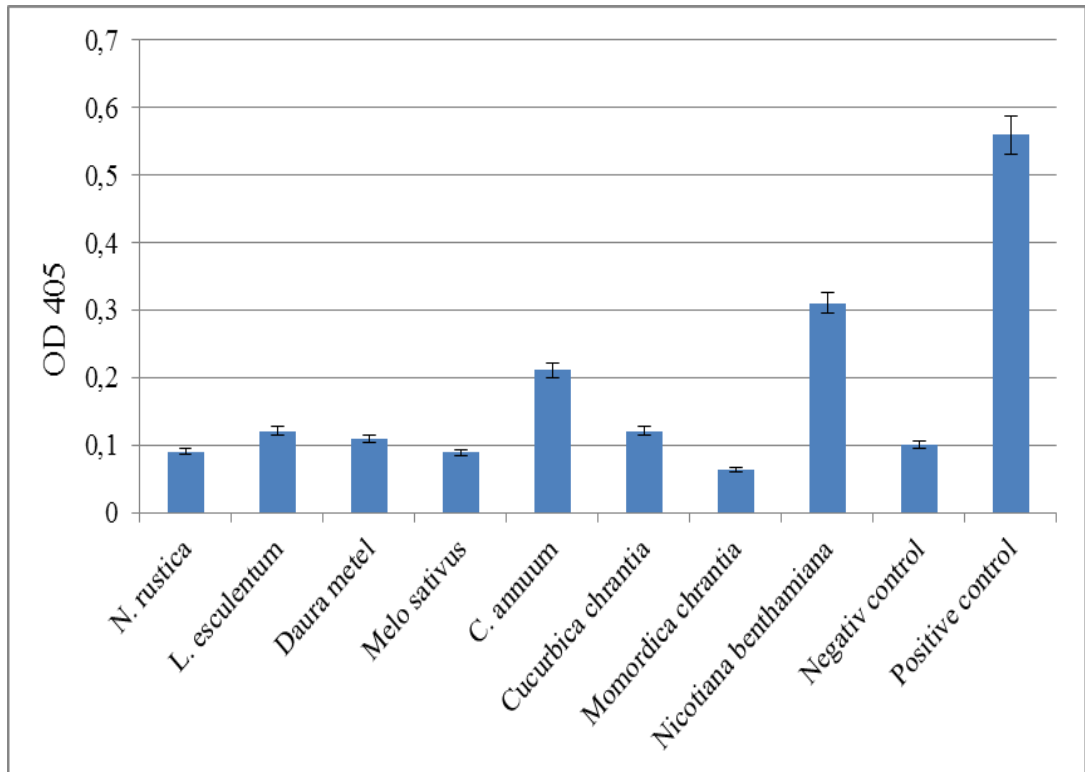


Рис. 6.2. Результати ІФА діагностики рослин-індикаторів на наявність ХВХ

Як відомо, локальні некрози виникають у надчутливих рослин в результаті загибелі інфікованих клітин в місцях потрапляння патогена. Сигнальні речовини активують захисні механізми у сусідніх та віддалених клітинах, що призводить до некротизації клітин. Загибель клітин призводить до виділення в міжклітинний простір антипатогенних ферментів і метаболітів, що блокують розповсюдження вірусу по рослині. Всі ці процеси, зрештою, призводять до одуження рослин [5].

У надчутливих рослинах можливе обмежене накопичення вірусу. В місцях інокуляції утворювались локальні некрози (Тютюн махорка (*Nicotiana*

rustica), Перець овочевий товстий (*Capsicum annuum ssp. grossum* FiL.). У надчутливих рослин «ближній транспорт» вірусу проходить тільки в період росту локальних некрозів. За межі сформованих некрозів вірус не може потрапити [8].

Однак локалізація вірусів не обов'язково супроводжується некротизацією клітин у інфікованих рослин. У толерантних рослинах рух вірусу тканинами рослини може не супроводжуватися розвитком симптомів на листках. В даному випадку такі рослини як: Кабачок цуккіні, сорт «Цукіша» (*Cucurbita pepo ssp. pepo*), Момордіка (*Momordica chrantia*), Диня посівна (*Melo sativus*), Дурман індійський (*Datura metel* L.) – безсимптомні інфіковані ХВХ рослини (Рис. 6.2.).

При візуальному спостереженні за експериментальними рослинами були відмічені збільшення розміру листкових пластинок.

Отже, з восьми видів рослин-індикаторів досліджуваній ізолят ХВХ спричиняє прояв симптомів у вигляді некрозів тільки на рослинах Томатів (*Lycopersicon esculentum*) та Перцю овочевому (*Capsicum annuum*), у вигляді мозаїки на тютюні (*Nicotiana benthamiana*). Методом ІФА встановлена наявність антигенів ХВХ тільки в зразках рослин Тютюну (*Nicotiana benthamiana*) та Перці овочевому (*Capsicum annuum*).

Отримані нами дані співпадають з даними літературних джерел про високу специфічність та виключність взаємодії ХВХ лише з рослинами хости та з рослинами тютюну (*Nicotiana benthamiana*) при експериментальному ураженні [91].

На даний час відомо лише два шляхи передачі Х-вірусу хости, вегетативний та механічний. Для визначення інших шляхів поширення ХВХ було проведено дослідження здатності українського ізоляту до насінневої передачі.

Для дослідження брали насіння рослин *Hosta Sieboldiana*, *H. August Moon*, *H. Sum & Substance*, *H. Gold Standard*, *H. Golden Tiara*, *H. Paul's Glory*,

відібрані в колекції Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка в період після цвітіння.

Рослини пророщені з насіння, на стадії трьох справжніх листків використовували для досліджування методом ІФА в модифікації «непрямий» з використанням специфічних антисироватки до ХВХ (Рис.6.3).

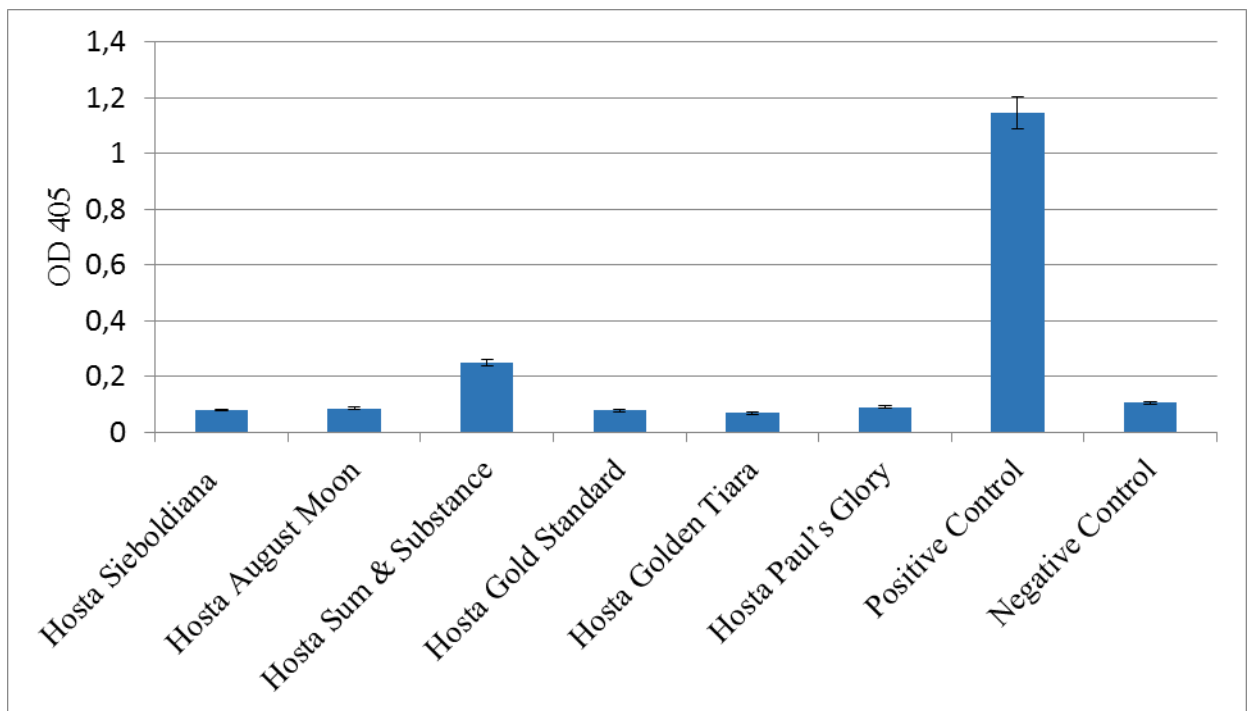


Рис. 6.3 Результати ІФА діагностики рослин хости

Серед шести досліджуваних зразків Х-вірус хости був детектований в рослинах *Hosta Sum and Substance*, раніше в рослинах цього сорту вже був детектований Х-вірус хости. Результати дослідження вказують на здатність вірусу передаватися насінням.

Вперше в Україні було встановлено здатність ХВХ до насінневої передачі. В Європі досліджень у цьому напрямку не проводилося, так як комерційне розмноження рослин хости проводять живцюванням, а не пророщуванням насіння, адже в такому разі втрачається сортова приналежність.

РОЗДІЛ 7 ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ Х - ВІРУСУ ХОСТИ

7.1 Філогенетичний аналіз послідовностей білка оболонки українського ізоляту

Філогенетичний аналіз – це метод біологічної систематики, що дозволяє встановити еволюційні зв'язки між досліджуваними об'єктами. Завдяки даному методу можливо прослідити чітку лінію еволюційних змін у геномі вірусу, спрогнозувати його можливі зміни, встановити походження та штамову приналежність.

Першими кроками у вивченні особливостей геному українського ізоляту ХВХ (KJ406186.1 Ukraine 2014) було порівняння нуклеотидних послідовностей капсидного білка українського ізоляту з представленими в світових базах даних відомими штамми та ізолятами ХВХ. Виявилось, що український ізолят має найвищий відсоток подібності (біля 99 % за нуклеотидними послідовностями та біля 100% за амінокислотними послідовностями) з новозеландським, польським та американськими ізолятами (Таб. 7.1).

Таблиця 7.1

Порівняння амінокислотних та нуклеотидних послідовностей білка оболонки Ukraine 2014 та різних ізолятів ХВХ, представлених в NCBI

Назва ізоляту	% Подібності н.к.	% Подібність а.к.
KJ406186.1 Ukraine 2014		
FJ821703 Poland 2009	99,1	99,4
FJ821704 Poland 2009	99,3	99,6
FJ821702 Poland 2009	99,1	99,2
FJ821705 Poland 2009	100	100
KJ406186 Czech Republic 2011	99,3	100
JF301950 Czech Republic 2011	99,6	100
FJ403380 USA OH 2009	99,8	100

FJ903405 USA TN 2009	99,3	99,4
FJ403386 USA OH 2009	99,8	99,8
FJ903402 USA TN 2009	99,6	100
FJ903395 USA TN 2009	99,6	100
FJ903387 USA TN 2009	99,8	100
FJ403384 USA OH 2009	99,1	99,2
FJ403381 USA OH 2009	99,6	100
FJ903414 USA TN 2009	99,6	100
FJ903407 USA TN 2009	99,6	100
FJ903406 USA TN 2009	99,3	100
FJ903400 USA TN 2009	99,3	100
FJ903399 USA TN 2009	99,3	100
FJ903396 USA TN 2009	99,3	100
FJ903390 USA TN 2009	99,3	100
FJ903389 USA TN 2009	99,6	100
FJ403387 USA OH 2009	99,8	100
AJ517352 SOUTH KOREA 2003	99,3	99,6
JX535294 China 2013	99,3	99,4
JF301954 Czech Republic 2011	99,1	99,5
JF301949 Czech Republic 2011	99,1	99,5
JF301948 Czech Republic 2011	99,6	100
FJ903412 USA TN 2009	99,6	100
FJ903411 USA TN 2009	99,1	100
FJ903410 USA TN 2009	99,3	99,4
FJ903408 USA TN 2009	99,8	100
FJ903398 USA TN 2009	99,3	99,4
FJ903393 USA TN 2009	99,1	99,3
FJ903391 USA TN 2009	99,1	99,2
FJ403383 USA TN 2009	99,6	99,8
FJ403382 USA OH 2009	99,1	99,8
JX891456 Iran 2014	98,9	99,2
JX891455 Iran 2014	99,6	99,7
FJ903413 USA TN 2009	99,6	99,6
FJ903401 USA TN 2009	99,1	99,4
FJ903388 USA TN 2009	99,6	99,3
FJ403385 USA OH 2009	99,1	99,8

JX891454 Iran 2014	98,6	99,0
FJ903386 USA TN 2009	99,1	99,3
JX891453 Iran 2014	98,9	99,2
FJ903404 USA TN 2009	99,6	99,8
JF732917 New Zealand 2011	100	100

Для визначення можливого походження українського ізоляту ХВХ був використаний метод найбільшої правдоподібності (Maximum Likelihood method), який є дискретним методом, з використанням моделі Т92+G (General Reversible Mitochondrial), підібраної за допомогою програми MEGA7 (Рис.7.2) [92 - 95].

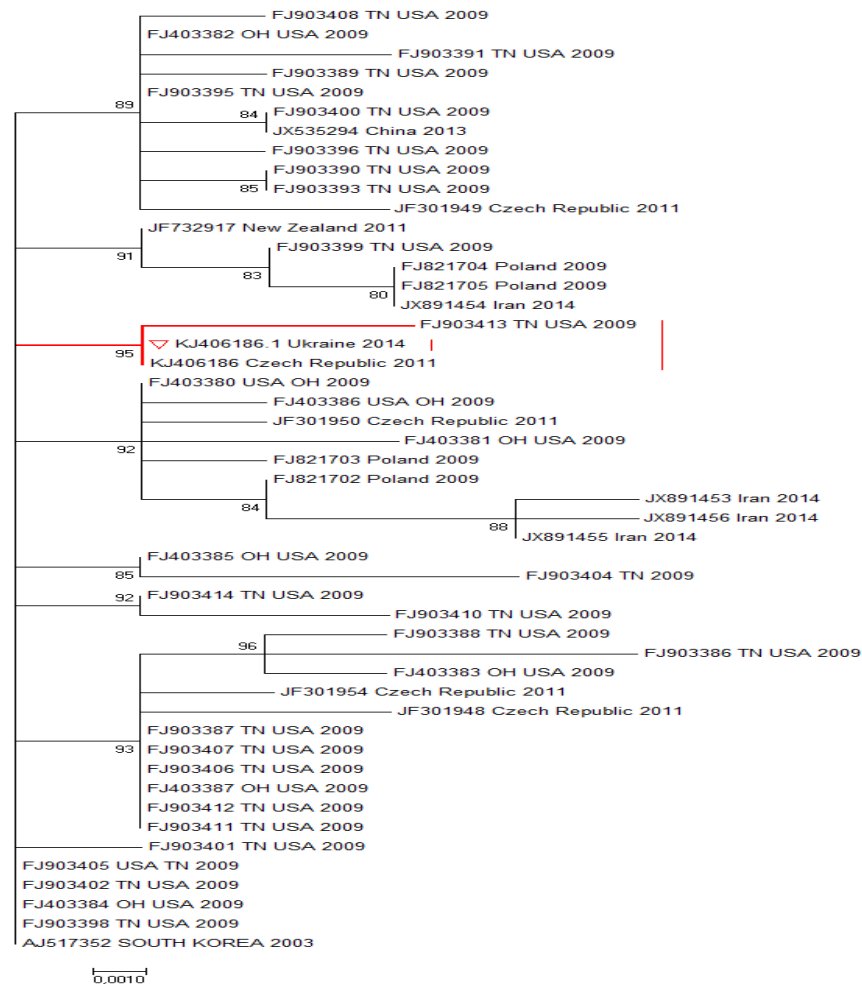


Рис. 7.2 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей білка оболонки (CP) різних ізолятів ХВХ методом максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood method), бутстреп 1000.

Як видно з отриманого філогенетичного дерева (Рис.7.2.), український ізолят утворив гілку з ізолятом з Чеської Республіки, вочевидь, вони мають спільного предка. При порівнянні послідовностей гена білка оболонки українського ізоляту з усіма представленими ізолятами зі світової бази даних (NCBI) число амінокислотних заміщень на сайт між послідовностями становить 0,017. При цьому максимальний відсоток подібності українського ізоляту склав 100 % з ізолятом з Нової Зеландії, а середнє значення 99,4 [96]. Таким чином, угруповання ізолятів ХВХ в групі не демонструють чітких географічних зв'язків і залежності від сортової приналежності рослин, з яких був ізолюваний патоген.

Для встановлення зв'язку дії позитивного і негативного добору на реалізацію генетичної інформації вірусу та можливі заміщення амінокислот у послідовностях білка оболонки українського ізоляту Х-вірусу хости та інших ізолятів, представлених в світовій базі даних *NCBI*, були використані наступні методи: SLAC, FEL, IFEL, MEME та FUBAR. В роботі використовувалися 5 різних статистичних методів з метою забезпечення достовірності отриманого результату [83, 97]. Значення добору вважається позитивним при значенні що найменше 0,1. У аналізі було використано 48, нуклеотидних послідовностей білка оболонки ХВХ ізолятів з США, Польщі, Кореї, Ірану та Чеської республіки по 672 нуклеотида кожна послідовність.

Загальний аналіз тиску добору методом FEL продемонстрував наявність одного синонімічного заміщення в 14 кодоні (Рис. 7.3.) та 32 несинонімічних заміщень.

Codon	dS	dN	dN/dS	Normalized dN-dS	p-value
14	1.86516e-16	7.20216	38614167149199000.000	55.5762	0.00543257

Codon	dS	dN	dN/dS	Normalized dN-dS	p-value
-------	----	----	-------	------------------	---------

6	4.16213	0	0.000	-32.1175	0.0930807
9	4.00808	0	0.000	-30.9288	0.0964413
13	3.59201	0	0.000	-27.7181	0.0917807
15	4.14829	0	0.000	-32.0107	0.0949547
32	3.88987	0	0.000	-30.0166	0.0490495
39	8.24566	0	0.000	-63.6285	0.0182861
42	4.16202	0	0.000	-32.1167	0.0797738
50	4.93673	0	0.000	-38.0948	0.0571749
56	6.24671	0	0.000	-48.2034	0.0881107
60	2.51295	0	0.000	-19.3914	0.0832581
62	5.26322	0	0.000	-40.6142	0.0372141
72	6.2493	0	0.000	-48.2234	0.0236864
83	5.7597	0	0.000	-44.4453	0.0855802
87	3.93592	0	0.000	-30.372	0.082813
105	6.98248	0	0.000	-53.8811	0.0797571
108	4.35614	0	0.000	-33.6146	0.0890374
119	14.6416	0	0.000	-112.983	0.00183526
125	4.21977	0	0.000	-32.5623	0.0904406
127	6.98274	0	0.000	-53.8831	0.0793932
128	4.97153	0	0.000	-38.3634	0.0878399
144	13.1441	0	0.000	-101.428	0.00327616
155	10.0724	0	0.000	-77.7248	0.0074685
160	4.21595	0	0.000	-32.5329	0.0905656
166	8.61775	0	0.000	-66.4997	0.0314911
178	3.9586	0	0.000	-30.5469	0.0974778
182	6.44472	0	0.000	-49.7314	0.08627
187	4.93698	0	0.000	-38.0968	0.0571722

191	3.90455	0	0.000	-30.1299	0.0471725
196	4.01266	0	0.000	-30.9641	0.0962791
198	2.70758	0	0.000	-20.8933	0.0931806
212	6.40093	0	0.000	-49.3934	0.0881118
218	2.59205	0	0.000	-20.0018	0.0817111

Рис. 7.3 Аналіз 48 послідовностей білка оболонки різних ізолятів ХВХ методом FEL

Для визначення тиску добору, який діє на кодони білка оболонки на внутрішніх гілках філогенетичного дерева, був застосований метод IFEL. За допомогою нього було виявлено один позитивно відібраних сайт (кодон 14, TTG) та три сайти отриманих під впливом негативного добору (кодон 119, 144, 155) (Рис 7.4).

Codon	dS	dN	dN Leaves	dN/dS	Normalized dN-dS	p-value
14	1.21043e-15	11.1267	5.82291	9192353130705616 .000	85.8604	0.00941797
119	14.6416	0	0	0.000	-112.983	0.0337521
144	13.1441	0	0	0.000	-101.428	0.0515056
155	10.0724	0	0	0.000	-77.7248	0.0618472

Рис 7.4 Аналіз 48 послідовностей білка оболонки різних ізолятів ХВХ методом IFEL.

Натомість методом MEME було виявлено 2 сайти позитивного добору в кодонах 14 та 43 при значенні p-value 0.0224212 та 0.05436 ($p=0.1$).

Аналіз послідовностей білка оболонки XBХ методом FUBAR підтвердив результати позитивного добору інших трьох аналізів FEL, IFEL та MEME та визначив його в позиції 14 кодону. Крім того було визначено 9 сайтів з негативним добром (Рис. 7.5).

Codon	α	β	$\beta-\alpha$	Posterior Prob $\beta>\alpha$	Emp. Bayes Factor	PSRF	Neff
14	0.137812	2.37451	2.2367	0.996029	423.867	0.99912	1211.38
Codon	α	β	$\beta-\alpha$	Posterior Prob $\beta<\alpha$			
32	0.741278	0.105481	-0.635797	0.919045			
39	1.9621	0.117352	-1.84475	0.964138			
62	1.19786	0.11163	-1.08623	0.942273			
72	1.49843	0.109347	-1.38908	0.955811			
119	4.72477	0.122345	-4.60243	0.997747			
144	4.17935	0.128492	-4.05086	0.997018			
155	2.69425	0.1086	-2.58565	0.976267			
166	2.42117	0.128989	-2.29218	0.964862			
191	0.728711	0.104708	-0.624003	0.918834			

Рис. 7.5 Аналіз 48 послідовностей білка оболонки різних ізолятів XBХ методом FUBAR.

Під дією негативного добору методами FEL та IFEL були визначено 32 та 3 сайти, відповідно (див. табл. 76).

Статистично значимі результати впливу негативного добору на нуклеотидні послідовності білка оболонки X вірусів хости методами SLAC, IFEL, FEL і FUBAR

Метод	Кі-сть кодонів, що перебувають під дією негативного добору	Номер кодону
IFEL	3	119, 144, 155
FEL	32	6, 9, 13,15, 32, 39, 42, 50, 56, 60, 62, 72, 83, 87, 105, 108, 119 , 125, 127, 128, 144, 155 , 160, 166, 178, 182, 187, 191, 196, 198, 212, 218
FUBAR	9	32, 39, 62, 72, 119, 144, 155 , 166, 191

Таким чином, трьома методами (IFEL, FEL і FUBAR) було визначено вплив негативного добору на 3 кодони (119, 144, 155). Вплив добору на інші сайти був нейтральний, число амінокислотних заміщень на сайт між послідовностями становить 0,017. Як відомо за літературними даними, генетична стабільність популяції вірусів рослин забезпечується саме направленою дією негативного добору – добору на підтримання сталості. Отже, показано генетичну стабільність послідовностей гена білка оболонки X-вірусу хости.

7.2 Повногеномне секвенування X-вірусу хости, виділеного з рослин хости

З розвитком молекулярних та філогенетичних методів дослідження сучасна наука може знайти відповіді на безліч запитань: як змінюється геном вірусу, як від цих змін буде залежати стратегія його розвитку, які

взаємозв'язки існували чи існують з іншими представниками царства *Vira*. Повногеномне секвенування методом *Next generation sequencing* дозволяє розширити ці дослідження і отримати послідовність геному будь якого розміру [98,99].

На першому етапі на шляху до отримання повногеномної послідовності українського ізоляту ХВХ було виділено РНК з використання *TRIzol® Reagent* зі зразків рослин хости шести сортів: *Hosta Wide Brime*, *Hosta Gold Standart*, *Hosta One Man's*, *Hosta Twilight*, *Hosta Venticosa steam*, *Hosta Stilleto* (Рис. 7.7).

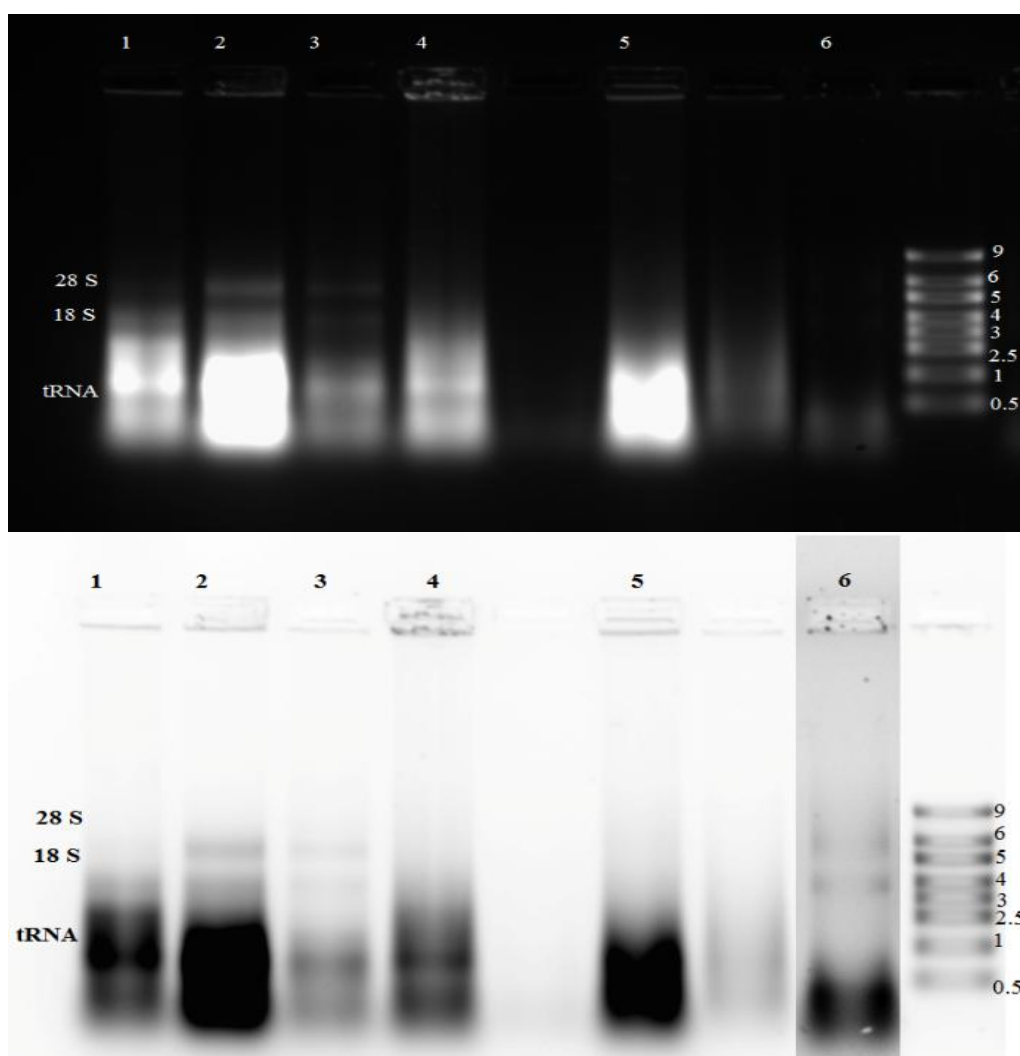


Рис. 7.7 Електрофореграма 28S, 18S та tRNA, виділених з листя хости: 1 – *Hosta Wide Brime*, 2 – *Hosta Gold Standart*, 3 – *Hosta One Man's*, 4 – *Hosta Twilight*, 5 – *Hosta Venticosa steam*, 6 – *Hosta Stilleto*.

Як видно рисунку 7.3, було виділено 28S та 18S рибосомальних субодиниці РНК. В подальшому провели вимірювання чистоти та концентрації препарату за допомогою приладу *NanoDrop*®: концентрація препарату в стерильній воді становила 106 нг/мкл.

Наступним кроком було створення ДНК-бібліотек для подальшого секвенування. В роботі використовувався набір *TruSeq*®*SmallRNA* [100, 101]. Для успішного повногеномного секвенування необхідно було створити індексовані ДНК-клони (Рис 7.8).

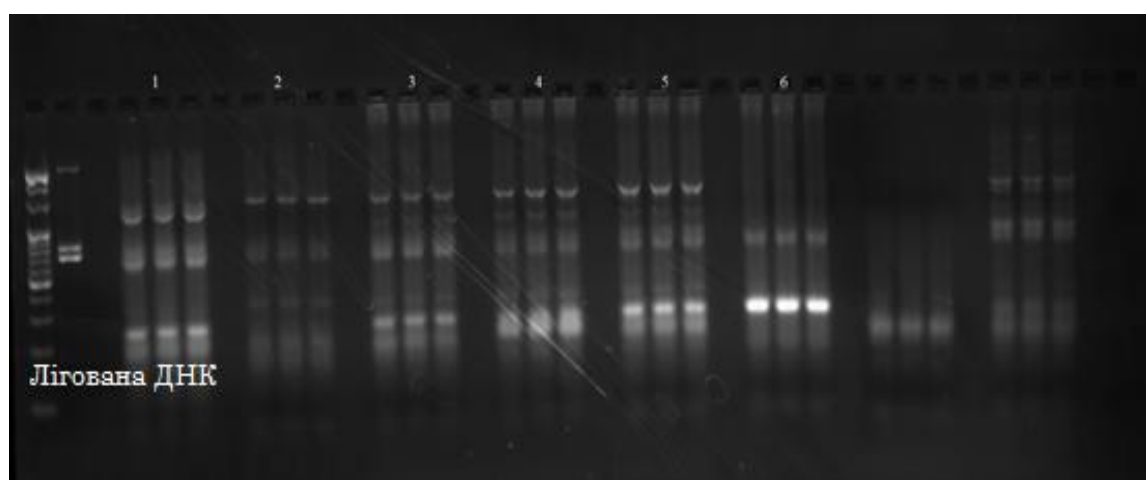


Рис. 7.8 Електрофореграма з візуалізованими зразками лігованих субматричних РНК з індексними послідовностями: 1 – *Hosta Wide Brime*, 2 – *Hosta Gold Standart*, 3 – *Hosta One Man's*, 4 – *Hosta Twilight*, 5 – *Hosta Venticosa steam*, 6 – *Hosta Stilleto*.

В подальшому зразки були передані до естонського геномного центру, Університет Тарту (м. Тарту, Естонія). Секвенування проводилося на апараті фірми *HiSeq2500* (*Illumina*).

Для роботи використовували безкоштовне програмне забезпечення *PuTTY* [101]. Для обробки отриманих послідовностей використовували програму для асамблювання коротких послідовностей – *Oasis*, за допомогою якої були отримані послідовності різної довжини, кожен з яких перевірили в програмі *BLAST* (Рис. 7.9) [102].

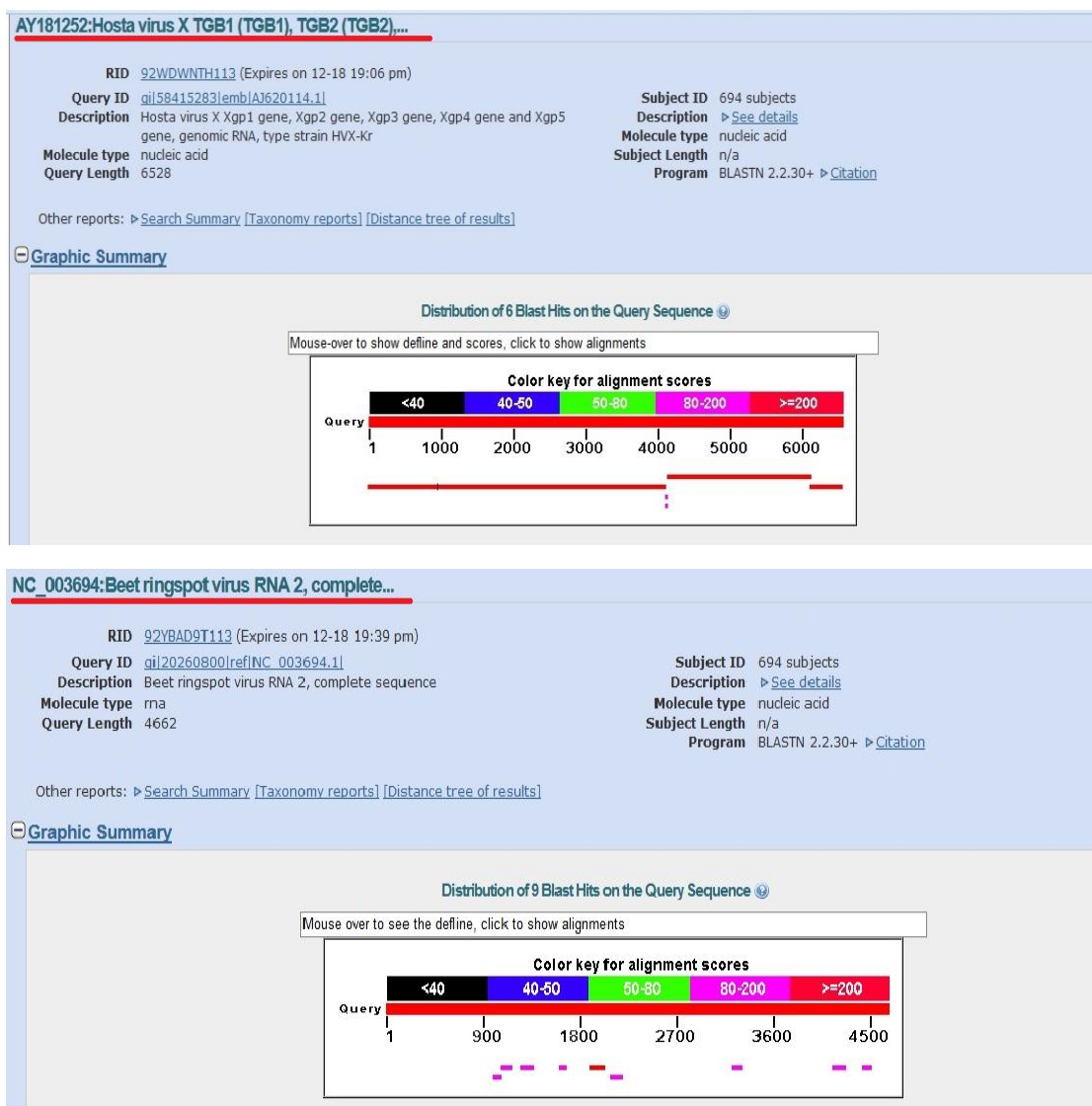


Рис.7.9 Аналіз послідовностей в програмі BLAST.

Аналіз даних продемонстрував наявність послідовності більшою ніж 6000 bp з високим відсотком подібності з Корейським ізолятом X – вірусу хости (NCBI NC 011544.1) та до дев'яти коротких послідовностей розміром від 50 до 100 bp. з середнім рівнем подібності до вірусу Кільцевої плямистості буряку (*Beet ringspot virus (BRSV)*).

7.3 Філогенетичний аналіз повногеномної послідовності українського ізоляту ХВХ

Для порівняння отриманої послідовності українського ізоляту Х-вірусу хости використовувалися три послідовності, представлені в NCBI. Філогенетичні взаємовідносини українського ізоляту та ізолятів з Америки та Кореї представлені у вигляді дерева з чотирьох повногеномних послідовностей (Рис. 7.10).



Рис.7.10 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей послідовностей ХВХ Українського ізоляту з ізолятами, представленими в NCBI, метод максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood method), будстреп 1000.

Для побудови філогенетичного дерева методом максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood method) використовувалась модель Tamura-Nei, підібрана за допомогою програми MEGA7 [88].

Аналіз повногеномної послідовності українського ізоляту ХВХ (6430 bp) (GenBank: KX033798.1) з іншими ізолятами продемонстрував 99 % ідентичності з американським ізолятом HVX-37 та 97,5 % подібності з ізолятом з Кореї, HVX-Kr. Усі ізоляти ХВХ утворили окрему кладу, відокремившись від ізолятів ХВК при 100 % значенню бутстреп. Таке розташування на дереві може бути обумовлене більш новітнім та якісним методом повногеномного секвенування українського ізоляту, відсутністю помилок зчитування за рахунок високої кількості реплікацій/зчитування та розшифрування послідовностей.

Більш детальний аналіз HVX-Ukr послідовності виявив деякі відмінності на 5' кінці порівняно з іншими ізолятами (Рис 7.11.).

```

HVX-Kr      -GAAAACAAAACCAATTTTAACCAACTTCAAACAAAGAAGTTTAATTTTCGCTT 52
HVX-37     -GAAAACAAAACCAATTTTAACCAACTTCAAACAAAGAAGTTTAATTTTCGCTT 52
HVX-Ukr    GGAAAAGAAAACCAAACGAACCTAACTTCAAACAAAGAAGTTTAATTTTCGCTT 53
          ***** * * *****

HVX-Kr      ACAAAC-CATTCGCAAACAGATCGATCGGAG-GGACTCCTAGATCTTAAGCA 102
HVX-37     ACAAACCCATTCGCAAACAGATCGATCGGAGGGACTCCCTAGATCTTAAGCA 104
HVX-Ukr    ACAAAC-CATTCGCAAACAGATCGATCGGAGGG-ACTCCTAGATCTTAAGCA 103
          ***** * *****

```

Рис. 7.11. Порівняння нуклеотидних послідовностей ХВХ 5' UTR ділянки ізолятів з Кореї (HV-Kr), Сполучених Штатів (HVX-37) та України (HVX-Ukr)

Також була виявлена заміна амінокислоти у старт-кодні ORF4 гену білка руху. Наявність неконсервативного старт-кодону підтвердилося додатковим секвенуванням за Сенгером. Так, в українському ізоляті ініціація TGB3 відбувається з кодона UUG, як і в ізолята зі Сполучених Штатів (U.S.

isolate; JQ911698, однак у ізолята з Кореї такої заміни виявлено не було (Korean isolate; AJ620114) [103].

Для встановлення філогенетичних відносин українського ізоляту ХВХ з представниками родини *Alphaflexiviridae* було побудоване філогенетичне дерево методом Neighbor-Joining з використанням моделі Tamura-Nei [85, 88] (Рис. 7.12) для визначення «схожості» ізолятів.

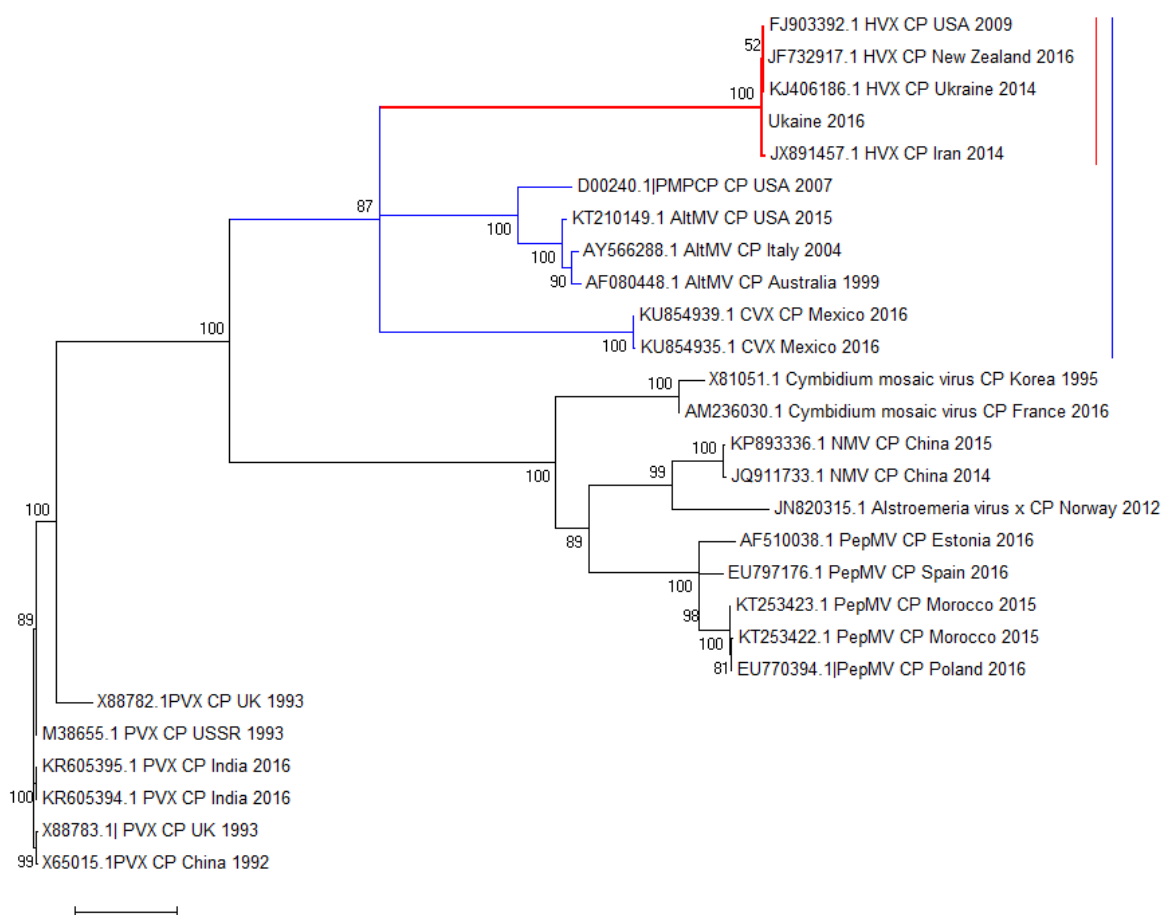


Рис.7.12. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей гена білка оболонки ХВХ українського ізоляту з ізолятами родини *Potexvirus* методом найближчих сусідів (Neighbor-Joining), бутстреп 3000.

Як видно з дерева ізоляти ХВХ, об'єднавшись у спільну гілку, знаходяться в одній кладі разом з вірусами *PMV* (*Paraya mosaic virus*), *AltMV* (*Alternanthera mosaic virus*) та *CVX* (*Cactus virus X*).

Для визначення можливого походження українського ізоляту ХВХ був використаний метод максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood method), який є дискретним методом, з використанням моделі моделі Hasegawa-Kishino-Yano (Рис.7.12.).

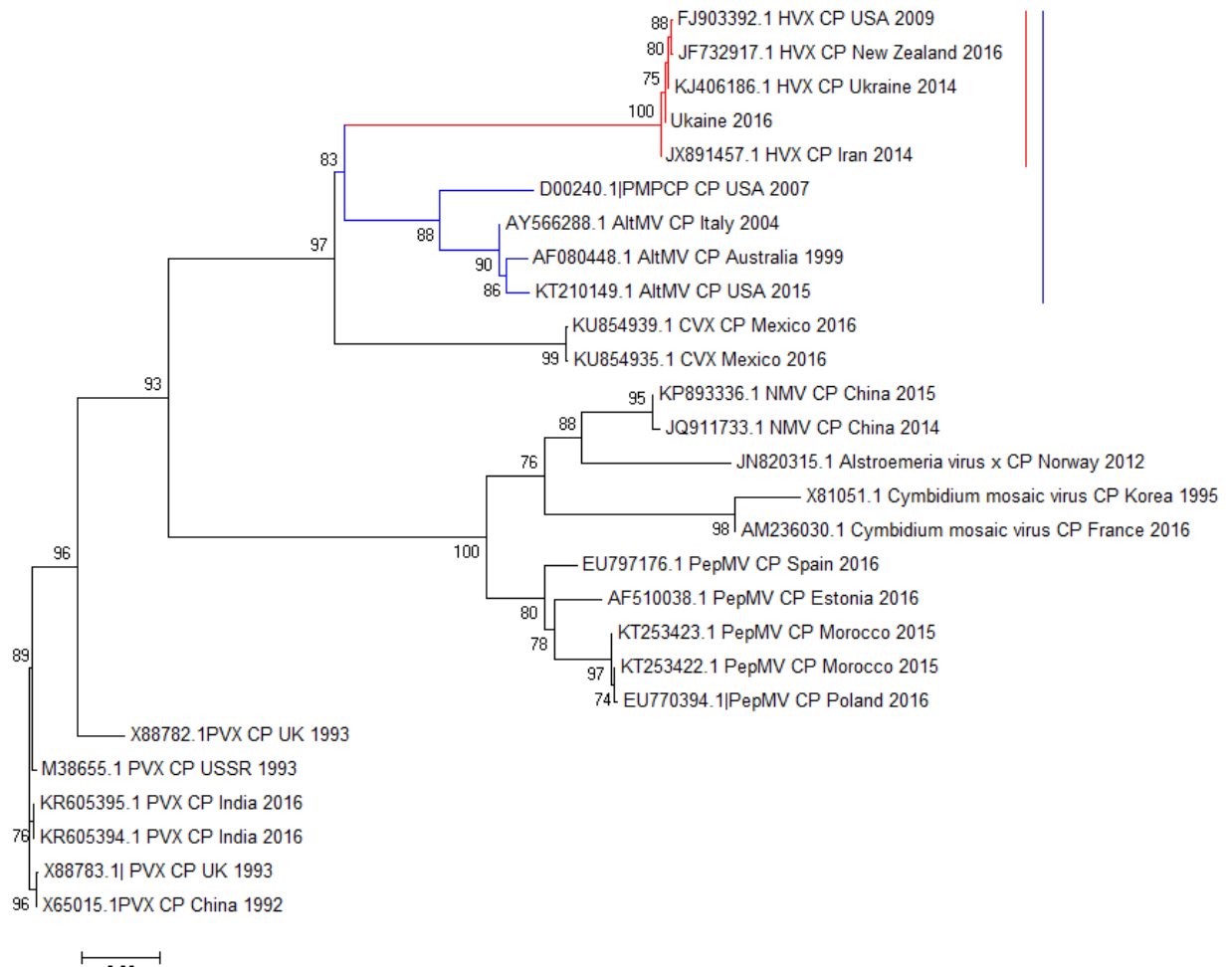


Рис. 7.12. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей гена білка оболонки ХВХ українського ізоляту з ізолятами родини *Potexvirus* методом максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood method) , бутстреп 3000.

Як і на попередньому дереві, ізоляти Х вірусу картоплі (*PVX-potato virus X*) утворили спільне угруповання з корнем ізоляту з Китаю. Натомість клайд ізолятів ХВХ знову розташувався згори. Український ізолят Ukr-2016

розташувався разом з ізолятом із Ірану. А от український ізолят Ukr-2014 розмістився окремо від ізоляту Ukr-2016.

Отже, філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей СР та повної геномної послідовності українського ізоляту з ізолятами зі світової бази даних продемонстрував монофілетичні зв'язки. В залежності від характеру послідовності, яка використовується для порівняння з представниками інших родів, відмінності в результатах були незначні.

Філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей СР показав одну групу ізолятів ХВХ, тісно пов'язану з вірусом *PMV* (*Papaya mosaic virus*), *AltMV* (*Alternanthera mosaic virus*) та *CVX* (*Cactus virus X*). Натомість літературні джерела свідчать про дещо інші філогенетичні взаємодії між ХВХ та представниками родини *Alphaflexiviridae*: Мозаїки азіатського подорожника (*PIAMV*), Х-вірусом тюльпану (*TVX*) і Вірусом мозаїки маніюки. Угрупування ізолятів ХВХ в кластери не показують жодного географічного зв'язку і не залежать від сортів рослин, з яких були спочатку отримані ці штами.

Порівняння послідовностей гена СР українських ізолятів з іншими ізолятами ХВХ продемонстрували стійкі монофілетичні зв'язки. Аналіз 3'-проксимального регіону гена білка оболонки продемонстрував його стабільність, що пов'язано з його важливістю у взаємодії з геномною РНК, русі і роздяганні віріонів.

Філогенетичний аналіз українського ізоляту ХВХ показав низький рівень дивергенції ділянки капсидного білка (99,6% за НК послідовностями та до 100% за АК) та високий відсоток гомології українського ізоляту з новозеландським, іранським та американським ізолятами.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Первинне візуальне обстеження колекції рослин хост Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України (м.Київ) дозволило виявити зразки з вірусоподібними симптомами та дослідити їх на наявність ХВХ інфекції [26]. За літературними даними Х-вірус хости серологічно споріднений до Х-вірусу картоплі, як представник групи *Potexvirus* [46]. Грунтуючись на цій інформації був проведений імуноферментний аналіз у модифікації «непрямий» з використанням антисироватки до Х-вірусу картоплі. Цей етап був попереднім на шляху до виявлення ХВХ та необхідним для подальшої побудови стратегії експерименту. Результати ІФА аналізу підтвердили наші здогадки: у зразку рослин *Hosta* сорту *Sum and Substance* був детектований вірусний збудник. Наступні наші кроки були спрямовані на підтвердження приналежності детектованого збудника до роду *Potexvirus*: методом електронної мікроскопії та його остаточне ідентифікування. Як результат, нами були візуалізовані вірусні часточки, що за морфологією та розміром вказують на представника роду *Potexvirus*. Аналіз амінокислотних і нуклеотидних послідовностей встановив 99,9% подібності українського ізоляту з різними ізолятами Х-вірусу хости, представленими в базі даних *NCBI*. Отже, в Україні було вперше детектовано ХВХ в колекції Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАНУ [104].

Отримані результати наштовхнули нас на розробку надійної, ефективної та недорогої тест-системи для виявлення ХВХ – інфекції. Зважаючи на високий попит рослин хости у зеленому господарстві, дана тест-система дозволить своєчасно виявити збудник і, як результат, допомогти попередити розповсюдження інфікованого посадкового матеріалу. Отриману антивірусну сироватку до ХВХ перевірили на специфічність та чутливість методом ІФА у модифікації «непрямий» та провели ПЛР зі зворотньою транскрипцією з

імунним захопленням. Встановили її робоче розведення – 1:8000 з титром вірусоспецифічних антитіл 1:16000 – для подальшого скринінгу Х-вірусу хости серологічними методами.

Антивірусна сироватка була апробована під час скринінгу колекцій ботанічних садів міста Києва. Проведений аналіз колекцій Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАНУ та ботанічного саду ім. Олександра Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка продемонстрував ефективність антисироватки до ХВХ. Аналіз колекції НБС ім. М.М.Гришка НАНУ у 2013 році методом ЗТ-ПЛР з імунним захопленням встановив 5 інфікованих зразків рослин хости таких сортів: *Hosta Ultraviolet light*, *Hosta Stiletto*, *Hosta Sum and substance*, *Hosta Great Expectations*, *Hosta Gold Standar* – серед 15 досліджуваних.

Повторний скринінг колекції у 2016 році виявив 15 інфікованих зразків рослин хости: *Hosta cv. Halcyon*, *Hosta cv. August Moon*, *Hosta cv. Pilgrim*, *Hosta longiper var. latifolia*, *Hosta fortune cv. Albopicta*, *Hosta cv Kiwi*, *Hosta cv. Patriot*, *Hosta cv. Phyllis Campbell*, *Hosta Siboldiana*, *Hosta plantaginea Aschers*, *Hosta cv. Midwest Magic*, *Hosta cv Feather Boa*, *Hosta Sum Tub*, *Hosta clausa*, *Hosta cv. Lacy Bella*. Однак серед тих зразків, в яких був детектований ХВХ, налічувалось 9 сортів росли хости, які щойно надійшли до колекції ботанічного саду.

Зважаючи на широке використання рослин *Hosta sp.* в озелененні та ландшафтному дизайні та присутність ХВХ в екологічних умовах України, необхідно проводити контроль за посадковим матеріалом та розповсюдженням вірусу за допомогою ранньої діагностики методом ІФА з використанням антисироватки до ХВХ.

Всі нові надходження рослин до ботанічного саду проходять карантин. Отже, можна зробити висновок, що світові селекціонери та офіційні постачальники посадкового матеріалу не дотримуються санітарних вимог та

не контролюють епідемічний процес серед рослин хости, що в результаті призводить до неконтрольованого поширення ХВХ у світі [103].

Натомість результати скринінгу 5 видів рослин хости, представлених у колекції Ботсаду ім. О.Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка вказують на відсутність ХВХ у цих рослинах. Причиною цього є відсутність постійного надходження нових рослин хости до колекції.

Біотестування українського ізоляту ХВХ на рослинах-індикаторах продемонстрував, що ХВХ викликає утворення слабких симптомів на деяких видах рослин, однак за результатами ІФА, уражує тільки рослини тютюну (*Nicotiana benthamiana*) [26]. Отримані нами дані співпадають з даними літературних джерел стосовно високої специфічності та виключності взаємодії ХВХ лише з рослинами хости, та з рослинами *Nicotiana benthamiana* при експериментальному ураженні (Lockhard, 2006). Однак було встановлено, що український ізолят ХВХ здатний уражувати також перець овочевий (*Capsicum annuum*).

Результати дослідження Х-вірусу хости до насінневої передачі вказують на даний шлях передачі. Раніше зазначалося, що Х-вірус хости такої здатності не мав. В Європі ж досліджень у цьому напрямку не проводилося, так як комерційне розмноження рослин хости проводять живцюванням, а не пророщуванням насіння, адже в такому разі втрачається сортова приналежність.

Для визначення молекулярної спорідненості українського ізоляту з іншими ізолятами ХВХ був проведений детальний філогенетичний аналіз, що показав низький рівень дивергенції ділянки капсидного білка та високий рівень ідентичності (99,6% за нуклеотидними послідовностями та до 100% за амінокислотними послідовностями). Було встановлено високий відсоток гомології амінокислотних та нуклеотидних послідовностей українського ізоляту з новозеландським, польським та американським ізолятами, що

вказує на те, що в Україну ХВХ потрапив з рослинами хости селекції однієї з цих країн.

Філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей білка оболонки та повної геномної послідовності українського ізоляту з ізолятами зі світової бази даних продемонстрував монофілетичні зв'язки. В залежності від характеру послідовності яка використовується для порівняння з представниками інших родів, відмінності в результатах були не значні. Угрупування ізолятів ХВХ в кластери не продемонстрували жодних географічних зв'язків та залежності від сорту рослини, з якої був виділений ізолят. Аналіз також показав, 3'-проксимальна частина білка оболонки є найменш мінливим регіоном. Це пов'язано з функцією посередницької взаємодії з геномною РНК, рухом і роздяганням віріонів [30].

Філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей білка оболонки ХВХ з іншими ізолятами в межах родини *Alphaflexiviridae* показав утворення спільної групи з ізолятами вірусу мозаїки папаї (*Papaya mosaic virus, PMV*), вірусу мозаїки альтернарії (*Alternanthera mosaic virus, AltMV*), Х-вірусу кактусу (*Cactus virus X, CVX*). Результати досліджень науковців університету штату Огайо на предмет спорідненості за геном реплікази різних ізолятів родини *Poxviridae* продемонстрували тісні зв'язки ХВХ з вірусом мозаїки азійського подорожника (*Plantago asiatica mosaic virus, PIAMV*), Х-вірусом тюльпану (*Tulip virus X, TVX*) і вірусом мозаїки маніюки (*African cassava mosaic virus, ACMV*) [30]. Слід відмітити, що за результатами цих досліджень, послідовності гена реплікази мають високий рівень генетичної варіабельності, на відміну від стійкого гена білка оболонки. Повногеномне секвенування та аналіз нових ізолятів дозволяє з року в рік накопичувати достатню кількість інформації для того, щоб встановити еволюційні шляхи розвитку ХВХ.

Аналіз повногеномної послідовності українського ізоляту ХВХ виявив заміну нуклеотиду у старт-кодоні білка руху (ORF4). Так в українському ізоляті ініціація відбувається з кодона UUG.

Наприкінці першої і початку наступної ділянки знаходиться так звана «пливуча» послідовність, яка є причиною явища «*leaky scanning*» з якого почитається синтез субгеномної мРНК [104].

Дана дисертаційна робота представляє собою сучасне вірусологічне дослідження. Вивчення вірусу з використанням класичних вірусологічних та новітніх молекулярних методів дозволяє отримати повну картину розвитку вірусного збудника та його еволюції.

ВИСНОВКИ

У результаті виконання дисертаційної роботи було проведено візуальні обстеження, серологічні та молекулярно-біологічні дослідження Х-вірусу хости, визначено нуклеотидні послідовності нуклеотидних послідовностей та здійснено філогенетичний аналіз українського ізоляту; проведено скринінг на наявність вірусу у ботанічних садах країни з використанням власно розробленої діагностичної антисироватки.

Головні наукові та практичні результати роботи сформовані у наступних висновках:

1. Вперше в Україні у 2012 році був детектований Х-вірус хости за допомогою електронної мікроскопії, серологічних та молекулярно-біологічних методів.
2. Отримано та апробовано антисироватку до Х-вірусу хости. Була встановлена її специфічність та чутливість (робоче розведення 1:8000 при титрі 1:16000) для подальшого скринінгу Х-вірусу хости методом ІФА.
3. Проведений скринінг колекцій ботанічних садів м. Києва з використанням антисироватки до ХВХ виявив, що колекція ботанічного саду імені Олександра Фоміна КНУ імені Тараса Шевченка не уражена Х-вірусом хости, натомість було виявлено, що ХВХ активно циркулює та поширюється в колекції НБС ім. М.М. Гришка НАНУ (5 інфікованих сортів хост з 15 досліджуваних у 2013 році та 15 інфікованих сортів з 68 досліджуваних у 2016 році).
4. Дослідження біологічних властивостей українського ізоляту Х-вірусу хости продемонструвало, що вірус уражує тільки рослини тютюну (*Nicotiana benthamiana*), вперше було встановлено, що український ізолят Х-вірус хости здатний передаватися через насіння.

5. Філогенетичний аналіз ХВХ показав низький рівень дивергенції ділянки капсидного білка (99,6% за нуклеїновими та до 100% за амінокислотними послідовностями). Встановлено високий відсоток гомології амінокислотних та нуклеотидних послідовностей українського ізоляту з новозеландським, польським та американським ізолятами, що вказує на те, що в Україну ХВХ потрапив з рослинами хости селекції однієї з цих країн.

6. Отримано повногеномну послідовність українського ізоляту Х-вірусу хости (6430 bp) та задепоновано в Ген Банк (GenBank: KX033798.1). Була виявлена мутація (AUG → UUG) у старт кодоні гена білка руху (ORF4), яка підтверджена повторним секвенуванням методом Сенгера. Порівняння повногеномних послідовностей ХВХ вказує на спорідненість українського та американського ізолятів Х-вірусу хости.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

1. Zilis M.R. The Hostapedia. Rochelle, IL: *Q & Z Inc.* 2009. P. 9-13.
2. Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2003. № 141: 399-436.
3. Grenfell D. Hosta: The flowering foliage plant. Portland, Oregon: *Timber Press*. №1990. P: 188-193.
4. Baker JG.. A revision of the genera and Species of Herbaceous Capsular Camophyllous Liliaeaceae. *Journal of the Linnaean Society of London*. 1870 № II 54. P: 349-436.
5. Zonneveld BJM, Iren F.. Genome Size and Pollen Viability as Taxonomic Criteria: Application to the Genus Hosta. *Plant Biology*. 2001. № 3(2). P: 176-185.
6. Fujita N. The genus Hosta in Japan. *The American Hosta Society Bulletin*. 1979. № 10. P: 14-43.
7. Gleason M.L., Daughtrey M.L., Chase A.R., Moorman G.W., Mueller D.S. Diseases of herbaceous perennials. *APS press*. 2009. P. 281.
8. Currier S., Lockhart B.E.L. Characterization of a potexvirus infecting Hosta spp. *Plant Dis*. 1996. Vol 80. P. 1040-1043
9. Sakurai T. Distinct efficiencies of Impatiens necrotic spot virus transmission by five thrips vector species (Thysanoptera: Thripidae) of tospoviruses in Japan. *Applied Entomology and Zoology*. 2007. Vol. 39, No. 1. P. 71-78.
10. Mathew B. Hostaceae a new name for the invalid Funkiaceae. *Kew Bulletin* 1988. № 43 (2). P: 302.
11. Maekawa F..The genus Hosta. *Journal of the Faculty of Science*. 1940. № 5. P: 394-397.
12. Chung MG, Jones SB, Hamrick JL, Chung HG.. Morphometric and Isozyme analysis of the genus Hosta in Korea. *Plant Species Biology*. 1991. № 6. P: 55-69.

13. Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J. Plant viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version:16th January 1997. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/descr186.htm>
14. Каталог коллекционера лилейников. Фотографии Олега Васильева. URL <http://www.moisad.norod.ru>
15. Олег Кулагин. Садовые заботы. ООО «Бонниер Пабליкейшенз». URL <https://www.supersadovnik.ru/>
16. Lewandowski D.J. Hosta virus X. *Ohio State University Fact Sheet*. HYG. 2008. P. 3069-08.
17. Ryu K.H., Park M.H., Lee J.S. Occurrence of mosaic disease of Hosta plants caused by Hosta virus X // *Plant Pathology*. 2002. № 18. P. 313-316.
18. Mueller D, Gleason M, Lewis D, Jeffers S, Edmunds B, Warfield C, WilliamsWoodward J. 2005. *Hosta diseases and Pests*. URL <http://www.extension.iastate.edu/Publications/SUL14.pdf>
19. Blanchette B., Lockhart B. Hosta virus X: A three - year study. *Hosta Journal*. 2003. № 35. P: 19–23.
20. Midwest regional hosta society newsletter Apollo Hosting. URL <http://midwesthosta-society.org>.
21. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) URL <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
22. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus Taxonomy : Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. London: *Elsevier*. 2005. P: 1217.
23. Lockhart B.E., Daughtrey M.L. First Report of Alternanthera mosaic virusInfection in Angelonia in the United States. *Disease Notes*. 2008. Vol. 92. № 10. P: 1473.
24. Valverde R.A., Sabanadzovic S., Hammond J. Viruses that enhance the aesthetics of some ornamental plants: beauty or beast. *Plant Disease*. 2002. Vol. 96. No. 5. P: 600-611.

25. Lockhart BEL, Daughtrey ML. First Report of Alternanthera mosaic virus Infection in Angelonia in the United States. *Plant disease*. 2008. № 92(10). P: 1473.
26. Lockhart BEL. Occurrence of Arabis mosaic virus in Hostas in the United States. *Plant Disease*. 2006. № 90. P: 834.
27. Characterization of Potexvirus Infecting Hosta spp. Sophie Currier, B.E.L. Lockhart. *Plant Disease*. 1993. Vol. 80. № 9. P: 1040 – 1043.
28. Cajza M, Zielińska L. Hosta virus X - A new pathogen of ornamental plants in Poland. *Progress in Plant Protection*. 2007. № 47. P: 69-72.
29. Bellardi M.G., Cavicchi L, Davino S. NPPO of Italy. First report of Hosta virus X infecting Hosta in Italy. *Journal of Plant Pathology*. 2011. № 93. S: 4.26.
30. Tang J, Hardy C, Lebas BSM, Ward LI. Presence of Hosta virus X in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes*. 2012. № 7. P: 39–40.
31. Geering ADW, Thomas JE. Characterisation of a virus from Australia that is closely related to papaya mosaic potexvirus. *Archives of Virology*. 1999. № 144 P: 577-592.
32. Wei MS, Zhang YJ, Li GF, Ma J, Li M. First report of Hosta virus X infecting hosta plants in China. *Plant Disease* 2013. № 97(3). P: 429.
33. Windham M.T., Moulton J.K., Hajimorad M.R. *EPPO Reporting Service PARIS*. 2013. Vol 08. P: 175.
34. Lockhart BEL, Currier S. Viruses occurring in Hosta spp. in the USA. *Acta Horticulturae*. 1996. № 432. P: 62-71.
35. Ryu KH, Park MH, Lee MY, Lee JS. 2006. Characterization and seed transmission of Hosta virus X isolated from Hosta plants. *Acta Horticulturae*. 2006. № 722. P: 91-94.
36. Blanchette B, Lockhart BEL. Hosta virus X: A three-year study. *Hosta Journal*. 2003. № 35. P: 19-23.

37. De La Torre CM, Qu F, Redinbaugh MG, Lewandowski DJ. Biological and Molecular characterization of a U.S. isolate of Hosta virus X. *Phytopathology*. 2012. Vol. 102. P.:1176-1181.
38. Agdia, Inc. Offers the First Rapid Test for the Detection of Hosta virus X. 2008. UTL <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/news/2008/HostaVirusTest/>
39. Kennelly M.M., Judith O'Mara, Pierzynski J. Hosta virus X Detected in Kansas. *Plant Management Network*. 2007. UTL <https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2007/virusX/>
40. Sherrie Smith. Hosta Virus X // Agriculture and Natural Resources UTL <http://www.uaex.edu/>
41. Hosta spp. UTL <https://www.flickr.com/photos/wxmam/>.
42. Фотографії Ткаченко Кирила UTL : <http://flower.onego.ru/other/phlox/en.5661.jpg>.
43. Мельничук М.Д., Кожукало В.Є., Смирнова С.О., Мартин Г.Г. Лабораторний практикум з загальної фітовірусології. Київ. *НАУ*. 2002. С: 260.
44. Forster RL, Bevan MW, Harbison SA, Gardner RC. The complete nucleotide sequence of the potexvirus white clover mosaic virus. *Nucleic Acids Res*. 1988. Vol 16. P: 291-303.
45. Dawson W. O., Hilf M. E. Host-range determinants of plant viruses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1992. Vol. 43. P: 527-555.
46. Tamai A., Meshi T. Cell-to-cell movement of Potato virus X: the role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block. *Mol Plant Microbe Interact*. 2001. Vol 14. P: 1158–1167.
47. Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. Пер. с англ. Москва. *Мирю* 1978. С: 430.
48. Jelkmann W., Maiss E., Martin R.R. The nucleotide sequence and genome organization of strawberry mild yellow edge-associated potexvirus. *J Gen Virol*. 1992. Vol 73. P: 475-479.

49. Ryu K.H., Min B.E., Choi G.S., Choi S.H. Zucchini green mottle mosaic virus is a new tobamovirus; comparison of its coat protein gene with that of kyuri green mottle mosaic virus. *Arch Virol.* 2000. Vol 145. P: 2325-2333.
50. Ryu K.H., Choi S.H. Molecular detection and analysis of Sweet potato feathery mottle virus from root and leaf tissues of cultivated sweet potato plants. *Plant Pathology.* 2002. Vol 18. P: 12-17.
51. Артюкова Е.В., Крылов А.В. Вирусы группы Potexvirus. Фитовирусологические исследования на Дальнем Востоке. *Владивосток: ДВО АН СССР.* 1989. С: 53.
52. Solovyev A.G., Novikov V.K., Merits A., Savenkov E.I. Genome characterization and taxonomy of *Plantago asiatica* mosaic potexvirus. *J Gen Virol.* 1994. Vol 75. P: 259-267.
53. Calvert L.A., Cuervo M.I., Ospina M.D. Characterization of cassava common mosaic virus and a defective RNA species. *J Gen Virol.* 1996. Vol 77. P.: 525-530.
54. Brunt A., Foster G., Martelli P., Zavriev S. Genus Potexvirus. *Van Regenmortel MHV.* 2000. Vol 32.
55. Park M. H., Ryu K. H. Molecular evidence supporting the classification of Hosta virus X as a distinct species of the genus Potexvirus. *Arch. Virol.* 2003. Vol. 148 P: 2039-2045.
56. Mowat WP. 1982. Pathology and properties of tulip virus X, a new potexvirus. *Annals of Applied Biology.* № 101. P: 51–63.
57. Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph M. and all. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology.* 2004. № 149. P: 1045-1060.
58. Chen J., Zheng H. Y., Chen J.P., Adams M.J. Characterisation of a potyvirus and a potexvirus from Chinese scallion. *Arch Virol.* 2002. Vol 147. P: 683–693.
59. Adedire O.L., Wen R.H., Windham A., and all. Hosta virus X in Hosta identified in Tennessee, USA. *Plant Pathology.* 2009. № 58. P: 405-405.

60. Alquist P, French R, Janda M, Loesch-Fries LS. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 1984. № 81. P: 7066-7070.
61. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990. № 215. P: 403-410.
62. Attathom S, Weathers LG, Gumpf DJ. Identification and characterization of a potexvirus from California barrel cactus. *Phytopathology*. 1978. № 68. P: 1401-1406.
63. Bendahmane A., Köhm B.A., Dedi C., Baulcombe DC. The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. *Plant Journal*. 1995. №8. P: 933-941.
64. Hsu H.T., Chou Y.L., Tseng Y.H. and al. Topological properties of the triple gene block protein 2 of Bamboo mosaic virus. *Virology* 2008. № 379. P: 1-9.
65. Chen J., Zheng H.Y., Chen J.P., Adams M.J. Characterisation of a potyvirus and a potexvirus from Chinese scallion. *Arch Virol*. 2002. Vol 147. P: 683-693.
66. Lin N.S., Lin B.Y., Lo N.W. Nucleotide sequence of the genomic RNA of bamboo mosaic potexvirus. *J Gen*. 1994. Vol 75. P: 2513-2518.
67. Ryu K.H., Choi S.H. Molecular detection and analysis of Sweet potato feathery mottle virus from root and leaf tissues of cultivated sweet potato plants. *Plant Pathol*. 2002. Vol 18. P: 12-17.
68. Fajolu O. L., Wen R. H., Windham A. S., Genetic variability and phylogenetic analysis of Hosta virus X. *Arch. Virol*. 2009. Vol. 154. P: 1909-1916.
69. Bird L.E, Subramanya H.S, Wigley D.B. Helicases: a unifying structural theme? *Current Opinion in Structural Biology*. 1998. № 8. P: 14-18.
70. Caruthers J.M., McKay D.B.. Helicase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*. 2002. № 12. P: 123-133.
71. Chapman S.N., Kavanagh T., Baulcombe D.C. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant Journal*. 1992. № 2. P: 549-557.

72. Chapman S. Construction of infectious clones for RNA viruses: TMV. *Plant Virology Protocols*. 2008. Vol. 451. P: 477-490.
73. Chen IH, Chou WJ, Lee PY and all. The AAUAAA Motif of Bamboo Mosaic Virus RNA Is Involved in Minus-Strand RNA Synthesis and PlusStrand RNA Polyadenylation. *Journal of Virology*. 2005. № 79. P: 14555-14561.
74. Draghici H.K., Pilot R., Thiel H., Varrelmann M. Functional mapping of PVX RNA-dependent RNA-replicase using pentapeptide scanning mutagenesis- Identification of regions essential for replication and subgenomic RNA amplification. *Virus Research*. 2009. № 143. P: 114-124.
75. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. *Москва*. 1993. С: 165-169.
76. Brierley P. Symptoms in the florist's hydrangea caused by tomato ringspot virus and an unidentified sap-transmissible virus. *Phytopathology*. 1954. № 44. P: 696-699.
77. Brown DJF, Halbrendt JM, Robbins RT, Vrain TC. 1993. Transmission of Nepoviruses by Xiphinema americanum-group Nematodes. *Journal of Nematology*. № 25(3). P: 349-354.
78. Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
79. Cheng JH, Peng CW, Hsu YH, Tsai CH. The synthesis of minus-strand RNA of bamboo mosaic potexvirus initiates from multiple sites within the poly(A) tail. *Journal of Virology*. 2002. №76 (12). P: 6114-6120.
80. Dagless EM, Shintaku, MH, Nelson, RS, Foster GD. 1997. A CaMV 35S promoter driven cDNA clone of tobacco mosaic virus can infect host plant tissue despite being uninfected when manually inoculated onto leaves. *Archives of Virology*. 1997. № 142. P: 183-191.

81. Derks A.F.L.M., Lemmers M.E.C. Detection of tospoviruses in bulbous crops and their transmissibility by vegetative propagation. *Acta Horticulturae*. 1997. № 430. P: 709-710.
82. Delport W., Poon A.F., Frost S.D., Kosakovsky Pond SL. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*. № 26 P: 2455–2457. UTL [http://doi: 10.1093/bioinformatics/btq429](http://doi:10.1093/bioinformatics/btq429) PMID: 20671151.
83. Hesagawa M., Kishino H., Yano T. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 1985. Vol. 22. P: 160-174.
84. Tamura K., Nei M. estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 1993. Vol.10. P: 512-526.
85. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol.4. P: 406-425.
86. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985. Vol. 39. P: 783-791.
87. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2015.
88. G. Shchetynina, I. Budzanivska, A. Kharina, Pereboychuk. First detection of Hosta Virus X in Ukraine. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2012. Vol. 62. P. 48-50.
89. Г.С. Щетиніна, А.В. Харіна, О.П. Перебойчук, І.Г. Будзанівська. Серологічна діагностика Х вірусу Хости в рослинах роду *Hosta* tratt. Агроекологічний журнал. 2015. №3. С: 98-101.
90. Shchetynina G. A., Prokopenko I. I., Budzanivska I. G. The host range for Ukrainian isolate for hosta virus X (HVX). Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016. № 1 (58).

91. Hesagawa M., Kishino H., Yano T. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 1985. Vol. 22. P: 160-174.
92. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 1993. Vol.10. P: 512-526.
93. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol.4.P: 406-425.
94. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985. Vol. 39. P: 783-791.
95. G. Shchetytnina, I. Budzanivska, A. Kharina, Pereboychuk. Phylogenetic analysis of Hosta Virus X in Ukraine. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. 2013. Vol. 65. P: 68-71.
96. Kosakovsky P. S. L, Frost S.D. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol*. 2005. № 22. P: 1208–1222.
97. Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*. 1992. Vol.8 P: 275-282.
98. Adachi J., Hasegawa M. Model of amino acid substitution in proteins by mitochondrial DNA. *J. Molecular Evolution*. 1996. Vol 42. P. 459-468.
99. Davenport G, Baulcombe D. Mutation of the GKS motif of the RNA-dependent RNA polymerase from potato virus X disables or eliminates virus replication. *Journal of General Virology*. 1997. № 78. P: 1247-1251.
100. Dawson WO, Beck DL, Knorr DA, Grantham GL. cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 1986. № 83. P: 1832-1836.
101. Download PuTTY. UTR <http://www.putty.org>

102. BLAST search

UTR https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

103. Shchetynin A. First report of Hosta virus X infecting hosta plants in Ukraine. *Acta virologica*. 2017. № 61 P: 498-499.

104. Щетиніна Г.С., Косенко Ю.А., Будзанівська І.Г. Х-вірус хости – небезпечний рослинний патоген.. Карантин та захист рослин. 2016. №1. С. 17-19.

ДОДАТКИ А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА

Публікації, що відображають основні результати дисертаційного дослідження (6 статей)

1. First detection of Hosta Virus X in Ukraine / Shchetynina G., Budzanivska I., Kharina A., Pereboychuk O. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2012. – №62. – С. 48-50. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).

2. Phylogenetic analysis of Hosta Virus X in Ukraine / Shchetynina G., Budzanivska I., Kharina A., Pereboychuk O. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2013. – №65. – С. 68-71. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).

3. Серологічна діагностика X вірусу Хости в рослинах роду *Hosta* tratt. / Щетиніна Г.С., Харіна А.В., Перебойчук О.П., Будзанівська І.Г. Агроєкологічний журнал. – 2015 – №3. – С. 98-101. (Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті та проаналізовані результати досліджень).

4. Щетиніна Г.С. X - вірус хости – небезпечний рослинний патоген / Г.С. Щетиніна, Ю.А. Косенко, І.Г. Будзанівська // Карантин та захист рослин – 2016. – №1 – С.17-19. (Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті та проаналізовані результати досліджень).

5. Shchetynina G.A., The host range for Ukrainian isolate for hosta virus X (HVX) / G.A. Shchetynina, I.I. Prokopenko, I.G Budzanivska // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України, – 2016 – № 1 (58). Режим доступу:

http://nd.nubip.edu.ua/2016_1/4.pdf. (Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті та проаналізовані результати досліджень).

6. Shchetynina A., First report of Hosta virus X infecting hosta plants in Ukraine / A. Shchetynina, I. Budzanivska, O. Pereboychuk, M. Somera, E. Truve. // Acta virologica. – 2017 – № 61 – P: 498 – 499. (Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті та проаналізовані результати досліджень).

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

(5 конференцій):

1. The Conference dedicated to 50-th Anniversary of the Virology Department «Virology: the past, the present, the future», 12 April, 2012, Kyiv, Ukraine.
2. VIIth International conference «Bioresources and viruses», 10-13 September, 2013, Kyiv, Ukraine.
3. Global Virus Network conference of virologists for the Scandinavia-Baltic-Ukraine region, 11th - 13th of June in Laulasma, Estonia.
4. 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology, 8-13 September 2014. Cracow, Poland.
5. VIII International conference «Bioresources and viruses», 12-14th September 2016, Kyiv, Ukraine.