

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

ШЕВЧЕНКО ТЕТЯНА ПЕТРІВНА

УДК: 578.85/.86: 578.2

ДИСЕРТАЦІЯ

**МОЛЕКУЛЯРНА ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ВІРУСІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР
УКРАЇНИ**

03.00.06 - вірусологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

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

_____ Т.П. Шевченко

Науковий консультант

Поліщук Валерій Петрович

 б. н., професор

Київ - 2019

АНОТАЦІЯ

Шевченко Т.П. Молекулярна епідеміологія вірусів овочевих культур України.- Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 «Вірусологія». - Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2019.

Робота присвячена визначенню закономірності епідеміології вірусів овочевих культур України з використанням їх молекулярно-біологічних характеристик. У дисертаційній роботі представлені нові підходи до вирішення актуальної науково-біологічної проблеми, а саме - розроблена концепція контролю вірусних інфекцій овочевих культур, що базується на встановлених молекулярно-біологічних властивостях вірусів та епідеміологічних закономірностях розвитку і поширення вірусних інфекцій.

Особлива увага приділялась рослинам представникам родин *Cucurbitaceae* (огірки, кабачки, цукіні, кавуни, гарбузи та дині) та *Solanaceae* (помідори, перець та баклажани), також досліджувались представники родини *Brassicaceae*.

У результаті виконання роботи проведено дослідження 12 видів вірусів різних родин, що інфікують овочеві культури України, а саме

- *Cucumber mosaic virus* – вірус огіркової мозаїки, *Bromoviridae*;
- *Tomato mosaic virus* – вірус мозаїки томату, *Virgaviridae*;
- *Tobacco mosaic virus* - вірус мозаїки тютюну, *Virgaviridae*;
- *Tobacco rattle virus* – вірус погрімковості тютюну, *Virgaviridae*;
- *Tomato ringspot virus* – вірус кільцевої плямистості томатів,

Secoviridae;

- *Pepper mild mottle virus* – вірус слабкої крапчатості перцю, *Virgaviridae*;
- *Watermelon mosaic virus 2* – вірус мозаїки кавуна 2, *Potyviridae*;
- *Zucchini yellow mosaic virus* – вірус жовтої мозаїки цукіні, *Potyviridae*;
- *Cucumber green mottle mosaic virus* – вірус жовтої крапчастої мозаїки огірка, *Virgaviridae*;
- *Potato virus Y* – Y-вірус картоплі, *Potyviridae*;
- *Potato virus X* – X-вірус картоплі, *Alphaflexiviridae*;
- *Turnip mosaic virus* – вірус мозаїки турнепсу, *Potyviridae*.

Крім того, встановлено відсоток моно- та змішаних вірусних інфекцій у рослин овочевих культур, досліджено варіабельність окремих ділянок геному вірусів, виділених з овочевих культур, проаналізовано філогенетичні зв'язки отриманих ділянок геномів ізолятів: *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus 2* (WMV-2), *Cucumber mosaic virus* (CMV), та проаналізувано насінневий шлях передачі вірусів овочевих культур в Україні.

Вперше встановлений спектр вірусів, що є представниками родин *Virgaviridae* (PMMoV, ToMV, CGMMV, TRV), *Bromoviridae* (CMV), *Potyviridae* (PVY, ZYMV, WMV-2, TuMV) та *Alphaflexiviridae* (PVX), які з урахуванням екологічних умов та біологічних властивостей є актуальними та шкодочинними для овочевих культур України та Європи. Вперше в Україні описані віруси PMMoV та TuMV, встановлені їх рослини-хазяї та вивчені способи передачі вірусів, які є небезпечними для широкого кола рослин агроценозів.

Показано поширення змішаних вірусних інфекцій, які супроводжуються більш суворими візуальними симптомами захворювання і втратами комерційної продукції, та встановлені типові групи вірусів, що

їх викликають в Україні: ZYMV/WMV-2, CMV/ZYMV/WMV-2, CMV/ToMV/PVY та TuMV/CMV. Частота виявлення вірусів у моноінфекції варіює у межах 1-30%, а у змішаній інфекції – 2-34% для різних вірусів, що визначається їх епідеміологічними властивостями, видом рослин-хазяїв, а також умовами вирощування культури.

Вперше в Україні встановлено нове джерело ZYMV та підтверджено здатність вірусу передаватися насінням з ефективністю у 2,6%. Обґрунтовано, що насіння овочевих культур є одним із важливих та недооцінених джерел вірусів в екосистемах. Встановлено, що в екологічних умовах України насінневий шлях передачі є актуальним, потребує відповідного контролю для ряду вірусів (CGMMV, ZYMV, ToMV та CMV) і становить особливу небезпеку для вірусів із широким колом рослин-хазяїв, а саме CMV та ToMV.

Продемонстрована консервативність генетичних послідовностей більшості вивчених вірусів. Підтверджена домінуюча роль точкових мутацій, синонімічних амінокислотних замін та стабілізуючого добору в еволюції вірусних популяцій в Україні.

Встановлена генетична однорідність українських популяцій вірусів WMV-2, ZYMV, PMMoV та ToMV, і подібність їх ізолятів до відомих штамів цих вірусів. Виявлені унікальні амінокислотні заміни білка 2b у українських ізолятів CMV і продемонстровано, що популяція цього вірусу в Україні є більш гетерогенною, ніж у інших європейських країнах і представлена різними генетичними групами.

Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів капсидного і транспортного білка та білка 2b українських ізолятів вірусу огіркової мозаїки показав, що в агроценозах України вірус огіркової мозаїки представлений геногрупами IA і IB, що належать до групи I CMV. Нуклеотидні послідовності українських ізолятів в межах кожної з геногруп характеризуються високою подібністю між собою та з іншими відомими штамми CMV. Зважаючи на суттєву різницю (<95%) в подібності

нуклеотидної послідовності між українськими ізолятами CMV-Ukr-28, CMV-Ukr-36, CMV-Ukr-58 та ізолятом CMV-Ukr-2114 можна розглядати дані ізоляти, як два окремі вірусні штами.

Виявлено унікальні амінокислотні заміни послідовностях білка 2b ізолятів CMV-28 і CMV-58, які не пов'язані з рослиною-хазяїном.

За результатами роботи подано 33 послідовності українських ізолятів вірусів овочевих культур до світового генетичного банку даних GenBank NCBI, що складає 25% сиквенованих ізолятів вірусів рослин з України. Зареєстровані сиквенси вірусів овочевих культур дають змогу використовувати їх у лабораторіях різних країн для порівняння з нуклеотидними послідовностями інших штамів даних вірусів.

Виділені ізоляти фітовірусів поповнили колекцію вірусів кафедри вірусології і використовуються для подальшого порівняння їх властивостей з властивостями нововиділених ізолятів вірусів та залучені як тест-об'єкти для вивчення вірусів рослин у навчальному процесі. Отримані результати можуть бути використані для вдосконалення методик діагностики вірусів овочевих культур в Україні.

Вперше встановлено, що філогенетична спорідненість українських ізолятів вірусів овочевих культур не залежить від географічного походження та рослини-хазяя, що має епідеміологічне значення, свідчить про інтенсивну циркуляцію вірусів в Україні і може бути використане для оптимізації діагностичних тест-систем.

Вперше знайдені нові рекомбінантні ізоляти шкочинних вірусів WMV-2 та TuMV, що свідчить про активні еволюційні процеси та обмін генетичним матеріалом вірусів в Україні. За результатами аналізу послідовності повного геному встановлено, що український ізолят TuMV UKR9 є нетиповим для Європи рекомбінантом двох різних генетичних груп і має один рекомбінаційний сайт у гені *HC-Pro*, який не був описаний раніше.

Показано, що рекомбінантний український ізолят TuMV UKR9 здатний системно інфікувати рослини двох основних родів хрестоцвітих *Brassica* та *Raphanus*, і становить потенційну небезпеку в епідеміологічному аспекті.

Підтверджено кореляцію генетичних ознак українських ізолятів вірусів з їх вірулентністю щодо овочевих культур. Встановлено, що українські ізоляти ZYMV, WMV-2, PMMoV не належать до високовірулентних штамів. За комплексом біологічних та молекулярно-епідеміологічних ознак встановлено, що ToMV, TuMV та CMV потенційно є найбільш небезпечними вірусами, які загрожують вирощуванню овочевих культур в Україні.

Вперше доведено значне поширення TuMV в міських екосистемах, де супутні культурні та дикорослі рослини є резервуарами для збереження популяції вірусу та його передачі механічно та літаючими векторами. Показано, що даний фактор має виключно важливе значення для епідеміології TuMV в Україні, не зважаючи на ефективність класичних заходів контролю вірусних захворювань.

Розроблений концептуальний підхід до ефективного та рентабельного контролю вірусних інфекцій овочевих культур України з урахуванням епідеміологічних властивостей вірусів, їх епідеміологічного потенціалу (способами передачі і збереження у довкіллі, вірулентністю та ін.), типом сприйнятливої культури та умовами її вирощування, і включає контроль насінневого матеріалу на вірусоносійство; тестування супутніх дикорослих рослин, які можуть виступати резервуарами вірусів з широким спектром рослин-хазяїнів в екосистемах; та тестування культурних рослин для видалення інфікованих рослин.

Ключові слова: віруси рослин, рекомбінанти, філогенетичний аналіз, овочеві культури, молекулярна епідеміологія

SUMMARY

Shevchenko T.P. Molecular epidemiology of viruses of vegetable crops in Ukraine. –Qualification scientific work on the rights of manuscripts. The thesis for a Dr. Sci. degree in biological sciences in speciality 03.00.06 – virology.– –Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

Epidemiological patterns for viruses infecting vegetable crops in Ukraine based on their molecular and biological properties were discovered. The thesis describes new approaches to solving the pressing scientific problem of designing a novel concept for controlling viral diseases of vegetable crops basing on their molecular-biological properties as well as on epidemiological regularities of development and spread of viral infections.

In this work, special attention was paid to plants belonging to the families *Cucurbitaceae* (cucumber, squash, zucchini, melon, pumpkin, and watermelon) and *Solanaceae* (tomato, pepper and eggplant), representatives of the family *Brassicaceae* were also studied.

During the research, we have studied 12 species of viruses which differ taxonomically but endanger cultivation of vegetable crops in Ukraine:

- *Cucumber mosaic virus* – family *Bromoviridae*,
- *Tomato mosaic virus* – family *Virgaviridae*,
- *Tobacco mosaic virus* - family *Virgaviridae*,
- *Tobacco rattle virus* – family *Virgaviridae*,
- *Tomato ringspot virus* – family *Secoviridae*,
- *Pepper mild mottle virus* – family *Virgaviridae*,
- *Watermelon mosaic virus 2* – family *Potyviridae*,
- *Zucchini yellow mosaic virus* – family *Potyviridae*,
- *Cucumber green mottle mosaic virus* – family *Virgaviridae*,

- *Potato virus Y* – family *Potyviridae*,
- *Potato virus X* – family *Alphaflexiviridae*,
- *Turnip mosaic virus* – family *Potyviridae*.

Moreover, we have elucidated the percentage of mono- and mixed viral infections for vegetable crops, studied variability of certain parts of genome of viruses isolated from vegetable crops, and analyzed phylogenetic relationships of the isolates of the following viruses: *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Watermelon mosaic virus 2* (WMV-2), and *Cucumber mosaic virus* (CMV) for their epidemiology, as well as studied seed transmission of viruses of vegetable crops in Ukraine.

Taking into account ecological conditions and based on the biological properties of pathogens, the spectrum of viruses harmful for cultivating vegetable crops in Ukraine was listed for the first time which includes representatives of the families *Virgaviridae* (PMMoV, ToMV, CGMMV, TRV), *Bromoviridae* (CMV), *Potyviridae* (PVY, ZYMV, WMV-2, TuMV) and *Alphaflexiviridae* (PVX). For the first time, PMMoV and TuMV were described in Ukraine together with their respective plant hosts and transmission ways endangering wide range of cultivated plants.

Significant portion of mixed virus infections connected with more severe visual symptoms of the disease and loss of commercial value was shown. Typically, these were induced in Ukraine by the following virus groups: ZYMV/WMV-2, CMV/ZYMV/WMV-2, CMV/ToMV/PVY, and TuMV/CMV. The frequency of virus occurrence varied from 1% to 30% in monoinfection, whereas mixed infection frequency reached 2-34% depending on the viruses as governed by their epidemiological characteristics, host plant and growing conditions.

For the first time in Ukraine, novel source of ZYMV was found and it was confirmed that ZYMV may be transmitted by seed with efficiency of 2.6%. It was established that seeds of vegetable crops was one of the important and

often neglected source of viruses in the ecosystems. For Ukraine, seed transmission was confirmed as an important way of spread of many viruses (CGMMV, ZYMV, ToMV and CMV) requiring special control for pathogens with wide host range (CMV and ToMV).

Conservancy of genetic sequences was shown for the majority of studied viruses. Prevalence of point mutations, synonymic amino acid substitutions and stabilizing selection in evolution of plant virus populations was established for Ukraine.

Ukrainian populations of WMV-2, ZYMV, PMMoV and ToMV were mainly genetically homogenous with high degree of identity to known isolates and strains of respective viruses. Unique amino acid substitutions in the 2b protein were found for Ukrainian isolates of CMV suggesting higher level of genetic heterogeneity of its population in Ukraine, and occurrence of different genogroups as opposed to other European countries.

Phylogenetic analysis of coat protein, movement protein and 2b protein genes of Ukrainian isolates of CMV showed the spread of representatives of two subgroups, IA and IB, of CMV, both belonging to the genogroup I. In each of these genogroups, the isolates were highly homologous to each other and to other known strains of CMV. However, in the view of significant evolutionary difference (<95% identity) between Ukrainian isolates CMV-Ukr-28, CMV-Ukr-36, CMV-Ukr-58 and isolate CMV-Ukr-2114, these may be considered as separate strains of CMV.

For isolates CMV-28 and CMV-58, unique amino acid changes were found in 2b protein unrelated to the host of the virus.

Following this work, 33 sequences of Ukrainian isolates of viruses infecting vegetable crops were submitted to the worldwide GenBank (NCBI) making as much as 25% of all plant virus records publicly available for Ukraine. Registered sequences of Ukrainian isolates of viruses infecting vegetable crops allow their further use by the third parties for comparing to other strains or isolates of these pathogens.

Isolated plant viruses were added to the collection of the Department of Virology and are routinely used both for studying novel isolates and in the educational process. Obtained results are useful for improvement of diagnostic techniques of viruses endangering vegetable crops in Ukraine.

For the first time, it was demonstrated that phylogenetic relationships of Ukrainian isolates of viruses infecting vegetable crops were not dependent on geographical origin of the isolates or their host plant. These findings are epidemiologically important and confirm intense circulation of viruses in Ukraine, and can be used for optimization of diagnostic test systems.

Novel recombinants of harmful viruses WMV-2 and TuMV were found for the first time suggesting intense exchange of viral genetic material and evolutionary processes in Ukraine. Analysis of the full-genome sequence of Ukrainian TuMV isolate showed that isolate UKR9 has not been described before and was an atypical European recombinant combining traits of two different genetic groups with a novel single recombination site in *HC-Pro* gene.

It was shown that new Ukrainian recombinant TuMV isolate UKR9 was able to infect systemically plant belonging to two major cruciferous genera *Brassica* and *Raphanus*, and was potentially dangerous in the epidemiological context.

Genetic characteristics of Ukrainian virus isolates were confirmed to correlate with their respective virulence toward vegetable crops. It was established that Ukrainian isolates of ZYMV, WMV-2 and PMMoV do not belong to highly virulent strains. Based on the complex of biological and molecular epidemiological features it was construed that ToMV, TuMV and CMV were potentially the most harmful viruses endangering cultivation of vegetables in Ukraine.

Urban ecosystems together with their concomitant wild-growing and cultural flora were demonstrated as important factors maintaining populations of TuMV with its spread mechanically and by flying vectors. This factor was

shown to be critical for TuMV epidemiology in Ukraine despite the efficiency of traditional measures for plant virus control.

The concept for reliable and cost-effective control of viruses infecting vegetable crops in Ukraine was elaborated basing on epidemiological properties of viruses, their epidemic potential (transmission ways and preservation in the environment, virulence, etc.), type of susceptible crop(s) and growing conditions. The concept includes control of seed material for viruses, testing of concomitant wild-growing plants which may serve as reservoirs for virus with wide spectrum of host plants in the ecosystems, and testing of cultivated plants for elimination of infected hosts.

Key words: plant viruses, recombinants, phylogenetic analysis, vegetable crops, molecular epidemiology.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Монографія:

Ахатов А.К., Ганнибал Ф.Ю., Мешков Ю.И., Джалилов Ф.С., Чижов В.Н., Игнатов А.Н., Полищук В.П., **Шевченко Т.П.**, Борисов Б.А., Стройков Ю.М., Белошапкина О.О. Болезни и вредители овощных культур и картофеля. М.:Товарищество научных зданий КМК. 2013. 463 с.

Посібники

1. Бойко А.Л., Полищук В.П., Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.** Вірусні хвороби перцю солодкого в Україні: діагностика та методи боротьби. *Методичні рекомендації*. К.:ЦОП «Глобус». 2012. 20.

2. Бойко А.Л., Полищук В.П., Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.** Вірусні хвороби томатів в Україні: діагностика та методи боротьби. *Методичні рекомендації*. К.:ЦОП«Глобус». 2012. 24с.

Авторські свідоцтва

1. Будзанівська І.Г., Шевченко О.В., Міщенко Л.Т., Снігур Г.О., **Шевченко Т.П.**, Дуніч А.А., Руднева Т.О., Бисов А.С. Свідоцтво №76810 про реєстрацію авторського права на літературний письмовий твір наукового характеру «Філогенетичний аналіз та встановлення механізмів еволюційної адаптації у системі «вірус-рослина» з використанням молекулярно-генетичних та біоінформаційних підходів», Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. 13.02.2018 р. (Заявка №77482 від 20.12.2017 р., Київський національний університет імені Тараса Шевченка).

2. Будзанівська І.Г., Шевченко О.В., Міщенко Л.Т., Молчанець О.В., **Шевченко Т.П.**, Дуніч А.А., Іутинська О.А., Бисов А.С. Свідоцтво №76811 про реєстрацію авторського права на літературний письмовий твір наукового характеру «Молекулярне типування шкочинних вірусів комерційно важливих культур і дикорослих рослин та оцінка їх епідемічного потенціалу у різних екологічних умовах», Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. 13.02.2018 р. (Заявка №77483 від 20.12.2017 р., Київський національний університет імені Тараса Шевченка).

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, А.Л. Бойко. Властивості вірусу жовтої мозаїки цукіні, ізольованого з рослин родини Cucurbitaceae *Агроекологічний журнал*. 2008. Спеціальний випуск. С. 205–207.

2. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Бисов А.С., Поліщук В.П. Поширення вірусних захворювань рослин родини Cucurbitaceae на території України. *Агроекологічний журнал*. 2008. № 2. С.62–66.

3. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Нацевич В.О., Поліщук В.П., Бойко А.Л. Контроль насінневої вірусної інфекції у рослин родини

Cucurbitaceae та її профілактики. *Агроекологічний журнал*. 2011. №2. С. 85-88.

4. Цвігун В.О., Шамрайчук В.О., Руднєва Т.О., **Шевченко Т.П.**, Бисов А.С., Поліщук В.П. Насіннєва вірусна інфекція рослин родини Solanaceae. *Агроекологічний журнал*. 2012. №3. С. 131-133.

5. Руднєва Т.О., **Шевченко Т.П.**, Цвігун В.О., Шамрайчук В.О., Бисов А.С., Поліщук В.П. Віруси перцю солодкого у агроценозах України та насіннєСМVу матеріалі . *Мікробіологія і біотехнологія*. 2012. №4 (20). С.29-35.

6. Tsvygun V., Shamraichuk V., Bysov A., Rudnieva T., **Shevchenko T.**, Polischuk V. Vabishchevich V., Blotskaya Zh.. Novel viral pathogens of vegetable crops in ukraine and belarus . *Bulletin of Taras Shevchenko' Kyiv National University. Biology*. 2012. №. 62. P. 54-56.

7. Руднєва Т.О., **ШевченкоТ.П.**, Цвігун В.О., Поліщук В.П. Моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської та Полтавської областей. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2013. №4 (24). С.55-62.

8. Shamraichuk V., **Shevchenko T.**, Bysov A., AlDalayn Emad, Budzanivska I. Novel Tobatovirus isolated from vegetable crops in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2013. V.3 (65). P. 66 – 68.

9. Руднєва Т. О., **Шевченко Т. П.**, Цвігун В. О., Будзанівська І. Г., Поліщук В. П. Філогенетична спорідненість українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2014. №4 (28). С.15-25.

10. Al Dalain E., Bysov A., Shevchenko O., **Shevchenko T.**, Polischuk V. Several viral diseases of *Lycopersicon esculentum* circulating in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2014. V.68(3). P.96-98.

11. Алдалаін Е., **Шевченко Т.П.**, Поліщук В.П., Міщенко Л.Т. Ефективність діагностики вірусних хвороб томатів. *Вісник аграрної науки*. 2015. №6. С.29-32.

12. AlDalain E., Bondar O.S., Tymchyshyn O.V., **Shevchenko T.P.**, Budzanivska I.G., Polishchuk V.P. Phylogenetic analysis of tomato mosaic virus isolated from seeds of *Lycopersicon esculentum*. *Наукові доповіді "НУБІП"* [http://nd.nubip.edu.ua/2015_2/12e.pdf]. 2015. Т.2(51). С.1-7.

13. Альдалаін Е., Бондар О.С., Богуславець О.О., **Шевченко Т.П.**, Поліщук В.П. Вірусна контамінація насіння овочевих культур в Україні . *Карантин і захист рослин* . 2015. Т.224. С.5-9.

14. **Shevchenko T.**, Tymchyshyn O., Kosenko I., Budzanivska I., Polishchuk V. Potyviruses infecting vegetable crops in Ukraine . *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2016. V.2 (72). P.48-52.

15. Tymchyshyn O., Kosenko Yu., **Shevchenko T.**, Shevchenko O. Phylogenetic analysis of seed-transmitted isolate of Zucchini yellow mosaic virus. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2017. V.2(74). P.46-50.

16. Руднева Т., **Шевченко Т.**, Шевченко О., Будзанівська І. Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка в агроценозах України. *Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер: Біологія*. 2018. 2 (76):71-79.

17. Пожилов І., Руднева Т., **Шевченко Т.**, Шевченко О., Цвігун В. Філогенетичний аналіз гена капсидного білка ізолятів вірусу мозаїки томату, що циркулюють в Україні. *Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер: Біологія*. 2019. 1 (77):71-79.

Статті у наукових фахових виданнях України,

які входять до міжнародних наукометричних баз даних:

1. Руднева Т.О., Будзанівська І.Г., Рижкова А.Є., Шевченко Т.П., Дем'яненко Ф.П., Поліщук В.П. Характеристика ізолятів вірусу зеленої

крапчатої мозаїки огірка, виділених з різних регіонів України. Мікробіологічний журнал. 2005.Т.67. №6.с.96-103. PMID16493891 <http://pubget.com/paper/16493891>(Scopus).

2. **Shevchenko T.P.**, Tymchyshyn O.V., AlDalain E., Bysov A.S., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. The first evidence of subgroup IB isolates of Cucumber mosaic virus in Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2015. V.31, N.1. P.57-62. (Scopus)

3. Tsvigun V.O., Rudneva T.O., **Shevchenko T.P.**, Budzanivska I.G., Polishchuk V.P. Strain attribution of Ukrainian isolates of Zucchini yellow mosaic virus and their occurrence in Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2016. V.32. N.3. P.235-241. (Scopus)

4. **Shevchenko T.P.**, Tymchyshyn O.V., Kosenko I.A., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of Cucumber mosaic virus based on the partial sequences of three genes. *Biopolymers and Cell*. 2018. V.34(1). P.32-40 (Scopus).

Статті в іноземних виданнях:

1. Boltovets P. M., Snopok B. A., Boyko V. R., **Shevchenko T.P.**, Dyachenko N. S., Shirshov Yu. M. Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies. *J Virol Methods*. 121(1):101-6 (2004) PMID 15350739. <http://pubget.com/paper/15350739> (Scopus)

2. Shevchenko, A.V., Budzanivska, I.G., **Shevchenko, T.P.**, Polishchuk, V.P., Spaar, D. Plant virus infection development as affected by heavy metal stress Archives of Phytopathology and Plant Protection Volume 37, Issue 2, May 2004. P.139-146 (Scopus)

3. Rudneva T.O., Shevchenko T.P., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Virus diseases of Cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine. *Plant Science*. 2006, N43 – p.508-510

4. Budzanivska I. G., Rudneva T. O., **Shevchenko T.P.**, Boubriak I., Polischuk V. P. Investigation of Ukrainian isolates of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2007. №56. P.376-380. (Scopus)

5. Polischuk V.P., Budzanivska I.G., **Shevchenko, T.**, Oliynik S.V. Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007. V.59. pp.409-417. (Scopus)

6. Budzanivska I.G., **Shevchenko T.P.**, Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of RNA viruses of plants. *Acta Microbiologica Bulgarica*. 2016. V.32, N.3. P.10-19.

7. Shevchenko O., Tymchyshyn O., **Shevchenko T.** Traditional cultivation practices may efficiently prevent the virus spread in susceptible crops: a case study of Turnip mosaic virus in Ukraine . *AGROFOR International Journal*. 2017. V.2, N3. P.84-91.

8. Shevchenko O., Yasaka R., Tymchyshyn O., **Shevchenko T.**, Ohshima K. First evidence of the occurrence of Turnip mosaic virus in Ukraine and molecular characterization of its isolate. *Journal of Phytopathology*. 2018. V.166.N6. P 429-437(Scopus)

Статті в інших виданнях:

1. Polischuk V.P., Shevchenko O.V., Budzanivska I.G., **Shevchenko T.P.** Abiotic environmental factors: effects on epidemiology of plant virus infections.. *Virus Diseases and Crop Biosecurity (NATO Series)*. pp.121-132. In: Cooper J.I. et al –Springer, 2006.

Тези наукових доповідей:

1. Руднева ТА, Будзанивская ИГ, Шевченко ТП, Полищук ВП. Новый штамм вируса зеленой крапчатой мозаики огурца на территории Украины. Стратегия и тактика защиты растений. Сборник научных трудов. Выпуск 30, часть1. М; 2006. 303–306 с.

2. Rudneva TO, Shevchenko TP, Budzanivska IG, Shevchenko OV, Polischuk VP. Virus diseases of cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine . 70-th Anniversary of plant protection institute and annual Balkan week of plant health. Book of abstracts. Kostinbrod; 2006 May 28–31. 14 p.
3. Руднева ТО, Шевченко ТП, Поліщук ВП. Вірусні хвороби овочевих культур закритого ґрунту на території України. Біоресурси та віруси: V Міжнародна конференція. Збірник тез. К; 2007 10-13 вересня. 189 с.
4. Rudnieva T, Shevchenko T, Polischuk V. Viruses infecting vegetable crops in Ukraine. Conference: Responses of Plants to Environmental Stresses: Programme and Abstracts. Elena; 2008 May 12–18. 67–68 p.
5. Руднева ТО, Шевченко ТП. Шляхи передачі вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка у тепличних господарствах України. XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Ужгород, Україна; 2009 25-30 травня. 463 с.
6. Шамрайчук ВО, Цвигун ВО, Руднева ТА, Бысов АС, Шевченко ТП. Новые вирусные инфекции овощных культур на территории Украины. Биология наука XXI века: 16 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Собрание тезисов. К; 2012. 50-51 с.
7. Shevchenko TP, Budzanivska IG, Rudnieva TO, AlDalaynEmad, Bysov AS, Polischuk VP. Viruses of vegetablecrops Circulating in Ukraine. XIII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського. Ялта, Україна; 2013 1-6 жовтня. 439 с.
8. Shamraichuk V, Rudnieva T, AlDalaynEmad, Bysov A, Shevchenko T. Distribution of tobamoviruses among plants of Solanaceae family. VII International conference «Bioresources and viruses». Kyiv, Ukraine; 2013 10-13 of September. 96 p.
9. Shevchenko T. Potyvirus infecting vegetable crops in Ukraine. VIII International conference «Bioresources and viruses». Kyiv, Ukraine; 2016 12-14 of September. 18-19 p.

10. Tymchyshyn O, Shevchenko T, Budzanivska I, Polishchuk V. Viruses Infecting Cucurbits In Ukraine And Their Phylogenetic Analysis. 13th International Plant Virus Epidemiology Symposium. Avignon, France; 2016 6-10 June. 148 p.

11. Shevchenko T, Tymchyshyn O, Kosenko I, Pichurina T, Shevchenko O, Budzanivska I. Genetic diversity of most harmful viral pathogens of vegetable crops in Ukraine. XV З'їзд товариства мікробіологів України. Збірник тез; 2017 11-15 вересня. 305 с.

12. Tymchyshyn O, Kosenko I, Shevchenko T. Biological and molecular chracterization of Ukrainian isolates of Zucchini yellow mosaic virus. VIII International Scientific Agriculture Symposium "AGROSIM 2017". Jahorina. Bosnia and Herzegovina; 2017 5-8 October. 742 p.

13. Shevchenko T, Rudneva T, Tsvigun V, Shevchenko O, Budzanivska I. Biodiversity of Plant Viruses Endangering Vegetable Crops in Ukraine. The 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity. Kiev, Ukraine; 2018 03-06 July. 337 p.

14. Фомічов АД, Руднева ТО, Шевченко ТП, Шевченко ОВ, Будзанівська ІГ. Вірус зеленої крапчастої мозаки огірка у агроценозах України. Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві. Чернігів; 2018 24-25 жовтня; 2018. 20-23 с.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	23
ВСТУП	31
РОЗДІЛ 1 СПЕКТР ВІРУСІВ РОСЛИН, ЩО ІНФІКУЮТЬ ОВОЧЕВІ КУЛЬТУРИ	50
РОЗДІЛ 2 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДЕЯКИХ ВІРУСІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР	59
РОЗДІЛ 3 ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВІРУСІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР	71
РОЗДІЛ 4 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	71
4.1. Віруси	71
4.2. Відбір зразків та підготовка рослинного матеріалу для проведення імуноферментного аналізу	71
4.3. Підготовка насіння для детекції вірусних антигенів методом ІФА	72
4.4 Тестування передачі ізолятів вірусів насінням	72
4.5 Біотестування на рослинах-індикаторах	73
4.6. Імуноферментний аналіз у модифікації «сендвіч»	73
4.7. Непрямий імуноферментний аналіз	75
4.8. Приготування препаратів для електронної мікроскопії	75
4.9. Виділення тотальної РНК	76
4.10. Зворотньоотранскрипційна полімеразна ланцюгова реакція в один крок	77
4.11 Зворотньоотранскрипційна полімеразна ланцюгова реакція в два кроки	80
4.12. Горизонтальний електрофорез нуклеїнової кислоти	81
4.13. Очищення продуктів ЗТ-ПЛР	82
4.14. Сиквенування ДНК	84
4.15. Філогенетичний аналіз нуклеотидних та амінокислотних	84

послідовностей

4.16. Статистична обробка результатів	84
РОЗДІЛ 5 ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ У ЗРАЗКАХ РОСЛИН ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР	86
5.1 Різноманіття вірусоподібних симптомів на рослинах овочевих культур	86
5.2 Видовий спектр вірусів ідентифікованих у зразках рослин овочевих культур за допомогою імуноферментного аналізу	92
5.2.1. Аналіз рослин овочевих культур родини <i>Solanaceae</i> на наявність вірусних антигенів	92
5.2.2 Детекція <i>Cucumber mosaic virus</i> в агроценозах України	100
5.2.3 Детекція <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> в агроценозах України	103
5.2.4 Детекція <i>Watermelon mosaic virus 2</i> в агроценозах України	105
5.2.5 Детекція <i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> в агроценозах України	109
5.2.6 Детекція <i>Turnip mosaic virus</i> в агроценозах України	114
РОЗДІЛ 6 ЗМІШАНІ ВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР	122
РОЗДІЛ 7 НАСІННЯ ЯК ОДНЕ З ДЖЕРЕЛ ВІРУСІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ	136
7.1 Тестування насіння овочевих культур родини <i>Solanaceae</i> на вірусоносійство	136
7.2 Перевірка насіння <i>Cucurbitaceae</i> на присутність CGMMV	140
7.3 Встановлення насінневої передачі ZYMV	144
РОЗДІЛ 8 МОЛЕКУЛЯРНО-ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ	151
8.1 Філогенетичний аналіз ізолятів <i>Watermelon mosaic virus 2</i>	151
8.2 Філогенетичний аналіз ізолятів <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	168
8.3 Філогенетичний аналіз ізолятів <i>Cucumber mosaic virus</i>	186
8.4 Філогенетичний аналіз ізолятів <i>Tomato mosaic virus</i>	218

	21
8.5 Філогенетичний аналіз ізолятів Pepper mild mottle mosaic virus	227
8.6 Філогенетичний аналіз ізолятів Turnip mosaic virus	231
РОЗДІЛ 9 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	251
ВИСНОВКИ	282
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	286
ДОДАТОК А	325

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЗТ-ПЛР	зворотньоотранскрипційна полімеразноланцюгова реакція;
ІФА	імуноферментний аналіз;
ПВП	полівінілпіролідон;
CMV	Cucumber mosaic virus;
CGMMV	Cucumber green mottle mosaic virus;
ToMV	Tomato mosaic virus;
TMV	Tobacco mosaic virus;
TRV	Tobacco rattle virus;
ToRV	Tomato ringspot virus;
TuMV	Turnip mosaic virus;
PMMoV	Pepper mild mottle virus;
PVX	Potato virus X;
PVY	Potato virus Y;
WMV 2	Watermelon mosaic virus 2;
ZYMV	Zucchini yellow mosaic virus;
AT	Aphid-transmissible isolate
CP	Capsid protein/Coat protein
NAT	Non-aphid-transmissible isolate
NIb	Nuclear inclusion protein B
PAT	Poor aphid-transmissible isolate
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
MEGA	– molecular evolutionary genetics analysis
MP	– movement protein
NCBI	– National Center for Biotechnology Information
PBS	– Phosphate-buffered solution
TBE	– tris-borate-EDTA

ВСТУП

Актуальність теми. Вірусні захворювання є одним з основних обмежуючих факторів у вирощуванні культурних рослин [1]. Питання мінімізації ризиків, які обумовлюються вірусними інфекціями рослин, завжди привертало увагу вчених, оскільки вірусні хвороби не лише є причиною значних втрат врожаю, але й слугують чи не єдиним прикладом захворювань, які не можна вилікувати або ж лікування яких не є рентабельним.

Очевидно, що взаємодія рослин, їх вірусів та факторів довкілля є комплексною і включає інші патогени, комахи-переносники, інші рослини (в тому числі, резервуари), а також абіотичні та антропогенні фактори [2].

Епідеміологія інфекційних хвороб у класичному розумінні - це система знань про закономірності епідемічного процесу та методи його вивчення, а також сукупності протиепідемічних заходів для попередження інфекційних хвороб, зниження показників захворюваності та ліквідації окремих інфекцій. Предметом вивчення епідеміології інфекційних хвороб є епідемічний процес, закономірності його розвитку та форми прояву.

Молекулярна епідеміологія - це наука, що вивчає роль потенційних генетичних і середовищних факторів ризику у етіології, поширенні і профілактиці захворювань у популяції з використанням молекулярно-біологічних та біоінформаційних методів [3, 4].

У фітовірусології цей термін був вперше використаний при вивченні генетичної структури популяції вірусу огіркової мозаїки в Іспанії. Методи генетичного аналізу вперше забезпечили можливість молекулярного типування ізолятів та штамів вірусів [5] і набули широкого використання [6, 7]. Філогенетичні дослідження популяцій вірусів овочевих культур підтвердили наявність кореляції між генетичними властивостями вірусів та їх географічним поширенням і епідеміологічними властивостями, та свідчать на користь подальшої еволюції вірусів рослин в новому локалітеті після потрапляння до країни [8].

Овочеві культури є важливим і комерційно привабливим елементом продукції рослинництва в Україні. Їх посівна площа складає 450 тис. гектарів (менше 2%), але обсяг виробництва сягає близько 9,5 млн. тонн, тобто майже 10% від валового збору всіх сільськогосподарських культур [9]. Останніми роками спостерігається стійке щорічне зростання (+6-10%) площ захищеного ґрунту для вирощування овочевих культур [10].

Кількість вірусів, які інфікують культурні рослини, невпинно зростає через адаптацію нових сільськогосподарських практик, глобальне потепління та поширення векторів, а також глобалізацію, що супроводжується масовим і швидким обміном насіннєвим та посадковим матеріалом між різними регіонами земної кулі. Згідно останнього звіту комітету з таксономії вірусів, на сьогодні відомо більше 1000 вірусів рослин [11], причому більше 300 вірусів уражують овочеві культури [12].

Інтенсифікація виробництва призвела до сильних екологічних зрушень в агроценозах, у тому числі, до змін у видовому та штамовому різноманітті вірусів рослин [13, 14]. У свою чергу, це спричинило появу в Україні нових захворювань вірусної природи та збільшення агресивності вже присутніх видів [15].

Враховуючи важкість наслідків ураження овочевих культур вірусами (зниження врожайності, втрата комерційної якості продукції, швидке виродження сортів), питання захисту від фітовірусів та їх попередження стоїть для України та світу вкрай гостро [16]. При цьому слід зазначити, що окрім інших чинників, ступінь прояву та характер симптомів захворювання сильно залежать від того, уражена рослина одним видом/штамом вірусу, чи кількома. Саме тому вивчення взаємодії різних вірусів на рівні організму хазяїна є важливим для попередження багатьох захворювань рослин.

Незважаючи на вищезазначене і на факт того, що в природних умовах та агрокультурі рослини зазвичай контактують з кількома патогенами одночасно, на сьогодні наше розуміння механізмів взаємодії

різних вірусів при змішаних інфекціях залишається поверхневим [17], а більша частина відомих даних отримана при дослідженні моноінфекцій.

Встановлення штамової та групової приналежності, вивчення генетичних властивостей та філогенетичних взаємозв'язків ізолятів вірусів овочевих культур, які циркулюють в агроценозах (разом з інформацією щодо дії антропогенних, абіотичних та інших біотичних факторів довкілля) [18, 19], необхідні для розробки дієвих заходів для попередження проникнення нових штамів та видів вірусів на територію України та розвитку епідемій, і є запорукою розуміння причин і механізмів виникнення більш вірулентних ізолятів вірусів.

Розуміння динаміки популяцій вірусів овочевих культур повинне враховуватись перед створенням та застосуванням стійких сортів або генетично модифікованих рослин на певній території і є основою для розробки та впровадження заходів контролю вірусних захворювань [20], зниження біологічного та екологічного ризику, зменшення потенційних втрат врожаю, більш ефективного планування господарчої діяльності, підвищення рентабельності виробництва та реалізації національної продовольчої стратегії та біобезпеки.

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

Дисертаційна робота виконана у рамках науково-дослідних тем кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка НДР 01БФ036-01 (№ ДР 0101U005076) «Моніторинг збудників вірусних інфекцій з метою розробки наукових основ екологічно чистих технологій вирощування сільськогосподарських культур», 2001-2005 рр., НДР 06БФ036-04 (№ ДР 0106U005749) «Вивчення екологічних особливостей та біоіндикаторних властивостей різних організмів та їх угруповань в умовах трансформованого середовища для розв'язання проблем біобезпеки України», 2006-2010 рр., НДР 11БФ036-02 (№ ДР 0111U004649) «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій

адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій», 2011-2015 рр., НДР 16БФ036-02 (№ ДР 0116U004778) «Молекулярне типкування та механізми еволюційної адаптації вірусів культурної і дикорослої флори України», 2016-2018 рр. та під час виконання білатерального проекту ДФФД-БРФФД «Дослідження видового різноманіття та філогенетичних взаємовідносин вірусів, що інфікують овочеві культури в агроценозах України та Білорусії» (2011-2012рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було встановити закономірності епідеміології вірусів овочевих культур України з використанням їх молекулярно-біологічних характеристик.

Відповідно до мети, були поставлені такі завдання:

1. Дослідити спектр вірусів, актуальних та шкочочинних для овочевих культур України.
2. Ідентифікувати детектовані віруси за комплексом таксономічно значущих ознак.
3. Провести порівняльний аналіз поширеності моно- та змішаних вірусних інфекцій овочевих культур.
4. Проаналізувати ефективність насінневого шляху передачі відповідних вірусів та його епідеміологічне значення в Україні.
5. Провести молекулярне типкування вірусів овочевих культур за їх маркерними генами.
6. Оцінити вірулентність українських ізолятів вірусів овочевих культур за генетичними ознаками та вивчити її кореляцію з біологічними властивостями вірусів.
7. Проаналізувати філогенетичну спорідненість українських ізолятів найбільш шкочочинних та варіабельних вірусів овочевих культур з їх відомими штамми та встановити наявність рекомбінантних ізолятів.

8. Встановити епідеміологічні закономірності поширення вірусів овочевих культур в Україні.

9. На підставі результатів досліджень розробити концептуальний підхід до ефективного та рентабельного контролю вірусних інфекцій овочевих культур в Україні.

Об'єкт дослідження – віруси, що інфікують основні овочеві культури в Україні.

Предмет дослідження - молекулярні властивості, джерела та шляхи розповсюдження вірусів овочевих культур в Україні.

Методи дослідження. У роботі використаний спектр методів, який включав візуальну діагностику вірусних захворювань, імуноферментний аналіз у різних модифікаціях, трансмісійну електронну мікроскопію, виділення тотальної РНК з рослинного матеріалу, очистку кДНК, електрофорез нуклеїнових кислот, полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), методи очистки кДНК, секвенування кДНК за Сенгером, філогенетичний аналіз, методи пошуку рекомбінантів та методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні описані віруси м'якої мозаїки перцю (РММoV) та мозаїки турнепсу (TuMV), встановлені їх рослини-хазяї та вивчені способи передачі вірусів, зокрема CMV, ToMV, які є небезпечними для широкого кола культурних рослин. Встановлений спектр вірусів, які з урахуванням екологічних умов та біологічних властивостей є актуальними та шкодочинними для овочевих культур України. Вперше підтверджено значне поширення змішаних вірусних інфекцій та встановлено типові групи вірусів, що їх викликають в Україні. Підтверджено, що насіння овочевих культур є одним із важливих та часто недооцінених джерел вірусів в екосистемах, а насінневий спосіб передачі є актуальним для багатьох вірусів овочевих культур і потребує відповідного контролю. Вперше в Україні виявлено штам вірусу жовтої мозаїки цукіні (ZYMV), який передається насінням з ефективністю у 2,6%.

Отже, встановлено нове джерело ZYMV та спосіб його передачі при циркуляції на території України. Підтверджено кореляцію біологічних властивостей українських ізолятів вірусів (ToMV, TuMV, CMV та ін.) з їх генетичними ознаками у контексті вірулентності щодо овочевих культур. Вивчено філогенетичну спорідненість українських ізолятів найбільш шкодочинних вірусів овочевих культур з їх відомими штамми, встановлено наявність рекомбінантних ізолятів WMV2 та TuMV. За результатами аналізу послідовності повного геному українського ізоляту TuMV встановлено, що ізолят UKR9 не був описаний раніше і є нетиповим для Європи рекомбінантом двох різних генетичних груп World-B та Asian-BR. Показано, що виявлені ізоляти ToMV не належить до високошкодочинних штамів, які можуть долати стійкість сортів до даного вірусу.

Вперше доведено можливість значного поширення вірусів овочевих культур в міських екосистемах, де супутні культурні та дикорослі рослини є резервуарами для збереження популяцій вірусу та його передачі. Встановлено епідеміологічні закономірності поширення вірусів овочевих культур в Україні. Розроблено концептуально новий підхід до контролю актуальних вірусних інфекцій комерційно важливих овочевих культур України. Отримані результати є науковим підґрунтям для вдосконалення системи епідеміологічного та вірусологічного нагляду за вірусними хворобами овочевих культур України.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами молекулярного типування депозитовано до генбанку (GenBank, NCBI) повногеномну та 33 часткові послідовності українських ізолятів вірусів овочевих культур, що складає більше 25% всіх сиквенованих вірусів рослин з України. Вільний доступ до генетичної інформації українських ізолятів вірусів рослин дає змогу їх використовувати для порівняльного аналізу, побудови прогностичних еволюційних та епідеміологічних моделей, розробки методів діагностики та схем контролю вірусних

захворювань. Виділені ізоляти фітовірусів депозитовані до колекції вірусів кафедри вірусології і використовуються для подальшого порівняння їх властивостей з властивостями нововиділених ізолятів вірусів та залучені як тест-об'єкти для вивчення вірусів рослин у навчальному процесі. Практичні положення дисертаційної роботи було використано в учбовому процесі ННЦ «Інститут біології та медицини», а саме для проведення спецкурсів зі студентами кафедри вірусології: «Фітовіруси», «Еволюція вірусів», «Прикладна вірусологія». Також актуальним є використання даних результатів при проведенні лабораторних робіт та навчальних практик. Отримані результати можуть бути використані для вдосконалення методів молекулярної діагностики вірусів овочевих культур. Розроблено методичні рекомендації для діагностики та контролю вірусних захворювань перцю та томату в умовах України.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним та оригінальним науковим дослідженням, виконаним на базі кафедри вірусології. Постановка задач, опрацювання літературних наукових джерел, розробка експериментальних схем та отримання експериментальних даних, аналіз та узагальнення результатів, їх статистична обробка, формулювання висновків дисертації зроблені автором особисто. Відбір дослідних зразків рослин овочевих культур здійснювався за участі співробітників кафедри вірусології.

Матеріали та положення кандидатської дисертації автора не використовувалися в докторській дисертації. Всі дані, отримані у співавторстві, відображені у спільних публікаціях. Автор висловлює щире подяку науковому консультанту д.б.н., професору Поліщуку В.П. за участь у плануванні експериментів та обговоренні результатів попередніх досліджень.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень і положення дисертації роботи доповідались та обговорювались на таких конференціях: 70th Anniversary of Plant Protection Institute and Annual

Balkan Week of Plant Health, May 28-31, 2006 (Kostinbrod, Bulgaria), Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів і молодих учених «Біологічне різноманіття екосистем і сучасна стратегія захисту рослин», 4-6 червня, 2007 р. (Харків), V Міжнародна конференція «Біоресурси і віруси», 10-13 вересня, 2007 р. (Київ), International Conference «Responses of Plants to Environmental Stresses», May 12-18, 2008 (Elena, Bulgaria), 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых „Биология - наука XXI века” (Пушино, 2012), Конференція „Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві”, 25-27 вересня 2012 р. (Чернігів), VII Міжнародна конференція „Біоресурси та віруси”, 10-13 вересня 2013 р. (Київ), XIII З’їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 2013 р. (Ялта); VIII International Scientific Agriculture Symposium “AGROSYM 2017”, October 5-8, 2017 (Jahorina, Bosnia and Herzegovina), 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity, July 03-06, 2018 (Kyiv).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 49 наукових праць, серед яких 30 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених МОН України, та міжнародних фахових журналах (9 статей у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS), одна монографія у співавторстві, 2 навчально-методичних посібника, два авторських свідоцтва та 14 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій і з’їздів.

Структура та обсяг роботи. Дисертація містить вступ; огляд літератури; розділ матеріалів та методів дослідження; розділи, у яких висвітлено результати досліджень, їхнє обговорення та узагальнення; висновки та список використаних літературних джерел, який складається з 354 найменувань; додатку. Загальний обсяг дисертаційної роботи 324 сторінки (без додатку), дисертація містить 62 рисунка та 23 таблиці.

РОЗДІЛ 1

СПЕКТР ВІРУСІВ РОСЛИН, ЩО ІНФІКУЮТЬ ОВОЧЕВІ КУЛЬТУРИ

Вірус жовтої мозаїки цукіні *Zucchini yellow mosaic virus*

Родина: *Potyviridae*

ZYMV був вперше описаний в Італії в 1973 році [21, 22] і на сьогодні вважається одним з найнебезпечніших вірусів гарбузових (з економічної точки зору): він був виявлений у 50 країнах на усіх континентах, окрім Антарктиди [23] і здатен спричиняти втрати 25-50, а іноді, навіть 100% врожаю [24]. Та попри його високу збитковість для сільських господарств та широкий ареал, вірус має досить мале коло хазяїв: 15 видів рослин з 7 різних родин, при чому важкі симптоми було виявлено лише на рослинах родини *Cucurbitaceae*.

ZYMV є членом роду потівірусів (рід *Potyvirus*, родина *Potyviridae*) (порядок невизначений). Віріони ниткоподібні, гнучкі, 682-730 нм завдовжки і 11-13 нм в діаметрі, складаються з близько 2000 субодиниць [11] одного білка масою 31 kDa та містить одноланцюгову (+) РНК близько 9600 нуклеотидів з 5'-кінцем геному, зв'язаним з вірусним протеїном (VPg), та 3'-полі (А) хвостом, які інкапсульовані в капсидний протеїн (CP) 36 кДа [25]. Віріон містить 4,5-7% нуклеїнових кислот та 93-95,5% протеїнів. РНК транслюється як один поліпротеїн, що розщеплюється трьома вірусними протеазами [23].

ZYMV досить ефективно передається багатьма видами попелиць (в організмі попелиці не персистує) завдяки властивостям свого капсидного білку та допоміжної протеази HC-Pro [26, 27].

Частковий контроль розповсюдження ZYMV може бути досягнутий шляхом обмеження передачі вірусу попелицями, використовуючи

адаптовані культурні практики. Показано, що перехресний захист з менш вірулентним штамом ефективний щодо більшості ізолятів ZYMV. Гени резистентності, виявлені в зародках Гарбузових, в даний час вводяться в стійкі сорти. Також були розроблені стратегії створення резистентних до ZYMV трансгенних рослин. Незважаючи на це, висока біологічна мінливість ZYMV виправдовує ретельну оцінку стратегій генетичного контролю з метою підвищення їхньої тривалості та ефективності [23].

Експериментальне коло хазяїв ZYMV включає членів з 11 родин дводольних рослин, таких як *Aizoaceae* (*Tetragonia expansa*), *Amaranthaceae* (*Gomphrena globosa*), *Chenopodiaceae* (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Spinacia oleracea*), *Compositae* (*Senecio vulgaris*), *Labiatae* (*Lamium amplexicaule*), *Leguminosae* (*Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Trigonella foenum-graecum*), *Ranunculaceae* (*Ranunculus sardous*), *Scrophulariaceae* (*Torenia fournieri*), *Solanaceae* (*Nicotiana clevelandii*, *N. benthamiana*), *Umbelliferae* (*Ammi majus*), хоча природна інфекція зареєстрована в основному в *Cucurbitaceae* [22]. Було виявлено, що більш ніж 20 представників *Cucurbitaceae* були чутливими до вірусу, включаючи головні культивовані види *Cucurbita melo*, *C. sativus*, *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *Citrullus lanatus*. Експериментальні хазяї за межами *Cucurbitaceae*, як правило, мають локальні пошкодження або латентні інфекції [28].

Вірус мозаїки кавуна 2 (WMV2 -Watermelon mosaic virus)

Родина: *Potyviridae*

Аналогічно до ZYMV, WMV2 відносять до роду *Potyvirus*, з родини *Potyviridae*. Віріони ниткоподібні, гнучкі, розміром 730-765 нм, містять 5% нуклеїнової кислоти. Геном представлений одноланцюговою лінійною молекулою (+) РНК. Містить один структурний білок розміром 34000 Da, та 7 неструктурних білків. Містить протеазу, полімеразу, білок оболонки та формує циліндричні включення [11].

Передача відбувається за допомогою комах-векторів: *Myzus persicae*, *Aphis craccivora*; щонайменш, 29 видів попелиць здатні передавати *Watermelon mosaic virus* [29]. Вірус передається механічним щепленням і не передається насінням [30, 31].

WMV-2 поширений по всьому світу, особливо у помірних регіонах. Коло його хазяїв ширше, ніж у більшості збудників з родини *Potyviriidae*: експериментально доведено, що він здатен вражати 170 видів рослин, що належать до 27 родин [32]. До цього переліку входять овочі з родини *Cucurbitaceae*, горох посівний [33], ваніль плосколиста [34] та інші культурні рослини.

У зв'язку зі значно ширшим, ніж у більшості представників своєї родини колом хазяїв, WMV-2 спричиняє досить широкий спектр симптомів у інфікованих рослин. Найбільш характерними симптомами інфекції у рослин роду *Cucurbita* є хлороз тканини листка, його деформація, карликовість. На огірку інфекція проявляється у вигляді яскравої мозаїки, на кавуні – у вигляді мозаїки, нитковидності листя та строкатості забарвлення плоду.

Для профілактики захворювань, спричинених WMV-2, необхідно виводити стійкі сорти, перевіряти насіння на наявність патогенів, вчасно знищувати бур'яни, можна також застосовувати інсектициди проти комах-переносників [35].

Вірус мозаїки турнепсу (TuMV - Turnip mosaic virus)

Родина: *Potyviriidae*

Вірус мозаїки турнепсу (*Turnip mosaic virus* (TuMV)) є типовим представником роду *Potyvirus*, який належить до найбільшої родини вірусів рослин – *Potyviriidae*. TuMV характеризується гнучкими ниткоподібними віріонами приблизно 700-750 нм у довжину, які містять одноланцюгову смислову геномну РНК розміром приблизно 10,000 нт [11]. Подібно до інших потівірусів, геном TuMV має одну відкриту рамку

зчитування (ORF), при трансляції якої утворюється один великий поліпротеїн, який надалі розщеплюється вірус-кодованими ферментами у 10 функціональних білків [36]. Як і більшість потівірусів, для TuMV притаманне вкрай широке коло хазяїв, хоча найчастіше даний вірус інфікує представників родини хрестоцвітних (*Brassicaceae*) и викликає системні симптоми (мозаїку, плямистість, хлоротичні ураження та ін.). Для культурних рослин роду *Brassica* вірус мозаїки турнепсу вважається одним з найбільш шкочочинних і економічно важливих вірусів [37]. TuMV відноситься до роду *Potyvirus*, представники якого поширені практично по всій земній кулі [38]. Тому TuMV не є виключенням в даному випадку. Цей вірус був знайдений в Південній та Північній Америці, Європі, Азії, Африці та Океанії [39, 40, 41] тому єдине місце де він не був знайдений, це Антарктида. Особливо серед цих держав, де він був знайдений, можна виділити такі держави як Іспанія [42], Великобританія [43], Італія [40, 44], Греція [45], Німеччина [46], Нідерланди, Чеська Республіка [47], Угорщина [48], Польща [49], Болгарія [50] та Росія [40, 51].

TuMV передається, головним чином, різними видами попелиць, а також механічно від рослини до рослини, але не передається насінням, хоча нещодавно це було поставлене під сумнів для одного з ізолятів цього вірусу [51].

Вірус мозаїки гарбуза (SqMV - Squash mosaic virus)

Родина: *Comoviridae*

Вірус мозаїки гарбуза (Squash mosaic virus) належить до роду *Comovirus* родини *Comoviridae*. Вірус простий з ікосаедричним типом симетрії $d = 30$ нм.

Вірус викликає на листках рослин появу кілець та крапочок. Часто можна спостерігати деформацію листків та різноманітні вирости - енації. У проростків, вирощених з інфікованого насіння, на першому або другому листках спостерігається кайомчатість жилок.

На плодах симптоми варіюють від звичайних хлорозів до серйозних деформацій.

На кабачках та гарбузах вірус спричинює зів'янення огуду, скручування молодих листків та появу жовтої крапчатості на них. Листки, що розвиваються пізніше або не мають симптомів, або вони проявляються дуже слабо. До того ж, симптоми маскуються при високих температурах, тому виявити інфекцію стає важко.

Вірус передається при механічному контакті рослин, насінням, а також жуками: хризомелідами та кокінелідами [52].

Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка (CGMMV - Cucumber green mottle mosaic virus)

Родина: *Virgaviridae*

Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка (CGMMV, рід *Tobamovirus*) – широко розповсюджений у світі патоген, який зустрічається у багатьох країнах світу [53]. Вірус однаково ефективно уражує як рослини закритого, так і відкритого ґрунту, а його коло рослин-хазяїв обмежується рослинами родини гарбузових (*Cucurbitaceae*). В залежності від стадії ураження рослин CGMMV викликає симптоми різного ступеня важкості. Так, втрати врожаю можуть становити від 25 до 50%, а в окремих випадках, коли рослини інфікуються на стадії проростків, вірус може призводити і до повної втрати врожаю [54].

Завдяки своїм біологічним властивостям вірус може тривалий час зберігатися в ґрунті, не втрачаючи інфекційність, а ефективна передача насінням сприяє передачі і поширенню CGMMV між різними країнами внаслідок експортно-імпортних відносин [53, 55].

Вірус тютюнової мозаїки (TMV - Tobacco mosaic virus)

Родина: *Virgaviridae*.

Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) був визнаний як модель, яка дозволяє висвітлити основні характеристики та властивості, які притаманні вірусу. Даний вірус додатково став прототиповою моделлю для дослідження біології рослин-хазяїв [56, 57].

Вірус тютюнової мозаїки належить до родини *Virgaviridae*, роду *Tobamovirus* [58]. ВТМ є унікальним у багатьох відношеннях. Він був першим з відкритих вірусів, першим його було виділено в чистому вигляді та кристалізовано, на ньому вперше було відкрито існування субодиниць і показано, що інфекційність вірусу пов'язана тільки з нуклеїновою кислотою. Зрештою саме ВТМ вперше розділено на білок та інфекційну РНК і знову ж відтворено вірус із цих же компонентів. ВТМ є першим вірусом, в якому розшифровано послідовність амінокислотних залишків у пептидному ланцюзі білкової молекули. За сучасними даними, ВТМ має форму порожнього циліндра діаметром 15 нм і завдовжки 300 нм. Віріон ВТМ містить одноланцюгову (+) РНК, його капсид складається з однакових, спіральних розміщених білкових субодиниць. У кожній спіралі на три витки припадає 29 субодиниць, кожна з яких є білковою молекулою з молекулярною масою 17 530. Загалом віріон містить 2130 (± 2 %) ідентичних білкових субодиниць. Температурна точка інактивації вірусу в соці при нагріванні протягом 10 хвилин становить 90°C.

TMV має широкий діапазон рослин-господарів, серед 199 представників 30 родин. Експериментальні рослини-хазяї: *Nicotiana tabacum* cvs. Turkish, Turkish Samsun, Samsun (Samsoun), White Burley, Burley and Xanthi, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Phaseolus vulgaris*. Експериментальні нечутливі рослини: *Allium porrum*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana megalosiphon* [59]. Симптомами на рослинах є скрученість та карликовість листя та рослини в цілому, мозаїчне забарвлення листків [60].

Цитопатологія: вірус знаходиться в усіх частинах хворої рослини. В цитоплазмі клітин спостерігаються кристалічні включення у вигляді голок та волокон, що являють собою скупчення вірусних часточок. Також, наявні аморфні “Х-тільця” [61].

Вірус мозаїки томатів (ToMV - Tomato mosaic virus)

Родина: *Virgaviridae*.

ВМТо завдає економічний збиток в теплицях і на відкритому повітрі серед томатних культур у багатьох країнах. Вірус легко поширюється через обробку та аграрні маніпуляції. Він також заражає насіння і ґрунт, але наразі його природний вектор не відомий.

Вірус широко поширений і часто спричинює епідемію серед томатів. Симптоми хвороби сильно залежать від температури, довжини світлового дня, інтенсивності світла, віку рослин, штаму вірусу і сорту томатів. Більшість пасльонових видів також сприйнятливі до вірусу. У родинях *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* і *Scrophulariaceae* також є види, що знаходяться у зоні ризику [59].

Паличкоподібний віріон не має оболонки, як правило, прямий. Довжина 300 нм, осьовий канал 4 нм в діаметрі, крок основної спіралі 2,3 нм. Генوم представлений одноланцюговою лінійною РНК [11].

Перші симптоми хвороби проявляються на листках у вигляді крапчатості, пізніше у вигляді темно і світло-зеленої мозаїки. Листя деформуються, можуть набувати ниткоподібну, рідше папоротниковидну форму, платівка листа стає зморшкуватою, плоди стають дрібніше, спостерігається нерівномірне їх дозрівання. На листі з ознаками ниткоподібності найчастіше проявляється енаційна мозаїка. В результаті поразки енаційною мозаїкою з нижнього боку листків утворюються специфічні листкоподібні вирости - енації. Вони можуть мати вухоподібну або чашоподібну форму, розмір досягає близько 1 см. Енаційна мозаїка -

одна з найшкідливіших форм ураження томатів. Важливо знати, що енації є чіткою ознакою ураження рослин вірусом. Схожі патології невірусних хвороб невідомі. При підвищенні температури в весняно-літній період до 30-35° С - кількість рослин з некрозом плодів збільшується. При змішаних інфекціях ВМТо з декількома вірусами: Х-вірусом картоплі, вірусом огіркової мозаїки або аспермії томата розвивається захворювання, зване стрик. Його симптоми - штрихованість, що з'являється на плодах, листі, стеблах і черешках, що має вигляд некротичних смуг. Згодом вони зливаються, оболонка плода розривається, і насіння поширюються зовні. Схожі симптоми можуть проявлятися також в результаті порушення режимів вирощування: різкі перепади температури, недолік освітленості, надлишок азотного харчування [63].

Передається шляхами, не пов'язаними з вектором. Вірус передається за допомогою механічної інокуляції; шляхом щеплення; передається при контакті між рослинами; передається насінням (до 94% вірусу в томаті знаходиться на зовнішній стороні насіння, іноді в ендоспермі, але не в ембріоні; зараження відбувається під час пересадки) [64, 65].

Вірус погримковості тютюну (TRV - Tobacco rattle virus)

Родина: *Virgaviridae*.

Tobacco rattle virus є представником роду *Tobravirus*. TRV має таку видову назву за рахунок того, що він індукує симптоми, які проявляються у вигляді зів'ялого, сухого листа тютюну, і при пориві вітру інфіковані листки сприяють утворенню гримучого звуку [66].

TRV, ймовірно, має широке коло рослин-хазяїв. Понад 100 видів рослин можуть бути інфікованими у природних умовах, а в лабораторних умовах – більш як 400 видів рослин. Відомо достатньо велика кількість серотипів вірусу. Вони відрізняються за важкістю та типом симптомів.

Наявність віріонів фіксують у всіх частинах рослини-хазяя, зокрема у цитоплазмі клітин.

Тобравіруси є біпартитними вірусами рослин. Кожна частинка містить одну одноланцюгову молекулу РНК позитивної полярності, RNA1 і RNA2 відповідно. Віріони мають форму паличкоподібних частинок, діаметром 20-23 нм, 180-210 нм в довжину.

RNA1 TRV складається з 7000 нуклеотидів, кодує чотири відкриті рамки зчитування. Нуклеотидна послідовність RNA2 відрізняється у різних ізолятів. Ці відмінності роблять неможливим опис повної організації генів [67].

TRV часто використовується у вивченні посттранскрипційного мовчання генів [68, 69].

Інфекція, як правило, швидко поширюється від клітини до клітини, але більш повільними темпами - системно.

Дані віруси належать до одного з двох родів вірусів, які поширюються через ґрунт, де мешкають нематоди (родів *Trichodorus* і *Paratrichodorus*). Контамінація відбувається під час харчування нематоди інфікованими клітинами епідермісу кореня, таким чином, вірус потрапляє у цитоплазму рослинної клітини.

Передача через насіння можлива лише в тому випадку коли мова йде про рослини помідорів.

Віруси цього роду можуть зберігатися в латентному стані у нематодах протягом одного року. Вірус поширюється нециркулятивно. Крім того, перебуваючи у нематодах тобравіруси можуть успішно зберігатися у багаторічних рослинах та ураженому насінні [70].

Поява TRV була зафіксована у Європі, Новій Зеландії, у Північній Америці та в Японії. Більшість захворювань, які були викликані TRV не мали великого економічного значення, але TRV може призвести до економічних втрат при вирощуванні тюльпанів, нарцисів, крокусів і гладіолусів. Ураження картоплі може спричинити зниження врожаю [71].

Поширення вірусу може бути обмежене за допомогою використання стійких сортів та безвірусного посадкового матеріалу. Так як вірус може передаватися через насіння деяких рослин, то наявність ретельного контролю бур'янів може бути ефективним. Застосування хімічної стерилізації ґрунту може обмежити кількість нематод, і тим самим перешкодити передачу TRV [72].

Вірус слабкої крапчастості перцю (PMMoV - Pepper mild mottle virus)

Родина *Virgaviridae*

Вірус слабкої крапчастості перцю належить до роду *Tobamovirus* [11]. PMMoV є простим вірусом. Капсид спіральної симетрії довжиною 312 нм і шириною 18 нм, 4 нм в діаметрі. Генوم не сегментований і містить лінійну одноланцюгову молекулу (+) РНК, кодує структурні і неструктурні білки, складається з 6357 нуклеотидів і містить чотири відкриті рамки зчитування, які кодують білки 126К і 183К, 28К білок і 17.5К (білок оболонки). Це перший з тобамовірусів, у якому жодна з рамок зчитування не перекривається [73]. Віріони у своєму складі мають один структурний білок [74].

Ліпіди відсутні. Реплікація вірусу відбувається у цитоплазмі.

Фізико-хімічні і фізичні властивості: ізоелектрична точка знаходиться в межах рН 3.3-3.7. Температура інактивації 95 °С. Життєздатність вірусу *in vitro* більше ніж 30 днів. Інфекційність вірусу не змінюється навіть при обробці ефіром.

Цитопаталогія: в цитоплазмі інфікованих клітин спостерігаються кристалічні включення [75].

Вірус може бути виявлений у мезофілі листка, флоємі. В основному віріони локалізуються в цитоплазмі.

PMMoV уражує рослини родини лободових, губоцвітих, пасльонових [76].

Поява вірусу м'якої плямистості на рослинах *Capsicum* вперше стало звичним у Бразилії [77].

Уражуючи рослини перцю, вірус викликає численні симптоми: жовто-зелена мозаїка, затримка в рості, особливо якщо рослини інфіковані у молодому віці. Плоди дрібні, строкаті і деякі з них мають некротичні пошкодження [78].

Передача вірусу за допомогою вектору не зафіксована. Саджанці можуть бути заражені механічною інокуляцією, насінням, вірус не передається пилком.

Припускають, що людина може виступати в якості «транспортного засобу» для поширення вірусу м'якої плямистості перцю завдяки тому, що вірус зберігає свою інфекційність навіть після перебування у шлунково-кишковому тракті [79].

Вірус огіркової мозаїки (CMV- Cucumber mosaic virus)

Родина: *Bromoviridae*.

CMV широко розповсюджений серед важливих сільськогосподарських культур, здатний заселяти регіони з відмінними кліматичними умовами та різним рослинним біорізноманіттям.

CMV належить до роду *Cuscutovirus* родини *Bromoviridae*. CMV знайдений у різних частинах світу і має велику кількість штамів. Віріон має ікосаедричну симетрію ($T=3$). Діаметр вірусної часточки становить 29 нм [80]. Віріони можуть бути знайдені в цитоплазмі у всіх тканинах ураженої рослини, мають вигляд включень різної форми.

Геном представлений одноланцюговою, позитивною смисловою РНК, яка включає три сегменти. П'ять генів кодує наступні білки: 1a, 2a, 2b, 3a і капсидний білок. Загальний розмір геному 8.621 т.н. [81].

Деякі штами CMV можуть містити сателітну РНК (РНК 5). РНК 5 – одноланцюгова молекула, довжиною 332-342 нуклеотида, її реплікація

повністю залежить від CMV. Сателітна РНК може упакуватись в віріони CMV, що забезпечує її розповсюдження від рослини до рослини за допомогою векторів. Присутність РНК 5 може не мати ніякого впливу на симптоми вірусного захворювання, або підсилювати їх шляхом утворення системних хлорозів або некрозів, або пригнічувати типові прояви CMV на рослині. Імовірний сценарій перебігу хвороби залежить від взаємодії сателітної РНК, штаму або ізоляту CMV та виду або сорту рослини-хазяїна [82].

CMV переноситься неперсистентно за допомогою 75 видів тлі [83], а також рослинами-паразитами, наприклад повитицею (*Cuscuta* sp.), за допомогою насіння й механічно [84]. CMV не здатний зберігатись у ґрунті та рослинних рештках. Ефективність перенесення варіює в залежності від виду комах-переносника, штаму вірусу, виду рослини-хазяїна, умов навколишнього середовища та пори року.

CMV здатний уражувати широкий спектр рослин: 1300 видів, які є представниками близько 500 родів зі 100 родин [85]. Хазяїнами CMV є важливі овочеві й декоративні культури. Багато видів рослин, серед яких є багато бур'янистих рослин, можуть бути резервуарами для CMV [85]. CMV швидко й успішно пристосовується до нових хазяїв та умов середовища, тому кожного року для нього описуються нові хазяї [86].

Найбільш типовим симптомом інфекції CMV є мозаїка. Також CMV може спричиняти хлорози, плямистість, зменшення розмірів листкової пластинки, некрози на листі та плодах. Тяжкість захворювання може варіювати від відсутності видимих симптомів до смерті хазяя [87].

CMV проявляє особливу патогенність на представниках родин гарбузових, пасльонових і бобових, призводячи до ураження 30-50% рослин в роки епіфітотій [86].

Дієвим методом боротьби є планування навколо ділянки природного бар'єру з нечутливих рослин, які затримують проникнення попелиці на ділянку, де висаджені чутливі культури.

Головними методами боротьби з даним патогеном залишаються моніторинг та контроль за якістю й сертифікацією насіння, адже розповсюдження за допомогою насіння є найбільш ефективним для поширення вірусів на великі відстані [88].

Вірус аспермії томатів (TAV-tomato aspermy virus)

Родина: *Bromoviridae*.

За властивостями та структурою вірус аспермії томату схожий на вірус огіркової мозаїки. Відсутність насіння в плодах обумовлено тим, що під час розвитку бруньок вірус блокує поділ при утворенні статевих клітин (порушує мейоз). Вірус аспермії томату відноситься до родини *Bromoviridae*, до роду *Cucumovirus*. Віріон ікосаедричний діаметром 29-30 нм. [89].

Геном вірусу аспермії томату складається із сегментованої одноланцюгової “+” РНК. Ліпіди та вуглеводи відсутні [11].

Крім томата, вірус уражує хризантеми, салат, айстри, канни, кали, тютюн [90]. Рослини не завжди виявляють ознаки захворювання, а можуть бути безсимптомними носіями. Інфекція від заражених рослин передається попелицями. Можлива передача вірусу і при контакті під час догляду за рослинами. З насінням вірус не передається [11].

Основним симптомом ураження вірусом аспермії томату є кущистість. В ураженій рослині пригнічується точка росту головного пагона та відбувається сильна затримка росту верхівки. Через це прокидаються бокові бруньки і з'являється велика кількість потужних бічних пагонів. Іноді страждає точка росту не тільки головного стебла, а й бічних першого порядку, в результаті відбувається подальше розгалуження. Листя хворої рослини набувають темно-зеленої крапчастості, надалі вони стають дрібнішими. Часто листові пластинки деформуються асиметрично, дрібніше тільки по одну сторону центральної

жилки. У багатьох листків зростання жилок сповільнюється і не встигає за зростанням м'якоті - вони стають гофрованими або зморшкуватими. Краї листових пластинок закручуються всередину, і це може привести до того, що листя скручується у вигляді коробочок. Жилки з нижньої сторони листа набувають антоціанового забарвлення. Після зараження рослини плодів на ньому утворюється помітно менше. Вони дрібні, деформовані, часто ребристі, жорсткі. Як правило, ці плоди без насіння або з дуже малою кількістю недорозвинених насінин [91].

X-вірус картоплі (PVX - Potato virusX)

Родина: *Alphaflexiviridae*.

ХВК є ниткоподібним вірусом з одноланцюговою (+) РНК. Послідовність 6435 нуклеотидів містить п'ять відкритих рамок зчитування, які були пронумеровані від одного до п'яти, починаючи з 5' кінця РНК. Реалізація генетичної інформації, необхідної для синтезу білка оболонки, відбувається шляхом синтезу вірусоспецифічної, субгеномної РНК [11, 92].

ХВК здатний уражати такі види, як *Amaranthus retroflexus* (лобода), *Brassica rapa subsp. rapa* (ріпа), *Capsicum annuum* (перець), *Capsicum frutescens* (стручковий перець), *Chenopodium album*, *Cynara cardunculus var. scolymus* (артишок), *Nicotiana tabacum* (тютюн), *Solanum laciniatum* (пташиний пасльон), *Solanum lycopersicum* (томат), *Solanum tuberosum* (картопля), *Trifolium pratense* (фіолетова конюшина), *Vitis vinifera* (виноградна лоза) [93].

Незважаючи на те, що вірус поширюється головним чином шляхом механічного контакту, також існують дослідження про передачу грибом *Synchytrium endobioticum* і кониками *Melanoplus differentialis*. Випадки поширення насінням не описані.

Багато штамів ХВК викликають тільки непомітний міжжилковий хлороз в деяких листах більшості сортів картоплі та майже безсимптомні інфекції в інших. Інші штами викликають серйозні мозаїки і зморщення листя, або гострий некроз кінчика, як правило, з подальшою смертю рослин. Розвиток симптомів, однак, залежить від взаємодії сортів, вірусного штаму і умов навколишнього середовища. Таким чином, хоча симптоми розвиваються при 16-22°C вони часто маскується при більш високих температурах. У помідорі, ХВК викликає мозаїку листя, плямистість з рідкісними некротичними кільцями і некрозом. У тютюні вірус викликає від слабкої плямистості до хлорозних кілець. Хвороби в картоплі і томаті особливо серйозні, коли ХВК присутній разом з іншими вірусами. Таким чином, для картопля ХВК з АВК або УВК викликає закручування або зморшкуваті мозаїки, відповідно. У помідорі РVХ і томатна мозаїка *tobamovirus* спричинюють захворювання стрик [94].

У-вірус картоплі (PVY - Potato virus Y)

Родина: *Potyviridae*.

УВК є найбільш шкодочинним вірусом картоплі з погляду на вплив на врожайність та якість. Він має значні біологічну, серологічну і молекулярну варіабельність, що ускладнює визначення збудника. Три основні штами УВК, як правило, визнані, УВК-С (пунктирні штрихи листків), УВК-N (некроз жилок тютюну) і УВК-О (загальний штам).

Геном представлений одноланцюговою лінійною РНК(+). Субгеномної РНК немає. Вміст білка в частці становить близько 94%. Тільки два білки, VPG і білок оболонки (CP), виявлені в вірусних частинках [11].

Природний діапазон хазяїв широкий і включає в себе до дев'яти сімей, в тому числі таких важливих культур, як перець (*Capsicum*), картопля (*Solanum tuberosum* підвид. *Tuberosum*), тютюн (*Nicotiana*), Томат

(*Lycopersicon Esculentum*), деякі декоративні рослини (Далія і Петунія) і багато бур'янів (*Datura, Physalis, Solanum*). Нові природно заражені види хазяїв були зафіксовані у Новій Зеландії: *Cotula Australis* і грицики звичайні.

Залежно від штаму вірусу і сорту картоплі, симптоми варіюються від легкої до важкої мозаїки позакореневого некрозу до загибелі рослин. Первинні симптоми від первинної інфекції можуть відрізнятися від вторинної інфекції потомства рослин. YBK-N може з'явитися безсимптомно або у вигляді м'якої мозаїки. Первинні симптоми YBK-O і YBK-C можуть бути важкою мозаїкою або некрозом листків. Первинна інфекція показує помірну мозаїку, хлорози листя, гофровані листи і некротичні кільця на поверхні бульби. Вони можуть бути ізольованими або зливатися по всій бульбі. Збільшення некрозу і кільця можуть сприяти гниттю. Вторинні симптоми показують чітку мозаїку на листках і важкий некроз на стеблі і жилках, що призводять до падіння листя.

Вірус може поширюватися за допомогою механічного контакту, але більш широко поширений шлях передачі за допомогою крилатих попелиць, зокрема, персикової попелиці (*Myzus persicae*). Вірус зберігається у переноснику протягом декількох годин. Отже, вірус передається тільки на коротку відстань до 100 метрів. Основним джерелом зараженого соку є бульби [95,96,97].

Вірус плямистого в'янення томату (TSWV - Tomato spotted wilt virus)

Родина: *Bunyaviridae*

Вірус плямистого в'янення томату (або бронзовості) томату був виявлений в Австралії на початку 1900-х років і швидко поширився на інші райони. В даний час поширений в помірних, субтропічних і тропічних регіонах по всьому світу. Захворювання вражає близько 800 різних видів рослин, і є серйозною проблемою для томатів [98].

Віріони являють собою сферичні частинки з оболонкою, близько 70-110 нм в діаметрі, які містять, щонайменше, чотири різні білки: внутрішній білок нуклеокапсида (N); два мембранних глікопротеїна (G1 і G2); і великий білок (L) [11].

Геном складається з трьох лінійних молекул одноланцюгової РНК, які утворюють комплекс з N білками з утворенням кругового нуклеокапсиду.

Рекомбінація сегментів може сприяти різноманітності, особливо щодо симптомів у різних рослин, серологічних властивостей та адаптивності до нових хазяїв і нових країн [99].

Вірус розмножується в трипсах, які можуть передавати вірус протягом всього життя. Дев'ять видів є векторами цього вірусу: *Frankliniella occidentalis*, *F schultzei*, *F fusca* (tobacco thrips); *Thrips tabaci* (onion thrips); *T setosus*, *T moultoni*; *F tenuicornis*, *Lithrips dorsalis* та *Scirtothrips dorsalis*. Перші чотири розглядаються як найбільш важливі вектори через їх широке розповсюдження і взаємодію із великою кількістю хазяїв [100, 101].

Вірус бронзовості томату здатний уражати велику кількість трав'янистих рослин. Найбільш потерпають від нього такі важливі культури, як овочевий перець, салат-латук, тютюн, томати та ще близько 271 різних видів. Понад 100 з них є представниками родин *Asteraceae*, *Fabaceae* та *Solanaceae* [102].

Вірус має досить широкий спектр симптомів навіть у межах окремих видів, на що впливають вік, сорт, харчові та екологічні умови конкретної рослини [103, 104]. На томатах вірус викликає бронзовість та кучерявість листя, некротичні смуги та плями. Темно-коричневі смуги також з'являються на черешках листя, стебел і зростаючих пагонів. Рослини маленькі і хирляві, в порівнянні зі здоровими рослинами. Стиглі

плоди мають бліді червоні або жовті ділянки на шкірі. Іноді уражені рослини гинуть від важкого некрозу. На овочевому перці спостерігаються, в основному, низькорослість і пожовтіння всієї рослини. Листи можуть мати хлорозні лінії або мозаїку з некротичними плямами. Некротичні смуги з'являються на стеблах та поширюються на кінцеві пагони. На стиглих плодах спостерігаються жовті плями з концентричними кільцями або некротичними прожилками. На салаті інфекція починається в листах на одній стороні рослини, згодом перетворюючись на хлоротичні плями. Знебарвлення поширюється на все листя [105, 106].

Вірус кільцевої плямистості томату (ToRV - *Tomato ringspot virus*)

Родина: *Secoviridae*

Tomato ringspot virus відноситься до роду *Nepovirus*. Ізометричні частки діаметром 25 нм, віріон без зовнішньої оболонки, має ікосаедричну симетрію.

Геном вірусу складається із сегментованої одноланцюгової (+) РНК. Повний геном представлений 15800 нуклеотидами. Ліпіди та вуглеводи відсутні.

Ізоелектрична точка знаходиться в межах рН 5.1. Температурна точка інактивації вірусу в соці при нагріванні протягом 10 хвилин становить 58°C. Життєздатність вірусу *in vitro* - 21 доба [11].

Цитопаталогія: вірусні частки наявні в цитоплазмі інфікованих клітин та вакуолях, що прилягають до плазмодесм. В ядрах - не виявлено [107].

Вірус розповсюджений по всьому світі, вперше відмічені випадки ураження в країнах Північної Америки.

Легко передається експериментально, механічною інокуляцією. Передача може здійснюватися нематодою *Xiphinema americanum*, а також насінням. Передача пилом не спостерігалась [108].

ToRV має широкий діапазон рослин-хазяїв. Експериментальні рослини-хазяї: *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana clevelandii*, *Petunia x hybrida*, *Lycopersicon esculentum*, *Chenopodium amaranticolor*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna sinensis*. Експериментальні нечутливі рослини: *Abelmoschus esculentus*, *Catharanthus roseus*, *Daucus carota*, *Hyoscyamus niger*, *Nicotiana glutinosa*, *Tetragonia tetragonioides*, *Tropaeolum majus*, *Zinnia elegans*.

Вірусна РНК накопичується в листках [109]. Симптомами на рослинах є локальні хлорози, апікальні некрози, системні хлорози та некрози, локальні некротичні плями та кільця на листках, загибель молодих листків [110].

Отже, за літературними даними наведено характеристику найпоширеніших вірусних захворювань, які розповсюджені серед овочевих культур різних країн.

РОЗДІЛ 2

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВІРУСІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР

Cucumber mosaic virus

На основі порівняння нуклеотидних послідовностей усі штами й ізоляти CMV розділяють на групи IA, IB, II (відповідають серологічним групам DTL, Co і ToRS). Для визначення групової приналежності можна застосовувати рослини-індикатори, серологічні методи [111], зворотньотранскрипційну полімеразно-ланцюгову реакцію [112], поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів [113], філогенетичний аналіз [114].

Групи CMV характеризуються неоднорідним розповсюдженням. Штами й ізоляти, які належать до групи IA і II поширені рівномірно по всьому світу, при цьому представники групи I зустрічаються частіше та інколи становлять близько 80% усіх ізолятів [115].

Представники групи IB трапляються в основному в Східній Азії, яка вважається їх батьківщиною [115]. Вони трапляються також в середземноморському регіоні, Каліфорнії, Австралії та Греції [114]. Вважається, що на ці території штами групи IB були занесені зі Східної Азії [115].

Представники груп IA і IB характеризуються широким температурним оптимумом, зустрічаються у тропіках і субтропіках, де завдають великих збитків і викликають епідемії [114]. Ізоляти II групи викликають слабші за проявом симптоми на рослинах, зазвичай поширені в країнах з помірним кліматом [114].

Ізоляти однієї групи виявляють >90% рівень ідентичності нуклеотидних послідовностей. Рівень ідентичності нуклеотидних послідовностей представників I та II груп становить приблизно 67-77%

[116]. Подібність нуклеотидних послідовностей між ізолятами груп ІА та ІВ – 92-94% [117].

Рівень ідентичності нуклеотидних послідовностей штамів однієї групи відрізняються на 2-3% [118]. Між групами дана різниця більша, зокрема рівень ідентичності послідовностей представників групи ІВ у порівнянні з групою ІА варіює у діапазоні на 7-12% за нуклеотидними послідовностями [117].

Філогенетичні дерева, побудовані на основі амінокислотних послідовностей різних відкритих рамок зчитування (ORF), є неконгруентними, що вказує на окрему еволюційну історію для трьох сегментів РНК вірусу огіркової мозаїки, яка пов'язана з реасортацією геномів [119]. Roossinck M.J. з колегами побудували філогенетичні дерева для усіх ORF, і встановили, що їх кластери є неконгруентними і більше того, вони не повністю відображають класифікацію на групи, яка була зроблена на основі гену капсидного білка [86].

Під час проведення філогенетичних досліджень видима різниця у структурі дерев спостерігається лише між генами капсидного білка і 3а (РНК 3). Вона проявляється у ступені галуження (вищий у 3а) та довжині гілок (довші у капсидного білку), особливо тих, що ведуть до субгруп І та ІІ. Ці відмінності відображають певні обмеження у тої чи іншої ORF на можливість еволюціонувати [86]. Як відомо, капсидні білки взаємодіють між собою та з нуклеїновою кислотою, і в меншій мірі з хазяїном. Взаємодія з векторами є мінімальною і здебільшого неспецифічною, оскільки 75 різних видів тлі можуть бути переносниками для даного вірусу, крім того CMV з мутантним капсидним білком переносяться тлею [120]. Водночас, білок 3а задіяний у транспорті вірусу і взаємодіє з плазмодесмами. Тобто хазяїн накладає певні еволюційні обмеження для 3а, сприяючи меншій радіальній дивергенції від предкової форми та утворення більш компактного філогенетичного дерева [86].

Білок 2a, РНК-залежна РНК-полімераза, містить GDD мотив і формує РНК-полімеразний комплекс разом з протеїном 1a та багатьма клітинними факторами [86]. Якщо порівняти філогенетичні дерева для даних генів, то спостерігатимемо щось подібне як у випадку з 3a і капсидним білком. З цього випливає, що еволюція білка 2a не обмежена взаємодіями вірус-хазяїн, тобто 2a не з'єднується з клітинними факторами під час реплікації [86].

Відкрита рамка зчитування 2b перекривається з карбоксильним кінцем білка 2a [121]. Імовірно, регіон перекривання є високопластичною ділянкою 2a ORF [86]. Відкрита рамка зчитування у цій ділянці характерна для роду *Cucumovirus*, а також для ще одного представника родини *Bromoviridae* - роду *Parvivirus*.

У всіх ізолятів CMV ініціаторний кодон гена 2b розташований у гомологічному положенні. Рівень спорідненості по амінокислотній послідовності білку 2b є низьким в порівнянні з іншими ORF серед представників родини *Cucumovirus*. Водночас, рівень спорідненості послідовності нуклеїнових кислот є вищою, ніж амінокислотної. У сумі ці дані вказують на те, ген 2a є предковим, а відкрита рамка зчитування 2b виникла багаторазово у одній і ті ж найбільш варіабельній ділянці геному [86].

3' - NTR є найбільш консервативною ділянкою геному CMV. 3' - NTR включає промотор для синтезу мінус-ланцюга РНК у ході вірусної реплікації. NTR взаємодіє з репліказою (білки 1a, 2a, клітинні фактори хазяя). Ця ділянка відіграє основну роль у регуляції трансляції, оскільки 1a і 2a експресуються в малих кількостях. У штучно синтезованих і природньоіснуючих реасортантів роду *Cucumovirus* 3-ділянка РНК 3 замінена на відповідну РНК 1 або РНК 2, мала здатність краще взаємодіяти з репліказою [122].

Watermelon mosaic virus 2

Штами WMV-2 можна розділити на 3 групи. До 1999 року у Франції переважали штами, які викликали слабкі симптоми, і не виявляли загрози для продукції гарбузових культур. Але починаючи з 2000 року у Південно-східній Франції почали детектувати емерджентні штами, які мали змінену патогенність, спричинювали розвиток симптомів більшої тяжкості. Дані штами є філогенетично віддаленими від класичних та відрізняються біологічними властивостями.

Рівень подібності амінокислотних послідовностей гену капсидного білка між різними штамами WMV-2 становить більш як 90%, не включаючи варіабельну N-кінцеву ділянку. При спорідненості менш як 70% штами вважаються представниками різних видів [123].

Емерджентні та класичні штами уражують однакове коло хазяїв, також вони мають спільних резервуарів серед бур'янів (*C. bursa-pastoris*, *Senecio vulgaris*, *Lamium amplexicaule*) для переживання несприятливих умов [124].

Chenopodium quinoa може розвивати системну інфекцію лише при ураженні класичними штамами, в той час як *Ranunculus sardous* при ураженні емерджентними штамами розвиває системну інфекцію [124].

Перенесення за допомогою попелиць *M. persicae* варіює від 17% (для емерджентного ізоляту FMF00-LL1) до 70% (для класичного штаму C05-465). Хоча суттєвої різниці при підрахунку середньої ефективності перенесення за допомогою попелиць не виявлено, навпаки середні значення були подібними для класичних і емерджентних штамів [124].

Часто спостерігається ко-інфекція класичними та емерджентними ізолятами, що є нетиповим для вірусів в принципі, оскільки зазвичай емерджентні штами витісняють класичні. У випадку з WMV-2 штами-партнери взаємодіють один з одним, надаючи нових властивостей [125]. При дослідженні ефективності передачі за допомогою попелиць у різних рослин було показано, що при змішаній інфекції загальна ефективність

передачі залишається однаковою, хоча при змішаній інфекції вона дещо менша. Водночас ефективність передачі емерджентних ізолятів є вищою при змішаній інфекції, ніж при моноінфекції [126].

Для WMV-2, як і для всіх РНК-вмісних вірусів, характерна велика частота мутацій. Крім того, WMV-2 належить до одного з вірусів роду *Potyvirus*, для яких характерні рекомбінації геному [127]. Рекомбінації призводять до виникнення нових штамів, які часто мають змінені властивості [124, 128, 129, 130].

На сьогодні у Генбанку [131] представлені штами WMV-2 що були виявлені в таких країнах як: США, Франція, Єгипет, Ізраїль, Пакистан, Тонга, Китай, Індія, Іран, Японія, Південна Корея та Боснія і Герцеговина [132, 133, 134, 135, 136].

Отже, невеликий перелік штамів WMV-2 свідчить про перспективність досліджень направлених на їх визначення та характеристику.

Zucchini yellow mosaic virus

Штами та ізоляти вірусу жовтої мозаїки цукіні відрізняються симптоматикою, колом чутливих хазяїв, патогенністю, ефективністю розповсюдження за допомогою попелиць.

Говорячи про генетичну неоднорідність вірусу жовтої мозаїки цукіні, потрібно згадати N-кінцеву ділянку капсидного білку, найбільш варіабельну ділянку геному, відому для більшості представників роду *Potyvirus*. Дану ділянку використовують для диференціації ізолятів та штамів ZYMV.

На сьогодні для вірусу жовтої мозаїки цукіні в Генбанку наявні нуклеотидні послідовності близько 400 штамів і ізолятів. Як відомо з літературних джерел висока генетична мінливість у представників роду *Potyvirus* характерна для N-кінцевій ділянці капсидного білку. N-кінцева ділянка – це єдина ділянка капсидного білку, яка містить вірус-специфічні

епітопи. Послідовність трипептиду DAG, що розташована поблизу N-кінця капсидного білку необхідна для перенесення за допомогою попелиць [137].

Багато досліджень проводили з нуклеотидними послідовностями ZYMV у біогеографічному контексті. У 2002 році Desbiez з колегами виділила 2 групи ZYMV – А і В, аналізуючи 250-нуклеотидні фрагменти 160 вірусних ізолятів, відібраних у 23 географічних регіонів [138]. При чому перша група підрозділялась на 3 кластери.

Подальший аналіз капсидного білка виявив три головні групи з різним географічним поширенням [139]. Перша група (I) включала в основному європейські ізоляти, а також деякі ізоляти з Китаю та Японії, і єдиний каліфорнійський ізолят. Група II була сформована з ізолятів з Азії, а III група складалась з китайських ізолятів. Потрібно зазначити, що ізоляти I та II групи викликали мозаїку на листкових пластинках, в той час як III група не спричинювала жодних симптомів на плодах, але викликала сильну мозаїку на листкових пластинках.

Більш філогенетично віддалені ізоляти ZYMV були детектовані в Сінгапурі і острові Реюньйон, а також на інших островах в Індійському океані, які представлені в групі В за класифікацією Desbiez [138].

Більш локальні філогеографічні дослідження проводились в Центральній Європі. Однак, ізоляти із прилеглих локацій не завжди були близькоспоріднені. Такі результати свідчать про те, що структура популяції ZYMV визначається міжнародною торгівлею інфікованим насінним матеріалом [140, 141].

У дослідженні Simmons та колег порівнюючи 55 повнорозмірних нуклеотидних послідовностей капсидних білків виявили, що можна об'єднати групи I і II, але їх аналіз не включав ізоляти з Ірану і В'єтнаму [142].

На з колегами проаналізували 61 повнорозмірну нуклеотидну послідовність капсидних білків та виявили три головних кластери:

I – ізоляти, розповсюджені по усьому світу;

II – ізоляти з острова Реюньйон, Сінгапуру та В'єтнаму;

III – ізоляти, виявлені в Китаї та В'єтнамі.

У дослідженні Vananepj та його колег 208 часткових нуклеотидних послідовностей (231 nt) було запропоновано виділяти дві групи (A та B). Група A включала ізоляти зі всього світу й складалась з трьох підгруп. Група B представлена ізолятами з Китаю, острова Реюньйон, Сінгапуру та В'єтнаму [143].

Отже, як видно з усього вищесказаного жодна робота не давала повної картини філогенетичного розподілення наявних ізолятів за групами та наявності/присутності географічного компонента у цій філогенетичній класифікації.

Найбільш повний аналіз провели Coutts з колегами [144]. Вони використали 143 нуклеотидні послідовності гену капсидного білку. Загалом, топологія філогенетичного дерева була подібною на отриману в дослідженні Ha et al. [145], які назвали їх I-III. Але оскільки групи були названі A і B у дослідженні Desbiez та її колег [138], тому їх класифікація була взята за основу. Третю групу, яка була відсутня в Desbiez, було названо C. Відповідно групи A, B та C відповідають групам I (всесвітньо поширена група), II (ізоляти з В'єтнаму, Реюньйону та Сінгапуру) та III (ізоляти з В'єтнаму та Китаю) класифікації Ha, група C також відповідає групі III за класифікацією Simmons та його колег.

Група A підрозділяється на чотири підгрупи: I, II, III та IV. Desbiez [138] також запропонувала розділяти групу A на три кластери, перший з них відповідає підгрупі AI, а другий – AII.

Ізоляти з Китаю та Кореї формували підгрупу AIII.

Підгрупа AIV включала ізоляти з Тайвані, Південної Кореї, Китаю та Японії.

До кластеру 1 входять штами, які найбільш частіше виявлялися по всьому світі. Більшість з них належать до серогрупи 1. Запропонований типовий представник цього кластеру є ZYMV-NAT.

Для кластеру 2 характерна не дуже висока бутстреп-підтримка, а також його виокремлення спостерігалось при використанні трьох методів аналізу і було доволі очевидним при вирівнюванні нуклеотидних послідовностей. Серологічно, представники цього кластеру не можуть бути відокремлені від кластеру 1, оскільки мутації присутні в представників кластерів 1 і 2 є синонімічними і штами не відрізняються на амінокислотному рівні.

Штами, які відносяться до 3 кластеру являють собою лише малу частину ZYMV ізолятів, які були знайдені на чотирьох континентах та пов'язані з іншими штамми з інших кластерів, як зокрема з ізолятами з Австрії, Італії та Іспанії.

Група В розділялась на підгрупи VI та VII. Підгрупа VI включала ізоляти, виявлені у В'єтнамі, Сінгапурі та Реюньйоні. У той час група VII складалась з австралійських ізолятів. Група С складалась із ізолятів, виявлених у Китаї, Польщі та В'єтнаму.

Говорячи про нуклеотидну подібність ізолятів всіх груп та підгруп Coutts наводять наступні відсотки [144]:

- група А – більш як 88,8 %:
- AI – більш як 95,9%;
- AII – більш як 93,2%;
- AIII – більш як 91,8%;
- AIV – більш як 85,6%;
- група В – більш як 86,5%:
- VI – більш як 86,5%;
- VII – більш як 98,7%;
- група С – більш як 85,8%.

Цікавим є також питання про близьку спорідненість ізолятів в межах певної території та відносна стабільність вірусних популяцій впродовж доволі тривалого часу. Адже з одного боку популяції РНК вірусів характеризуються високим рівнем мутацій, великим розміром

популяцій та швидкою реплікацією, що надає їм широку генетичну мінливість.

З іншого боку, деякі вірусні популяції залишаються відносно стабільними. Це відбувається завдяки ефекту «пляшкового горличка», що визначає генетичну різноманітність популяції через системну інфекцію та горизонтальне перенесення за допомогою попелиць [146, 147].

РОЗДІЛ 3

ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВІРУСІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР

CMV здатний уражувати широкий спектр рослин: 1300 видів, які є представниками близько 500 родів зі 100 родин [11]. Хазяїнами CMV є важливі овочеві й декоративні культури. Багато видів рослин, серед яких є багато бур'янистих рослин, можуть бути резервуарами для CMV [148]. CMV швидко й успішно пристосовується до нових хазяїв та умов середовища, тому кожного року для нього описуються нові хазяї [149].

Типовим симптомом інфекції CMV є різні типи мозаїки [150]. CMV здатний спричиняти хлорози, плямистість, зменшення розмірів листкової пластинки, некрози на листі та плодах [151]. Тяжкість захворювання може варіювати в залежності від штаму вірусу та хазяя [152, 153, 154, 155, 156].

CMV має широке коло чутливих хазяїв, але особливу патогенність проявляє на представниках родин гарбузових, пасльонових і бобових, призводячи до ураження 30-50% рослин в роки епіфітотій.

Надзвичайно різноманітні симптоми, спричинені CMV, можуть бути пов'язані з багатьма факторами (вид, вік, фізіологічний стан рослини, штам вірусу, температура та ін.), одним з яких є змішані інфекції з іншими вірусами [151].

CMV може спостерігатись у змішаних інфекціях з вірусом жовтої мозаїки цукіні (ZYMV) та вірусом мозаїки кавуна – 2 (WMV-2). Хоча ці віруси відрізняються за багатьма параметрами, зокрема форма віріону (WMV-2 і ZYMV мають нитковідні вірусні часточки, а у CMV - сферичні), тип нуклеїнової кислоти (у WMV-2 і ZYMV РНК монопартитна, а у CMV вона трипартитна і також присутня субгеномна РНК), при змішаних інфекціях відбуваються синергетичні взаємодії між ними.

Коінфекція ZYMV та вірусу огіркової мозаїки проявляється у синергетичному ефекті на прояв симптомів, накопичення обох вірусів до

вищих титрів у рослині. У результаті спостерігаються більші втрати врожаю, ніж при моноінфекції [157].

При ко-інфекції CMV та ZYMV спостерігається посилення симптомів та розповсюдження по рослині. Інколи посилюється ефективність транспортування від рослини до рослини за допомогою попелиці [157].

Доведено, що при сумісному інфікуванню рослини вірусом мозаїки кавуна та CMV симптоми були більш вираженими та сильнішими, але рослина залишається живою. Також при коінфекції окремих штамів WMV-2 та CMV спостерігається підвищення акумуляції вірусних частинок у рослині у два рази, але при зміні штамів рівень накопичення збільшується незначно [158].

Для профілактики захворювань, спричинених CMV, необхідно виводити стійкі сорти, перевіряти насіння на наявність патогенів, вчасно знищувати бур'яни, можна також застосовувати інсектициди проти комах-переносників, але цей метод є неефективним і нераціональним [159]. Дієвим методом боротьби є планування навколо ділянки природного бар'єра з нечутливих рослин, які затримують проникнення попелиць на ділянку.

Головними методами боротьби з даним патогеном залишаються моніторинг та контроль за якістю й сертифікацією насіння, адже розповсюдження за допомогою насіння є найбільш ефективним для поширення вірусів на великі відстані [160].

На противагу цьому, інша велика родина вірусів, що інфікують овочеві культури, а саме потівіруси - передаються механічним шляхом і відносяться до групи неперсистентних вірусів. У широкому розповсюдженню серед культурних та дикоростучих рослин допомагають попелиці багаточисельних видів, але зустрічаються віруси, які можуть передаватися кліщами, наприклад, вірус штрихуватої мозаїки пшениці або вірус мозаїки пирію [161].

Окремі представники потігрупи передаються насінням хворих рослин (вірус мозаїки квасолі, мозаїка коров'ячого гороху, мозаїка сої тощо). Однак для більшості потівірусів даних про насіннєву передачу немає. У заражених вірусом жовтої мозаїки квасолі гороху, бобів, білої конюшини, жовтого та білого люпину процент насіннєвої передачі складає 3 – 6%. Резерватами потівірусів можуть бути коренеплоди цукрового буряка, бульби картоплі, цибулини тюльпану, цибулі тощо.

Коло рослин-хазяїв для одних потівірусів велике (вірус мозаїки турнепсу, УВК), для інших, особливо ті, які передаються через насіння, навпаки дуже вузьке (мозаїка гіпеастрому, мозаїки сої). Інфіковані рослини реагують розвитком мозаїки та крапчастості на листках, більшість вірусів викликають строкатість тюльпанів, крапчастість та деформації та насіння, що значно знижує кількість та якість продукції.

ТТІ для більшості потівірусів знаходиться у межах 50° – 70°С, але краще за все віруси інактивуються при 55° – 60°С. Зустрічаються віруси, які мають більш низьку температуру інактивації, наприклад вірус шарки сливи інактивується при 51° – 54°С, а в замороженому соці *Chenopodium foetidum* при 40° – 47°С [161].

Поширення досліджуваних вірусів роду Potyvirus у світі.

Вірус жовтої мозаїки цукіні виявлений у Франції, Німеччині, Італії, Ізраїлі, Лівані, Марокко, Іспанії, США, Єгипті, Австралії, Маврикії та Великобританії. Ізольований від дикого *Cucurbit Melothria pendula* у Флориді [162, 163, 164].

Експериментальний діапазон хазяїв ZYMV включає членів родин Aizoaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Ranunculaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Umbellifrae [21].

Вірус мозаїки кавуна 2 розповсюджений по всьому світі, особливо в Австралії, Чехії, Чилі, Франції, Угорщині, Ірані, Ізраїлі, Італії, Японії, Новій Зеландії, США та Югославії [21, 22].

До ВМК 2 є чутливими більш ніж 160 різновидів рослин з 23 родин. Вірус добре передається механічно.

Вірус мозаїки кавуна 2 – один з найбільш відомих патогенів рослин родини *Cucurbitaceae* наряду з вірусами огіркової мозаїки, мозаїки гарбуза та жовтої мозаїки цукіні. Він широко розповсюджений на Північно-Американському континенті, в південній Африці, в Європі, в Австралії. Епіфітотії WMV-2 описані і в країнах азіатсько-тихоокеанського регіону. У Китаї природними хазяями вірусу є гарбуз, диня, кавун, горох, квасоля. В Японії WMV-2 знайдений на посадках огірка, кавуна, гарбуза, гороху. Відомий також вірус в Таїланді та Кореї. Захворювання викликані WMV-2, виявлені в Україні, Молдавії та Казахстані.

Зниження врожаю кавуна та гарбуза у випадку епіфітотії WMV-2 досягає, по даним різних авторів, від 9-43 до 19-73% і залежить від строків інфікування рослин. Якщо зараження вірусом проходить в перші 10 днів, плоди не утворюються, а втрати врожаю складають 100% [165].

Найбільш характерними симптомами інфекції у рослин роду *Cucurbita* (гарбуз, патисон, кабачок) є хлороз тканини листка, його деформація, карликовість. Починається захворювання з посвітління жилок. Надалі розвивається крапчастість, а також темно-зелені здуття, що деформує листок. Верхівки листків звужуються та ниткоподібно витягуються. У результаті форма листка суттєво змінюється. Можливе зменшення розміру та деформація плодів, зміна їх забарвлення. На огірку інфекція проявляється у вигляді яскравої мозаїки, на кавунові – у вигляді мозаїки, нитковидності листя та строкатості забарвлення плоду.

Передається WMV-2 в природі, в основному, за допомогою комах-переносників, головні з яких – попелиці *Aphis gossypii* та *Myzus persicae*.

Вірусні захворювання в цілому можуть бути викликані однією, або змішаною інфекцією двох чи більше вірусів. Одночасна інфекція викликана різними вірусами або різними штамми одного й того самого виду вірусу нерідко зустрічається в природі [166]. У рослинах, одночасне

інфікування різними вірусами може призвести до явища, описаного як нейтралізм, коли віруси не заважають реплікації, накопиченню і передачі один одного [167]. Періодично, це може привести до антагонізму, коли один вірус знижує інфекцію або накопичення іншого вірусу [167], або синергізму, коли ко-інфекція призводить до збільшення проявів симптомів та/або збільшення концентрації вірусу. Синергичні взаємодії між вірусами рослин можуть призвести до збільшення захворюваності у посівах, які сприйнятливі до різних вірусних комбінацій [168, 169].

Набагато менше відомо про синергетичні взаємодії, що відбуваються в баштанних видах подвійно інфікованих CMV і потівірусами. Інфекції баштанних видів таких як ZYMV, WMV-2 або CMV дуже поширені, і завдають значної шкоди в усьому світі, у вигляді важких епідемій баштанних полів, чи в поодинокій чи в подвійній інфекції. Значного економічного збитку було завдано Кореї від подвійної інфекції вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка і WMV-2 що викликали некрози у кавунів. У комплексно інфікованих клітинах рослинах кавуна і огірка виникала специфічна дев'ятикутна ультраструктура, викликана взаємодією двох патогенів – WMV-2 і CGMMV. Одна частинка WMV-2 була оточена 9 частинками CGMMV [170]. Накопичена CGMMV РНК при змішаній інфекції з WMV-2 в деяких гарбузових була вище, ніж при зараженні тільки CGMMV. Крім того, рівень капсидного білка CGMMV збільшилася при змішаній інфекції. Однак, рівень WMV-2, не показував істотного підвищення порівняно з поодинокую інфекцією. Поодинокі інфекції WMV-2 або CGMMV в тих самих хазяях проявлялася лише посвітлінням жилок, утворенням пухирців, системній мозаїці чи плямистості на верхніх листках і подібні симптоми розвивалися після подвійної інфекції [171].

Синергізм спостерігається між WMV-2 та іншими вірусами, що вражають Гарбузові, які можуть виражатися або збільшенням темпів розмноження вірусів або більш важкими симптомами. Коли WMV-2 знаходиться в змішаній інфекції з полеровірусами, наприклад, вірус

пожовтіння огірка, що передається попелицями (ВПО), швидкість розмноження ВПО та інтенсивність його симптомів збільшуються.

Взаємодія WMV-2 і ZYMV, двох близькоспоріднених потівірусів (*Potyviriidae*), представляє особливий інтерес, тому що ці генетично різні вірусні види відносяться до однієї й тієї ж підгрупи і займають подібні екологічні ніші, що дозволяє припустити, що конкуренція між цими вірусами може бути важливим фактором, що впливає на їх еволюцію. WMV-2 і ZYMV мають подібні діапазони хазяїв (в першу чергу – гарбузові), викликають подібні симптоми і передаються (не завжди) тими ж видами попелиць, хоча і з різною ефективністю. Як і інші потівіруси, WMV-2 і ZYMV мають уніпартитний одноланцюговий (+)РНК геном (подібні за розміром і організацією, що кодує поліпротеїни, і обидва використовують допоміжний компонент білка для перенесення на попелицях. Коінфекція WMV-2 і ZYMV в одних і тих же популяціях хазяїна і в окремих рослинах зустрічається однаково часто як для культурних так і для диких видів хазяїв. Але інфекція, не викликає таких важких синергетичних ефектів, як повідомлялося для подвійних інфекцій деяких вірусів в роду *Potyvirus* разом з вірусами з інших родів, таких як *Cucumovirus* (родина *Bromoviridae*) або *Potexvirus* (родина *Alphaflexiviridae*) - подібні ефекти насправді, як видається, відносно рідкісні, і ко-інфекція вірусів в природі частіше показує слабшу взаємодію [165].

Вірус жовтої мозаїки цукіні має велике економічне значення в середземноморських країнах, центральній Європі та Сполучених штатах Америки. Гарбузові рослини, які культивуються в українських агроценозах, також чутливі до вірусу жовтої мозаїки цукіні, який трапляється як у моноінфекції, так і в змішаній інфекції з вірусом мозаїки кавуна-2.

Вірус жовтої мозаїки цукіні набув великого економічного значення практично зразу після його ідентифікації і відкриття в 1981 році [172]. Він

був знайдений практично одночасно в Італії та Франції. Зараз цей вірус виявлений у багатьох країнах світу (рис. 3.1), а у 22 країнах на п'яти континентах часто спричинює спустошливі епіфітотії [173].

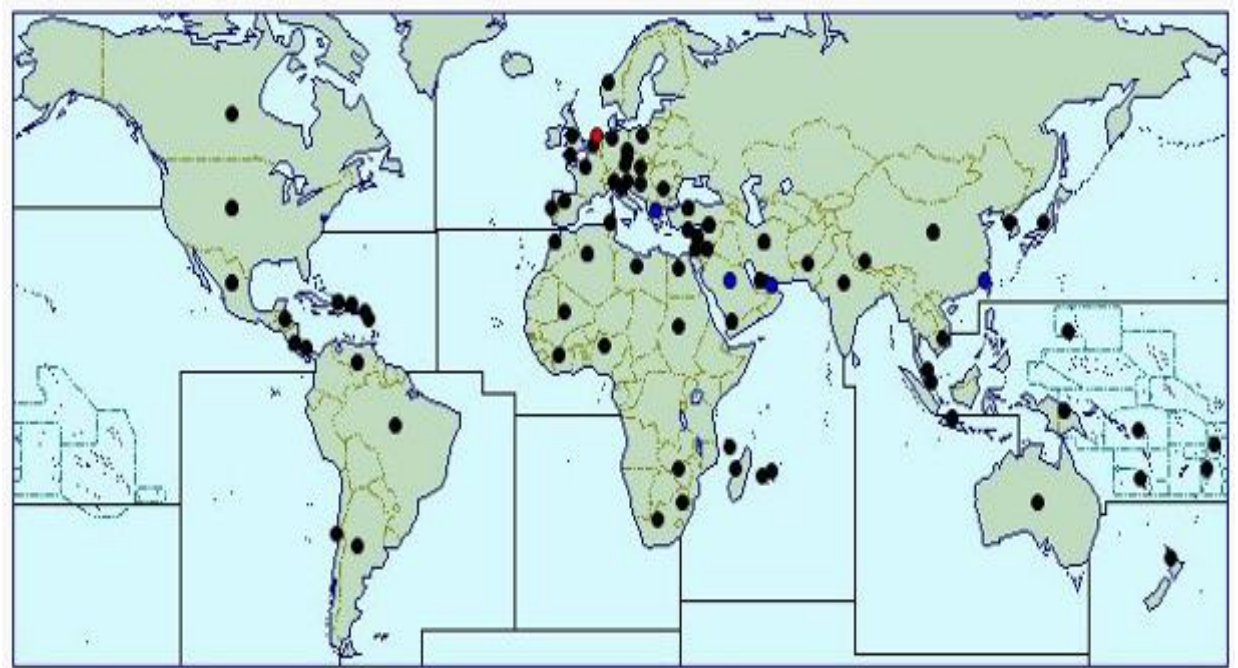


Рисунок 3.1 – Поширення ZYMV в світі [174]

ZYMV здатний уражувати практично всі види гарбузових рослин: цукіні (*Cucurbita pepo* L. cv. *caserta*), кабачки (*Cucurbita pepo* var. *giraumontia*), різні сорти гарбузів (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*), кавуни (*Citrullus lanatus*), огірок (*Cucumis sativus* L.)

В експериментальних умовах вірус також може уражувати представників родин *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Ranunculaceae*, *Scrophulariaceae* та *Solanaceae* [175, 176].

Симптоми включають сильну мозаїку, деформацію, пухирчастість та зменшення розмірів листкової пластинки. На плодах гарбузів, цукіні, кабачків, кавунів і огірків ZYMV спричинює плямистість, нерівномірне забарвлення, бугристість, яка є маркерним симптомом ZYMV. На інфікованих плодах дині спостерігається поверхнева сіточка. На плодах

дині і та кавуна часто спостерігаються повздовжні або радіальні щілини. Інколи вони також утворюються і на плодах інших гарбузових рослин. Уражені плоди мають тонку шкірочку. Уражені рослини продукують менше насіння, інколи воно деформоване.

Прояв симптомів залежить від умов навколишнього середовища. При +25°C в цукіні розвивались слабші симптоми мозаїки та плямистості. При +25-35°C симптоми більш сильні, переважають деформації листків та бугристість плодів [175].

ZYMV часто зустрічається у змішаній інфекції з вірусом мозаїки кавуна – 2, а також рідше з вірусом огіркової мозаїки [177, 178].

Вірус мозаїки кавуна – 2 та ZYMV часто співіснують в однакових популяціях гарбузових культур та мають однакових переносників. Саме тому змішані інфекції цих двох вірусів є надзвичайно частими [179]. Коінфекція була виявлена як на культурних рослинах, так і на дикорослих видах. При цьому реплікація ZYMV відбувається на тому ж рівні за умови змішаної інфекції. У той же час, штами вірусу мозаїки кавуна – 2 накопичуються менше за присутності ZYMV. ZYMV стимулює зміну кольору листків та виділення летючих речовин для приваблення попелиць. Не зважаючи на знижені титри вірусу мозаїки кавуна – 2 в рослині, він не втрачає здатності передаватись за допомогою попелиць. Загалом, змішана інфекція вірусу мозаїки кавуна – 2 та вірусу жовтої мозаїки цукіні не має сильного синергетичного ефекту на вірулентність обох партнерів [177].

Коінфекція ZYMV та вірусу огіркової мозаїки спостерігається значно рідше, але наслідки від спільного інфікування рослини проявляться у синергетичному ефекті на прояв симптомів, накопичення обох вірусів до вищих титрів у рослині [178]. У результаті спостерігаються більші втрати врожаю, ніж при моноінфекції.

Для передачі ZYMV від рослини до рослини потребує живих рослин, віріони не здатні зберігати життєздатність і передаватись через ґрунт і відмерлі рослини. Головним джерелом розповсюдження ZYMV є

старі уражені гарбузові рослини, бур'яни і самовисівні рослини, які зазвичай ростуть між рядами сільськогосподарських культур, біля заборів і забезпечують виживання вірусу між сезонами [180]. У Флориді важливим резервуаром є дикорослий повзучий огірок *Melothria pendula* з родини Гарбузових.

Вірус з рослини на рослину поширюється за допомогою різних видів попелиць: переважно *Aphis gossypii*, *Aphis citricola*, *Macrosiphum euphorbiae* та *Myzus persicae*. Усього 26 видів попелиці можуть переносити ZYMV [181]. Вектори переносять вірус неперсистентно. Попелиці здатні утримувати вірус на своєму стилеті протягом короткого періоду часу, і якщо вона не знаходить за цей час сприятливої рослини, то інфекційність вірусу втрачається. Проте деяким видам попелиць цього часу достатньо, щоб облетіти велику кількість рослин у пошуках відповідної рослини для колонізації і інфікувати їх вірусом.

Ефективність передачі варіюється в залежності від виду попелиць. Хоча точний механізм передачі/взаємодії комаха – вірус – рослина є досі не зовсім зрозумілим, було відомо протягом майже 40 років, що два вірусні білки (CP і HC-Pro) мають важливе значення для цих процесів. Передача ZYMV та інших потівірусів може відбуватися з гетерологічним HC-Pro, що може вказувати на консервативні потівірусні області в CP і HC-Pro, які пов'язані з перенесенням попелицями [182].

Крім того, змішана інфекція двох ізолятів ZYMV (інфекційних і неінфекційних) призвела до втрати передачі через 4-6 пасажів на гарбузах, що може вказувати на переваги NAT штамів (віріони стабільні, краще здатні до реплікації та/або руху) у порівнянні з AT штамом. ZYMV-NAT відображає значно більш високий вірусний титр, ніж AT штам [183]. Ще два ізоляти, що погано передаються попелицями HC-Pro (природні мутанти) були охарактеризовані, окрім CP-мутантів, що не передаються попелицями (ZYMV-NAT). У першого мутанта ZYMV зміни відбулися на N-кінці HC-Pro, тобто відбулася заміна амінокислоти Lis на Glu в KLSC

мотиві. За збігом, та ж мутація була виявлена у Potato virus Y, що не передається попелицями. У другого ізолята ZYMV точкова мутація була виявлена на С кінці HC-Pro, в консервативному PAK мотиві. Заміна Pro або Thr в PAK мотиві на Ala перешкоджає передачі попелицями.

Два мотиви передачі попелицями (ELSC і PAK) розташовані в різних регіонах HC-Pro, в N- і С-кінцях, відповідно. Було висловлено припущення, що механізм передачі попелицями ZYMV через HC-Pro можна розділити на дві різні взаємодії: один з DAG мотивом на N-кінці CP через PAK мотив, і другий-між HC-Pro і частини стилета попелиць через KITS/KLSC мотиви у ZYMV і Y вірусу картоплі. Ця теорія була підтверджена використанням рекомбінантних ZYMV.

Проте передача лише за допомогою попелиць не змогла б забезпечити таке широке розповсюдження даного вірусу, адже на попелиці вірус здатний зберегти ефективність максимум до 5 год при температурі 21°C [184]. Саме тому можна зробити висновок, що розповсюдження на далекі відстані пов'язане зі здатністю цього вірусу передаватись за допомогою насіння. Вперше здатність передаватись за допомогою насіння була виявлена в 2001 році на гарбузах [185].

Частота передачі вірусу за допомогою насіння варіює в межах 0 до 18.9% [186]. Такий діапазон пов'язаний з використання різних методів детекції вірусних антигенів та використання різних видів рослин.

Деякі з повідомлених варіацій в оцінці передачі насінням ZYMV, безсумнівно, є наслідком відмінностей у методах детекції. Наприклад, за допомогою ІФА виявили, що 18% (246 з 1,299) саджанців *C. pepo* були заражені ZYMV [187]. Аналогічно, використовуючи DAS-ELISA спостерігали передачу ZYMV насінням у 3,5% *C. maxima* [188]. Проте, їх результати слід інтерпретувати з обережністю, оскільки вони також спостерігали 2% передачі ZYMV в їх контролі.

Використовуючи DAS-ELISA, було виявлено ZYMV у 2 з 1000 безсимптомних *Cucumis sativus* L. (огірок), *C. pepo* L. і *C. maxima*, які

виросли з насіння заражених рослин, в той час як ZYMV був виявлений в 1.4% (15 з 1,031) саджанців *C. pero* з допомогою суміщення обох DAS-ELISA та ЗТ-ПЛР [188]. Визначення швидкості передачі ZYMV насінням має фундаментальне значення для розуміння епідеміології цього вірусу.

Також ZYMV поширюється контактним шляхом через взуття, обладнання й механічні ушкодження.

Тяжкість симптомів та масштаби втрати врожаю залежать від штаму вірусу та сорту рослини-хазяїна, а також часу інфікування. Якщо гарбузові рослини інфікуються рано (перед цвітінням), то втрати врожаю можуть досягати 100%. Якщо ураження відбулось до появи плодів, або саме під час їх дозрівання, то у більшості випадків вони втрачають свій товарний вигляд.

Для мінімізації втрат врожаю через епіфітотії ZYMV можна використовувати наступні стратегії боротьби з даною вірусною інфекцією:

- Стійкі рослини

Виготовляються шляхом внесення генів стійкості від інших видів гарбузових рослин. Виявлено стійкі сорти огірку (*Cucumis sativus L.*) у Китаї, дині (*Cucumis melo L.*) в Індії, *Cucurbita ecuadorensis L.* та *Cucurbita moschata L.* у Нігерії [189]. Всі комерційні сорти кавуна (*Citrullus lanatus L.*) є сприятливими до ZYMV, але стійкість була виявлена в *Citrullus colocynthis L.* з Нігерії. Деякі сорти Зімбабве також характеризуються високою стійкістю до ZYMV.

Стійкість таких рослин обмежена, оскільки зазвичай вона штам-специфічна, проте у комбінації з іншими методами можна досягти хороших результатів [190, 191].

Кращого результату можна досягти при внесенні капсидного білку в геном рослини. Наявні комерційні сорти дині і огірка з цим типом стійкості до ZYMV.

- Удосконалення стратегії вирощування рослин

Зменшити частоту інфікування рослин в агроценозах можна шляхом створення бар'єру з рослин, нечутливих до ZYMV навколо ділянки. Такі бар'єри із різнотрав'я запобігають потраплянню попелиці на ділянку і із сусідніх ділянок, на яких потенційно можуть рости рослини, інфіковані ZYMV [192, 193].

- Використання пасток для попелиць та інсектицидів

При використанні пасток для попелиць та інсектицидів не забезпечує 100% елімінацію інфікування ZYMV.

- Вилучення уражених рослин
- Вилучення бур'янів з агроценозів

Бур'яни є резервуарами ZYMV, при чому інфекція безсимптомна. Оскільки попелиць живиться як на бур'янах, так і на культурних рослинах, ZYMV легко передається і поширюється. Зокрема ZYMV здатний уражувати бур'ян з родини Гарбузових *Cucumis maderaspatanus*, який зазвичай росте поміж культур гарбузових, стелячись по землі та сягаючи 4 м в довжину [194].

- Дотримання санітарно-гігієнічних норм.

Розуміння основ динаміки популяцій вірусів овочевих культур є основою для розробки та впровадження стратегій контролю вірусних захворювань. Ці дані повинні враховуватись перед створенням та застосуванням стійких сортів або генетично модифікованих рослин на певній території [195, 196].

Узагальнюючи огляд літератури варто зазначити, що різноманіття вірусів овочевих культур, їх біологічні, молекулярні та епідеміологічні властивості вимагають встановлення штамової та групової приналежності, вивчення генетичної різноманітності та філогенетичних взаємозв'язків, що циркулюють у агроценозах ізолятів вірусів овочевих культур. Отриманні данні допоможуть запобігати розвитку епідемій, проникнення нових штамів на територію України та виникнення більш патогенних ізолятів.

РОЗДІЛ 4

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1 Віруси

Об'єктами досліджень були віруси овочевих культур, а саме:

- *Cucumber mosaic virus* – вірус огіркової мозаїки, *Bromoviridae*;
- *Tomato mosaic virus* – вірус мозаїки томату, *Virgaviridae*;
- *Tobacco mosaic virus* - вірус мозаїки тютюну, *Virgaviridae*;
- *Tobacco rattle virus* – вірус погрімковості тютюну, *Virgaviridae*;
- *Tomato ringspot virus* – вірус кільцевої плямистості томатів, *Secoviridae*;
- *Pepper mild mottle virus* – вірус слабкої крапчатості перцю, *Virgaviridae*;
- *Watermelon mosaic virus 2* – вірус мозаїки кавуна 2, *Potyviridae*;
- *Zucchini yellow mosaic virus* – вірус жовтої мозаїки цукіні, *Potyviridae*;
- *Cucumber green mottle mosaic virus* – вірус жовтої крапчастості мозаїки огірку, *Virgaviridae*;
- *Potato virus Y* – Y-вірус картоплі, *Potyviridae*;
- *Potato virus X* – X-вірус картоплі, *Alphaflexiviridae*;
- *Turnip mosaic virus* – вірус мозаїки турнепсу, *Potyviridae*.

4.2 Відбір зразків та підготовка рослинного матеріалу для проведення імуноферментного аналізу

Рослинні зразки овочевих культур відбирали шляхом візуального обстеження рослин на наявність вірусоподібних симптомів протягом вегетаційних сезонів 2003-2018 років в агроценозах різних областей України. Для досліджень використовували листки середнього або

верхнього ярусу [197]. Під час проведення досліджень було проаналізовано близько 1420 зразків. У роботі використовувались зразки овочевих культур таких як томати, перець, капуста, редис, огірки, кабачки, цукіні, гарбузи, дині та кавуни.

Зразки рослин гомогенізували у 0,1М фосфатно-сольовому буфері (рН 7,4) у співвідношенні 1:2 (m/v). Фосфатно-сольовий буфер містив 8 г NaCl, 0,2 г KH_2PO_4 , 2,9 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 г KCl на 1 л дистильованої води. Отриманий гомогенат центрифугували у режимі 5000 об/хв протягом 20хв при температурі 4° на центрифугі PC-6 для очистки матеріалу від рослинних компонентів [198, 199]. Відібраний надосад використовували для подальшої діагностики вірусних антигенів за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) [200, 201].

4.3 Підготовка насіння для детекції вірусних антигенів методом ІФА

Перед проведенням серологічних досліджень насіння культурних рослин перцю овочевого ставили на пророщування на 7 діб при кімнатній температурі (25°C). Для пророщування насіння використовували чашки Петрі та воду. Надалі пророщене насіння гомогенізували у ступках у фосфатному буфері (0.1М ФСБ, рН 7.4) у співвідношенні 1:4 (m/v). Отриманий гомогенат центрифугували у режимі 5000 об/хв протягом 20 хв при 4°C для очистки матеріалу від рослинних компонентів. Відібраний надосад був використаний для подальшої діагностики вірусних антигенів [202, 203].

4.4 Тестування передачі ізолятів насінням

Відбирали насіння рослин, які мали характерні симптоми ZYMV, що підтверджувалось методом імуноферментного аналізу, а також не були

уражені вірусом огіркової мозаїки і вірусом мозаїки кавуна-2. Загальна кількість насіння становила 100 штук.

Насіння висаджували у чисті горщики і вирощували в теплиці, вільній від членистоногих (в тому числі попелиць, основного переносника ZYMV). Потім рослини ретельно оглядались. Рослини з симптомами, типовими для ZYMV, відбирались і далі перевірялись на наявність ZYMV методом зворотнотранскрипційної полімеразноланцюгової реакції [204, 205].

4.5 Біотестування на рослинах-індикаторах

Для оцінки інфекційних властивостей вірусу використовували метод біологічного тестування на рослинах-індикаторах [198, 206]. Ураження рослин-індикаторів проводили механічно на стадії 4-6 справжніх листків за допомогою карборунду та скляної палички. 50 мкл вірусного препарату наносили на справжній листок і розтирали по поверхні листкової платинки. Рослину переносили у темне місце на одну добу, а потім продовжували спостереження при нормальних експериментальних умовах. Симптоми вірусних захворювань спостерігалися залежно від вірусу через 3-18 днів після інфікування.

4.6 Імуноферментний аналіз у модифікації «сендвіч»

Імуноферментний аналіз (ІФА) – це метод, який поєднує в собі високу специфічність імунологічних реакцій з чутливою каталітичною дією ферментів.

У проведеному дослідженні використовувався метод ELISA у модифікації «сендвіч». Ця модифікація широко розповсюджена завдяки простоті, високій специфічності й чутливості. Відповідно до схеми даного

варіанта твердофазного ІФА антитіла, які абсорбують на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком, який містить антигени.

Після відмивання в лунки вносять мічені ферментом антитіла до того ж антигена та відмивають від кон'югатів фермент-антитіло, які не зв'язувалися з іммобілізованим антигеном. Потім додають субстрат і фіксують розвиток кольорової реакції [207]. Постановку ІФА проводили у 96-лункових полістиролових планшетах «Labsystem» відповідно до рекомендацій виробника тест-систем Loewe (Німеччина).

Комерційні антитіла наносили в карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9.6) у розведенні 1:200. Карбонат-бікарбонатний буфер необхідний для сенсibiliзації, містить 0,015 М Na_2CO_3 і 0,035 М NaHCO_3 . Інкубували ніч при $+4^\circ\text{C}$. Відмивали 3 рази по 5 хв у буфері відмивки (рН 7.2-7.4, фосфатно-сольовий буфер з Tween-20 (0,2%)).

Зразки наносили у буфері для антигену. Були використані стандартні комерційні позитивні контролі. У якості негативного контролю використовували здоровий сік рослин. Інкубували ніч при $+4^\circ\text{C}$ [208].

Далі наносили антитіла, кон'юговані з лужною фосфатазою, у буфері для антитіл (2% полівінілпіролідона (ПВП), 0,2% молока, 0,2% tween-20 довести до 1 л PBS). Відмивали 3 рази по 5 хв у буфері відмивки. Інкубували дві год при $+37^\circ\text{C}$. Знову відмивали 3 рази по 5 хв у буфері відмивки. Надалі наносили субстрат для лужної фосфатази (нітрофенілфосфат у концентрації 1мкл/мл) у субстратному буфері (рН 9.6), який містить 97 мл диетаноламіна на 1л дистильованої води, доведений до необхідного рН за допомогою HCl . Інкубували 1 год при $+37^\circ\text{C}$ [207, 208, 209, 210].

Результати реєстрували на рідері Thermo Labsystems Odis MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм.

4.7 Непрямий імуноферментний аналіз

Аналіз проводять на полістиролових планшетах. На першому етапі наносили АГ на карбонатному буфері рН 9,6 в концентрації 1-5мкг/мл, здоровий сік рослини в розведенні 1:4 в якості негативного контролю та інкубували протягом ночі при +4°C. Відмивали 3 рази по 5 хв буфером відмивки (0,1М PBS + tween-20, рН7,4). На другому етапі проводили блокування 1% знежиреним молоком на 0,1М PBS, рН 7,4 та інкубували протягом 2 год за температури 37°C. Відмивали 3 рази по 5 хв буфером відмивки (0,1М PBS + tween-20, рН7,4). Далі наносили АТ1 на буфері для розведення АТ, рН 7,4 (1% знежирене молоко + 0,1М PBS + 0,05% tween-20, рН7,4). Інкубували 2 год при температурі 37°C. Знову відмивали 3 рази по 5 хв буфером відмивки (0,1М PBS + tween-20, рН7,4). Наступним етапом є нанесення АТ2 на буфері для розведення АТ. Як антивидові АТ використовують антикролячі АТ, кон'юговані лужною фосфатазою або пероксидазою хрону. Інкубували 2 год при температурі 37°C. Відмивали 3 рази по 5 хв буфером відмивки (0,1М PBS + tween-20, рН7,4) і 1 раз 0,1М PBS. На останньому етапі вносили субстратний буфер для лужної фосфатази (пероксидази хрону) з хромогеном. Субстратний буфер готували наступним шляхом: 97 мл діетаноламіну доводили до 1л дистильованою водою та доводили розчином концентрованої НСІ до рН 9,8. Як субстрат і хромоген використовували N-n-нітрофенілфосфат, С=1мл/мг. Реакцію зупиняли додаванням 3М NaOH. Результати реєстрували на рідері при довжинах хвиль 405/630 нм [207, 2011].

4.8 Приготування препаратів для електронної мікроскопії

Знежирене скло занурювали на 20-30с в 2% розчин формвару в хлороформі. Витримали у парах хлороформу 20 с. Після цього висушили плівку й обрізали по периметру лезом. Опустили скельце під кутом 45° у

воду, отримали плівку й на її поверхню виклали сіточки. Потім сіточки з плівками були зняті з дистильованої води за допомогою фільтрувального паперу та висушені в чашці Петрі [212, 213].

Для виготовлення препаратів попередньо виготовлену сіточку з плівкою витримували протягом 5 хв на каплі з вірусомісною суспензією. Залишки суспензії відбирали фільтрувальним папером, і переносили сіточку на краплину фосфатно-сольового буферу і залишали на 2 хв. Видаляли залишки рідини, і переносили на краплину дистильованої води і витримували протягом 1 хв. Після цього залишки рідини відбирали фільтрувальним папером, і контрастували препарат протягом 2 хв у 2% ураніл ацетаті. Залишки рідини видаляли, висушували препарат.

Для проведення досліджень використовували електронний мікроскоп JEM-1400.

4.9 Виділення тотальної РНК

Виділення РНК проводили з використанням наборів RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Великобританія), Invitrogen (США) та Promega (США) [214].

Виділення тотальної РНК за допомогою набору RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Великобританія) проводили згідно з рекомендаціями виробника [215].

Гомогенізували 100 мг листя в ступці, отриману суміш переносили в стерильний епендорф. Додавали 500 мкл RLT буферу та 5 мкл β -меркаптоетанолу, ставили на інкубацію протягом 2 хв на водяну баню при температурі 56°C. Основним компонентом RLT буферу є гуанідин тіоціанат. Отриманий лізат центрифугували при 13000 об/хв протягом 2 хв. 440 мкл надосаду переносили в пробірку та додавали 220 мкл етанолу (96-100%). Піпетували, переносили 650 мкл до RNeasy mini колонки та центрифугували при 10000 об/хв протягом 15 с. Додавали 700 мкл RW1

буферу (основний компонентом є спирт) до колонки та центрифугували знову при 10000 об/хв протягом 15 с. Перенесли до нової 2 мл пробірки і додавали 500 мкл RPE буферу. Центрифугували при 10000 об/хв протягом 15 с. Додали знову 500 мкл RPE буферу до колонки і центрифугували при 13000 об/хв протягом 1 хв. Колонку перенесли до нової пробірки, додавали 35 мкл стерильної води та центрифугували 10000 об/хв 1 хв. При цьому в епендорфі залишилась РНК. Всі етапи проводили при температурі +20 - +24°C [216].

Результати були перевірені за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі в буфері TBE.

4.10 Зворотньютранскрипційна полімеразна ланцюгова реакція в один крок

Зворотньютранскрипційна полімеразна ланцюгова реакція була здійснена з використанням набору QIAGEN One-step RT-PCR Kit з використанням Q-розчину згідно з рекомендаціями виробника (Qiagen, Велика Британія) [217].

У першому випадку до складу інкубаційної суміші входили наступні компоненти:

- 5-кратний Qiagen OneStep RT-PCR – 10мкл;
- суміш dNTP (містить 10 мМ кожного dNTP) – 2 мкл;
- 5-кратний Q-розчин – 10 мкл;
- прямий праймер – 2 мкл;
- зворотний праймер – 2 мкл;
- суміш фермента Qiagen OneStep RT-PCR – 2 мкл;
- матриця РНК – 6 мкл;
- вода, вільна від РНК-аз – 16 мкл.

Умови ЗТ-ПЛР:

- 50°C – 30 хв (зворотна транскрипція; 1 цикл);

- 95°C – 15 хв (початкова стадія ПЛР, активація HotStarTaq ДНК полімерази; 1 цикл);
- 94°C – 30 с (денатурація, 30 циклів);
- 56°C – 30 с (відпал праймерів, 30 циклів) – для капсидного білка;
 - 59°C – 30 с – для білка руху;
 - 62°C – 30 с – для білка 2b;
- 72°C – 1 хв (елонгація ланцюга, 30 циклів);
- 72°C – 10 хв (фінальна елонгація, 1 цикл).

Були використані відомі з літературних даних праймери, специфічні до гену капсидного білка [218,219,220] (розмір продукту – 500 п.о), білка руху CMV (розмір продукту – 800 п.о) [221] та білка 2b (розмір продукту – 300 п.о) [221] CMV.

Праймери, які були використані в роботі:

Назва вірусу	Ділянка геному	Праймери	Продукт, по	Посилання
CMV	CP	CMV-F– 5'- TATGATAAGAAGCTTGTTCGCGCA-3'; CMV-R – 5'- TTT TAGCCGTAAGCTGGATGGACAACCC-3';	500	[218, 219]
CMV	MP	CMV-MP-F - 5'ATGGCTTTCCAAGGTACC3'; CMV-MP-R - 5'-ACCGTTAACCACCTGCG-3'	800	[220 221]
CMV	2b	CMV-2b-F - 5'- ATGGAATTGAACGCCGGAGGCGCAATG3' CMV-2b-R- 5'- TCAAAACACCCTC(T)CCGCCCACTCGTT3'	300	[221]
ToMV	CP	forward – CGGAAGGCCTAAACCAAAAAG; Tob-Uni1 primer – ATTTAAGTGGAGGGAAAAACACT	700(686)	[222]
PMMoV	CP	5'-TACTTCGGCGTTAGGCAATC3'(forward); 5'-GGAGTTGTAGCCCAGGTGAG-3'(reverse)	387	[223]
WMV-2	CP	•forward праймер – 5'GAATCAGTGTCTCTGCAATCAGG-3'; •reverse праймер – 5'ATTCACGTCCSTTGCAGTGTG-3'	825	[224, 225]
ZYMV	Nib/CP	forward праймер – 5'ATGTCGAGTATCACATTTCC3` reverse праймер–5` GGTTCATGTCCCACCAAGC3`	605	[226, 227, 228]

Постановка реакції (на один зразок для ідентифікації одного патогену) проводилася за рекомендацією виробника, а саме:

2xReachinmix – 12,5 мкл

Template RNA – 3 мкл

Sense primer – 1 мкл

Anti-sense primer – 1 мкл

SuperScript – 1 мкл

H₂O – 6,5 мкл

Додавання всіх реагентів в епандорф проводили на холоді.

Дана пара праймерів ампліфікує ділянку розміром 825 пар нуклеотидів.

Параметри реакції (температурний режим):

1 цикл 30 хв при 60 °C

1 цикл 2 хв при 94 °C

94 °C – 30 сек	} 35 циклів
63 °C – 30 сек	
68 °C – 1 хв	

Для детекції вірусу жовтої мозаїки цукіні використовували послідовність праймерів до ділянки капсидного білку :

forward праймер – 5` ATGTCGAGTATCACATTTCC3`

reverse праймер – 5` GGTTCATGTCCCACCAAGC3`

Постановка реакції (на один зразок для ідентифікації одного патогену) проводилася за рекомендацією виробника, а саме:

Template RNA – 3 мкл

Sense primer – 1 мкл

Anti-sense primer – 1 мкл

Revers laid Premium Reverse - 0,5 мкл

Preum Tag Grunmoster mix – 25 мкл

H₂O – 19,5 мкл

Дана пара праймерів ампліфікує ділянку розміром 605 пар нуклеотидів

Параметри реакції (температурний режим):

50 ⁰ C – 30 хв	} 35 циклів
95 ⁰ C – 1 хв	
95 ⁰ C – 30 сек	
55 ⁰ C – 30 сек	
72 ⁰ C – 1 хв	

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі з використанням стандартних маркерів Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas, Латвія).

4.11 Зворотньюотранскрипційна полімеразна ланцюгова реакція в два кроки

При постановці ЗТ-ПЛР у два етапи з використанням RevertAid RT Reverse Transcription Kit з Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США), спочатку була синтезована кДНК шляхом зворотньюотранскрипційної реакції. Для цього вносили у стерильну, вільну від нуклеаз пробірку:

- тотальну РНК (3 мкл);
- праймери, специфічні до гену капсидного білка (1 мкл);
- воду, оброблену DEPC (85 мкл).

Після цього обережно перемішували, осаджували краплі за допомогою центрифугування, інкубували суміш при 65⁰C протягом 5 хв, охолоджували на льоду, знову центрифугували і переносили на лід.

Додавали наступні компоненти у даному порядку:

- 5X Reaction Buffer (4 мкл);
- Суміш dNTP (2 мкл);
- RevertAid Reverse Transcriptase (1 мкл).

Обережно перемішували та осаджували краплі. Інкубували при 42 °С протягом 60 хв для здійснення зворотнотранскрипційної реакції. Закінчення реакції спричинювали нагріванням до 72°С за 10 хв.

Наступним етапом було проведення ПЛР з отриманою кДНК.

До складу суміші для ПЛР входили наступні компоненти:

- Отримана кДНК (3 мкл);
- Прямий праймер (1мкл);
- Зворотній праймер (1 мкл);
- Стерильна вода (7,5 мкл);
- DreamTaq Green DNA Polymerase (12,5 мкл).

Були використані наступні умови для ампліфікації:

- 95°С 1 хвилина (1 цикл);
- денатурація при 95°С 30 секунд (30 циклів);
- відпал праймерів при відповідній температурі 30 секунд (30 циклів):
 - 56°С для капсидного білка;
 - 59°С для білка руху;
 - 62°С для білка 2b;
- елонгація при 72°С 1 хвилина (30 циклів);
- 72°С 5 хвилин (1 цикл).

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі з використанням стандартних маркерів Gene Ruler 50bp або 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas, Латвія).

4.12 Горизонтальний електрофорез в агарозному гелі

Для аналізу ЗТ-ПЛР та розміру фрагментів провели електрофорез нуклеїнових кислот.

Електрофорез проводили в 1,5% агарозному гелі, який приготували на буфері TBE (Tris/Borate/EDTA): розчинили 300 мг агарози у 20 мл TBE, розплавляли в термостійкому стаканчику. Додали 10 мкл бромистого етидію для візуалізації нуклеїнових кислот в розплавлену агарозу. Зразки на гель наносили в 6-кратному буфері зразка.

В одну лунку додали 10 мкл зразку та 5 мкл буферу. Для маркерів 6 мкл маркеру та 3 мкл буфера зразка. Маркери 100 bp (Fermentas, США).

Після розділення під дією електричного поля за допомогою транслюмінатора візуалізували результати у ультрафіолетовому випромінюванні, за якого бромистий етидій флюоресціює помаранчевим світлом [229, 230].

4.13 Очищення продуктів ЗТ-ПЛР

Проводили горизонтальний електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР у 1,5% агарозному гелі. Після закінчення електрофорезу стерильним скальпелем вирізали відповідний фрагмент кДНК з гелю. Залишки агарози видаляли для мінімізації розміру фрагмента гелю.

Очищення продукту ЗТ-ПЛР від агарозного гелю проводили з використанням «mi-Gel Extraction Kit» (Thermo, США) за наступним протоколом:

1. Вирізали фрагмент ДНК з агарозного гелю з чистим, гострим скальпелем та помістили у стерильну мікроцентрифужну пробірку.
2. Додали 3 об'єми буферного QG до 1 об'єму гелю.
3. Інкубували за температури 50 ° C протягом 10 хв (або до повного розчинення гелю). Щоб допомогти розчинити гель, перемішували.
4. Після того, як гель розчинився повністю, перекона, що колір суміші жовтий (аналогічний буферу QG без розчиненої агарози).

5. До зразка додали 1 об'єм ізопропанолу та перемішали. (Наприклад, якщо шматок агарозного гелю становить 100 мг, додати 100мкл ізопропанолу).
6. Розташували QIAquick колонку (spin column) в пробірці (collection tube) 2 мл.
7. Щоб зв'язати ДНК, нанесли зразок до колонки QIAquick та центрифугували 1 хв 10000xg.
8. Вилили рідину і помістили колонку назад у ту ж колекторну пробірку.
9. Додали 0,5 мл буферу QG до QIAquick колонки та центрифугували протягом 1 хв 10000xg. На цьому кроці видаляються усі залишки агарози. Це потрібно лише тоді, якщо ДНК використовується для секвенування, транскрипції *in vitro* або мікроін'єкції.
10. Для промивання, додали 0,75 мл буферу PEв QIAquick колонку та центрифугували 1хв 10000xg.
11. Вилили рідину і центрифугували колонку QIAquick ще 1 хв при 10000xg.
12. Помістити QIAquick колонку в чисту мікроцентрифужну пробірку 1,5 мл.
13. Для елюції ДНК, додали 50 мкл буфера EB (10 мМ Tris HCl, рН 8,5) або H₂O до центру мембрани QIAquick і центрифугували колонку протягом 1 хв з максимальною швидкістю (10000xg).

4.14 Сиквенування ДНК

Отримані очищені ампліфіковані фрагменти були сиквенувані на базі лабораторії Оксфордського університету (Оксфорд, Велика Британія). Сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на аналізаторі Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з використанням Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, USA).

4.15 Філогенетичний аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей

Пошук та вибірку необхідних послідовностей проводили за допомогою BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Матрицю даних для філогенетичного аналізу формували з отриманих нами сиквенсів, а також послідовностей, імпортованих з GenBank.

Для філогенетичного аналізу застосовували програмні пакети MEGA [231, 232]. Вирівнювання послідовностей здійснювали за допомогою програми Clustal W [233, 234]. Для побудови філогенетичних дерев користувалися методами максимальної правдоподібності (ML) [235] та зв'язування найближчих сусідів (NJ) [236]. з використанням оптимальних моделей (найчастіше – моделі Джукса-Кантора, яка є найбільш оптимальною для таких досліджень) [237]. Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп-тест з 1000 реплікаціями [238]. Для асемблювання та багаторазового вирівнювання послідовностей генів вірусів застосовували програмний пакет BioEdit v.7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Для рекомбінаційного аналізу використовувався програмний пакет RDP4 та вбудовані в нього алгоритми RDP, GENECONV, BOOTSCAN, MAHCN, CHIMAERA та SISCAN [239, 240, 241, 242, 243, 244, 245]. Достовірними вважалися такі рекомбінаційні події, які були підтверджені принаймні 3 алгоритмами.

4.16 Статистична обробка результатів

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel з врахуванням t критерію Ст'юдента [246] та за допомогою вбудованих алгоритмів відповідних програмних пакетів [232, 239-245].

Для обрахунку позитивних результатів ІФА використовували середнє арифметичне та середнє квадратичне відхилення, за позитивний результат приймали значення оптичної густини, яке більше ніж на два стандартних відхилення перевищувало середнє значення оптичної густини негативного контролю.

Для перевірки достовірності побудови дерев філогенетичних відносин ізолятів вірусів застосовували бутстреп аналіз (1000 реплікацій).

РОЗДІЛ 5

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ У ЗРАЗКАХ РОСЛИН ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР

5.1 Різноманіття вірусоподібних симптомів на рослинах овочевих культур

Метод виявлення та відбору рослинного матеріалу за зовнішніми симптомами є найпростішим і найпоширенішим методом. Він заснований на здатності багатьох вірусів викликати на рослинах характерні симптоми ураження, які проявляються у вигляді смуг на листових пластинках, їх деформацій, вкорочення стебел та пагонів, зміні забарвлення листя, появи некротичних плям на листках та інші.

Рослинні зразки овочевих культур відбирали шляхом візуального обстеження рослин на наявність вірусоподібних симптомів протягом вегетаційних сезонів 2003-2018 років в агроценозах різних 13 областей України (Житомирської, Харківської, Полтавської, Київської, Запорізької, Херсонської, Львівської, Вінницької, Черкаської, Чернігівської, Івано-Франківської, Одеської, Кіровоградської обл.) та Автономної Республіки Крим протягом вегетаційних сезонів 2003-2018 років (рис. 5.1).

На рослинах родини *Cucurbitaceae* асимптоми захворювання спостерігали через місяць – півтора після сівби, у період бутонізації. Перші ознаки хвороби проявлялися на молодих листках у вигляді жовтуватих плям та просвітління тканини вздовж головних жилок. У подальшому на рослинах розвивалися симптоми жовтої або зеленої системної мозаїки, з'являлася деформація листків та плодів.

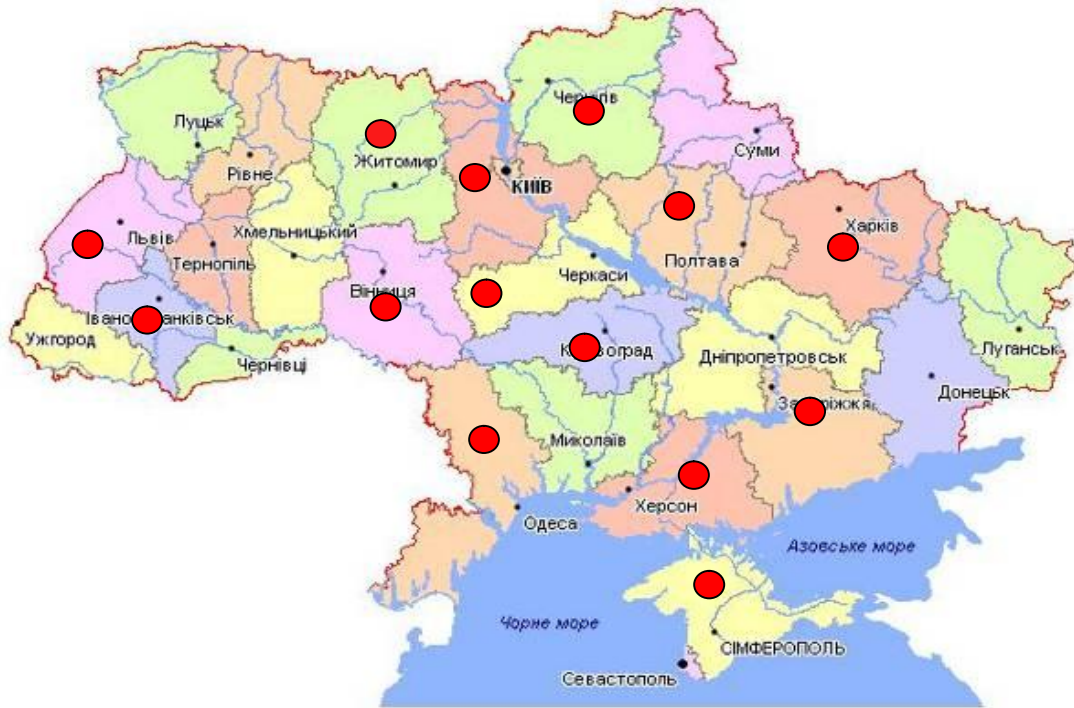


Рисунок 5.1 – Карта регіонів відбору зразків рослин для аналізу

На листових пластинках спостерігались різні типи мозаїк як за забарвленням (світло-зелена та жовто-зелена), так і за розміщенням (прижилкова та міжжилкова мозаїка), також спостерігались хлорози та деформації (рис.5.2).

На листках рослин часто спостерігаються симптоми мозаїки, пухирчасті здуття, появу смуг вздовж жилок та різноманітні деформації аж до нитковидності листової пластинки. На вірусінфікованих плодах рослин спостерігається яскраво виражена деколоризація і слабка деформація (рис.5.2). Зазвичай уражені рослини продукують меншу кількість насіння, інколи воно деформоване, а утворені плоди мають тонку шкірочку.



А-плямистість на плодах



Б-деформація плодів



В-мозаїка та деформація листків



Г-темно-зелена прижилкова мозаїка

Рисунок 5.2 - Візуальна детекція симптомів вірусного ураження на рослинах цукіні та кабачків

Бронзове забарвлення листків, яке характерне для вірусу плямистого в'янення томатів, не зустрічалось. На плодах спостерігались жовті плями неправильної форми або у вигляді кілець (рис.5.3).

На рослинах помідору звичайного *Lycopersicum esculentum* фіксували наявність світло-зеленої мозаїки.

У деяких випадках хворі рослини значно відставали у рості та втрачали квітконос у період бутонізації.



А-прижилкова мозаїка
листів



Б-світло-зелена мозаїка
листіків

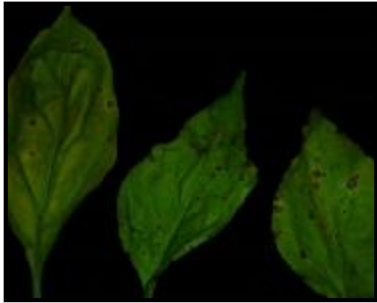


В-жовта плямистість плодів

Рисунок 5.3 - Візуальна детекція симптомів вірусного ураження на рослинах томатів

Системна інфекція на рослинах перцю овочевого *Capsicum annuum* більшості сортів була подібною. На листовій пластинці вона проявлялася у вигляді пухирчатого темно-зеленого здуття, на плодах – некротичні плями (рис. 5.4).

На вірусінфікованих рослинах перцю розвивалися симптоми жовтої кільцевої мозаїки та жовто-зеленої листкової мозаїки, плоди при цьому деформувалися; також спостерігалася деформація листкової пластинки з засиханням країв листка та скручуванням листкової пластинки.



А-некрози на листках



Б-мозаїка, пухирчастість



В-жовта мозаїка листків



Г-некрози на плодах



Д-деформація плодів

Рисунок 5.4 - Візуальна детекція симптомів вірусного ураження на рослинах перцю

Хрестоцвітні рослини (капуста, червоний редис, гірчиця та ін.) аналізували візуально, відбирали рослини із симптомами, які включали мозаїку, плямистість, набухання листкових жилок та/чи деформацію листків (рис 5.5).



А-світло-зелена мозаїка
листіків (редис)



Б-світло-зелена мозаїка
листіків (гірчиця)



В-зморшкуватість, набухання жилок
листіків (капуста)



Г-набухання жилок
листіків (капуста)

Рисунок 5.5 - Візуальна детекція симптомів вірусного ураження на капустяних рослинах

Симптоми, що проявлялися на рослинах різних сортів були подібними до симптомів, які викликають віруси, що уражують овочеві культури. До таких вірусів належить вірус огіркової мозаїки, вірус слабкої крапчатості перцю, вірус погремковості тютюну, вірус мозаїки томату, вірус тютюнової мозаїки, вірус кільцевої плямистості тютюну, вірус кільцевої плямистості томату та багато інших. Характерною особливістю даних вірусів є їх вузька спеціалізація по відношенню до овочевих культур [251-253]. Але подібність прояву симптомів на рослинах не дозволяє чітко

визначити вид вірусу. Отож, подальші дослідження були спрямовані на встановлення виду вірусів, використовуючи додаткові методи.

5.2 Видовий спектр вірусів ідентифікованих у зразках рослин овочевих культур за допомогою імуноферментного аналізу

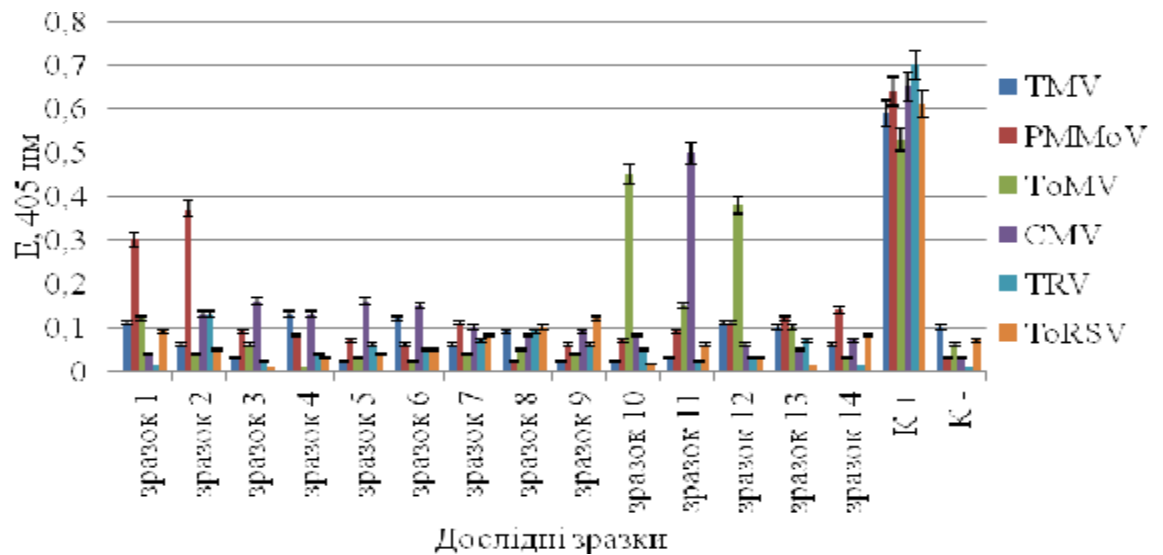
5.2.1. Аналіз рослин овочевих культур родини *Solanaceae* на наявність вірусних антигенів

Візуальне спостереження зовнішніх симптомів ураження є досить ненадійним методом виявлення та діагностики вірусних інфекцій, оскільки прояв симптомів вірусного ураження залежить, головним чином, від взаємодії вірусу та хазяїна. Крім того, досить часто штами одного й того ж вірусу здатні викликати різні симптоми на рослинах одного виду, змінюючи при цьому зовнішні прояви від надчутливості до безсимптомного носійства вірусу. На прояв симптомів, крім того, впливають умови вирощування рослин і наявність супутньої інфекції. У деяких випадках лише сумісне інфікування рослин перцю може призводити до прояву таких симптомів інфекції як мозаїка та плямистість [247, 248, 249, 250]. Тому діагноз “вірусна інфекція” повинен бути підтверджений специфічними методами діагностики вірусних інфекцій та ідентифікацією вірусів, зокрема за допомогою серологічних реакцій. Перевагою серологічних реакцій є надійність та швидкість отримання результату [208, 209].

За допомогою ІФА у модифікації «сендвіч» з тест-системами виробництва Loewe (Німеччина) було проведено ідентифікацію антигенів вірусів у відібраних зразках *L. esculentum*. У результаті нами було

встановлено наявність антигенів шести вірусів, на наявність яких було проведено тестування (рис 5.6- 5.10).

Проаналізовано зразки рослин *Capsicum annuum* та *Lycopersicon esculentum* з Полтавської області на предмет їх ураження патогенами вірусної етіології (рис. 5.6).



А

Б

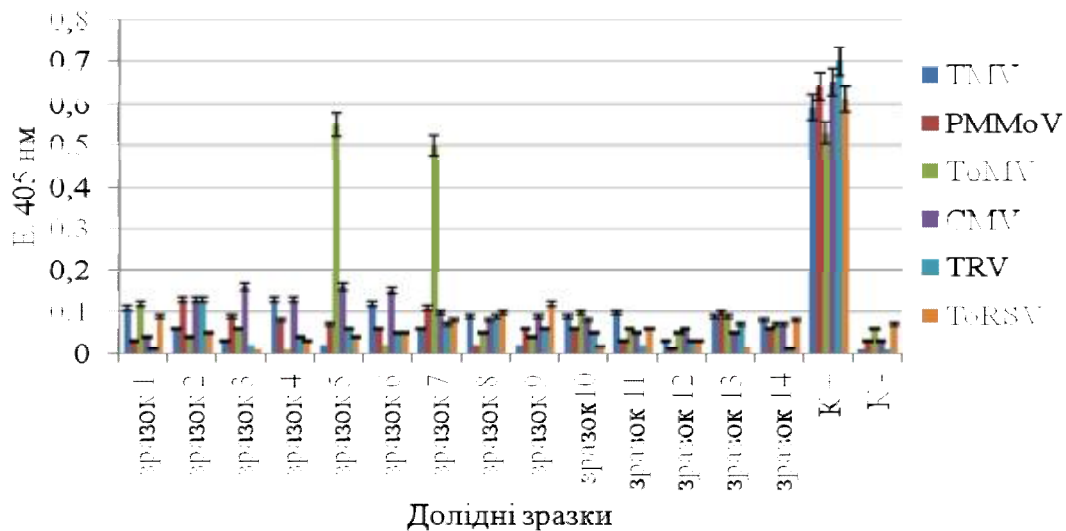


Рисунок 5.6 - Результати тестування зразків *Capsicum annuum* (А) та *Lycopersicon esculentum* (Б) ІФА у модифікації “сендвіч” на наявність вірусних антигенів (Полтавська область)

Серед дослідних зразків помідору звичайного антигени вірусу мозаїки томатів були детектовані у зразках *Capsicum annuum* № 10 та №12, , крім того зразки №1 та №2 містили антигени РММoV, а також у зразках *Lycopersicon esculentum* №5 і №7.

Проаналізовано зразки рослин *Lycopersicon esculentum* з Житомирської області на предмет їх ураження патогенами вірусної етіології (рис. 5.7).

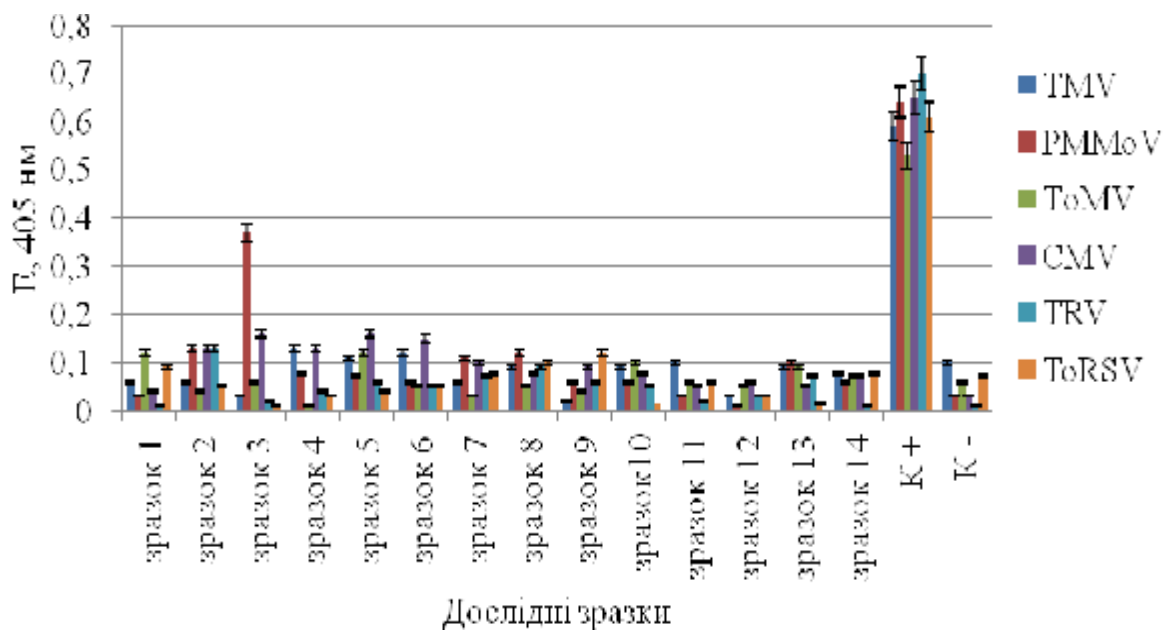
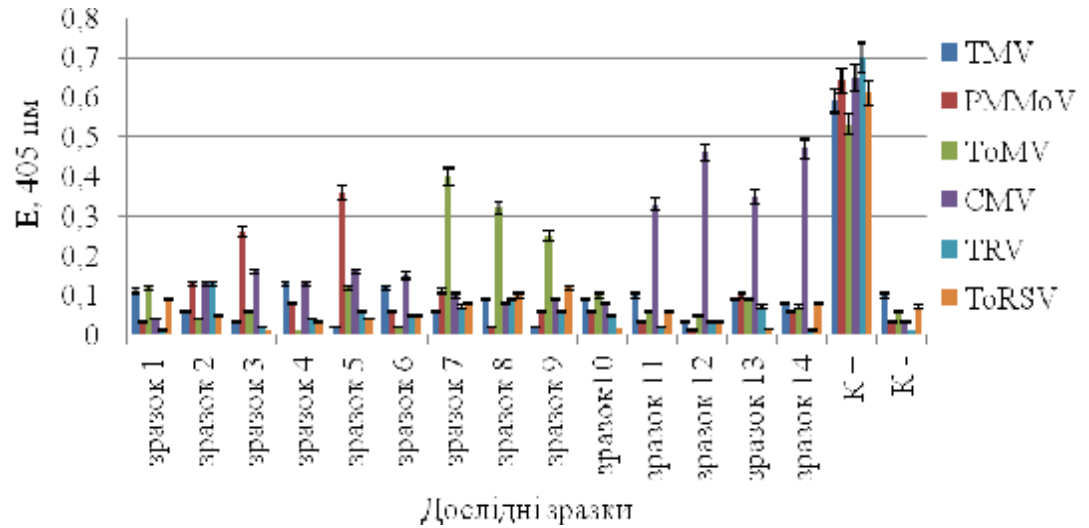


Рисунок 5.7 - Результати тестування сортів помідору звичайного методом ІФА у модифікації “сендвіч” на наявність вірусних антигенів (Житомирська область)

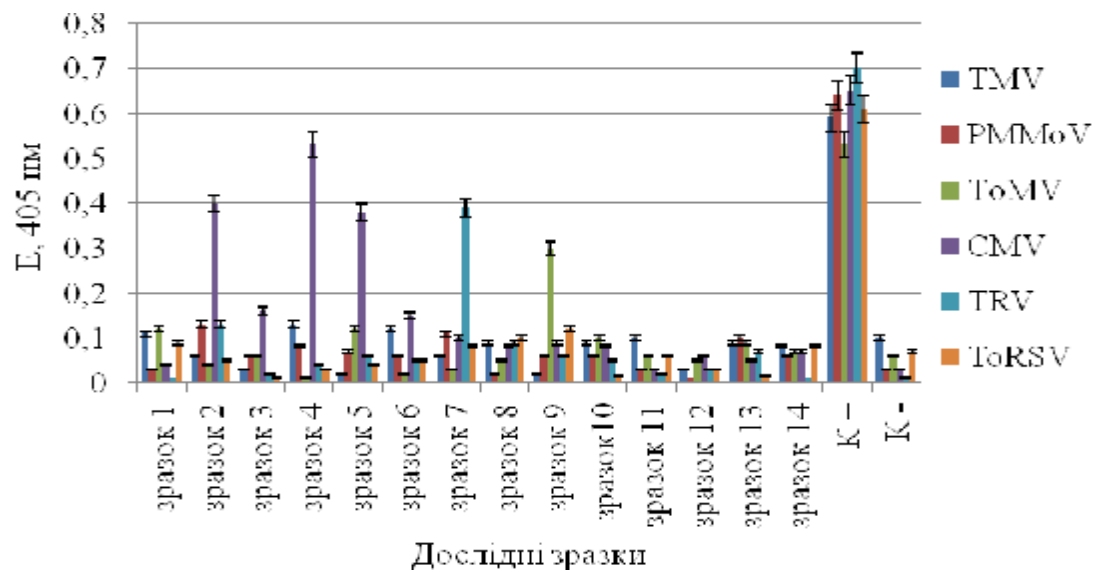
Серед дослідних зразків помідору звичайного антигени вірусу слабкої крачатості перцю були детектовані у зразку під номером 3.

При діагностиці зразків *Capsicum annuum* на наявність вірусних антигенів у Житомирській області жодного інфікованого зразка не було виявлено.

Проаналізовано зразки рослин *Capsicum annuum* та *Lycopersicon esculentum* з Київської області на предмет їх ураження патогенами вірусної етіології (рис. 5.8).



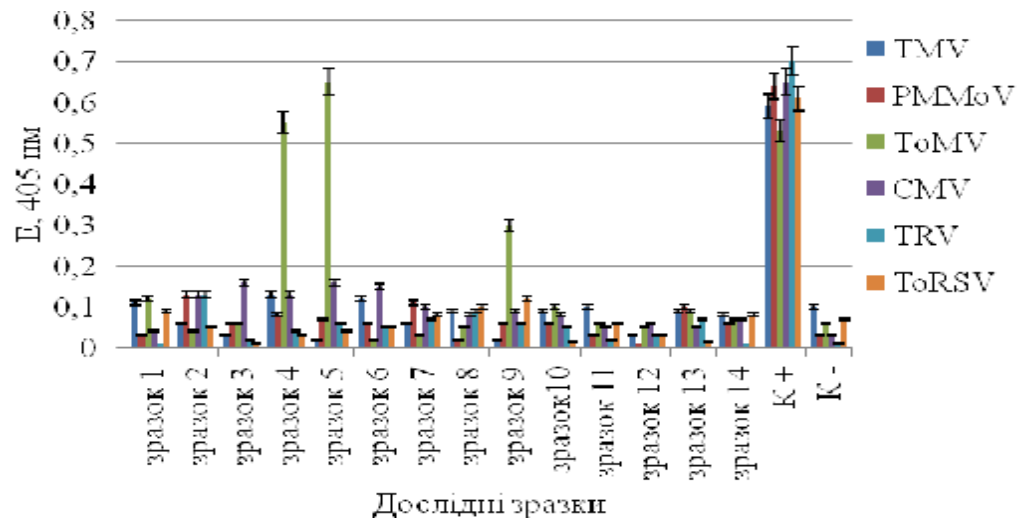
А



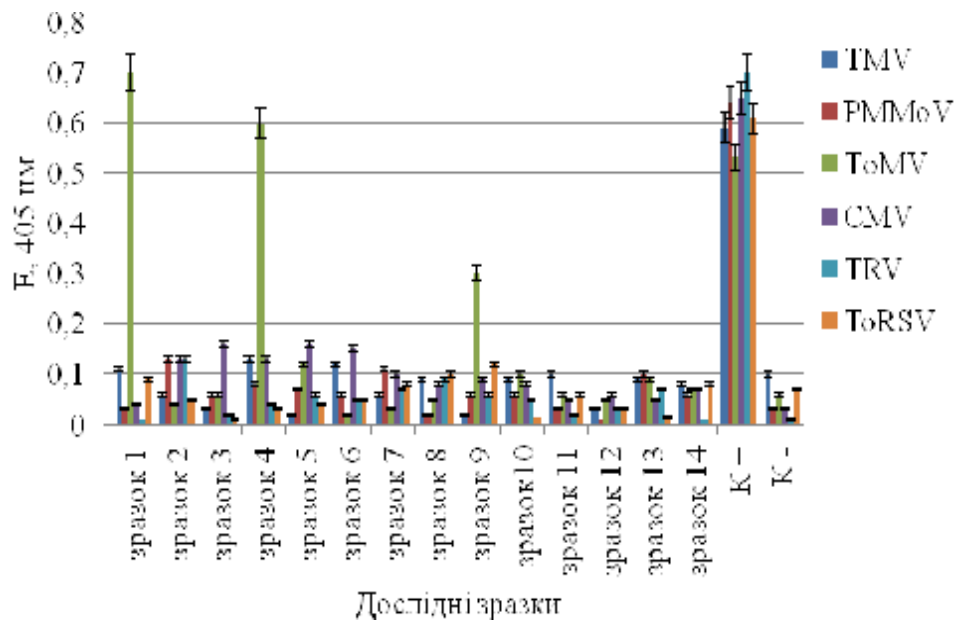
Б

Рисунок 5.8 - Результати тестування зразків *Capsicum annuum* (А) та *Lycopersicon esculentum* (Б) ІФА у модифікації “сендвіч” на наявність вірусних антигенів (Київська область)

Серед дослідних зразків перцю овочевого антигени вірусу слабкої крачатості перцю були детектовані у зразках №3 та №5, антигени вірусу мозаїки томату – у зразках №7, №8 та №9, антигени вірусу огіркової мозаїки – у зразках №11, №12, №13 та №14.



А



Б

Рисунок 5.9 - Результати тестування зразків *Capsicum annuum* (А) та *Lycopersicon esculentum* (Б) ІФА у модифікації “сендвіч” на наявність вірусних антигенів (Вінницька область)

Серед дослідних зразків помідору звичайного антигени вірусу мозаїки томатів були детектовані у зразку під номером №9, антигени вірусу огіркової мозаїки – у №2, №4 та №5 зразку, антигени вірусу погремковості тютюну – у №7 зразку.

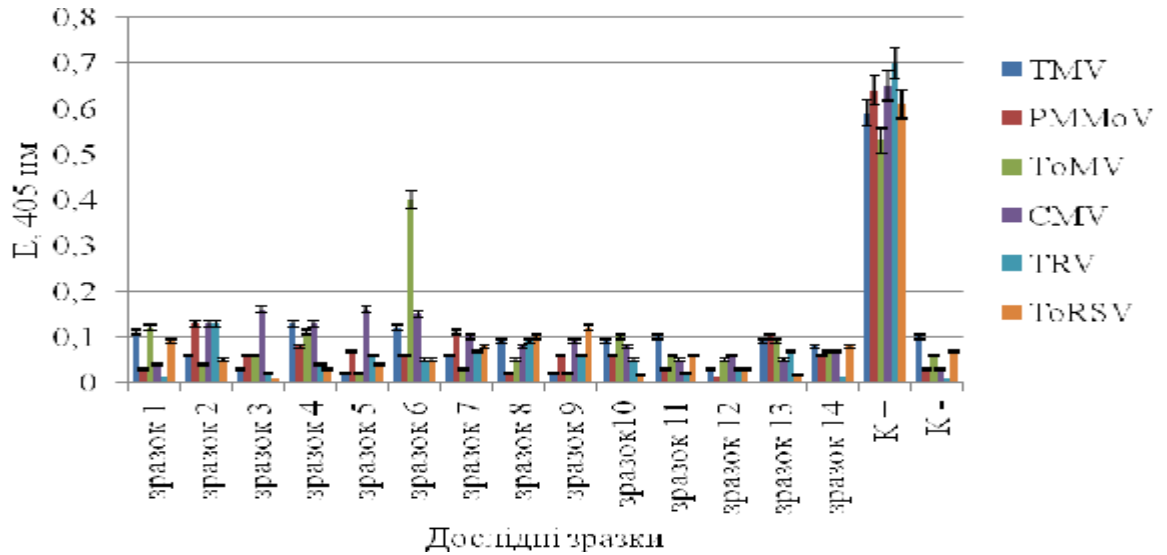
Проаналізовано зразки рослин *Capsicum annuum* та *Lycopersicon esculentum* з Вінницької області на предмет їх ураження патогенами вірусної етіології (рис. 5.9). Серед дослідних зразків перцю овочевого антигени вірусу мозаїки томатів були детектовані у зразках №4 та №5. Серед дослідних зразків помідору звичайного антигени вірусу мозаїки томатів були детектовані у зразках №1, №4 та №9 (рис. 5.9).

Аналогічно проводили детекцію вірусних антигенів у зразках рослин *Capsicum annuum* та *Lycopersicon esculentum* з АР Крим (рис. 5.10).

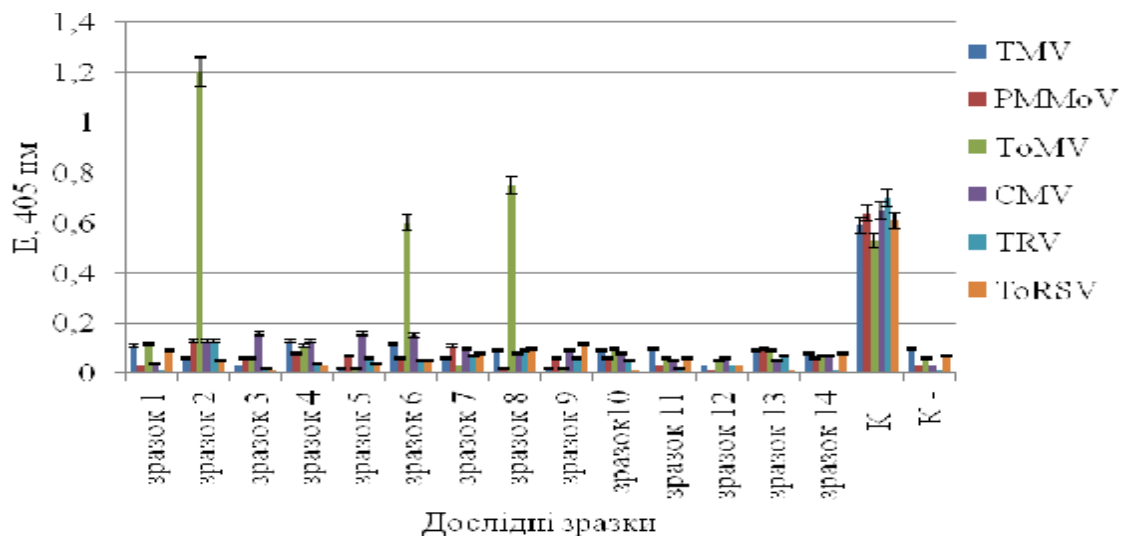
Серед дослідних зразків перцю овочевого антигени вірусу мозаїки томатів були детектовані у зразку під номером №6. Серед дослідних зразків помідору звичайного антигени вірусу мозаїки томатів були детектовані у зразках №2, №6 та №8.

Отримавши дані результати, можна визначити відсоток ураження зразків овочевих культур вірусними агентами відносно загальної кількості всіх зразків, які були задіяні в досліді.

Отже, у Полтавській області 14,3% досліджуваних зразків перцю овочевого уражено РММoV, 14,3% дослідних зразків помідору звичайного – ToMV та 7,1% досліджуваних зразків перцю овочевого - CMV. В Житомирській області 7,1% дослідних зразків *Lycopersicon esculentum* уражено РММoV. В Київській області 21,4% зразків *Capsicum annuum* контаміновані ToMV та 7,1% зразків помідору звичайного також уражені цим вірусом, 7,1% зразків рослин помідору звичайного – TRV, CMV контаміновано 35,7% зразків рослин перцю овочевого та 21,4% зразків рослин помідору звичайного.



А



Б

Рисунок 5.10 - Результати тестування зразків *Capsicum annuum* (А) та *Lycopersicon esculentum* (Б) ІФА у модифікації “сендвіч” на наявність вірусних антигенів (АР Крим)

У Вінницькій області детектовано 14,3% зразків рослин перцю овочевого, які уражені вірусом мозаїки томатів та 14,3% зразків рослин

помідору звичайного інфіковані аналогічним вірусом. В АР Крим 7,1% зразків перцю овочевого контаміновані ToMV та 21,4% зразків рослин помідору звичайного – ToMV.

Отже, найбільш контамінованими виявились зразки рослини *L. esculentum*, які містили антигени PVY, TRV, ToMV та РММoV.

Метод електронної мікроскопії було застосовано для прямого виявлення вірусів у зразках *Lycopersicon esculentum*, для визначення морфології та розмірів вірусних часток. При електронно-мікроскопічних дослідженнях зразків рослин *L. esculentum*, було виявлено паличкоподібні вірусні частки розміром $300 \pm 3 \times 19 \pm 3$ нм, що за літературними даними характерно для вірусів роду Tobamovirus [11] (рис. 5.11).

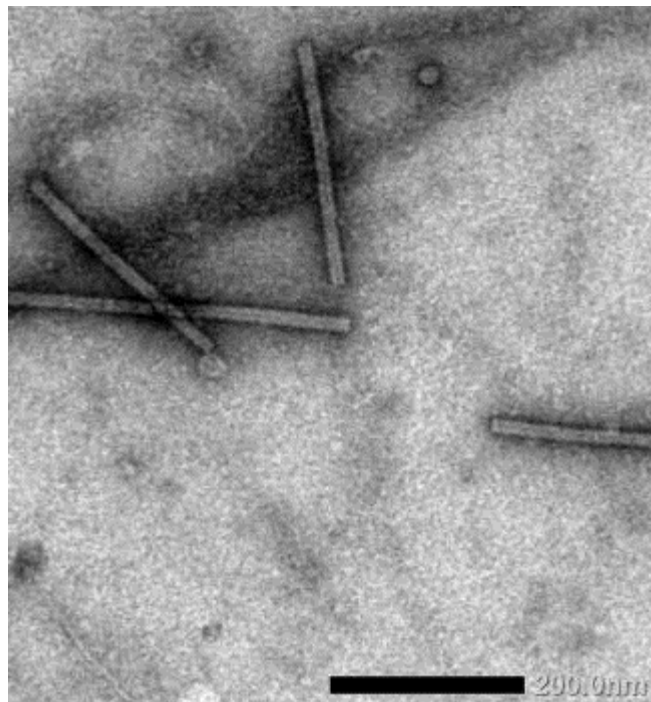


Рисунок 5.11 - Електронно-мікроскопічне зображення вірусу паличкоподібної форми виділеного із рослини *L. esculentum*

Отже, у ході досліджень нами встановлено, що рослини *Lycopersicum esculentum* були інфіковані РММoV, PVY, ToMV за результатами ІФА та ЕМ. При дослідженні вірусних хвороб *L. esculentum* здебільшого зустрічалась моноінфекція. Окрім імуноферментного аналізу було зроблена спроба відпрацювати метод детекції вірусних антигенів у великій кількості зразків, тобто в епідеміологічних дослідженнях, за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу [254].

5.2.2 Детекція *Cucumber mosaic virus* в агроценозах України

За літературними даними практично всі види овочевих культур з родини *Cucurbitaceae*, які використовуються людиною у сільському господарстві, є чутливими до ВОМ [255, 256, 257].

Антигени CMV були знайдені у зразках рослин з 8 областей України.

Частота трапляння рослин, уражених вірусом огіркової мозаїки, у 2013-2018 рр. варіювала у межах 18-38%.

У 2013 році CMV детектовано в 20% зразків у Полтавській, Вінницькій, Київській, Черкаській та Одеській областях. Серед інфікованих рослин були гарбузи, кабачки, цукіні, дині та помідори.

У 2014 році встановлено наявність антигенів CMV у 21% перевірених зразків (рис.5.20). Рослини, уражені CMV, було виявлено у Полтавській, Київській і Львівській областях на кабачках, гарбузах та цукіні.

У 2015 році CMV детектовано у агроценозах Київської, Полтавської, Черкаської та Львівської областей на рослинах кабачків, кавунів, гарбузів, огірків, помідорів та динь. CMV було детектовано у 38% зразків, які включали пасльонові і гарбузові рослини (рис. 5.12).

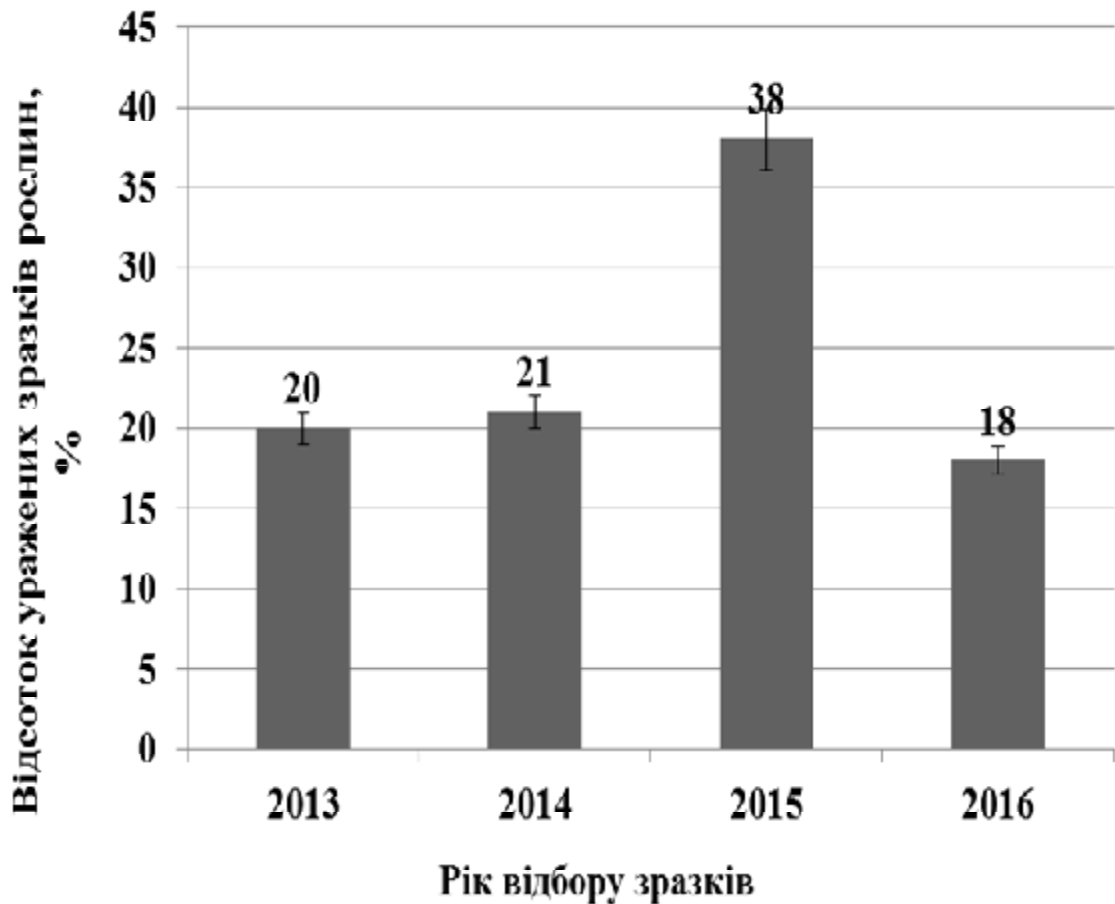


Рисунок 5.12 - Частота виявлення рослин, уражених вірусом огіркової мозаїки, у 2013-2016 рр.

У 2016 році встановлено наявність антигенів CMV в 18% обстежених зразків (рис. 5.12), виявлених у Львівській, Черкаській, Вінницькій, Полтавській та Чернігівській областях на помідорах, огірках, цукіні, гарбузах та кабачках.

Симптоми вірусу огіркової мозаїки на рослинах з родини *Cucurbitaceae* були різноманітними. На литкових пластинках спостерігали різноманітні варіанти мозаїки, пухирчастість і деформації листкових пластинок, скручування листків, плямистість, хлорози вздовж центральних жилок, гофрування жилок, пожовтіння, затримка росту (рис. 5.13).

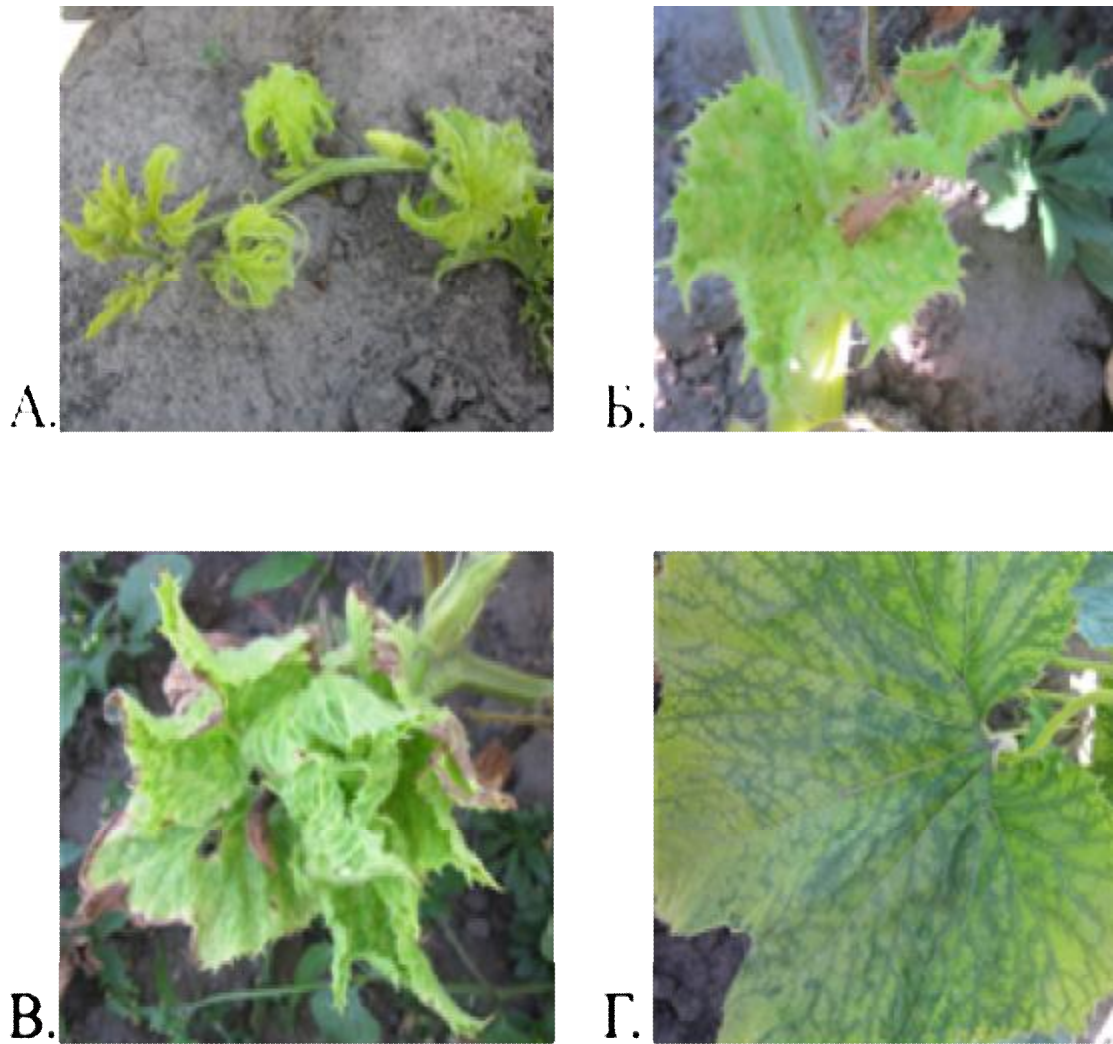


Рисунок 5.13 - Симптоми вірусу огіркової мозаїки на рослинах: скручування листкових пластинок кабачка (А), світло-зелена мозаїка та пухирці на листках кабачка (Б), карликовість, скручування листя кабачку (В), потемніння жилок гарбуза (Г)

На плодах симптоми CMV включали деформацію, пожовтіння, в'янення, зменшення розмірів. На рослинах з родини *Solanaceae* спостерігали жовті плями на плодах та мозаїку на листкових пластинках (рис. 5.14) [258, 259].

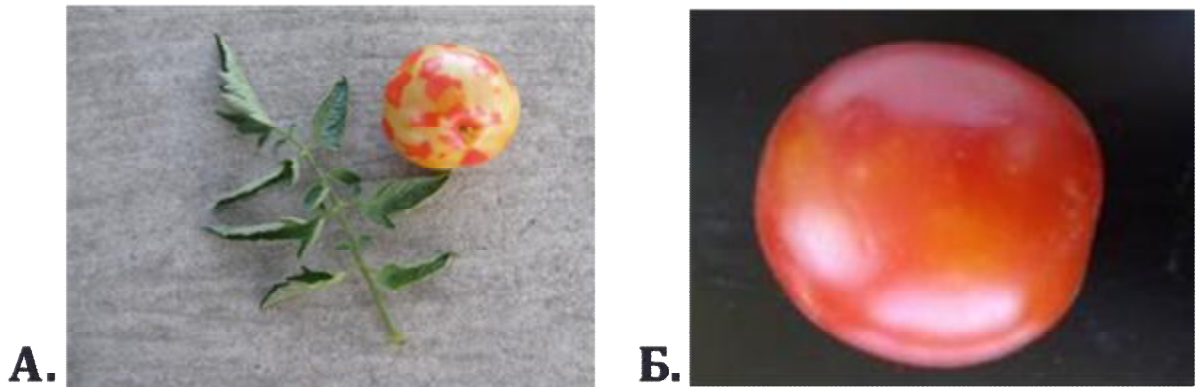


Рисунок 5.14 - Симптоми вірусу огіркової мозаїки на рослинах з родини *Solanacea*: мозаїка на листках (А) та жовті плями на плодах (А, Б)

Дані симптоми є типовими для інфекції CMV і зустрічаються у інших країнах Європи та світу [85, 115, 152, 156].

5.2.3 Детекція *Zucchini yellow mosaic virus* в агроценозах України

Частота трапляння ZYMV на гарбузових рослинах в обстежених агроценозах становила 21%. Найчастіше, ураженими були цукіні, кабачки та гарбузи [260].

Антигени ZYMV було знайдено в агроценозах Полтавської, Черкаської та Вінницької областях.

Симптоми ZYMV включали різноманітні варіанти мозаїки, характерну нитковидність листкової пластинки; плямистість, пухирчастість, сильну деформацію та редукцію розмірів листків (рис. 5.15). При цьому загальний розмір рослини також зменшувався.

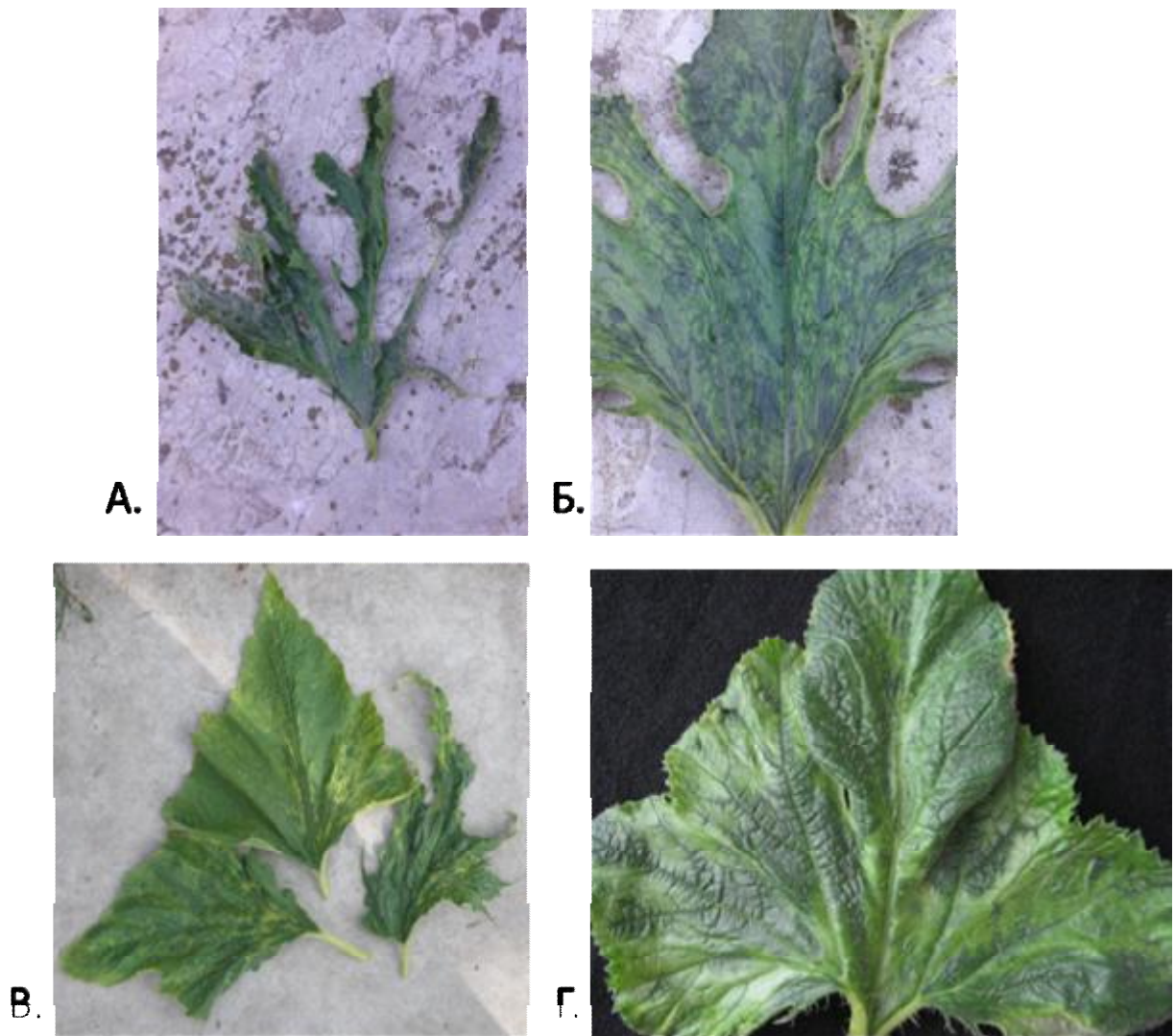


Рисунок 5.15 - Симптоми ZYMV на листкових пластинках гарбузових: А. нитковидність; Б. потемніння вздовж жилок; В. мозаїка; Г. плямистість

Часто рослини, уражені ZYMV, з сильним варіантом деформації та нитковидності листкових пластинок не плодоносили. Імовірно, інфікування таких рослин відбувалось у період до цвітіння, або вірус був присутній у насінні.

На плодах гарбузових рослин спостерігали різноманітні варіанти плямистості, пожовтіння, бугристість, деформації, зменшення їх розмірів (рис. 5.16). Усі ці симптоми призводили до втрати товарного виду плоду та значних збитків.



Рисунок 5.16 - Симптоми ZYMV на плодах гарбузових рослин: А. бугристість плоду кабачка, Б. пожовтіння кабачка

Розповсюдження ZYMV відбувається в основному за допомогою попелиці, а також насінневого матеріалу. Саме тому необхідний постійний моніторинг уражених рослин у агроценозах та контроль за якістю насіння на території нашої держави з метою уникнення подальшого розповсюдження цієї вірусної хвороби та проникнення вірус-інфікованого матеріалу з інших країн. На наступному етапі дослідження було вирішено здійснити вибіркочу перевірку насіння для виявлення ізолятів, які здатні передаватись за допомогою насіння та визначити частоту їх передачі.

5.2.4 Детекція Watermelon mosaic virus 2 в агроценозах України

Вірус мозаїки кавуна 2 – один з найбільш відомих патогенів рослин родини *Cucurbitaceae* наряду з вірусами огіркової мозаїки, мозаїки гарбуза та жовтої мозаїки цукіні. Він широко розповсюджений на Північно-Американському континенті, в південній Африці, в Європі, в Австралії. Епіфітотії ВМК-2 описані і в країнах азіатсько-тихоокеанського регіону. У Китаї природними хазяями вірусу є гарбуз, диня, кавун, горох, квасоля. В Японії ВМК-2 знайдений на посадках огірка, кавуна, гарбуза, гороху. Відомий також вірус в Тайланді та Кореї [16].

Даний патоген не є новим видом для нашої країни. Уперше вірус було виявлено на рослинах родини Гарбузових (*Cucurbitaceae*) у кінці 70-х років [256]. На той час ВМК 2 був найбільш поширеним збудником мозаїчних захворювань баштанних культур в Україні. Він уражував, в основному, кавуни, дині, кабачки, гарбузи, а кількість інфікованих рослин при цьому досягала 50 – 90%. Значного поширення вірус мозаїки кавуна 2 набув у відкритому ґрунті Запорізької, Одеської і Херсонської областей. На рослинах детектували моноінфекцію ВМК 2 та змішану інфекцію, зазвичай представлену ВМК 2 і вірусом огіркової мозаїки (ВОМ) [257]. Після довготривалої перерви вірус мозаїки кавуна 2 знову було виявлено у 2005 році. Вірус уражував рослини виключно відкритого ґрунту. Серед вірусінфікованих були огірки, кабачки, цукіні, гарбузи, дині .

Впродовж дослідження рослин агроценозів України на предмет WMV-2 було показано, що вірус поширений на культурах гарбузів, кабачків, цукіні, динь та огірків переважно у вигляді змішаної інфекції у поєднанні з вірусом жовтої мозаїки цукіні, вірусом огіркової мозаїки чи вірусом пожовтіння огірка, що передається попелицями. Моноінфекція WMV-2 на рослинах траплялася значно рідше. Зазвичай, на рослинах уражених WMV-2, симптоми проявлялися у вигляді темно-зеленої

прижилкової мозаїки листкової пластинки або ж темно-зеленої мозаїки з пухирчастим здуттям (рис. 5.17).

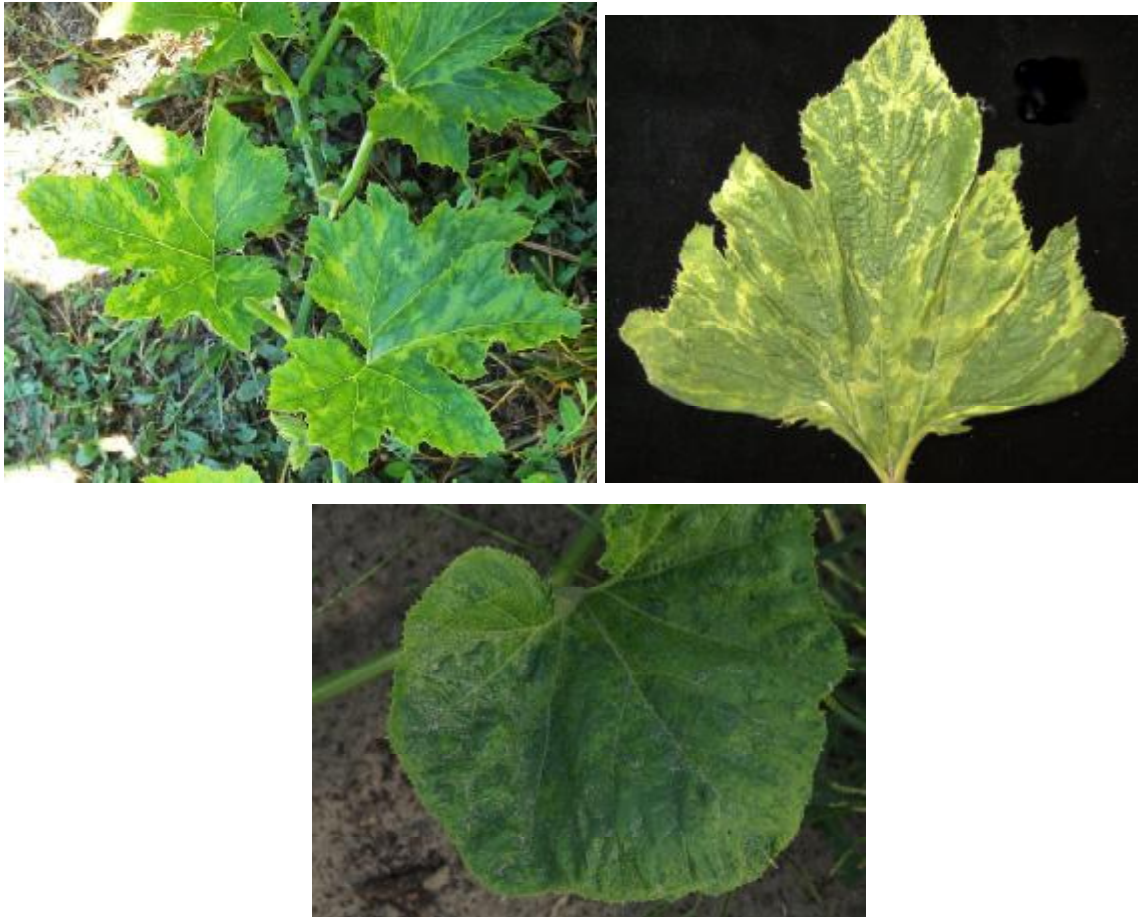


Рисунок 5.17 - Темно-зелена прижилкова мозаїка листкової пластинки на рослинах кабачків, індукована вірусом мозаїки кавуна

За результатами імуноферментного аналізу вірус мозаїки кавуна було детектовано у агроценозах Київської, Полтавської, Одеської та Донецької областей на рослинах кабачків, гарбузів, огірків та динь (рис. 5.18).

Періодично змінна циркуляція вірусу мозаїки кавуна 2 пов'язана зі шляхами його передачі. З одного боку вірус ефективно передається багатьма видами попелиць, з іншого, – використовує дикорослі рослини, як

резерватори вірусної інфекції, де він може зберігатися протягом досить тривалого часу. Попелиці, отримавши вірус від рослини-резерватора, повторно уражують рослини культурного виду, викликаючи інфекцію.

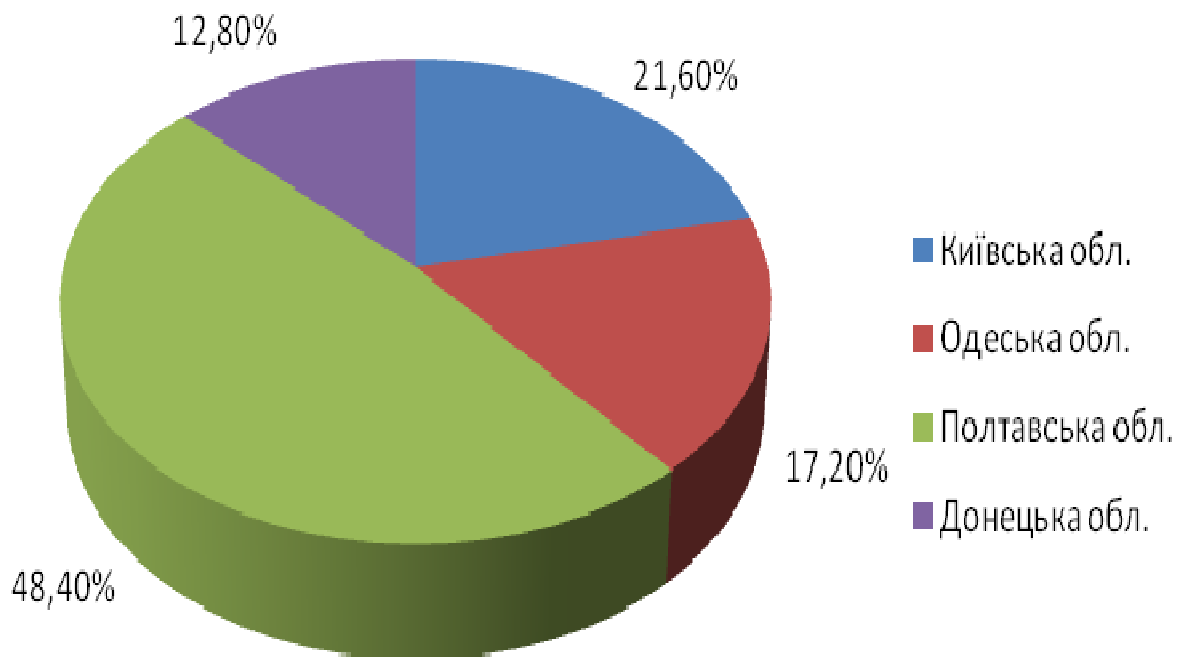


Рисунок 5.18 - Питомий вміст антигенів ВМК2 у зразках рослин, з різних областей України

Слід відмітити, що окрім моноінфекції, вірус мозаїки кавуна 2 досить часто зустрічався у вигляді змішаної інфекції, зазвичай представленої сумішшю з вірусом огіркової мозаїки. Необхідно зауважити, що нами не було знайдено жодного випадку контамінації тепличних культур вірусом мозаїки кавуна 2 [261, 262].

Протягом 2004 – 2017 років вірус мозаїки кавуна 2 виявляли у агроценозах відкритого ґрунту як Київської так і Полтавської областей у вигляді змішаної інфекції з поодинокими випадками моноінфекції.

На території України вірус мозаїки кавуна уражує рослини родини *Cucurbitaceae* виключно у агроценозах відкритого ґрунту [9].

Аналізуючи циркуляцію вірусу у агроценозах, не можна не відмітити важливість впливу природно - кліматичних умов та сортів рослин на розвиток вірусної інфекції [263]. Таким чином, сукупність різних факторів, таких, як наявність комах-переносників, бурянів-резерваторів, сорту рослин та природно-кліматичних умов визначає затухання чи навпаки активацію розвитку вірусної інфекції, впливаючи на кількість хворих рослин та відсоток їх ураження.

5.2.5 Детекція *Cucumber green mottle mosaic virus* в агроценозах України

Дослідження вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка на території України розпочалося в середині 1960-х років. Тоді вперше було ідентифіковано українські ізоляти вірусу, описано їх фізико-хімічні властивості і показано, що в екологічних умовах України CGMMV зустрічається лише в умовах закритого ґрунту на культурах огірків [256].

Після багаторічної перерви, починаючи з 2000 року, дослідження вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка в екологічних умовах України знову стало актуальним через масові ураження рослин огірків даним вірусом у тепличних господарствах. На той час було ідентифіковано та виділено нові ізоляти CGMMV, досліджено їх серологічні, фізичні та молекулярно-біологічні властивості, на основі отриманих антивірусних сироваток до CGMMV створено високоефективні тест-системи для непрямого імуноферментного аналізу (ІФА). Сиквенування послідовностей

гену капсидного білка ізолятів та порівняння їх з уже відомими штамми та ізолятами з ГенБанку дало можливість встановити, що на території України циркулюють ізоляти, високогомологічні до російських та грецьких ізолятів CGMMV [264, 265]. Нами було доведено, що в екологічних умовах України вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка передається виключно через ґрунт, хоча ми детектували високий відсоток ураженості комерційного насіння рослин гарбузових [266].

Необхідно відмітити, що на території України в період з 2000 по 2008 роки вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка зустрічався виключно на рослинах огірків закритого ґрунту. Нами не було виявлено випадків інфікування рослин кабачків, цукіні, динь, кавунів та гарбузів у відкритому ґрунті [266]. З іншого боку, дослідження зарубіжних вчених [267] вказують на широке розповсюдження CGMMV на рослинах кавунів, динь, огірків та кабачків як у закритому, так і у відкритому ґрунті. Зважаючи на таку ситуацію, та приймаючи до уваги велику шкодочинність CGMMV, дослідження питання щодо поширення вірусу на території України є дуже актуальним. Ми здійснюємо постійний моніторинг рослин родини гарбузових як відкритого, так і закритого ґрунту на наявність CGMMV та вивчаємо властивості нових вірусних ізолятів. Оскільки вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка – високоефективний патоген, здатний призводити до повної втрати врожаю, необхідно постійно проводити його моніторинг, щоб завчасно попередити поширення вірусу в агроценозах і, по можливості, запобігти масовому ураженню рослин та втратам врожаю.

В умовах же відкритого ґрунту обстежених нами семи регіонів України (Вінницької, Житомирської, Запорізької, Київської, Полтавської та Херсонської) не було зафіксовано жодного випадку контамінації рослин родини гарбузових вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка.

Однак ситуація з поширенням CGMMV у світі виглядала зовсім інакше. За період з 2007 по 2016 роки вірус значно розширив свій ареал, перекочовавши на території, де раніше не зустрічався [268]. Так,

починаючи з 2013 року, CGMMV вперше було зареєстровано в Канаді, США, Австралії, де в умовах відкритого ґрунту на рослинах кавунів та динь вірус викликав суворі симптоми і, як наслідок, колосальні збитки продукції [269]. На думку зарубіжних дослідників, вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка на нові території потрапив саме з комерційним вірусінфікованим насінням, яке використовувалося, як посадковий матеріал. Адже згідно результатів філогенетичного аналізу, усі нові штами CGMMV, як-от канадські, з США чи австралійські мають азіатське походження [270, 271].

Зважаючи на таку ситуацію, свої подальші дослідження ми вирішили зосередити на пошуку CGMMV саме на рослинах родини гарбузових в умовах відкритого ґрунту. В період з 2009 по 2017 роки нами було обстежено рослини у Вінницькій, Київській, Кіровоградській, Львівській, Полтавській та Черкаській областях. Для досліджень відбирали рослини огірків, кабачків, патисонів, гарбузів, динь та кавунів з симптомами світло-зеленої та темно-зеленої мозаїки, нитковидності та гофрування листкової пластинки. Часто на уражених рослинах спостерігалась темно-зелена та світло-зелена плямистість листкової пластинки, а на плодах – темно-зелена пухирчастість, бугристість та бліде забарвлення (рис. 5.19).



Рисунок 5.19 - Жовто-зелена мозаїка листкової пластинки рослини кавуна, спричинена вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка

Методом імуноферментного аналізу було показано наявність вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка у зразках з відкритого ґрунту Київської та Полтавської областей (табл. 5.1).

Таблиця 5.1 - Результати тестування рослин родини Гарбузових з відкритого ґрунту різних регіонів України на наявність CGMMV

Область	Культури рослин, відібрані для досліджень	Наявність CGMMV	Культури рослин, на яких виявлено CGMMV	Тип інфекції (моно, змішана)
Вінницька	огірки, кабачки, цукіні	–		
Київська	огірки,	+	огірки	моноінфекція

	кабачки, цукіні, гарбузи			
Кіровоградська	огірки, кабачки, кавуни, дині	–		
Львівська	огірки, кабачки, цукіні	–		
Полтавська	огірки, кабачки, цукіні, гарбузи, кавуни, дині, патісони	+	кавуни дині кабачки	моноінфекція змішана інфекція
Черкаська	огірки, кабачки, гарбузи	–		

Проте це були лише поодинокі випадки, до того ж половину з них становила змішана вірусна інфекція. Серед досліджуваних зразків вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка виявили лише у п'яти зразках рослин, що становить 2,4% від загальної кількості (рис. 5.20).

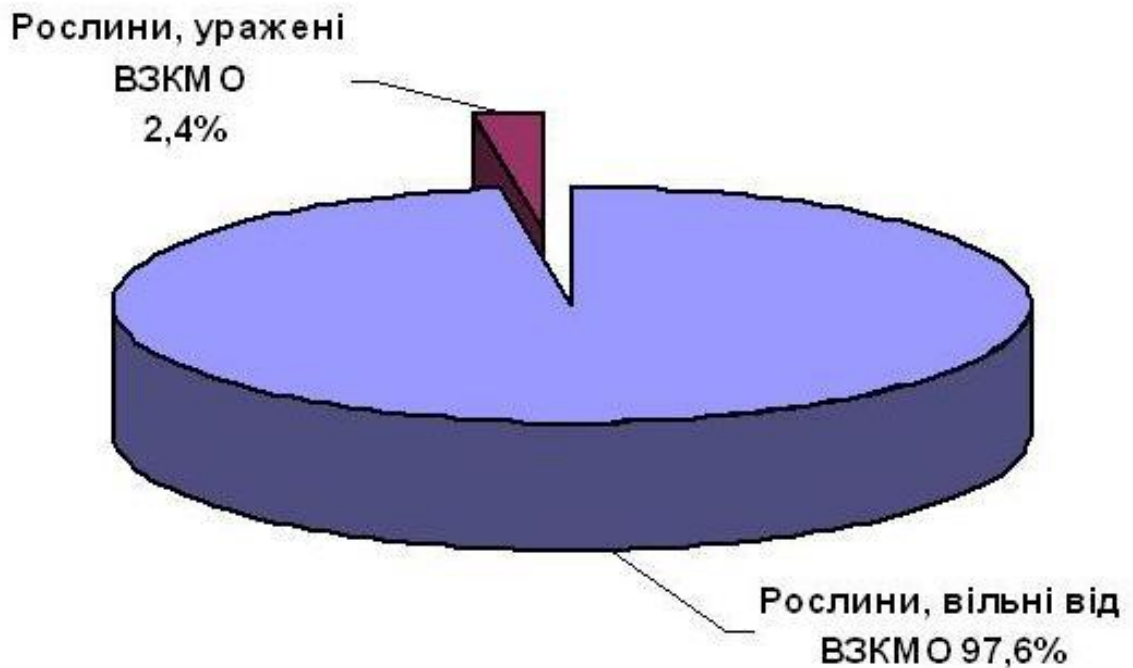


Рисунок 5.20 - Зведені дані щодо поширення CGMMV у гарбузових рослинах, які культивуються в умовах відкритого ґрунту

Таким чином, CGMMV у відкритому ґрунті було виявлено на рослинах огірків у Київській області, а також на рослинах кавунів, кабачків та динь в Полтавській області.

Результати ІФА на наявність моноінфекції CGMMV у рослинах відкритого ґрунту було підтверджено результатами електронної мікроскопії. У полі зору мікроскопа спостерігали паличкоподібні віріони, за розмірами характерні для даного вірусу.

Як показали результати досліджень, на території України в умовах відкритого ґрунту вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка практично не зустрічається.

Специфіку поширення вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка у тепличних господарствах України і майже повну її відсутність у відкритому ґрунті ми пов'язуємо зі способом передачі вірусу. Оскільки вірус дуже ефективно передається з ґрунтовим розчином, то погана стерилізація ґрунту (а часто і повна її відсутність у тепличних

господарствах нашої країни) призводить до циклічного перезараження рослин і неможливості тривалого позбавлення від вірусної інфекції. Для тепличних господарств України основним шляхом поширення вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка є вірусінфікований ґрунт. Рослинні рештки розкладаючись вивільнюють вірус, який, потрапивши у ґрунт, зберігається там досить тривалий час, а при висіванні насіння у такий ґрунт відбувається швидке інфікування проростків.

5.2.6 Детекція *Turnip mosaic virus* в агроценозах України

Відбір зразків обмежувався регіонами комерційного вирощування сільськогосподарських культур/ Відбір зразків у Київській обл. проводився на декількох великих полях поблизу селищ Лука та Гореничі, на яких вирощувалися промислові посіви капусти. Хрестоцвітні рослини (капуста, червоний редис, гірчиця та ін.) аналізували візуально, зразки відбирали з рослин з TuMV-подібними симптомами, які включали мозаїку, плямистість, набухання листкових жилок та/чи деформацію листків. Керуючись попередніми повідомленнями щодо інших рослин-хазяїв TuMV [40], також були відібрані деякі симптоматичні дикорослі рослини інших родин.

Всі відібрані зразки були надалі проаналізовані методом імуноферментного аналізу (ІФА) у модифікації «сендвіч» [211] на предмет наявності антигенів вірусу мозаїки турнепсу. Для ІФА була використана комерційна тест-система виробництва Loewe (Німеччина), при постановці керувалися рекомендаціями виробника

Загалом було відібрано та проаналізовано 54 зразки хрестоцвітних рослин з TuMV-подібними симптомами мозаїки та плямистості. TuMV був детектований у 27 зразках рослин.

Таким чином, частота інфекції TuMV у симптоматичних рослинах досягала 50%. Вірус був знайдений у культурних рослинах *B. oleracea var.*

capitata, *R. sativus*, *S. alba*, *B. juncea*, *C. sativa*, дикорослих рослинах *Brassica sp.*, *Raphanus sp.*, та інтродукованій бур'янистій рослині *Bunias orientalis*.

Найтипівішими симптомами вірусної інфекції рослин капусти були набухання жилок та деформація листків, в той час як системна мозаїка та плямистість були більше властиві TuMV-інфікованим рослинам редису та гірчиці. Слід також відмітити, що у 6/27 випадках (22%) рослини були також коінфіковані вірусом огіркової мозаїки (*Cucumber mosaic virus* (CMV)). Цікаво, що різні місця відбору зразків рослин характеризувалися різним рівнем частоти інфекції TuMV (табл. 5.2).

У випадку двох промислових полів Київської обл., які були розташовані на відстані лише 5 км одне від одного, частота інфекції TuMV коливалася від 17% і 42%. Вірогідно, це є наслідком підтвердженого регулярного знищення хворих рослин на полі №1, що підкреслює важливість здавна відомого та простого підходу – знешкодження джерела вірусу – у боротьбі із захворюванням.

В свою чергу, висока частота інфекції TuMV, відмічена для приватних присадибних ділянок (58%), може пояснюватися спільним впливом CMV як зростання хворих рослин (через незнешкодження джерел інфекції), так і повторним вирощуванням сприйнятливих культур з року в рік. Іншими словами, не витримувалася інша ефективна технологія попередження поширення вірусних інфекцій – сівозміна.

Таблиця 5.2 - Детекція вірусу мозаїки турнепсу у рослинах, відібраних на різних агроекологічних ділянках

Місце відбору зразків	Кількість відібраних зразків	Кількість зразків, позитивних у ІФА	Частота інфекції TuMV (%)
Поле промислового вирощування капусти 1	6	1	17
Поле промислового вирощування капусти 2	12	5	42
Приватні присадибні ділянки	12	7	58
Загалом для сільськогосподарських ділянок	30	13	39
Ботанічний сад НАН України (Київ)	9	8	89
Ботанічний сад Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ)	3	1	33
Національний музей народної архітектури та побуту України (Київ)	3	2	67
Місто Київ	9	3	33
Загалом для міських ділянок	24	14	55
ЗАГАЛОМ	54	27	50

Отримані результати вочевидь демонструють високу ефективність широковідомих заходів вирощування рослин (які давно відомі, але якими часто нехтують) для контролю поширення вірусів, які передаються

механічно та літаючими векторами, та зниження подальших збитків у 2.5-3.4 рази.

Результати, наведені у таблицях 5.2, 5.3, свідчать про фактично однакову частоту інфекції TuMV у симптоматичних рослинах незалежно від того, чи це сільськогосподарська ділянка, чи вулиця міста.

Таблиця 5.3 - Зведені результати детекції вірусу мозаїки турнепсу у культурних, супутніх та дикорослих рослинах

Тип зразків	Кількість відібраних зразків	Кількість зразків, позитивних у ІФА	Частота інфекції TuMV (%)
<u>Культурні рослини, відібрані з місць вирощування</u> (Brassicaceae)	30	13	43
<u>Супутні культурні та дикорослі рослини, відібрані поза місцями вирощування</u> (Brassicaceae, Primulaceae, Papaveraceae/Ranunculaceae, Asteraceae, Malvaceae, Orchidaceae)	34	14	41
ЗАГАЛОМ	64	27	42

Отже, можна стверджувати, що не зважаючи на ефективність класичних заходів контролю вірусних захворювань, вони не є єдиним і вирішальним фактором у профілактиці поширення вірусу мозаїки турнепсу. Вочевидь, в урбанізованих умовах супутні культурні та дикорослі рослини відіграють важливу роль як резервуари для збереження популяцій вірусу та його передачі.

Отримані результати свідчать на користь значного поширення вірусу мозаїки турнепсу як у сільськогосподарських, так і в міських екосистемах, а також підтверджують, що цей вірус довгий час залишався невідомим в Україні [272].

Отже, підсумовуючи отримані данні, у результаті детекції вірусів серед представників родини *Cucurbitaceae* встановлена наявність 4-х вірусів, а саме CMV, WMV2, ZYMV та CGMMV (рис.5.21), серед представників родини *Solanaceae* встановлена наявність 6-ти вірусів, таких як CMV, ToMV, TMV, TRV, PMMV, PVY та PVX (рис.5.22), а серед представників родини *Brassicaceae* - 2-х вірусів: CMV та TuMV (рис.5.23).

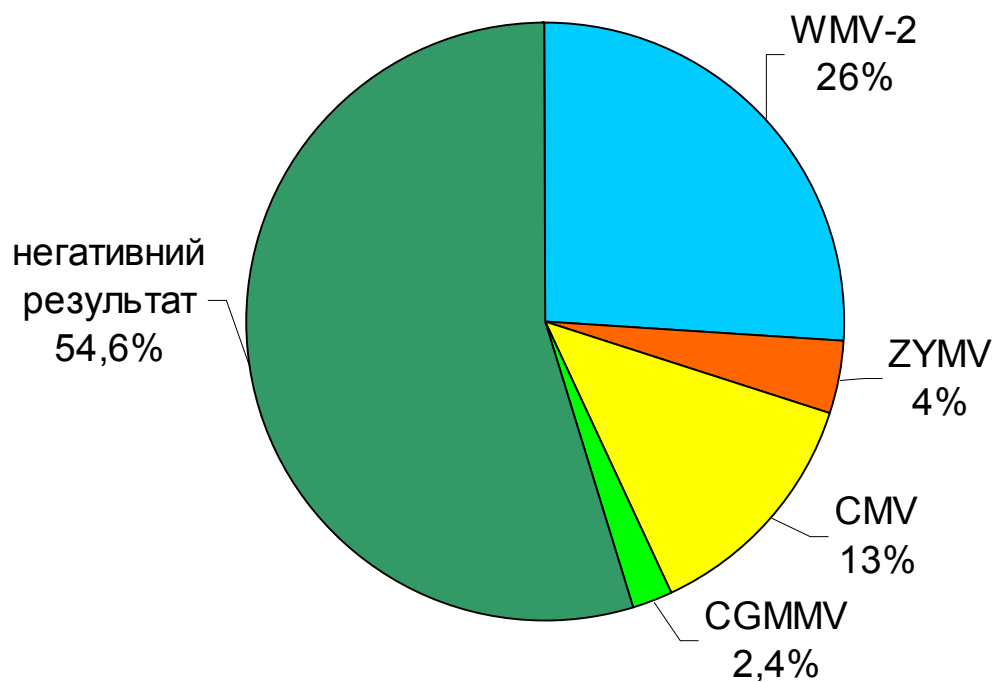


Рисунок 5.21 - Узагальнені результати детекції вірусів серед представників родини *Cucurbitaceae*

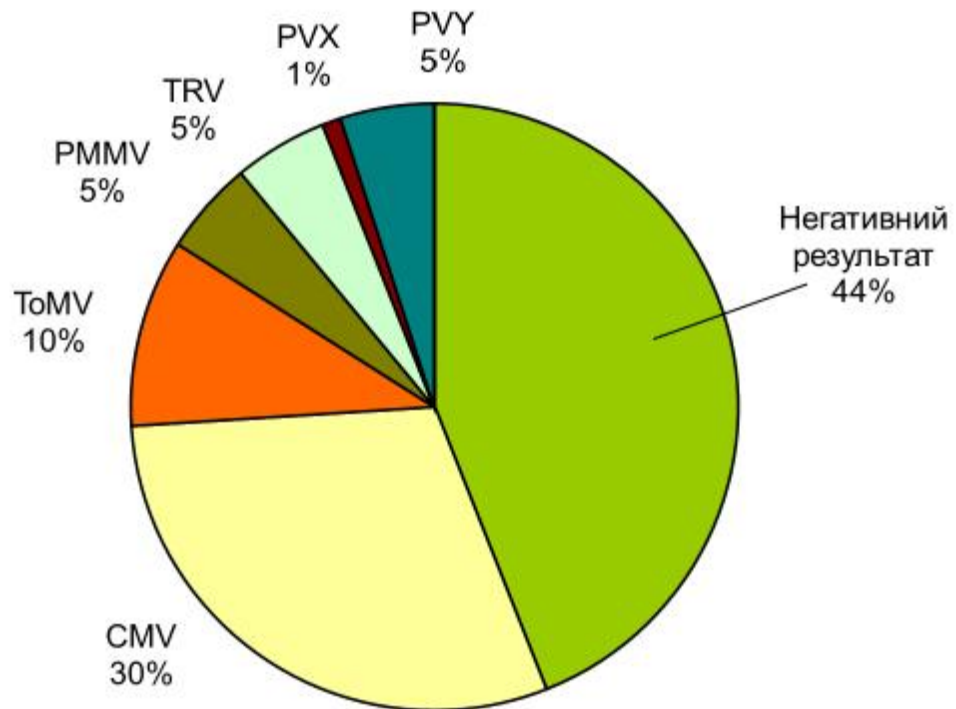


Рисунок 5.22 - Узагальнені результати детекції вірусів серед представників родини *Solanaceae*

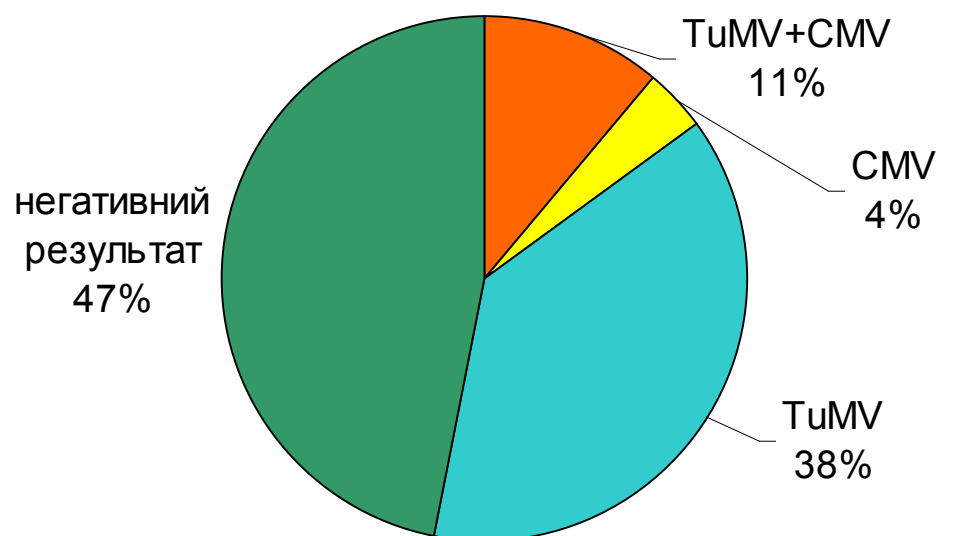


Рисунок 5.23 - Узагальнені результати детекції вірусів серед представників родини *Brassicaceae*

Таким чином, у зразках рослин з вірусоподібними симптомами методом ІФА детектовані антигени десяти вірусів різних таксономічних

груп: WMV2, ZYMV, CMV, CGMMV, PVY, PVX, PMMoV, TRV, ToMV і TuMV. Частота виявлення вірусів варіювала у межах 1-30%. PMMoV та CGMMV рідко зустрічалися на овочевих культурах України в умовах відкритого ґрунті.

Результати, викладені у розділі, опубліковані в наступних роботах: [251, 252, 253, 254, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 272, 273, 274, 275].

РОЗДІЛ 6

ЗМІШАНІ ВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР

У природі, в тому числі і при розвитку патологічних процесів у рослин, часто зустрічаються багато компонентні системи вірусів. Характер взаємозв'язку цих вірусів з розвитком патологічних реакцій у рослині-хазяїні вивчений недостатньо.

Вірусні захворювання в цілому можуть бути викликані однією, або змішаною інфекцією двох чи більше вірусів. Одночасна інфекція викликана різними вірусами або різними штамми одного й того самого виду вірусу нерідко зустрічається в природі [151]. У рослинах, одночасне інфікування різними вірусами може призвести до явища, описаного як нейтралізм, коли віруси не заважають реплікації, накопиченню і передачі один одного [165]. Періодично, це може привести до антагонізму, коли один вірус знижує інфекцію або накопичення іншого вірусу [169], або синергізму, коли коінфекція призводить до збільшення проявів симптомів та/або збільшення концентрації вірусу. Синергічні взаємодії між вірусами рослин можуть призвести до збільшення захворюваності у посівах, які сприйнятливі до різних вірусних комбінацій [167, 169]. Крім того, вірусна синергія може призвести до резистентності або обмеженого поширення іншого вірусу. Значне збільшення симптомів при подвійній інфекції в порівнянні з поодинокую інфекцією було помічено в кількох дослідженнях за участю комбінації потівірусів і вірусів, що належать до інших родів [177].

Набагато менше відомо про синергетичні взаємодії, що відбуваються в баштанних видах подвійно інфікованих CMV і потівірусами. Інфекції баштанних видів таких як ZYMV, WMV-2 або CMV дуже поширені, і завдають значної шкоди в усьому світі, у вигляді важких епідемій баштанних полів, чи в поодинокій чи в подвійній інфекції. Значного економічного збитку було завдано Кореї від подвійної інфекції

вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка і WMV-2 що викликали некрози у кавунів. У комплексно інфікованих клітинах рослинах кавуна і огірка виникала специфічна девятикутна ультраструктура, викликана взаємодією двох патогенів – WMV-2 і CGMMV. Одна частинка WMV-2 була оточена 9 частинками CGMMV [169]. Накопичена CGMMV РНК при змішаній інфекції з WMV-2 в деяких гарбузових була вище, ніж при зараженні тільки CGMMV. Крім того, рівень капсидного білка CGMMV збільшилася при змішаній інфекції. Тим не менш, рівень WMV-2, не показував істотного підвищення порівняно з поодиначою інфекцією. Поодиначна інфекція WMV-2 або CGMMV в тих самих хазяях проявлялася лише посвітлінням жилок, утворенням пухирців, системній мозаїці чи плямистості на верхніх листках і подібні симптоми розвивалися після подвійної інфекції [170].

Синергізм спостерігається між WMV-2 та іншими вірусами, що вражають Гарбузові, які можуть виражатися або збільшенням темпів розмноження вірусів або більш важкими симптомами. Коли WMV-2 знаходиться в змішаній інфекції з полеровірусами, наприклад, вірус пожовтіння огірка, що передається попелицями (ВПО), швидкість розмноження ВПО та інтенсивність його симптомів збільшуються.

Взаємодія WMV-2 і ZYMV, двох близькоспоріднених потівірусів (*Potyviridae*), представляє особливий інтерес, тому що ці генетично різні вірусні види відносяться до однієї й тієї ж підгрупи і займають подібні екологічні ніші, що дозволяє припустити, що конкуренція між цими вірусами може бути важливим фактором, що впливає на їх еволюцію. WMV-2 і ZYMV мають подібні діапазони хазяїв (в першу чергу – гарбузові), викликають подібні симптоми і передаються (не завжди) тими ж видами попелиць, хоча і з різною ефективністю. Як і інші потівіруси, WMV-2 і ZYMV мають уніпартидний одноланцюговий (+) РНК геном (подібні за розміром і організацією, що кодує поліпротеїни, і обидва використовують допоміжний компонент білка для перенесення на

попелицях. Коінфекція WMV-2 і ZYMV в одних і тих же популяціях хазяїна і в окремих рослинах зустрічається однаково часто як для культурних так і для диких видів хазяїв. Але інфекція, не викликає таких важких синергетичних ефектів, як повідомлялося для подвійних інфекцій деяких вірусів в роду *Potyvirus* разом з вірусами з інших родів, таких як *Cucumovirus* (родина *Bromoviridae*) або *Potexvirus* (родина *Alphaflexiviridae*) - подібні ефекти насправді, як видається, відносно рідкісні, і коінфекція вірусів в природі частіше відображає слабшу взаємодію [164].

Вірусне інфікування культур гарбузових найчастіше відбувається потівірусами ZYMV та WMV-2, а також CMV (родина *Bromoviridae*, рід *Cucumovirus*). Всі з них є (+) олРНК вірусами. Дані фітовіруси призводять до гострих епіфітотій на гарбузових полях як у вигляді моноінфекції, так і змішаної інфекції. Однак, організації геному CMV і потівірусів не споріднені. CMV має трипартитний, позитивно-смысловий РНК-геном, що експресує п'ять генів: три з геномної РНК 1-3 і субгеномні РНК 4 і 4А. Деякі штами CMV можуть нести сателітні РНК, які послаблюють симптоми. На відміну від цього, потівіруси містять монопартитні, позитивно-смылові геноми РНК, що кодують один поліпротеїн, який розщеплюється до 9 або 10 протеїнів. Більш того, хоча будь-який індивідуальний потівірус має дуже вузький діапазон хазяїв, колективний діапазон хазяїв великої кількості відомих потівірусів є дуже широким. Навпаки, штами CMV мають колективний діапазон хазяїв понад 1000 видів.

Змішана вірусна інфекція є досить звичним явищем для рослин. У багатьох випадках змішана вірусна інфекція у рослин призводить до посилення прояву симптомів та підвищенні титру одного чи обох вірусів завдяки синергічному ефекту. Синергізм, що викликається представниками роду *Potyvirus* є доволі добре описаним. Вважається, що за синергічного ефекту, що викликається даними вірусами, зростає лише титр тих задіяних

у змішаній інфекції вірусів, що не належать до даного роду [177]. Хоча існують відомості про синергічний ефект, який призводить до зростання чи зменшення аккумуляції *Potyvirus* за змішаної інфекції [178].

Допоміжний компонент протеїнази (НС-Pro), кодований потівірусною геномною РНК, був ідентифікований як ключовий компонент синергізму, що виконує роль супресора РНК-сайленсинга, що і дозволяє ко-інфікуючому РНК-вірусу досягати високого титру. Основною функцією НС-Pro є прикріплення до стилети попелиці для трансмісії віруса [178].

Вважається, що даний механізм є класичним для потівірусів. Модель змішаної інфекції найкраще досліджена на взаємодії потівіруса Вірус картоплі Y (PVY) з потексвірусом Вірус картоплі X (PVX). За ко-інфекції PVY та PVX спостерігалось підвищення акумуляції PVX, а титр PVY залишався на сталому рівні, порівняно з моноінфекціями. Підвищення рівня накопичення пояснюється збільшенням кількості віріонів на клітину, а не збільшенням кількості інфікованих клітин. Спостерігалось непропорційне і тривале підвищення рівня (-) РНК PVX порівняно з (+) РНК PVX, що свідчить про збільшення реплікації PVX, а не про збільшення руху віруса по рослинному організму. Окрім того, мутації в центральній кодуючій області гена НС-Pro нівелювали синергічну взаємодію PVX-потівірус, що підтверджує пряме залучення НС-Pro до синергічної відповіді [167].

Ще одним ефектом за вірусної ко-інфекції може бути зміна локалізації та полегшення розповсюдження гетерологічних вірусів, особливо що стосується можливості зараження рослин, що не є типовими хазяями для одного з вірусів. Наприклад, НС-Pro віруса гравіювання табака, що належить до роду потівірусів, полегшує розповсюдження лютеовірусів, поширення яких зазвичай обмежене флоемою, до клітин мезофілу [276].

Було показано, що за змішаного інфікування рослин CMV та ZYMV, титр CMV зростає, порівняно з моноінфекцією. Інколи підвищення титру спостерігається майже у два рази. Даний ефект є результатом зростання кількості інфікованих клітин, а не збільшення вірусного титру у індивідуальній клітині. Хоча існують суперечливі дані про підвищення титру CMV всередині клітини за змішаної інфекції. ZYMV може легко проникати у судини ксилеми за моноінфекції, в той час як проникнення до тканин та судин ксилеми CMV за моноінфекції є обмеженим. За змішаної інфекції цих двох вірусів CMV набуває здатності проникати до судин ксилеми, що опосередковано ZYMV HC-Pro [277]. Симптоматичним ефектом змішаної інфекції CMV та ZYMV є прискорене в'янення рослини та її загибель. Підвищення титру ZYMV за змішаної інфекції порівняно із моноінфекцією виявлено не було [167].

Існують дані щодо зміни видового тропізму CMV за ко-інфекції з ZYMV. Проте зміна тропізму не супроводжувалася загостренням симптомів захворювання, симптоми залишалися такими, які характерні для моноінфекції ZYMV. За спільної інокуляції безсимптомним варіантом ZYMV-AG та CMV, CMV-інфікування відбувалося без прояву захворювання. Отже, інтенсифікація накопичення вірусної РНК і капсидного білка може відбуватися без відповідного підвищення рівня розвитку хвороби [168].

CMV належить до вірусів з широким колом хазяїв і тому навіть при сівозміні с/г рослин, що культивуються він може тривалий час йциркулювати на одному ареалі.

CMV зустрічався як у моноінфекції, так і у вигляді змішаної інфекції з вірусом мозаїки кавуна – 2 (WMV-2) та вірусом жовтої мозаїки цукіні (ZYMV). Частота виявлення зразків із змішаною інфекцією CMV і WMV-2 варіювала від 7% до 17% (рис. 6.1).



Рисунок 6.1 - Частота трапляння змішаної інфекції CMV і WMV 2 протягом 2013-2016 рр.

Електронномікроскопічні дослідження підтвердили наявність обох типів вірусних частинок: сферичних віріонів CMV з діаметром 29 нм і нитковидних віріонів WMV-2 з довжиною 730 нм, що співпадає з літературними даними [11] (рис. 6.2).

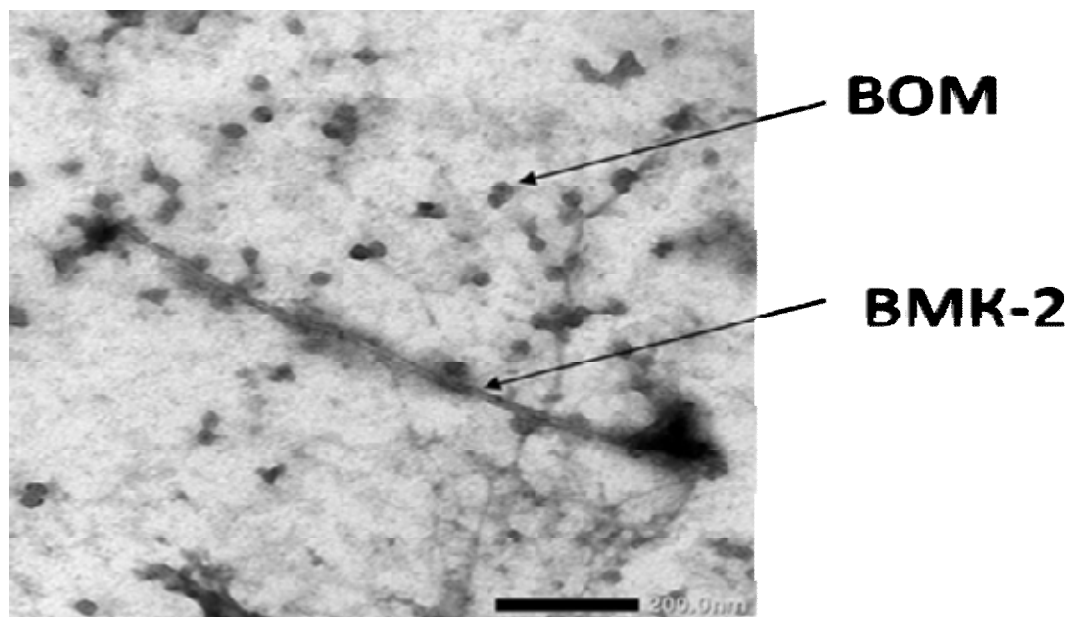


Рисунок 6.2 - Електронномікроскопічне зображення зразку із змішаною інфекцією CMV і WMV-2

На рослинах із змішаною інфекцією CMV і WMV-2 спостерігали темнозелену мозаїку, потемніння вздовж жилок, пухирчастість листків, їх деформацію, а також деформацію і бугристість плодів (рис. 6.3).



Рисунок 6.3 - Симптоми змішаної інфекції CMV і WMV-2: деформація листків (А, Б) та плоду (А)

Загалом, при змішаних інфекціях CMV і WMV-2 вірусоподіні симптоми мали сильніший прояв. Згідно з літературними даними, коінфекція CMV і WMV-2 є прикладом синергізму, оскільки призводить до сильнішого прояву симптомів, зокрема слабкі штами WMV-2, що не здатні спричинювати розвиток сильних пухирців на листовій пластинці, набувають таку здатність при коінфікуванні [167].

Змішаної інфекції CMV і вірусу жовтої мозаїки не було знайдено, хоча в літературних даних є згадки про такий тип інфекцій. Взаємодія CMV і ZYMV також має синергетичний характер і призводить до посилення симптомів [168].

Взаємодія WMV і ZYMV значно відрізняється від взаємодії ZYMV та CMV, адже вони є представниками одного роду і мають схожу екологічну нішу. Це свідчить про те, що конкуренція між вірусами може

бути важливим фактором, що впливає на їх еволюцію. WMV і ZYMV мають спектри хазяїв, що перекриваються, викликають подібні симптоми і передаються неперсистентно тими ж видами попелиць, хоча і з різною ефективністю. Як вже зазначалося, WMV і ZYMV часто зустрічаються у одних популяціях рослин-хазяїв та в окремих рослинах, що характерно як для культивованих, так і для диких рослин.

Але коінфекція не викликає сильного синергічного впливу на вірулентність, як повідомляється про подвійну інфекцію деяких вірусів у роду *Potyvirus* разом з вірусами інших родів, таких як *Cucumovirus* (родина *Bromoviridae*) або *Potexvirus* (родина *Alphaflexiviridae*).

Ізоляти ZYMV реплікуються з аналогічною швидкістю за моно- і змішаної інфекції, тоді як ізоляти WMV накопичуються до значно нижчих рівнів у присутності ZYMV. Крім того, ZYMV індукує зміни кольору листя та продукцію летких речовин, що посилює приваблення попелиць (*Aphis gossypii*) до інфікованих рослин. На відміну від цього, WMV не має сильного впливу на взаємодію рослина-попелиця. Тим не менш, WMV може використовувати переваги змішаної інфекції і легко передаватися до інших рослин під час неї [178].

Змішані інфекції ZYMV та вірусу мозаїки кавуна – 2 є доволі частими, що зумовлене подібним колом хазяїв з одного боку й перенесенням однаковими видами переносників (попелиці) з іншого. На обстежених нами рослинах із змішаною інфекцією спостерігали плямистість, мозаїку, пухирчастість, нитковидність та деформацію листових пластинок; на плодах – бугристість, плямистість та деформацію (рис. 6.4).



Рисунок 6.4 - Змішана інфекція, спричинена ZYMV і WMV-2: А, Б. мозаїка, пухирчастість, сильна деформація листків; В. деформація плоду

Загалом симптоми при змішаних інфекціях ZYMV та WMV-2 є більш вираженими та сильнішими, що співпадає з літературними даними [27].

Також було знайдено рослини, уражені трьома вірусами (CMV, WMV-2, ZYMV) одночасно. У 2013 році частота трапляння зразків рослин з таким типом інфекції становив 5%. На динях та гарбузах спостерігали темнозелену мозаїку, деформацію листкової пластинки, пухирчастість, деякі з них не утворювали плодів (рис. 6.5).

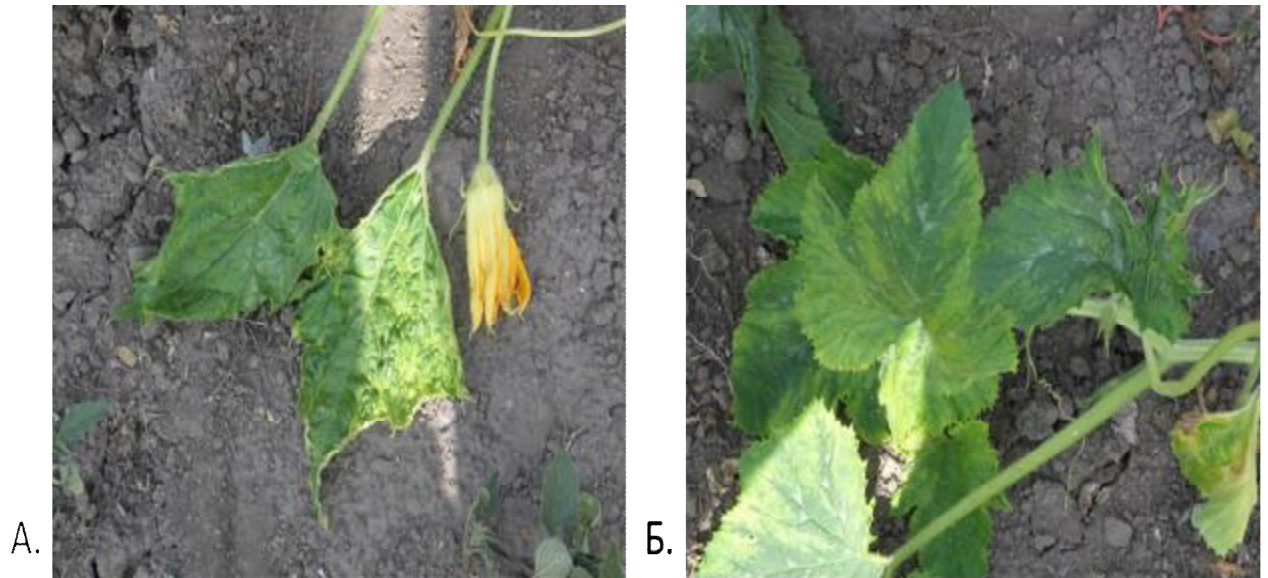


Рисунок 6.5 – Симптоми на рослинах зі змішаною інфекцією CMV, ZYMV і WMV – 2: сильна деформація листків (А) та мозаїка (Б)

Різноманітність симптомів, спричинених змішаними інфекціями українських ізолятів CMV, WMV-2 та ZYMV збігається з літературними даними [17, 23, 24].

Таким чином, частота виявлення зразків зі змішаною інфекцією становила 2-34 % для різних вірусів (рис 6.6)

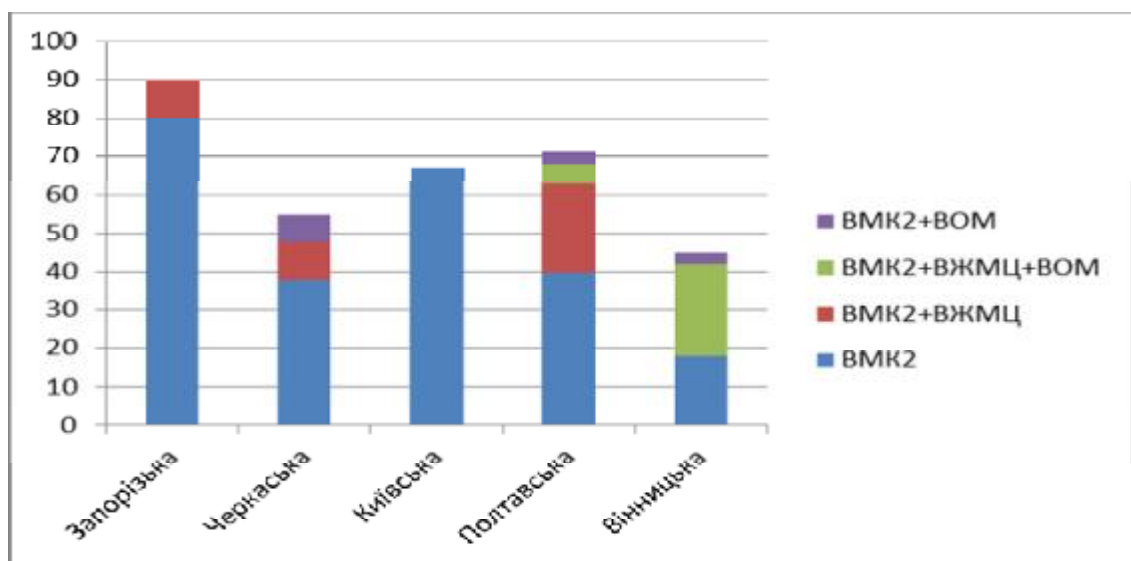


Рисунок 6.6 - Змішані вірусні інфекції рослин родини *Cucurbitaceae* деяких областей в п'яти областях України

Стосовно CGMMV, то частота його детекції у відкритому ґрунті була не висока, всього 2,4%. Причому, моноінфекція спостерігалася лише у випадку огірків та кавунів, на динях і кабачках була змішана інфекція, представлена сукупністю одразу двох чи трьох вірусів (рис.6.7).

Так, на рослинах динь було виявлено змішану інфекцію у вигляді CGMMV і вірусу мозаїки кавуна 2 (ВМК 2 родини Potyviridae), ВМК 2 і вірусу жовтої мозаїки цукіні (ZYMV родини Potyviridae). Що стосується кабачків, то вони виявилися ураженими сумішшю CGMMV і вірусом огіркової мозаїки (СMV, родини Bromoviridae).

Досліджувані зразки рослин родини гарбузових на наявність вірусу мозаїки кавуна 2, вірусу жовтої мозаїки цукіні та вірусу огіркової мозаїки ми аналізували не випадково, адже дані віруси є найбільш розповсюдженими патогенами в умовах відкритого ґрунту на представниках вищезазначеної родини у багатьох країнах світу [17, 39]. На відміну від вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка, який є видоспецифічним і уражує переважно представників родини Cucurbitaceae, дані віруси мають широку спеціалізацію і інфікують не лише різні види рослини в межах певної родини, а і представників з абсолютно різних родин [11].

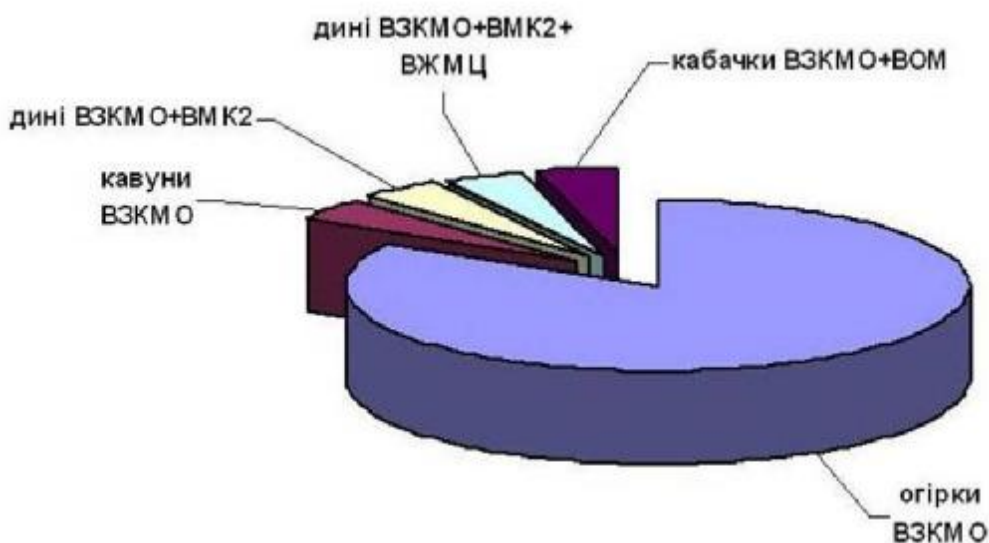


Рисунок 6.7 - Розподіл моно- та змішаної інфекції серед симптоматичних зразків гарбузових рослин, уражених CGMMV

В останні роки дані вірусні патогени набули значного розповсюдження в агроекологічних умовах нашої країни. Ми регулярно виявляли ВМК 2, ZYMV та CMV в умовах відкритого ґрунту на гарбузових культурах. Таким чином, для більш чіткого розуміння стану поширення вірусних захворювань рослин родин гарбузових в умовах відкритого ґрунту України, огірки, кабачки, гарбузи, патісони, цукіні, дині та кавуни ми аналізували не лише на наявність CGMMV, а і на інші, розповсюджені в агроценозах України віруси.

Стосовна рослин родини Brassicaceae значна частина (22%) проаналізованих рослин, що були інфіковані вірусом мозаїки турнепсу, також містила антигени вірусу огіркової мозаїки (CMV), що узгоджується з результатами інших дослідників. Зокрема, було показано, що TuMV здатний стимулювати реплікацію CMV [278, 279], комплементувати системний транспорт дефектних штамів цього вірусу [280] та викликати більш суворі симптоми на рослинах *Nicotiana benthamiana* у випадку змішаної інфекції.

Отже, CMV зустрічався у коінфекції з вірусом жовтої мозаїки цукіні та вірусом мозаїки кавуна-2, викликаючи при цьому сильніший прояв симптомів та з TuMV. ТоMV зустрічався у коінфекції з Y-вірусом картоплі та CMV(рис 6.8).

Згідно результатів дослідження, з досліджуваних вірусів найпоширенішим є CMV, що може бути спричинене тим, що на відміну від ZYMV та WMV-2, CMV здатен передаватись не лише попелицями, а й повітицею та через інфіковане насіння. Крім того, існують докази взаємодії CMV з представниками родини *Potyvirus*, згідно яким, при змішаній інфекції в деяких рослинах титр CMV буде зростати, порівняно з моноінфекцією, а титр другого збудника залишатиметься незмінним, що збільшує рівень векторної трансмісії CMV.

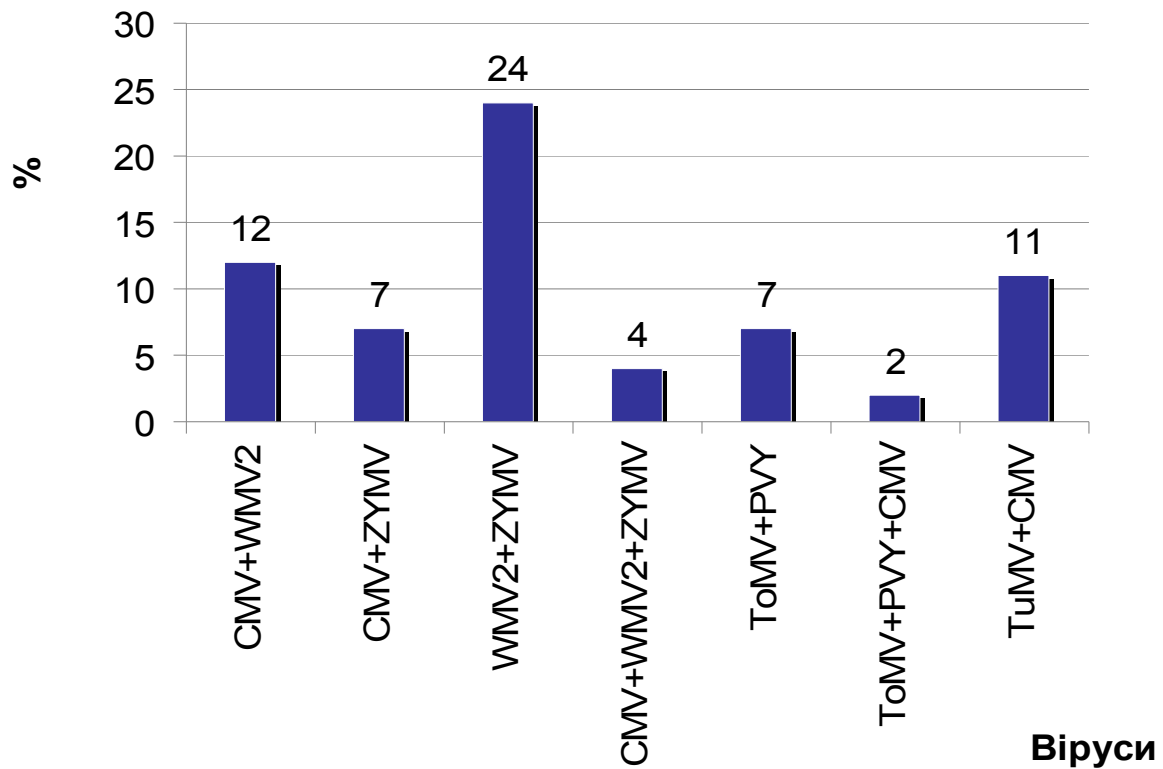


Рисунок 6.8 - Різноманіття та частота виявлення змішаних вірусних інфекції овочевих культур

Широка розповсюдженість ZYMV на досліджуваній території може бути пояснена тим, що попри досить вузьке коло хазяїв, вірус не викликає важких симптомів на рослинах, що не належать до родини *Cucurbitaceae*, а отже, може зберігатись в природних резервуарах непоміченим.

Враховуючи, на скільки у WMV-2 широке коло хазяїв, для нього більш вигідним може бути перехід на інших хазяїв, аніж конкуренція з ZYMV, котрий маючи сильно обмежену здатність розмножуватись в рослинах, що не належать до родини *Cucurbitaceae*, вимушений більш агресивно утримувати свою нішу.

Висока поширеність CMV та ZYMV в сумі з помірною кількістю змішаних інфекцій та описаними випадками синергізму між збудниками, може свідчити про наявність чинників, що обмежують їх поширення. Можливо одним з цих чинників є той факт, що гарбузові є однорічними

рослинами: при потраплянні в нову екологічну нішу кількох вірусів одночасно, на початкових стадіях епіфітотії, коли наявна велика кількість потенційних хазяїв, ще не уражених жодним збудником, імовірність розвитку змішаних інфекцій є вкрай низькою, але з часом зростає в міру зменшення кількості не інфікованих рослин, тобто кожного року епідемічний спалах починається з початку. Однак точно можна сказати, що як на рівні організму так і на рівні екосистеми важливу роль відіграють видо- та штамоспецифічні особливості репродукції CMV та ZYMV та видо- і сортоспецифічні особливості захисних механізмів інфікованої рослини.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах:
[281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288,289]

РОЗДІЛ 7

НАСІННЯ ЯК ОДНЕ З ДЖЕРЕЛ ВІРУСІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ

7.1 Тестування насіння овочевих культур родини *Solanaceae* на вірусносієство

Багато вірусів рослин здатні передаватись за допомогою насіння, забезпечуючи собі таким чином розповсюдження на далекі відстані [11, 75, 185]. На культурі перцю солодкого зареєстровано близько 35 вірусів, більшість з яких передається попелицями. Інші віруси, що уражують перець, переносяться нематодами, трипсами, цикадками, білокрилками, жуками, грибами, насінням, а також при контакті рослин та через ґрунт [11]. Втрати врожаю перцю солодкого у тепличних господарствах та на полях від вірусних інфекцій є досить значними. Віруси, що уражують дану культуру, індукують різноманітні симптоми: мозаїку, крапчастість, некрози та деформацію листків. З економічної точки зору врожаї перцю солодкого часто є низькими і нестабільними, і причиною цього є саме вірусні хвороби, що призводять до низької урожайності і погіршення якості плодів [54]. Часто на листових пластинках рослин спостерігається слабкий прояв симптомів, а тому хвороба залишається непомітною впродовж тривалого часу. Як результат, віруси можуть передаватися на сусідні поля, а відсоток уражених рослин перцю різко збільшується [223]. На сьогодні в Україні в умовах відкритого і закритого ґрунту вирощують понад 18 сортів перцю солодкого. Більшість вірусів, що уражують культуру перцю солодкого, досить ефективно передається насінням. Зважаючи на це, особливу увагу потрібно приділяти передпосівному обстеженню насіння з подальшим знешкодженням вірусних патогенів у разі їх виявлення. Таким чином, вчасна діагностика вірусних інфекцій

дасть можливість провести обробку як інфікованого насіння, так і рослин і, як наслідок, запобігти втратам урожаю [54].

Сучасний стан розвитку обміну товарними продуктами та насіннєвим матеріалом демонструє можливості розповсюдження нових штамів (або навіть видів) збудників вірусних захворювань рослин до нових екологічних ніш, що свідчить про необхідність постійного моніторингу та контролю видового та штамового різноманіття вірусів, які здатні уражувати *Lycopersicon esculentum*. Для Східної Європи найбільш шкочочинними для томатів вважаються ToMV, TMV, PVY, TAV, CMV та РММoV. В Україні час від часу проводяться дослідження окремих вірусів, які приводять до значного зниження врожаю або викликають раніше неописані симптоми на *Lycopersicon esculentum* [290], однак системних досліджень різноманітності та поширеності вірусних хвороб томатів до цього часу проведено не було.

Зразки насіння овочевих культур родин *Solanaceae* та *Cucurbitaceae* аналізувалися на наявність антигенів наступних семи вірусів:

- *Zucchini yellow mosaic virus* – вірус жовтої мозаки цукіні
- *Cucumber green mottle mosaic virus* – вірус жовтої крапчастої мозаїки огірку
- *Cucumber mosaic virus* – вірус огіркової мозаїки;
- *Tomato mosaic virus* – вірус мозаїки томату;
- *Tobacco rattle virus* – вірус погрімковості тютюну;
- *Tomato ringspot virus* – вірус кільцевої плямистості томатів;
- *Pepper mild mottle virus* – вірус слабкої крапчатості перцю

У ході досліджень було проаналізовано 8 сортів насіння *Capsicum annuum* та 8 сортів насіння *Lycopersicon esculentum* на предмет контамінації вірусними патогенами, типовими для даних культур.

Нами було проаналізовано насіння перцю овочевих сортів «Айвенго», «Юпітер», «Антей», «Золотий фазан», «Лагідний», «Подарунок

Молдови», «Black diamond», «Дружок» і показано, що усі вище зазначені сорти містили вірусні антигени. Переважно, це були моноінфекції представлені вірусом огіркової мозаїки та вірусом мозаїки томату. Однак, ми виявили і змішану інфекцію вірусу огіркової мозаїки і вірусу м'якої крапчастості перцю (рис.7.1).

Окрім зразків насіння культурних рослин *Capsicum annuum* було протестовано насіння *Lycopersicon esculentum*.

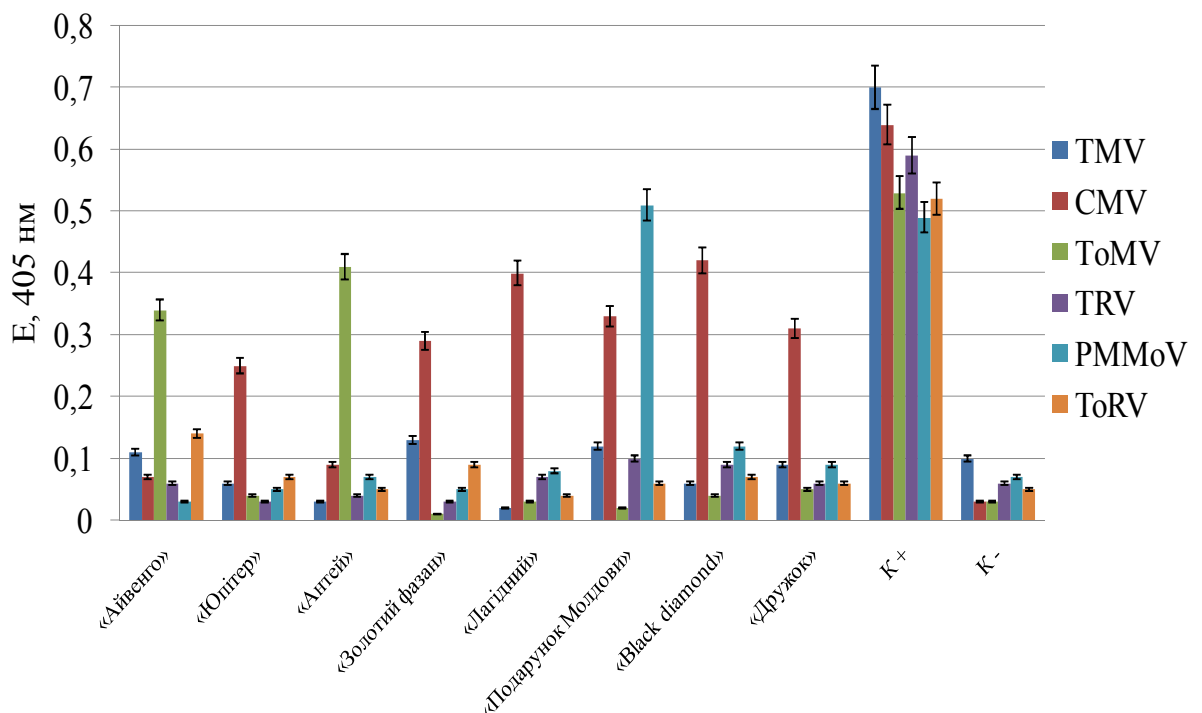


Рисунок 7.1 - Результати тестування насіння перцю різних сортів методом ІФА на наявність вірусних антигенів

З восьми сортів насіння томатів «Жеронімо F1», «Домашній», «Ляна», «Волгоградський», «Сливка», «Алькасар F1», «Гібрид Тарасенка», «Волинський», що підлягало аналізу, половина зразків була вірусифікованою (рис.7.2). На відміну від перцю солодкого, у зразках томатів не виявляли змішану інфекцію, та і видове різноманіття вірусів було значно вужчим. У основному детектували вірус огіркової мозаїки і вірус погремковості тютюну у одному із зразків.

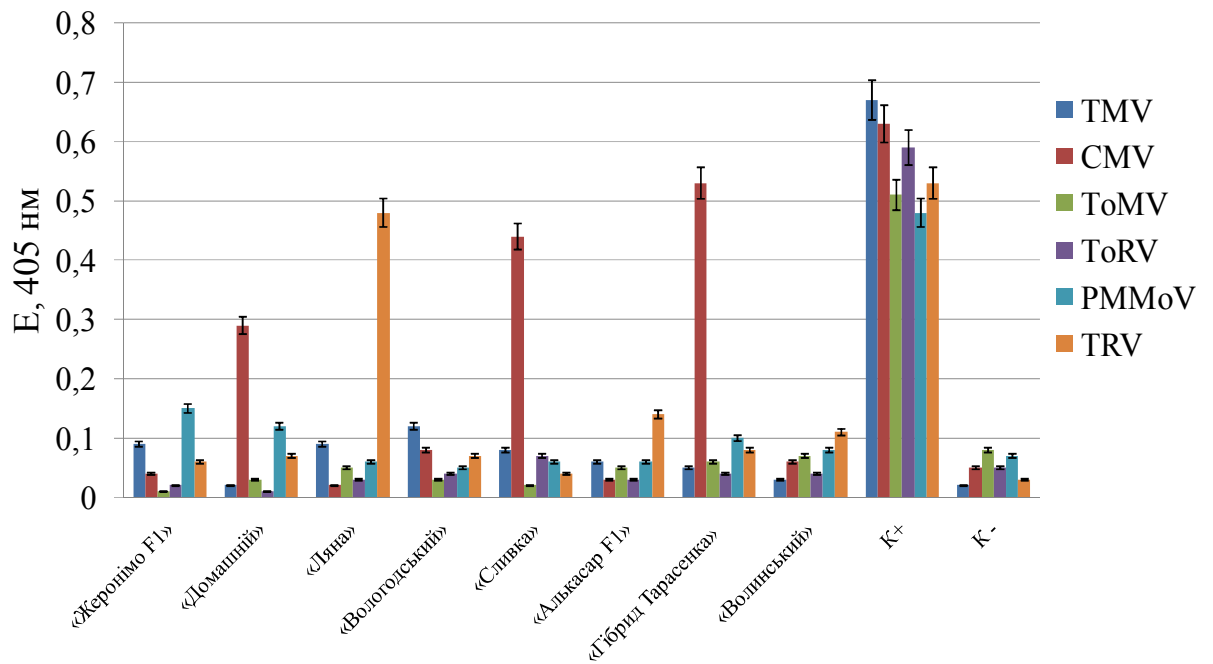


Рисунок 7.2 - Результати тестування насіння томату різних сортів методом ІФА на наявність вірусних антигенів

Таким чином, у насіннєвому матеріалі перцю та томатів було виявлено чотири види вірусів, а саме вірус мозаїки томату, вірус м'якої крапчастості перцю, вірус огіркової мозаїки та вірус погремковості тютюну (рис.7.3).

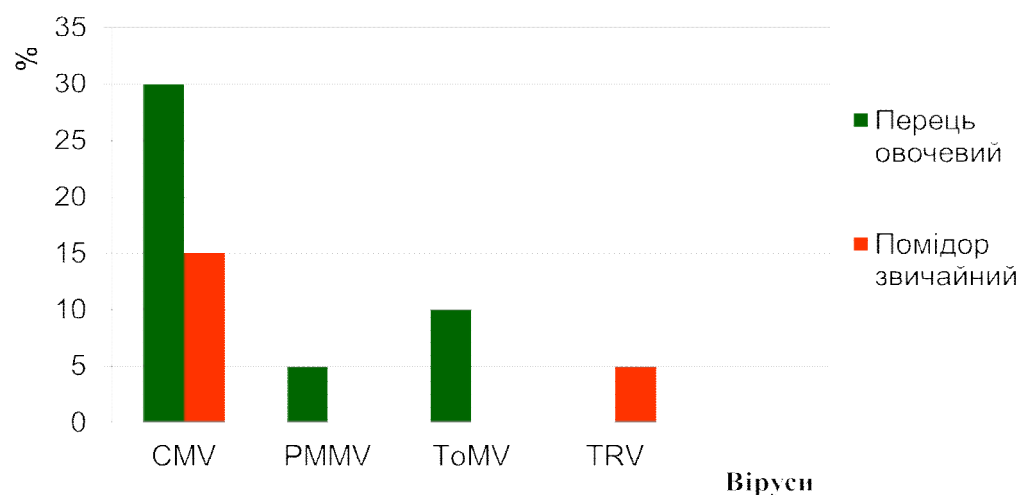


Рисунок 7.3 - Узагальнені результати тестування комерційного насіння рослин родини *Solanaceae* на наявність вірусних антигенів

Необхідно зазначити, що вірус м'якої крапчастості перцю (РММoV) є новим патогеном для агроценозів України. Уперше РММoV було виявлено нами в умовах відкритого ґрунту на рослинах перцю у Полтавській області. Симптоми захворювання проявлялись у вигляді жовто-зеленої мозаїки, деформації листкової пластинки, а також локального некротичного ураження та антоціанового забарвлення шкірки плоду. Оскільки насінневий шлях передачі є єдиним можливим шляхом поширення для даного вірусу, то можна стверджувати, що РММoV на український ринок був занесений саме з вірусінфікованим комерційним насінням.

Такі дані безсумнівно мають значний практичний інтерес – на основі цих даних стає можливим створювати власні сучасні діагностичні тест-системи та застосовувати їх для створення стійких сортів.

7.2 Перевірка насіння *Cucurbitaceae* на присутність CGMMV

За літературними даними CGMMV дуже ефективно передається насінням: вірус міститься на верхній частині плівки насіння і його передача потомству відбувається внаслідок травмування тканини паростків, куди й потрапляє інфекція [164]. Саме завдяки вірусконтамінованому комерційному насінню, обмін яким відбувається при експортно-імпортних відносинах, вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка подолав міжконтинентальні бар'єри і на сьогодні являється одним із самих розповсюджених вірусів у світі [109].

У своїх дослідженнях ми також проводили перевірку різних сортів комерційного насіння на наявність CGMMV і встановили, що лише незначна його кількість була контамінована вірусними антигенами (табл. 7.1).

Таблиця 7.1 - Результати перевірки насіння різних сортів рослин родини *Cucurbitaceae* на наявність CGMMV

Фірма-виробник	Вид рослини	Сорт рослини	E405, о.о.	Наявність CGMMV
№1	Диня	Леся		–
		Тітовка		–
		Ананас		–
	Кавун	Кримсон світ		–
		Чальстон Грей		–
	Огірок	Парад		–
		Лялюк		–
		Паризький корнішон		–
		Кустовий		–
		Ізид F1		–
№2	Кавун	Орфей		–
		Огірок	Засолочний-65	
		Далекосхідний 27		–
		Міг		–
		Ізяцний		–
		Голубчик		–
№3	Диня	Колхозниця		–
		Золотістая	0,325±0,005	+
	Кавун	Огоньок		–
	Кабачок	Грибовський		–
	Огірок	Лялюк		–
	Джерело		–	
№4	Кавун	Огоньок		–
		Фотон		–

Фірма-виробник	Вид рослини	Сорт рослини	E405, о.о.	Наявність CGMMV
	Кабачок	Іскандер		–
		Скворушка		–
	Диня	Тітовка		–
	Огірок	МашаF1		–
		АстеріксF1		–
		АмурF1		–
		МаріндаF1		–
		МатільдаF1		–
		АтлантикF1		–
		КарінF1		–
		АнулькаF1		–
		ФеніксF1		–
		ЛьошаF1		–
		Апоміксис Коняєвих		–
№5	Диня	Дідона		–
	Кавун	Таврійський		–
№6	Цукіні	Скворушка		–
	Кавун	Сахарний малиш		–
№7	Диня	Дубовка		–
		Медовий аромат		–
	Кавун	Ультраскоростиглий		–
№8	Огірок	Регія F1		–
		Отелло F1		–
№9	Огірок	Малиш F1	0,256±0,008	+
		Парад	0,234±0,006	+

Фірма-виробник	Вид рослини	Сорт рослини	E405, о.о.	Наявність CGMMV
		Водограй	0,348±0,011	+
		Лялюк	0,280±0,008	+
		Кустовий	0,410±0,014	+
		Засолочний	0,560±0,012	+
		Фенікс	0,640±0,011	+
		Паризький корнішон	0,520±0,018	+
		Джерело	0,604±0,014	+
		Ніжинський		–
		Закусочний		–
№10	Огір ок	Сквирський F1		–
		СМФ		–
		ДС-27		–
		Левадний		–
		Лінія П1		–

Отже, було протестовано більше шестидесяти сортів насіння огірків, кабачків, цукіні, динь та кавунів десяти різних комерційних фірм. Результати ІФА показали наявність CGMMV у насінні огірків, що належало фірмі №9 та насінні дині «Золотиста» фірми №3.

Так, з шестидесяти трьох сортів насіння, десять виявилися вірусконтамінованими, що становить 16% від загальної кількості перевіреного насіння. Отже, нами було показано, що на сьогодні в Україні комерційне вірусконтаміноване насіння може бути цілком ймовірною причиною появи вірусного захворювання на рослинах родини гарбузових.

7.3 Встановлення насіннєвої передачі ZYMV

Широке розповсюдження ZYMV у всьому світу піднімає питання про його способи поширення та збереження в той час, коли сприйнятливі культивовані гарбузяні культури не вирощуються.

До сих пір було виявлено дуже мало потенційних резервуарів вірусу, хоча в експериментальних умовах були зареєстровані інфікованими деякі бур'яни (*Ranunculus sardous*, *Lamium amplexakule*) або сільськогосподарські культури (*Sesamum indicum*). Для ZYMV було встановлено, що вірус може передатися насінням з механічно заражених *Ranunculus sardous*. ZYMV був ізольований з дикого багаторічного представника *Cucurbitacea* - *Melothria pendula* в Флориді. Деякі дикі види рослин також були інфіковані ZYMV в США або Судані. У Йорданії *Moluccella laevis* був описаний як природний резервуар ZYMV [173].

До теперішнього часу в помірних регіонах не було виявлено природних резервуарів ZYMV. Для перезимування вірусу важливу роль може відігравати розширення періоду культивування Гарбузових з розвитком тепличних господарств в Середземноморському басейні. За цих умов ранні саджанці можуть зростати поряд з пізньо інфікованими культурами. У пустельних долинах Каліфорнії джерела ZYMV були чітко визначені як старі гарбузяні культури, що вижили в житлових районах [175].

Як тільки ZYMV потрапляє до однієї рослини на певній посадковій площі, його поширення на решту поля, як правило, є дуже швидким. Це може статися з поширенням інших вірусів, що переносяться попелицями. Нещодавнє дослідження показало, що не колонізуючі попелиці (наприклад, *A. craccivora*) мали як підвищену ефективність передачі, так і вищу схильність до поширення ZYMV, ніж *A. gossypii*, який колонізує гарбузові [23,27].

Незважаючи на те, що потівіруси переносяться попелицями, не переселюючи у них, у 30-годинний період після потрапляння вірусу до *M. persicae* і 10-20-годинний після потрапляння до *A. gossypii* спостерігається рівень трансмісії ZYMV у 1%. Це може сприяти дальньому розповсюдженню вірусу у тілі попелиці, що розноситься вітром [13, 23, 191].

Іншим фактором, який може сприяти швидкому поширенню ZYMV, є передача насінням [174]. Багато вірусів рослин здатні передаватись за допомогою насіння, забезпечуючи собі таким чином розповсюдження на далекі відстані. Такий тип розповсюдження полегшується також глобалізацією та жвавим обміном товарами між різними країнами і континентами.

Передача ZYMV за допомогою насіння залишається дискусійним питанням, адже в залежності від виду рослини-хазяїна та методу дослідження різні групи вчених виявляли різний відсоток передачі даного вірусу або взагалі спростовували його передачу за допомогою насіння.

В Україні ізоляти ZYMV, які здатні передаватись за допомогою насіння, не виявлялись. Вперше в Україні нами було виявлено один ізолят, який здатний передаватись за допомогою насіння, – ZYMV-14P. Даний ізолят походить із агроценозу в Полтавській області. Було відібрано насіння з інфікованого гарбуза та висаджено в ґрунт у теплицю, вільну від попелиць (для унеможливлення передачі вірусу іншими шляхами окрім насінневим).

На деяких рослинах, отриманих із насіння інфікованого гарбуза, через чотири тижні після висадження в ґрунт спостерігали симптоми, характерні для ZYMV: нетипова деформація у вигляді нитковидності листової пластинки. Крім того спостерігали темно-зелену плямистість та мозаїку (рис. 7.4).

Загалом із 154 рослин на 4 проявились симптоми, притаманні ZYMV. Потім наявність антигенів була підтверджена за допомогою ІФА в модифікації «сендвіч» та ЗТ-ПЛР

Таким чином, частота передачі ізоляту ZYMV-14P за допомогою насіння становить 2,6%. За літературними даними, частота передачі вірусу варіює в межах 0 до 18.9% [186].

За літературними даними ZYMV у насінні міститься у тканинах навколо ембріона і на насінневій шкірці, при чому кількість вірусних часточок на насінневій шкірці у рази більше [186].

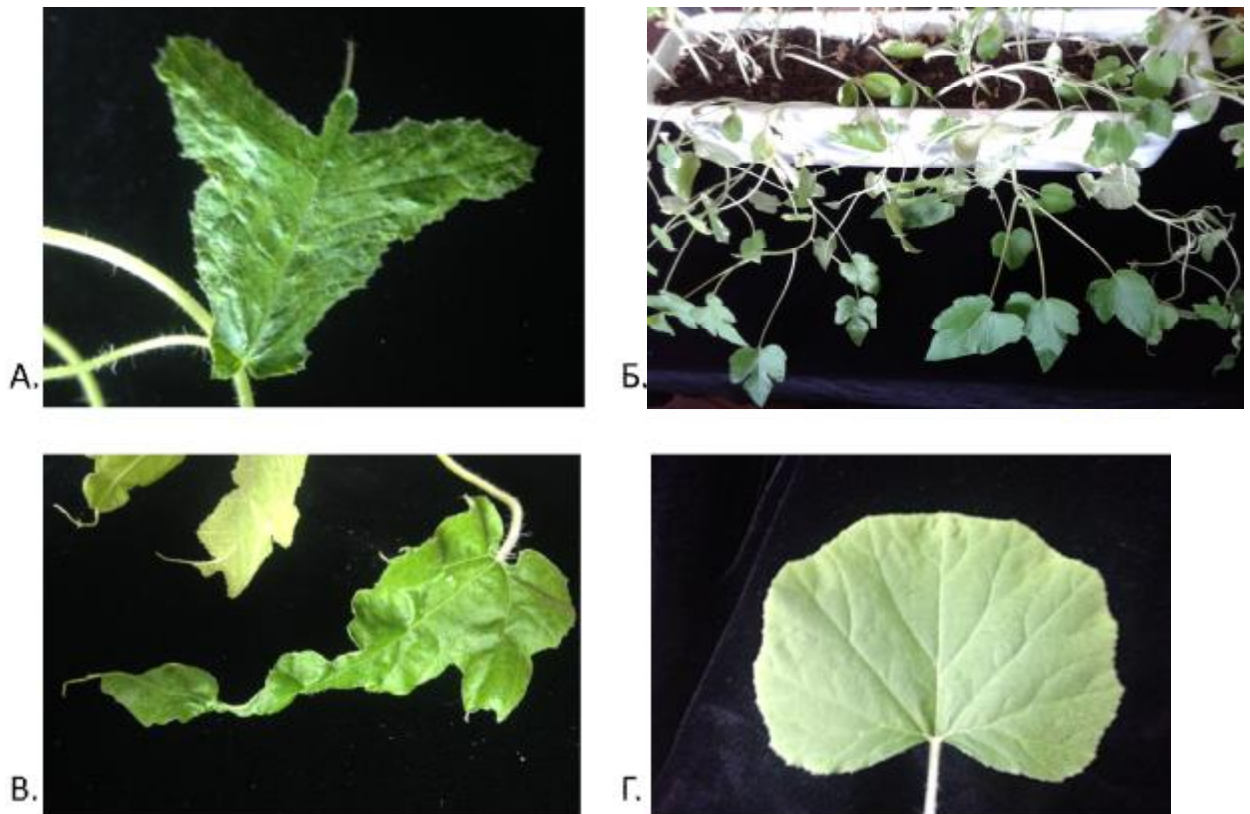


Рисунок 7.4 - Симптоми на рослинах, отриманих із насіння кабачка, інфікованого ZYMV-14P: А. Плямистість листкової пластинки; А-В. Деформація листкової пластики; Г. Контрольна рослина

Для профілактики насіннєвої передачі ZYMV потрібно обробляти насіння перед висадженням у ґрунт, для знищення вірусних часточок на поверхні насінини. Також потрібно враховувати той факт, що кількість насіння, що утворюється на ураженій рослині є значно меншою. При цьому схожість насіння є нижчою, а кількість ізолятів, які передаються насінням у достатньому титрі для провокування епідемій, обмежена [174].

У будь-якому випадку наявність таких ізолятів вказує на необхідність контролю якості насіння на території нашої держави, особливо того, що приходить із-за кордону, адже близько 20% вірусів рослин передається насінням [11]. Дана профілактика дозволить попередити проникнення високопатогенних штамів на територію нашої країни та розвиток епіфітотій.

Надалі було вирішено приділити особливу увагу вивченню біологічних та молекулярних властивостей ізоляту ZYMV, який здатний передаватись насінням.

При дослідженні біологічних властивостей виявлених ізолятів було використано наступні рослини: кабачки (*Cucurbita pepo*), квасоля (*Phaseolus vulgaris*), тютюн (*Nicotiana rustica*) та огірки (*Cucumis sativus*).

Види рослин-індикаторів -	Симптоми
кабачок (<i>Cucurbita pepo</i>) -	деформація листків, засихання країв листкової пластинки, в'янення листків та їх засихання
квасоля (<i>Phaseolus vulgaris</i>) -	локальні хлорози і некрози
тютюн (<i>Nicotiana rustica</i>) -	скручування країв листкової пластинки
огірок (<i>Cucumis sativus</i>) -	безсимптомна інфекція

Інфекція була підтверджена за допомогою ІФА у модифікації «сендвіч».

На огірках (*Cucumis sativus*) спостерігали безсимптомну інфекцію, при цьому ІФА виявив присутність антитіл ZYMV.

Загалом, виявлений ізолят не проявляли високої патогенності на рослинах-індикаторах.

Проведено електронну мікроскопію вірусного препарату, отриманого з рослини, ураженої ZYMV-14P, та виявлено ниткоподібні часточки довжиною 750±5нм (рис. 7.5).

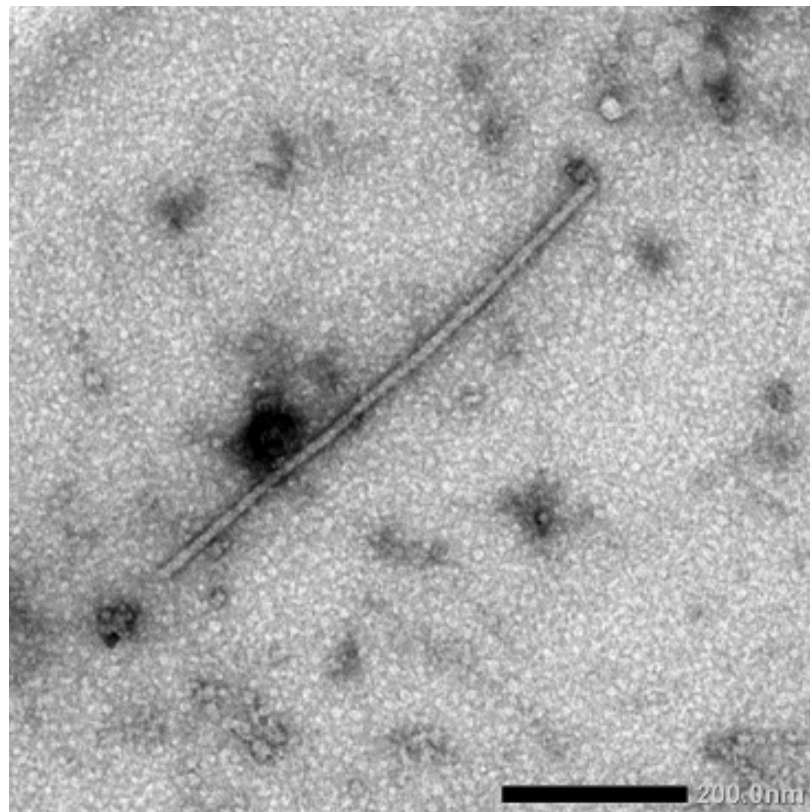


Рисунок 7.5 - Електронномікроскопічне зображення ізоляту ZYMV-14P

Згідно з літературними даними віріони такого розміру та морфології належать ZYMV [11].

Кілька експериментів, які проводилися в різних лабораторіях з суперечливими результатами щодо можливості передавання вірусу через насіння. С. Шрїйнверкерс та ін. [294] показав, що ZYMV був переданий

насінням у *C. pepo*, хоча і з дуже низькою ефективністю. ZYMV, можливо, залишаються на зовнішній оболонці насінини, тому інфекція може виникати за проростання насіння. ZYMV-інфіковані рослини зазвичай виробляють дуже мало життєздатного насіння, але навіть невелика кількість насіння, яке може передати вірус, може забезпечити первинне ураження врожаю, яке є достатнім для ініціювання руйнівних епідемій [173, 174]. На сьогодні немає відомостей про передачу вірусу насінням для *C. melo* або *C. sativus*.

Отже, узагальнюючи дані по насінні рослин родини *Cucurbitaceae*, встановлено, що антигени трьох вірусів (рис. 7.6) здатні передаватись за допомогою насіння, забезпечуючи собі таким чином розповсюдження на далекі відстані.

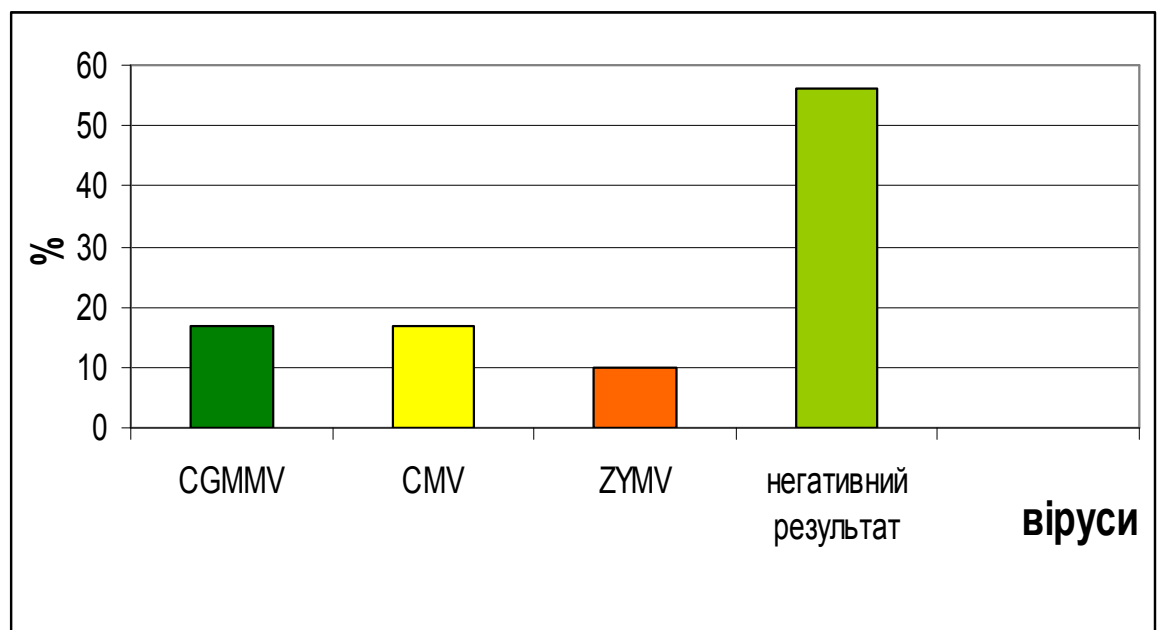


Рисунок 7.6 - Узагальнені результати тестування комерційного насіння рослин родини на наявність вірусних антигенів

Таким чином, аналізуючи отримані результати, було встановлено, що насіння овочевих культур є одним із важливих джерел вірусів в екосистемах.

В умовах України насіннєвий спосіб передачі є актуальним для CGMMV, ToMV та CMV, і потребує відповідного контролю. Особливо небезпечною є передача насінням вірусів із широким колом рослин-хазяїв, а саме CMV та ToMV.

Передача ZYMV за допомогою насіння залишається дискусійним питанням, адже в залежності від виду рослини-хазяїна та методу дослідження різні групи вчених виявляли різний відсоток передачі даного вірусу або взагалі спростовували його передачу насінням.

Вперше в Україні виявлено здатність ZYMV передаватися за допомогою насіння кабачка. Частота передачі ізоляту ZYMV-14P за допомогою насіння становить 2,6%. Отже, встановлено нове джерело ZYMV при циркуляції на території України.

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах:[295, 296, 297, 298, 299, 300, 301].

РОЗДІЛ 8

МОЛЕКУЛЯРНО-ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ

8.1 Філогенетичний аналіз ізолятів *Watermelon mosaic virus 2*

Вірус мозаїки кавуна-2 (WMV-2) - представник роду *Potyvirus* родини *Potyviridae* [32]. WMV-2 широко поширений по всій земній кулі. Здатний вражати 160 видів дводольних рослин з 23 родин. WMV-2 викликає різноманітні мозаїки і крапчастість на овочевих культурах, спричинює зниження якості плодів. Зниження врожаю у випадку епіфітотії WMV-2 досягає, по даним різних авторів, від 19 до 73% і залежить від строків інфікування рослин. Якщо зараження вірусом проходить в перші 10 днів, то плоди не утворюються, а втрати врожаю складають 100% [16]. Безперервний моніторинг даного вірусного захворювання в межах держави та аналіз циркулюючих ізолятів вірусу дозволять попередити розвиток епідемій, проникнення нових штамів на територію України та виникнення більш патогенних ізолятів.

У агроценозах України вірусні збудники мозаїчного захворювання овочевих культур є чи не найголовнішою причиною значних втрат урожаю. На представниках родини Гарбузових (*Cucurbitaceae*), до яких належать огірки, кабачки, гарбузи, цукіні, кавуни та дині, останні 12 років активно циркулює вірус мозаїки кавуна 2 (*Watermelon mosaic virus 2*, WMV 2), що належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae* [16].

Даний патоген не є новим видом для нашої країни. Уперше вірус було виявлено на рослинах родини *Cucurbitaceae* у кінці 70-х років [256]. На той час вірус мозаїки кавуна 2 (ВМК 2) був найбільш поширеним збудником мозаїчних захворювань баштанних культур в Україні. Він уражував, в основному, кавуни, дині, кабачки, гарбузи, а кількість інфікованих рослин при цьому досягала 50 – 90%. На рослинах визначали

моноінфекцію ВМК 2 та змішану інфекцію, зазвичай представлену ВМК 2 і вірусом огіркової мозаїки (СМV) [257].

У 2005 році вірус мозаїки кавуна 2 було виявлено нами у агроценозах відкритого ґрунту на культурах огірків, кабачків, гарбузів та цукіні. Наші попередні дослідження показали, що на території України ВМК 2 зустрічається лише на рослинах відкритого ґрунту, головним чином на кабачках, гарбузах, цукіні, динях і огірках. Окрім моноінфекції, ВМК 2 часто циркулює у вигляді змішаної інфекції, зазвичай представленої сумішшю вірусів огіркової мозаїки, вірусу жовтої мозаїки цукіні (ZYMV) та вірусу пожовтіння огірка, що передається попелицями (ВПО).

На рослинах родини Гарбузових ВМК 2 індукує різні симптоми, залежно від ізоляту вірусу та сорту рослин. На листках рослин вищезазначений вірус викликає симптоми мозаїки, пухирчасті здуття, появу смуг вздовж жилок та різноманітні деформації аж до нитковидності листкової пластинки. На вірусінфікованих плодах рослин спостерігається яскраво виражена деколоризація і слабка деформація. Вірус передається неперсистентно щонайменше 35 видами попелиць з 19 родів, з соком рослин при механічному контакті [32].

За результатами наших попередніх досліджень [262] вірус мозаїки кавуна 2 циркулює у агроценозах України зі змінною періодичністю. При активації розвитку вірусної інфекції кількість хворих рослин та відсоток їх ураження різко збільшується, що в свою чергу призводить до отримання низькоякісної продукції та значних втрат урожаю.

Оскільки вірус мозаїки кавуна 2 – патоген широко розповсюджений у світі, важливо проаналізувати спорідненість українських ізолятів з уже відомими ізолятами і штамми вірусу та з'ясувати можливі шляхи походження українських ізолятів. Адже встановлення штамової та групової приналежності українських ізолятів ВМК 2, вивчення їх генетичної різноманітності та філогенетичних взаємозв'язків з іншими штамми та ізолятами ВМК 2 допоможе попередити розвиток епіфітотій,

проникнення нових штамів вірусу на територію України та виникнення більш патогенних ізолятів ВМК 2.

Зважаючи на все вищесказане, метою роботи було встановлення філогенетичної спорідненості українських ізолятів ВМК 2, виділених із рослин кабачків, з відомими штамми та ізолятами ВМК 2, шляхом порівняння нуклеотидної послідовності гену капсидного білка віріона (табл. 8.1).

Таблиця 8.1 - Перелік українських ізолятів WMV-2

Ізолят, номер Genbank	Група	Хазяїн	Симптоми	Регіон
2G (KJ461320)	G1	Гарбуз (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	Темно- зелена мозаїки вздовж жилок	Полтавська область
4К (KJ461321)	G1	Гарбуз (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	Темно- зелена мозаїки вздовж жилок	АР Крим
3ch	G1	Цукіні	Темно-зелена мозаїки вздовж жилок	Черкаська область
4ch	G1	Цукіні	Темно-зелена мозаїки вздовж жилок	Черкаська область
WMV 21	G1	Цукіні	Зелена мозаїка, нитковидність	Полтавська область
WMV 63	G1	Огірок (<i>Cucumis sativus L.</i>)	Темно-зелена крапчатість	Чернігівська область

Слід відмітити, що для вивчення генетичної різноманітності потівірусів, найбільш часто використовують ген, що кодує капсидний білок [224, 225]. З огляду на це, ступінь дивергенції між штамми і ізолятами ВМК 2 ми аналізували саме за його нуклеотидною послідовністю.

Біологічні властивості вірусів вивчали за допомогою методу біологічного тестування.

Найпоширенішими симптомами ураження на WMV-2 є системна мозаїка, деформація листя, локальні хлорози та некрози. В деяких випадках хвороба протікає в латентній формі.

Для вивчення біологічних властивостей WMV-2, нами проводилося біологічне тестування на 14 сортах рослин, 5 фірм: «Насіння України», «Шість соток», «Радомир», «Васма Рітейл», «Насіння НК». Фірми деяких рослин були невідомі.

Загалом, як рослини-індикатори, було використано сорти рослин, 2 з яких – кавуни, 2 – гарбузи, 2 – дині, 2 – тютюн, 1 – кабачок, 1 – горох, 1 – квасоля, 1 – люпин, 1 – огірок, 1 – соя.

Перед висадкою в ґрунт, насіння оброблялося розчином перманганату калію.

Для вивчення біологічних властивостей ізолятів WMV-2 на рослинах-індикаторах були використані зразки, що позитивно реагували з тест - системою до WMV – 2 в ІФА.

Інфікування проводилося шляхом механічного пошкодження листової пластинки та нанесення на місце пошкодження концентрованого вірусного препарату.

У результаті біологічного тестування були отримано симптоми на рослинах квасолі, гороху, сої та гарбуза (табл. 8.2).

Таблиця 8.2 - Біологічне тестування WMV-2 на рослинах індикаторах

Рослина Ізолят	<i>Phaseolus coccineus</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Cucumis melo</i>	<i>Cucumis sativus</i>
2G	Поодинокі некрози	Без симптомів		Засихання краю листової	Засихання краю листової пластинки	
№ 3/12	Поодинокі некрози	Без симптомів	Без симптомів	Засихання краю та скручування листової пластинки	Засихання краю листової пластинки	Без симптомів
№ 3/13	Пожовтіння	Засихання рослини	Засихання рослини	Засихання краю листової	Засихання краю листової пластинки	Без симптомів
№ 1	Пожовтіння	Засихання рослини	Засихання рослини	Засихання краю листової	Засихання краю листової пластинки	Засихання рослини
№ 8	Без симптомів	Без симптомів	Засихання рослини	Засихання краю та скручування	Засихання краю листової	Засихання рослини

Рослина Ізолят	<i>Phaseolus coccineus</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Cucumis melo</i>	<i>Cucumis sativus</i>
				листової пластинки	пластинки	
№ 9	Без симптомів	Без симптомів	Засихання рослини	Засихання краю та скручування листової пластинки.	Засихання краю листової пластинки	Без симптомів
№ 18	Пожовтіння	Без симптомів	Некрози	Засихання краю листової пластинки і засихання сім'ядолі листіків	Засихання краю листової пластинки	Без симптомів

Рослини з виявленими на них симптомами були зібрані для подальшої роботи. Встановлено, що біологічні властивості досліджуваних ізолятів для рослин *Pisum sativum* відрізнялися від вказаних в літературі, оскільки спостерігалася загибель рослини, а не описана в літературних даних системна мозаїка [33, 34].

Зважаючи на все вищесказане, метою роботи було встановлення філогенетичної спорідненості українських ізолятів WMV – 2, виділених із рослин кабачків, з відомими штамами та ізолятами WMV – 2, шляхом порівняння нуклеотидної послідовності гену капсидного білка віріона.

Для виділення тотальної РНК використовували рослини, які в імуноферментному аналізі позитивно реагували з тест-системою до WMV

– 2. Після візуалізації тотальної РНК проводили зворотньоотранскрипційну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ–ПЛР) зі специфічними праймерами до ділянки РНК, яка кодує капсидний білок французького штаму WMV-2–Fr [224, 225].

Дані праймери комплементарні ділянкам нуклеотидів 8926–8948 і 9727–9747 геному і ампліфікують фрагмент розміром 825 п.о., який відповідає гену капсидного білка вірусу .

У результаті ЗТ–ПЛР було отримано продукти ампліфікації розміром 825 п.о., аналогічні за розміром ділянці геному, яка кодує капсидний білок вірусу (рис. 8.1).

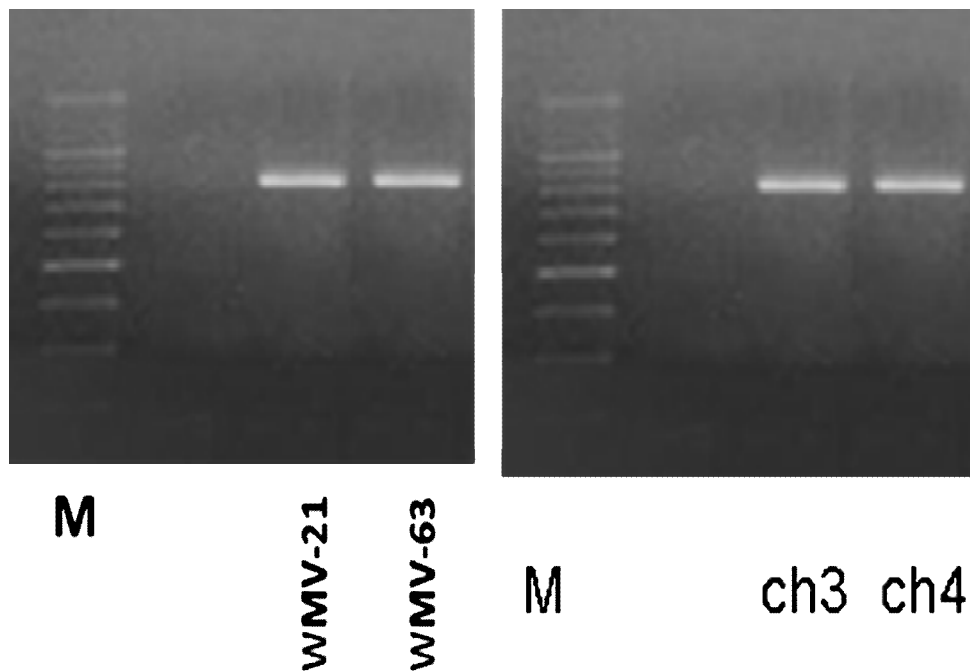


Рисунок 8.1 - Результати ЗТ-ПЛР продукту ампліфікації розміром 825 п.о. (праймери 100 п.о.)

Після сиквенування кДНК українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2 проводили порівняння сиквенованих нуклеотидних послідовностей капсидного білка українських ізолятів WMV 2–2g–Ukr і WMV 2–2k–Ukr між собою та з такими ж відомих штамів і ізолятів ВМК 2.

Послідовності штамів та ізолятів WMV-2 було взято з Генбанку [131]. Нами було проаналізовано ізоляти з Генбанку (табл. 8.3).

Штами WMV-2 можна розділити на 3 групи. До 1999 року у Франції переважали штами, які викликали слабкі симптоми, і не виявляли загрози для продукції гарбузових культур. Але починаючи з 2000 року у Південно-східній Франції почали детектувати емерджентні штами, які мали змінену патогенність, спричинювали розвиток симптомів більшої тяжкості. Дані штами є філогенетично віддаленими від класичних та відрізняються біологічними властивостями.

Подібність амінокислотних послідовностей гену капсидного білка між різними штамами WMV-2 становить більше 90%, не включаючи варіабельну N-кінцеву ділянку. При подібності менше 70% штами вважаються представниками різних видів [11].

Емерджентні та класичні штами уражують однакове коло хазяїв, також вони мають спільних резервуарів серед бур'янів (*C. bursa-pastoris*, *Senecio vulgaris*, *Lamium amplexicaule*) для переживання несприятливих умов [130].

Chenopodium quinoa може розвивати системну інфекцію лише при ураженні класичними штамами, в той час як *Ranunculus sardous* при ураженні емерджентними штамами розвиває системну інфекцію [130].

Перенесення за допомогою попелиць *M. persicae* варіює від 17% (для емерджентного ізоляту FMF00-LL1) до 70% (для класичного штаму C05-465). Хоча суттєвої різниці при підрахунку середньої ефективності перенесення за допомогою попелиць не виявлено, навпаки середні значення були подібними для класичних і емерджентних штамів [124].

Часто спостерігається коінфекція класичними та емерджентними ізолятами, що є нетиповим для вірусів впринципі, оскільки зазвичай емерджентні штами витісняють класичні. У випадку з WMV-2 штами-партнери взаємодіють один з одним, надаючи нових властивостей [125]. При дослідженні ефективності передачі за допомогою попелиць у різних

рослин було показано, що при змішаній інфекції загальна ефективність передачі залишається однаковою, хоча при змішаній інфекції вона дещо менша. В той же час ефективність передачі емерджентних ізолятів є вищою при змішаній інфекції, ніж при моноінфекції [137].

Для WMV-2, як і для всіх РНК-вмісних вірусів, характерна велика частота мутацій. Крім того, WMV-2 належить до одного з вірусів роду *Potyvirus*, для яких характерні рекомбінації геному [130]. Рекомбінації призводять до виникнення нових штамів [136, 137], які часто мають змінені властивості.

Таблиця 8.3 - Штами і ізоляти WMV-2 з Генбанку, які використовували у філогенетичному аналізі

Ізолят	Група	Хазяїн (якщо вказаний)	Номер	Країна
WMV-C06-526	G1	Диня (<i>Cucumis melo L.</i>)	JF273462	Франція
WMV-FMF00-LL2	G1		EU660578	Франція
WMV-ITA00-G	G1		EU660590	Італія
WMV-M116	G1		AF551334	Іспанія
WMV-MUR95.4	G1	Диня (<i>Cucumis melo L.</i>)	AJ579501	Іспанія
WMV-TUR91	G1		EU660579	Туреччина
WMV-C05-337	G1		EU660589	Франція
WMV-CHI02-481	G1		EU660582	Чилі
WMV-Tonga	G2		L22907	Тонга

Ізолят	Група	Хазяїн (якщо вказаний)	Номер	Країна
WMV-CHI87-620	G2		EU660580	Чилі
WMV-USA	G2		D13913	США
WMV-C06-188	G2		EU660587	Франція
WMV-New Zealand	G2		AY995215	Нова Зеландія
WMV-Lecce	G3	Кавун (<i>Citrullus lanatus L.</i>)	FJ823122	Італія
WMV-C05-270	G3		EU660585	Франція
WMV-FMF03-141	G3		EU660583	Франція
WMV-S96-6	G3	Огірок (<i>Cucumis sativus L.</i>)	AB693979	Японія
WMV-Habenaria	G3		AB001994	Японія
WMV-Watermelon	G3			Південна Корея
WMV-CHN	G3	Кавун (<i>Citrullus lanatus L.</i>)	DQ399708	Китай
WMV-Ch99/69	G3	Цукіні (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	EF127832	Китай
WMV-HLJ	G3		AY464948	Китай

На наступному етапі було побудоване філогенетичне дерево (рис. 8.2).

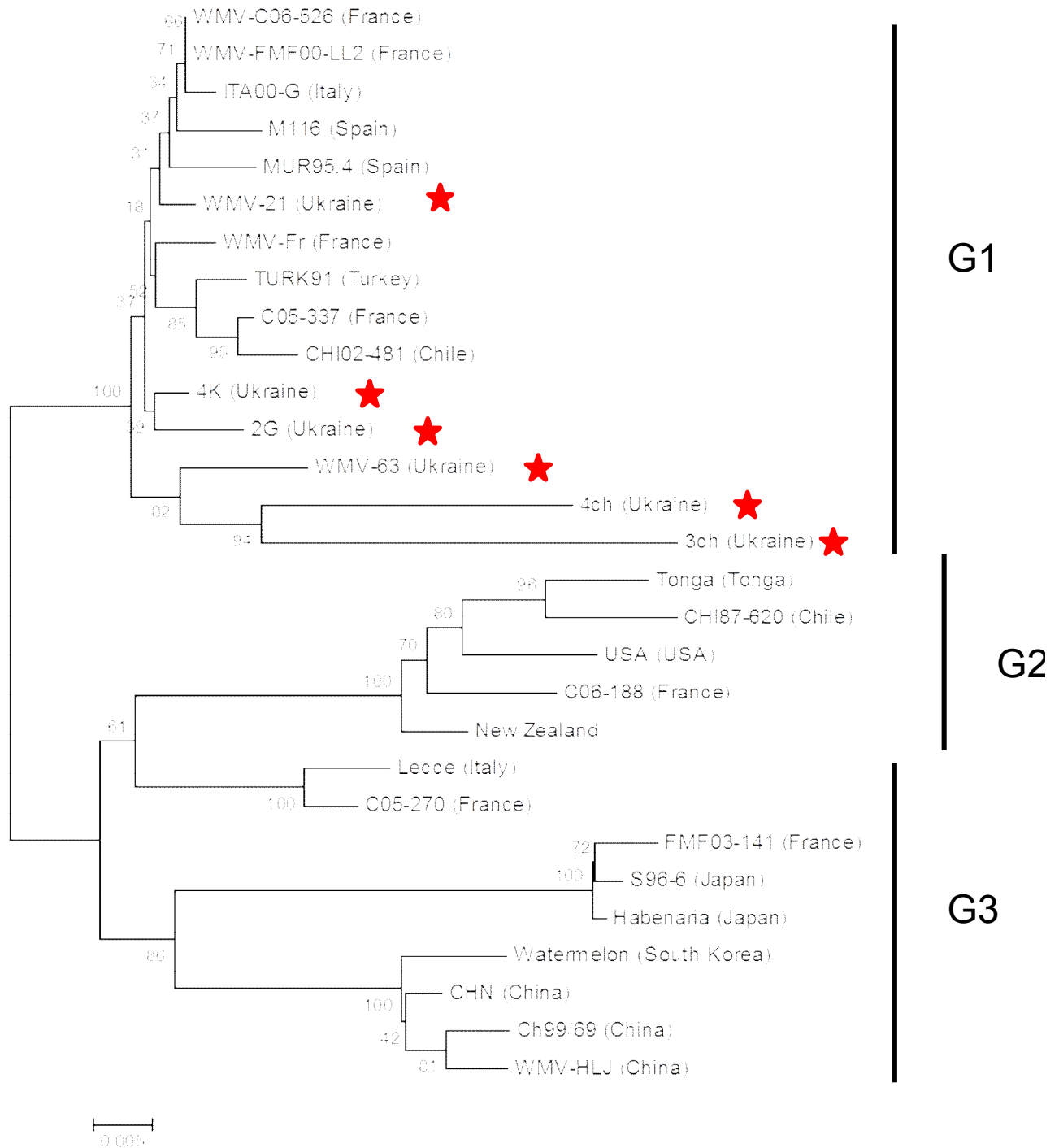


Рисунок 8.2 – Філогенетичні відносини ізолятів WMV-2. Дерево побудоване за геном капсидного білка методом NJ. Українські ізоляти виділені зірочками

Побудова філогенетичного дерева на основі нуклеотидних послідовностей ділянки геному Nib-CP методом найближчих сусідів за

допомогою моделі Джукса Кантора у програмі MEGA 7 дозволила згрупувати досліджувані штами і ізоляти ВМК 2 у три окремі кластери.

На філогенетичному дереві українські ізоляти були згруповані із ізолятами із групи G1. До цієї групи належать нерекомбінантні штами, розповсюджені на території Європи [16, 19, 130]. Ізоляти WMV-3ch та WMV-4ch утворювали гілку, відокремлену від інших представників групи G1 значною генетичною відстанню.

Подібність українських ізолятів варіювала у діапазоні 95-99% (табл. 8.4). Висока подібність спостерігалася між ізолятами WMV-21w, WMV-63w, WMV-4K та WMV-2G (більше 98%). Дещо нижча подібність спостерігалась між вищезгаданими ізолятами та ізолятами із Черкаської області області (WMV-3ch, WMV-4ch). Подібність між ізолятами WMV-3ch та WMV-4ch становила 94%. Таке згрупування не корелює з географічним походженням ізолятів, оскільки WMV-4K виділений з АР Крим, WMV-2G – Полтавської області, WMV-3ch, WMV-4ch – Черкаської області. Даний розподіл може бути пов'язаний із різним походженням ізолятів WMV-3ch, WMV-4ch, так і з наявністю рекомбінацій у даній ділянці геному вищезгаданих ізолятів [19].

Найбільшу подібність у 98-99,6% українські ізоляти мали з європейськими та близькосхідними ізолятами. Серед згаданих вище – два французьких ізоляти FMFOO – LL2 і CO5–337, італійський ITA00–G, іспанський MAL99.4, турецькі ізоляти TURK91 і W2 та іранські ізоляти Gonbad 68 і KER.KE.1. Сюди ж увійшов і французький штам WMV– Fr. Необхідно відмітити, що український ізолят з АРК, – WMV 2– 2k– Ukr виявився більш близькоспорідним з європейськими ізолятами ніж з українським ізолятом з Полтавської області WMV 2– 2g– Ukr. Подібність кримського ізоляту відносно європейських складала від 99,3 до 99,6% і була найбільшою з французьким ізолятом FMFOO – LL2, – 99,6%.

Таблиця 8.4 - Подібність українських ізолятів WMV-2 у відсотках

Ізоляти	4K	2G	3ch	4ch	21w	63w
4K	100	99	95,5	96	99,3	98,1
2G	99	100	95,1	95,4	98,6	97,9
3ch	95,5	95,1	100	94,3	95,7	95
4ch	96	95,4	94,3	100	96,1	96
21w	99,3	98,6	95,7	96,1	100	98
63w	98,1	97,9	95	96	98	100

Деяко меншу подібність з українськими ізолятами, а саме 97%, продемонстрували ізоляти з Ірану (Kh.S.Nah, IRO2-54), Саудівської Аравії (WMV-SA), а також ізраїльський штам Israel. Найменша подібність у даному кластері відносно українських ізолятів була з пакистанським штамом PK – 96%.

До другого субкластеру G2 увійшли ізоляти з Південної та Північної Америки, а саме ізоляти з Чилі (CHI87– 620), Венесуели (VE10– 099), США (USA), а також штам з Тонга (Tonga), один ізолят з Іспанії (SG99.2) та один італійський ізолят Лессе. Подібність з українськими ізолятами складала 93-93,7% окрім ізолята Лессе, подібність якого з українськими ізолятами становила 95%.

Що стосується третього субкластеру G3 , то тут розмістилися штами і ізоляти з США (RS – 22, HQ11–16), Китаю (Liaocheng, HLJ, WMV–CHN), Південної Кореї (Watermelon) та Польщі (CN). Подібність з

українськими ізолятами була у межах 93 – 94%.

Другий окремий кластер 2К склали японський штам (*Habenaria*), виділений з рослини *Habenaria radiata* родини орхідних, французький ізолят (CO7– 284) та іранський ізолят (Shiraz) з подібністю відносно українських ізолятів у 91 – 93%. Згрупованість даних ізолятів в один кластер зі штамом *Habenaria* свідчить про високу ймовірність походження французького і іранського вище зазначених ізолятів від даного штаму.

На відміну від представників другого кластеру, штами і ізоляти першого кластеру було ізолювано з рослин родини гарбузових, що і пояснює їх згрупованість на філогенетичному дереві у окремий кластер.

Подібність варіювала у діапазоні 87-99% (табл. 8.5). Українські ізоляти є найбільш подібними до ізолятів із Європи (Франція, Італія, Іспанія).

Таблиця 8.5 - Подібність українських ізолятів WMV-2 та штамів з Genbank у відсотках

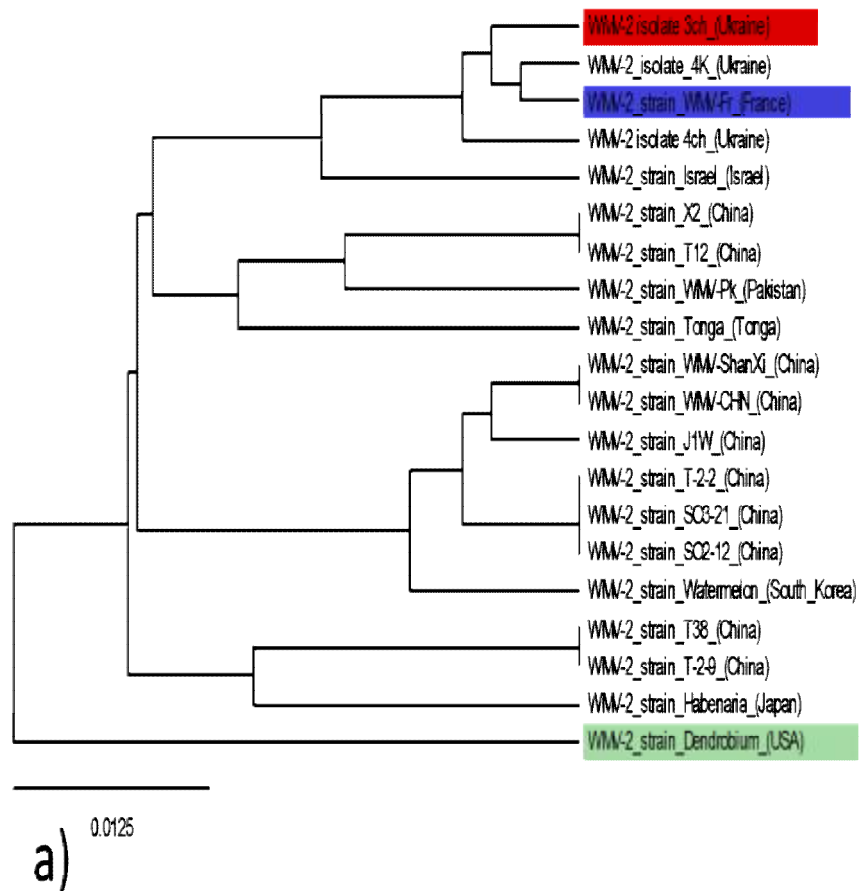
Ізоляти	4K	2G	3ch	4ch	21w	63w
WMV-C06-526(France)	99,5	98,8	95,6	96	99,3	98,1
WMV-FMF00-LL2	99,5	98,8	95,6	96	99,3	98,1
WMV-ITA00-G	99,2	98,5	95,3	95,7	99	97,9
WMV-M116	98,6	98	95	95,1	98,8	97,7
WMV-MUR95.4	98,7	98	94,9	95,2	98,9	97,6
WMV-TUR91	99	98,3	95,1	95,5	98,9	97,7

Ізоляти	4K	2G	3ch	4ch	21w	63w
WMV-C05-337	98,8	98,3	95	95,2	98,6	97,6
WMV-CHI02-481	98,3	97,9	94,5	94,8	98,2	97,1
WMV-Tonga	92,6	92,6	89,4	89,8	92,8	91,9
WMV-USA	90,9	90,7	87,4	87,8	90,7	89,5
WMV-Lecce	95,1	94,7	92	91,9	95	94,2
WMV-FMF03-141	92,9	92,5	89,6	89,8	93	91,4
WMV-S96-6	93,2	92,8	89,9	90,2	93,4	91,7
WMV-Habenaria (Japan)	93,4	92,9	90,2	90,3	93,5	91,8
WMV-Watermelon	94	93,8	90,6	91,3	94,1	92,9
WMV-CHN	94,7	94,6	91,1	91,3	94,9	93,5
WMV-HLJ	94	93,8	90,7	91	94,5	92,9

Також було проведено рекомбінаційний аналіз WMV - 2, який виявив рекомбінацію між українським ізолятом WMV-3ch та штамом WMV-Fr із Франції (рис. 8.3).

Отже, виходячи з отриманих результатів можна сказати, що коло найвірогідніших країн, звідки можуть походити або, навпаки, куди були завезені українські ізоляти досить широке і включає Іспанію, Італію, Францію, а також Іран, Туреччину, Ізраїль та Саудівську Аравію. Така ситуація може бути пояснена експортно-імпортними відносинами України

з країнами Середземномор'я та Близького сходу і активним обміном сільськогосподарською продукцією.



Method	P-value
3Seq	6,295·10⁻⁶
Chimaera	5,259·10⁻⁹
GENECONV	2,897·10 ⁻⁴
MaxChi	2,205·10 ⁻⁷
RDP	4,173·10 ⁻²
SIScan	2,062·10⁻¹¹

б)

Рисунок 8.3 - Філогенетичні відносини та рекомбінаційний аналіз українських ізолятів WMV2-3ch. Дерево UPGMA побудоване з використанням ділянки батьківської послідовності; статистична достовірність показана у таблиці

Таким чином, нуклеотидні сиквенси гену капсидного білка українських ізолятів вказують на високу подібність їх між собою і з уже відомими штамми і ізолятами WMV - 2. Подібність між українськими ізолятами та штамми і ізолятами з Генбанку становила від 90,7 до 99%. Найбільшу подібність за геном капсидного білка українські ізоляти мали, переважно, з європейськими ізолятами з Іспанії, Італії та Франції, а також зі штамми і ізолятами з Близького Сходу, що можливо, пояснюється джерелом їх походження. Відтак, вірус мозаїки кавуна 2 міг потрапити до України з країн Середземномор'я чи Близького Сходу або ж, навпаки, міг бути занесений туди з України. Таким чином, схожість чи навпаки, різниця у нуклеотидній послідовності ізолятів, пов'язані саме з їх географічним розташуванням, що є одним із детермінуючих факторів штаммоутворення.

Отже, отримано нуклеотидні послідовності шести ізолятів WMV-2. Подібність ізолятів за геном капсидного білку не залежить від місця відбору – ізоляти 3ch та 4ch Черкаської області менш споріднені між собою (94,3%), ніж з представниками інших регіонів. Найвища подібність спостерігається між ізолятом 21w (Полтавська обл.) та 4К (АР Крим). Всі ізоляти WMV-2 належать до представників групи G1 і споріднені з ізолятами з Франції, Італії та Іспанії. Виявлено рекомбінацію між українським ізолятом WMV-3ch та штамом WMV-Fr із Франції.

Отже, на території України вірус мозаїки кавуна уражує рослини родини *Cucurbitaceae* виключно у агроценозах відкритого ґрунту. Впродовж моніторингу агроценозів України на предмет WMV-2 було показано, що вірус поширений на культурах гарбузів, кабачків, цукіні, динь та огірків переважно у вигляді змішаної інфекції у поєднанні з вірусом жовтої мозаїки цукіні, вірусом огіркової мозаїки чи вірусом пожовтіння огірка, що передається попелицями. Моноінфекція WMV-2 на рослинах траплялася значно рідше. Зазвичай, на рослинах уражених WMV-2, симптоми проявлялися у вигляді темно-зеленої прижилкової мозаїки листкової пластинки або ж темно-зеленої мозаїки з та деформації листя.

8.2 Філогенетичний аналіз ізолятів *Zucchini yellow mosaic virus*

У сільськогосподарському секторі України Гарбузові культури, як от гарбузи, кабачки, цукіні, дини, кавуни, займають одне з провідних місць. Однак ці культури досить часто зазнають шкодочинного впливу вірусних патогенів, що, в свою чергу, призводить до зниження якості продукції, зменшення її кількості, а інколи і повної втрати урожаю.

На сьогодні в агроценозах України циркулює один із самих небезпечних вірусів – вірус жовтої мозаїки цукіні (*Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)*), що належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae* [11]. Вірус детектується у багатьох країнах світу та часто спричинює спустошливі епіфітотії [195].

Вперше на території України вірус жовтої мозаїки цукіні (ZYMV) було виявлено нами дванадцять років тому, у 2005 році, на рослинах відкритого ґрунту [271]. Відтоді ми щорічно детектували патоген на гарбузових культурах, де він викликав характерні симптоми нитковидності листкової пластинки та бугристість плодів, які при цьому повністю втрачали свій торгівельний вигляд.

Вірус жовтої мозаїки цукіні здатний уражувати практично всі види культурних і дикорослих гарбузових рослин, зменшуючи врожайність від 25 до 50% (залежно від ступеню розвитку хвороби та від патогенності штаму вірусу), а у деяких випадках, навіть призводити до повної втрати сільськогосподарської продукції [195].

На інфікованих рослинах вірус жовтої мозаїки цукіні викликає сильну мозаїку листкової пластинки, деформацію, пухирчастість та зменшення розмірів листків. На плодах з'являються маркерні симптоми ZYMV у вигляді плям, бугрів і диколоризації [174]. Часто на інфікованих плодах дині можна побачити поверхневу сіточку, а на плодах дині і кавуна вищезазначений вірус викликає повздовжні або радіальні щілини. Зазвичай

уражені рослини продукують меншу кількість насіння, інколи воно деформоване, а утворені плоди мають тонку шкірочку.

Вірус жовтої мозаїки цукіні – генетично неоднорідний. Така генетична неоднорідність популяції вірусу спричинена варіабельністю N-кінцевої ділянки капсидного білка – найбільш варіабельної ділянку геному потівірусів. Дану ділянку використовують для диференціації ізолятів та штамів ZYMV [11].

Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей CP регіонів ізолятів з різних географічних місць дав можливість виокремити три відокремлені близько споріднені групи, які відображають географічне походження ізолятів

У ранніх дослідженнях з 47 частковими нуклеотидними послідовностями CP ZYMV, було виявлено, що ізоляти згруповані у два кластери – А та В. При цьому А кластер складався з трьох підкластерів, які включають ізоляти з Європи, Північної Америки та Східної Азії, а кластер В обмежувався ізолятом з острова Реюньон [138]. Згодом, за порівняння 39 повних нуклеотидних послідовностей CP ZYMV, були запропоновані три філогенетично споріднені групи ZYMV (I-III): I – ізоляти з різних частин світу; II – азійські ізоляти; III – лише ізоляти з Китаю [139].

За порівняння 61 повногеномної послідовності вірусу були запропоновані три основні кластери: I – ізоляти, поширені в усьому світі; II – ізоляти з острова Реюньон, Сингапуру та В'єтнаму; III – ізоляти з В'єтнаму та Китаю [145]. У дослідженні, де порівнювалися 208 часткових нуклеотидних послідовностей ZYMV, їх було розділено на 2 основних кластера: А та В [25].

Таким чином, більшість філогенетичних досліджень вказували на наявність двох-трьох основних груп (кластерів).

На сьогодні для вірусу жовтої мозаїки цукіні в Генбанку наявні нуклеотидні послідовності близько 400 штамів і ізолятів. Штами та ізоляти ZYMV поділяються на три групи: А, В та С [138, 139]. До групи А входять

ізоляти, розповсюджені у всьому світі. Група В представлена ізолятами з В'єтнаму, Реюньйону та Сінгапуру [25], група С – ізолятами з В'єтнаму та Китаю.

Група А підрозділяється на чотири підгрупи: I, II, III та IV. Desbiez [138] також запропонувала розділяти групу А на три кластери, перший з них відповідає підгрупі AI, а другий – AII.

Ізоляти з Китаю та Кореї формують підгрупу AIII.

Підгрупа AIV включає ізоляти з Тайвані, Південної Кореї, Китаю та Японії.

До кластеру 1 входять штами, які найбільш частіше виявлялися по всьому світі. Більшість з них належать до серогрупи 1. Запропонований типовий представник цього кластеру є ZYMV-NAT.

Представники кластеру 2 серологічно не можуть бути відокремлені від кластеру 1, оскільки для представників обох кластерів характерні синонімічні мутації і тому на амінокислотному рівні штами не відрізняються.

Штами, які відносяться до 3 кластеру являють собою невелику частину ізолятів ZYMV, які були знайдені на чотирьох континентах та пов'язані з іншими штамами інших кластерів, зокрема з ізолятами з Австрії, Італії та Іспанії [138].

Група В розділяється на підгрупи VI та VII. Підгрупа VI включає ізоляти, виявлені у В'єтнамі, Сінгапурі та Реюньйоні. У той час група VII складається з австралійських ізолятів.

До групи С входять ізоляти, виявлені у Китаї, Польщі та В'єтнамі.

Згідно досліджень Coutts [144], подібність нуклеотидних послідовностей між ізолятами ZYMV групи А становить 88,8 %. Причому подібність між ізолятами всередині підгруп має наступний вигляд: AI – 95,9%; AII – 93,2%; AIII – 91,8%; AIV – 85,6%.

Представники групи В подібні між собою на 86,5%, а в межах підгрупи: VI – 86,5%; VII – 98,7%.

Подібність вірусних ізолятів групи С за нуклеотидною послідовністю становила 85,8%.

У наших попередніх дослідженнях було показано, що в умовах агроценозів України вірус жовтої мозаїки цукіні часто зустрічається у вигляді змішаної інфекції з вірусом мозаїки кавуна 2, рідше з вірусом огіркової мозаїки [281, 283]. ZYMV передається, в основному, попелицями [11], а також насінням, проте менш ефективно [173, 175].

Враховуючи цей важливий фактор і зважаючи на активний торговельний обмін не тільки готовою овочевою продукцією, але і насіннєвим матеріалом в рамках ринкових відносин між Україною та країнами-імпортерами, доцільно було проаналізувати можливі шляхи потрапляння українських ізолятів ZYMV на територію України, а також встановити ступінь генетичної спорідненості українських ізолятів з уже відомими ізолятами і штамми вірусу. А дослідження філогенетичних зв'язків українських ізолятів з уже відомими штамми та ізолятами ZYMV допоможе більш чітко уявити звідки саме в агроценози нашої країни потрапили дані ізоляти. В свою чергу така інформація буде корисною для контролювання шляхів потрапляння вірусифікованої сільськогосподарської продукції на територію України.

Враховуючи все вищесказане, метою роботи було встановлення штамової приналежності українських ізолятів вірусу жовтої мозаїки цукіні та дослідження їх філогенетичної спорідненості з відомими штамми та ізолятами ZYMV, шляхом порівняння нуклеотидної послідовності ділянки гену Nib/CP.

Для виділення тотальної РНК використовували рослини *Cucurbita pepo* з Вінницької та Полтавської областей, які в імуноферментному аналізі позитивно реагували з тест-системою до ZYMV. Після візуалізації тотальної РНК проводили зворотньотранскрипційну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ-ПЛР) зі специфічними праймерами до ділянки РНК, яка кодує Nib/CP вірусу жовтої мозаїки цукіні [226, 227, 228].

Дані праймери комплементарні ділянкам нуклеотидів 8200-8220 і 8800-8819 геному і ампліфікують фрагмент розміром 605 п.о., який кодує Nib/CP вірусу (рис. 8.4).

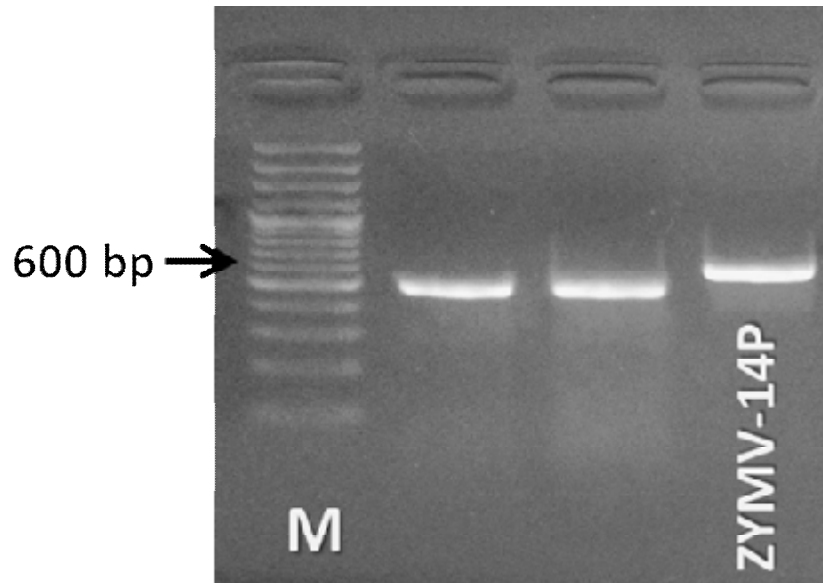


Рисунок 8.4 - Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР. М - маркери (100 по, Fermentas), ZYMV-14P – продукт розміром приблизно 600 по

Саме цей фрагмент зазвичай використовується для вивчення мінливості потівірусів, оскільки N-кінцева ділянка білка оболонки є сильно варіабельною.

У результаті ЗТ-ПЛР було отримано продукти ампліфікації розміром 605 п.о., аналогічні за розміром ділянці геному, яка кодує Nib/CP вірусу.

Філогенетичний аналіз капсидного білку ZYMV-14P було проведено для встановлення його групової приналежності та спорідненості цього ізоляту з іншими українськими ізолятами, виявленими в попередніх дослідженнях, та ізолятами з інших країн світу. Оскільки даний ізолят здатний передаватись насінням, то важко передбачити спорідненість

даного ізолята з іншими українськими ізолятами, адже перевірка насіння в Україні на предмет інфікованості насіння ZYMV не ведеться. Даний ізолят може бути близькоспорідним як і з українськими ізолятами, так і з ізолятами з інших країн.

Для філогенетичного аналізу було використано українські ізоляти ZYMV-10G, ZYMV-10P, ZYMV-3814, ZYMV-513, ZYMV-B, виявлені в попередніх дослідженнях (табл. 8.6). Усі вони належать до групи AI [23], яка включає штами та ізоляти з усього світу й доволі широко розповсюджена в Європі. Також використані нуклеотидні послідовності ізолятів, отримані, але не опубліковані: ZYMV-23, ZYMV-7, ZYMV-21, ZYMV-34.

Три ізоляти – Z7, Z8, Z33 – знаходилися в рослині у стані вірогідної моноінфекції, адже за перевірки на наявність CMV та WMV-2, з якими ZYMV часто знаходиться у формі змішаної інфекції, антигенів до CMV та WMV-2 знайдено не було. Інші три ізоляти знаходилися у формі змішаної інфекції: Z11 з CMV, а Z24 та Z40 з WMV-2.

Після візуалізації РНК з використанням електрофоретичного методу українських ізолятів ZYMV провели полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (ЗТ–ПЛР).

Для проведення у подальшому філогенетичного аналізу українських ізолятів ZYMV застосовували праймери (reverse праймер: 5'-ATGTCGAGTATCACATTTCC-3': 8200-8220 і forward 5'-GGTTCATGTCCSACCAAGC-3': 8800-8819), специфічні до ділянки, спільної для генів NIb/CP. Провели ампліфікацію ділянки у 605 пар основ (bp). Послідовність геному, яка отримана після ампліфікації перекриває NIb/CP сайт розрізання в позиції 8542. Цей фрагмент зазвичай використовується для вивчення мінливості потівірусів, тому що N-кінцева ділянка капсидного білка, як відомо, сильно варіює, в той час як полімераза є більш консервативною для усіх вірусів.

Ампліфікація з даною парою праймерів до послідовності геному ZYMV призвела до появи чітких смуг ампліконів заданої довжини (близько 605 bp), що було перевірено електрофоретично. Задля подальшого дослідження амплікони були очищені від агарозного гелю, а успішність виділення була перевірена електрофоретично відібраною аліквотою зі зразка (рис. 8.5).

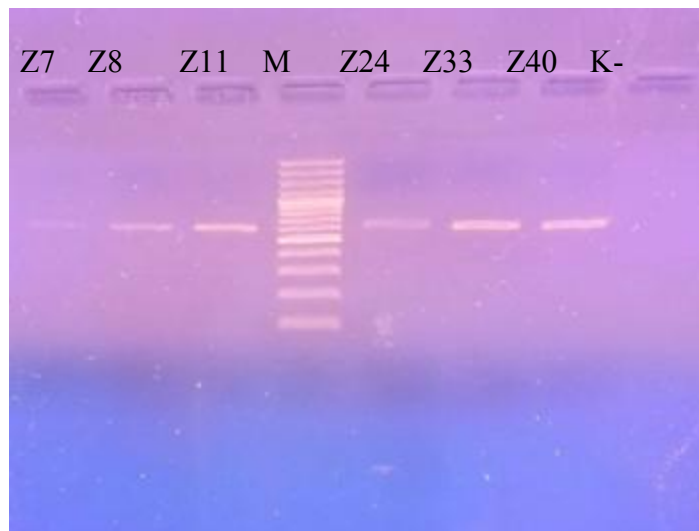


Рисунок 8.5 - Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР українських ізолятів ZYMV: Z7, Z8, Z11, Z24, Z33, Z40 ; M – маркер 100 по (Fermentas)

Для дослідження варіабельності нуклеотидних послідовностей українських ізолятів було проведено сиквенування за методом Сенгера з використанням Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з Big Dye термінаторами, версія 3.1 (Applied Biosystems, USA), та були отримані нуклеотидні послідовності для подальшого аналізу.

Таблиця 8.6 - Характеристика українських ізолятів ZYMV

Ізолят, номер з Genbank	Рослина	Симптоми	Регіон	Дата відбору зразків
ZYMV-10G KY99097	<i>Cucurbita</i> <i>perо</i>	Пухирці на листовій пластинці	Вінницька область	2012
ZYMV-10P KY99098	<i>Cucurbita</i> <i>perо</i>	Ниткоподібність листових пластинок	Полтавськ а область	2012
ZYMV- 3814 KY99099	<i>Citrullus</i> <i>lantanus</i>	Бугристість	Черкаська область	2014
ZYMV-513 KY99100	<i>Cucurbita</i> <i>perо</i>	Ниткоподібність листків, деформація	Полтавськ а область	2013
ZYMV-B KY99101	<i>Cucumis</i> <i>melo</i>	Деформація листової пластинки	Черкаська область	2013
ZYMV-23	<i>Cucurbita</i> <i>perо</i>	Зелена плямистість, пухирці, деформація листової пластинки, деформація плоду	Львівська область	2015
ZYMV-7	<i>Citrullus</i> <i>lantanus</i>	жовто-зелена мозаїка, деформація листової	Полтавськ а область	2015

Ізолят, номер з Genbank	Рослина	Симптоми	Регіон	Дата відбору зразків
		пластинки		
ZYMV-21	Цукіні	Зелена мозаїка, нитковидність	Полтавськ а область	2015
ZYMV-34	<i>Cucurbita</i> <i>pepo</i>	Деформація плоду	Черкаська область	2015
ZYMV-14P KY99102	<i>Cucurbita</i> <i>pepo</i> , насіння	Ниткоподібність листків, деформація	Полтавськ а область	2016

Ізоляти ZYMV з інших країн, які використовувались для побудови філогенетичного дерева належать до різних груп (А, В, С), виділені з різних видів рослин та різняться своїми біологічними властивостями (табл. 8.7).

Таблиця 8.7 - Характеристика штамів та ізолятів вірусу жовтої мозаїки цукіні з різних країн світу, використаних у філогенетичному аналізі

Штам/ Ізолят	Хазяїн (якщо вказаний)	Номер	Країна
ZYMV-H	<i>Cucurbita pepo</i>	KF976712	Чехія
ZYMV-Kuchyna	<i>Cucurbita pepo</i>	DQ124239	Словаччина

Штам/ Ізолят	Хазяїн (якщо вказаний)	Номер	Країна
ZYMV-Cg11-396	Цукіні	KJ815024	Франція
ZYMV-VE10-263	<i>Cucumis dipsaceus</i>	JX310107	Венесуелла
ZYMV-Iraq	Цукіні	JQ026020	Ірак
ZYMV-Cu	Огірок	EU561043	Польща
ZYMV-P	Гарбуз (<i>Cucurbita moschata</i>)	AJ316227	Китай
ZYMV-Pak	<i>Lageneria siceneria</i>	AB127936	Пакистан
ZYMV- SYZY102	Кабачок	GU903893	Сирія
ZYMV-NAT		EF062582	Ізраїль
ZYMV-CI09-09	Огірок	CI09-09	Кот Д'Івуар
ZYMV-E9	Цукіні	HM641798	Франція
ZYMV-begonia	<i>Begonia</i>	AM422386	Тайвань
ZYMV-Cg11-379	Цукіні	KJ815022	Франція
ZYMV-Zuy	Цукіні	EU561044	Польща
ZYMV-Zug	Цукіні	EU561045	Польща
ZYMV-Florida		ZYMCP	США
ZYMV-C-16		DQ645729	Іспанія
ZYMV-WM	Кавун	AJ515911	Китай
ZYMV-KR-PA	<i>Cucurbita moschata</i>	AY278998	Корея
ZYMV-Cg10-253	Цукіні	KJ815014	Франція
ZYMV-RDA	<i>Cucurbita pepo</i>	AB369279	Південна Корея
ZYMV- Singapore		AF014811	Сінгапур

Штам/ Ізолят	Хазяїн (якщо вказаний)	Номер	Країна
ZYMV-VN/Cm1	<i>Cucurbita moschata</i>	DQ925448	В'єтнам
ZYMV-LG1	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>melopepo</i> (zucchini)	AJ889243	Китай
ZYMV-TY	<i>Thladiantha grosvenorii</i>	AJ889244	Китай
ZYMV-Knx-1	<i>Cucurbita moschata</i>	JF792363	Австралія
ZYMV-Knx-3	<i>Cucumis melo</i>	JF792365	Австралія
ZYMV- CH99/193	Кабачок	AY611023	Китай
ZYMV-WG	<i>Benincasa hispida</i>	AJ316229	Китай
ZYMV-TV1	<i>Cucurbita moschata</i>	KJ789918	Південно-африканська республіка
ZYMV-390-10	<i>Cucurbita pepo</i> 'Horgos'	JX262127	Сербія
ZYMV-670-40	<i>Cucurbita maxima</i>	JX262134	Сербія
ZYMV-SYR-B2	<i>Cucurbita pepo</i>	EU999757	Сирія
ZYMV-Austria 12		AJ420017	Австрія

Усього для побудови філогенетичного дерева було використано 35 штамів і ізолятів ZYMV з різною груповою приналежністю.

Філогенетичне дерево було побудоване за допомогою методу найближчих сусідів у програмі MEGA 6 з використанням моделі Джукса-Кантора (рис. 8.6).

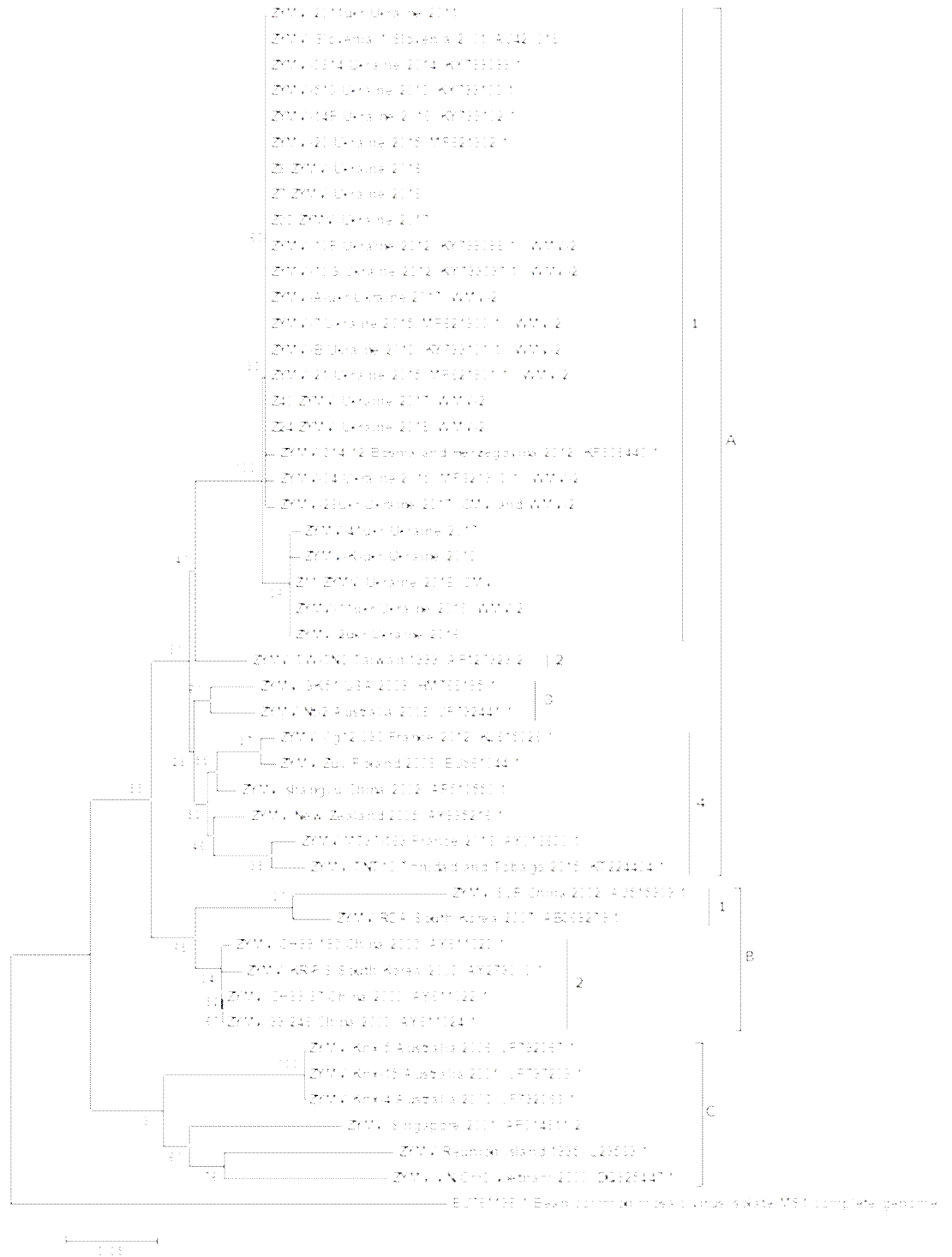


Рисунок 8.6 - Філогенетичні відносини ізолятів ZYMV. Дерево побудоване за ділянкою геному Nib/CP за допомогою методу NJ

На філогенетичному дереві чітко виокремлювалось три основних кластери, які відповідають трьом філогенетичним групам ZYMV: А, В та С [23, 28]. Група А була сформована з ізолятів і штамів з усього світу. Вона

підрозділялась на чотири кластери, що відповідають підгрупам AI та AII (виявлені у різних країнах світу), AIII (ізоляти з Китаю та Кореї) та AIV (ізоляти з Тайвані, Південної Кореї, Китаю та Японії).

Українські ізоляти розташовувались у групі А, кластері підгрупи AI. Вони були у одному кластері з ізолятами з Франції, Угорщини, Словаччини, Чехії, Сербії та Австрії. Подібність з цими ізолятами становила 97-100%.

Найбільша подібність була з ізолятами ZYMV-H (Чехія), ZYMV-Cg11-379 (Франція), ZYMV-Austria 12 (Австрія), ZYMV-390-10 (Сербія). Така висока подібність не викликає подиву, оскільки у цьому кластері були ізоляти з європейських країн, між якими розвинені торгівельні відносини.

У групі В були ізоляти з Сінгапуру та Австралії. Подібність з цими ізолятами становила 69-73%. З ізолятами з Австралії, які належать до підгрупи BII, подібність варіює в діапазоні 71-73%, у той же час подібність між українськими ізолятами та штамом з Сінгапуру, який належить до підгрупи BI, становить 69-70%.

У групі С були ізоляти із Польщі, Китаю, В'єтнаму та Південної Кореї подібність українських ізолятів та представників цієї групи варіювала у діапазоні 64-82%. Найвища подібність була з ізолятом ZYMV-RDA (Південна Корея) – 81-82%, а найнижча – з ізолятом ZYMV-TY (Китай) – 64-66%.

Отримані дані співпадають з літературними даними. Згідно з якими подібність між ізолятами групи А становить 88,8 %, при чому в підгрупі AI – 95,9%, AII – 93,2%, AIII – 91,8%, AIV – 85,6%, у групі В – 86,5% (BI – 86,5%; BII – 98,7%, а у групі С – 85,8%. (табл 8.8).

При порівнянні українських ізолятів між собою виявили їх високу (>99%) подібність, хоча вони були знайдені в різних географічно віддалених локаціях.

Таблиця 8.8 - Подібність українських ізолятів ZYMV та ізолятів з

Генбанку

Ізоляти з Генбанку	Подібність з українськими ізолятами ZYMV, %									
	ZYMV-10G	ZYMV-10P	ZYMV-3814	ZYMV-513	ZYMV-B	ZYMV-23	ZYMV-7	ZYMV-21	ZYMV-34	ZYMV-14P
ZYMV-H	100	100	100	100	100	100	100	100	98,9	100
ZYMV- Kuchyna	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	98,4	99,5
ZYMV- Cg11-396	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	98,4	99,5
ZYMV- VE10-263	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	95	96,2
ZYMV- Iraq	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	95,6	96,7
ZYMV- Cu	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	95,6	96,7
ZYMV-P	95	95	95	95	95	95	95	95	93,8	95
ZYMV- Pak	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	96,2	95	96,2
ZYMV- SYZY102	97,3	97,3	97,3	97,3	97,3	97,3	97,3	97,3	96,2	97,3
ZYMV- NAT	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	95,6	96,7
ZYMV- CI09-09	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	95,6	96,7
ZYMV- E9	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	95,6	96,7

Ізоляти з Генбанку	Подібність з українськими ізолятами ZYMV,%									
	ZYMV-10G	ZYMV-10P	ZYMV-3814	ZYMV-513	ZYMV-B	ZYMV-23	ZYMV-7	ZYMV-21	ZYMV-34	ZYMV-14P
ZYMV- begonia	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	92,6	93,8
ZYMV- Cg11-379	100	100	100	100	100	100	100	100	98,9	100
ZYMV- Zuy	90,9	90,9	90,9	90,9	90,9	90,9	90,9	90,9	89,6	90,9
ZYMV- Florida	89,1	89,1	89,1	89,1	89,1	89,1	89,1	89,1	87,8	89,1
ZYMV-C- 16	90,4	90,4	90,4	90,4	90,4	90,4	90,4	90,4	89,1	90,4
ZYMV- WM	73,7	73,7	73,7	73,7	73,7	73,7	73,7	73,7	71,7	73,7
ZYMV- KR-PA	89	89	89	89	89	89	89	89	87,7	89
ZYMV- Cg10-253	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	88,4	89,7
ZYMV- RDA	82,5	82,5	82,5	82,5	82,5	82,5	82,5	82,5	81	82,5
ZYMV- Singapore	70,2	70,2	70,2	70,2	70,2	70,2	70,2	70,2	69	70,2

Ізоляти з Генбанку	Подібність з українськими ізолятами ZYMV,%									
	ZYMV-10G	ZYMV-10P	ZYMV-3814	ZYMV-513	ZYMV-B	ZYMV-23	ZYMV-7	ZYMV-21	ZYMV-34	ZYMV-14P
ZYMV-VN/Cm1	65	65	65	65	65	65	65	65	63	65
ZYMV-LG1	67,8	67,8	67,8	67,8	67,8	67,8	67,8	67,8	65,8	67,8
ZYMV-TY	66,1	66,1	66,1	66,1	66,1	66,1	66,1	66,1	64	66,1
ZYMV-Knx-1	73	73	73	73	73	73	73	73	71,2	73
ZYMV-Knx-3	73	73	73	73	73	73	73	73	71,2	73
ZYMV-CH99/193	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	88,4	89,7
ZYMV-WG	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	88,4	89,7
ZYMV-TV1	92,2	92,2	92,2	92,2	92,2	92,2	92,2	92,2	90,9	92,2
ZYMV-390-10	100	100	100	100	100	100	100	100	98,9	100
ZYMV-670-40	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	97,8	98,9
ZYMV-SYR-B2	97,3	97,3	97,3	97,3	97,3	97,3	97,3	97,3	96,1	97,3

Ізоляти з Генбанку	Подібність з українськими ізолятами ZYMV, %									
	ZYMV-10G	ZYMV-10P	ZYMV-3814	ZYMV-513	ZYMV-B	ZYMV-23	ZYMV-7	ZYMV-21	ZYMV-34	ZYMV-14P
ZYMV- Austria 12	100	100	100	100	100	100	100	100	98,9	100
ZYMV- Zug	73,2	73,2	73,2	73,2	73,2	73,2	73,2	73,2	71,4	73,2

Така висока подібність спостерігалася для багатьох центральноєвропейських ізолятів ZYMV. Скоріш за все, вона пов'язана з ефектом «пляшкового горлишка», який визначає структуру популяції через системну інфекцію та горизонтальне перенесення за допомогою тлі.

Статистично значущої різниці у значеннях ідентичності між групами моноінфекції, змішаної інфекції та об'єднаної групи моно- і змішаної інфекції не було знайдено (рис. 8.7).

Отже, філогенетичний аналіз українських ізолятів вказує на те, що нуклеотидна послідовність N1b/CP має високий рівень ідентичності серед усіх штамів та ізолятів ZYMV. Результати аналізу нуклеотидної послідовності ділянки геному N1b/CP українських ізолятів вказують на високу подібність їх між собою і з уже відомими штамми і ізолятами ZYMV.

Вперше в Україні виявлено штам ZYMV, який передається за допомогою насіння (ZYMV-14P) з частотою передачі 2,6%. Отже встановлено нове джерело ZYMV, що циркулює на території України.

Ізолят ZYMV-14P належить до групи AI, яка включає ізоляти, поширені в усьому світі. Подібність ізолятів цієї підгрупи за нуклеотидними послідовностями становить 97-100%.\

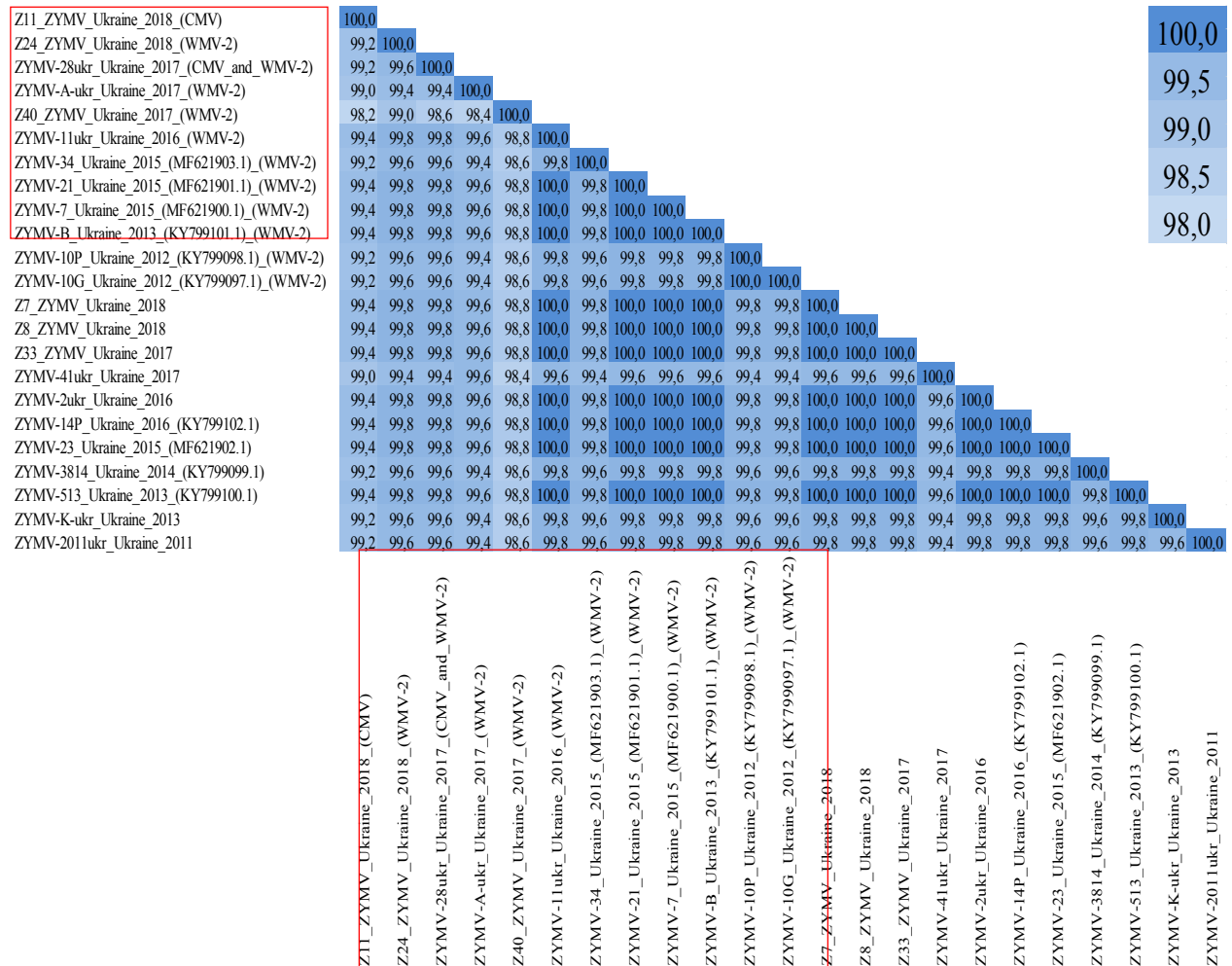


Рисунок 8.7 – Подібність українських ізолятів. Червоною рамкою позначені ізоляти ZYMV, виділені з рослин зі змішаною вірусною інфекцією (коінфекція з CMV або WMV-2)

Український ізолят ZYMV продемонстрував високу подібність як за нуклеотидними, так і за амінокислотними послідовностями (99-100% та 100%, відповідно).

Отже, при порівнянні українських ізолятів з ізолятами з різних країн було встановлено, що ідентичність між усіма наведеними ізолятами

становить від 68 до 100%, а подібність між українськими ізолятами та світовими, взятими для аналізу, становить 71-100%. Найвища ідентичність українських ізолятів спостерігалася до ізолятів із центральної та східної Європи: Чехія (DQ144062.1), Австрія (AJ420014.1), Боснія та Герцеговина (KF836440.1) та Словенія (AJ420018). Українські ізоляти були менш подібні до ізолятів з країн Азії та Австралії.

За результатами аналізу ділянки геному NІb/СР українських ізолятів було встановлено, що всі українські ізоляти є високоподібними (від 98 до 100%), що свідчить про їх приналежність до одного штаму.

На філогенетичному дереві чітко виокремлені три основних кластери, які відповідають трьом філогенетичним групам ZYMV: А, В та С. Українські ізоляти угруповані до підкластера 1 кластера А, як і ізоляти зі східної та центральної Європи. Окрім українських ізолятів, ця підгрупа також включає ізоляти з Чехії, Австрії, Боснії та Герцоговини та Словенії.

Ізолят ZYMV-14Р, здатний до передачі насінням, також належить до підкластера А1, який включає ізоляти, поширені в усьому світі. Рекомбінаційних подій серед українських ізолятів ZYMV виявлено не було.

8.3 Філогенетичний аналіз ізолятів *Cucumber mosaic virus*

На сьогодні у фермерських господарствах України, що займаються активним вирощуванням овочевих культур, суттєву проблему становлять вірусні захворювання. Одним із самих небезпечних збудників вірусної інфекції, здатним викликати епіфітотії та призводити до ураження 30-50% рослин є вірус огіркової мозаїки (СМV) [116].

СМV належить до роду *Cucumovirus* родини *Bromoviridae*. Він знайдений на рослинах у різних частинах світу і має велику кількість штамів. Геном представлений одноланцюговою, позитивносмісловою РНК та включає три сегменти.

На уражених вірусом огіркової мозаїки рослинах розвивається мозаїка, хлорози, плямистість, некрози на листках і плодах, спостерігається зменшення розмірів листкової пластинки. Тяжкість захворювання може варіювати від відсутності видимих симптомів до смерті хазяя [117, 158].

У агроценозах України CMV часто циркулює у змішаних інфекціях з вірусом жовтої мозаїки цукіні (ZYMV) та вірусом мозаїки кавуна 2 (ВМК 2).

CMV переноситься неперсистентно за допомогою 75 видів попелиць [83], а також рослинами-паразитами, наприклад, повитицею (*Cuscuta sp.*), за допомогою насіння і механічно [118].

На основі порівняння нуклеотидних послідовностей усі штами і ізоляти CMV розділяють на групи I (IA, IB) та II (відповідають серологічним групам DTL, Co і ToRS). Для визначення групової приналежності можна застосовувати зворотньютранскрипційну полімеразно-ланцюгову реакцію, поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів, філогенетичний аналіз.

Групи CMV характеризуються неоднорідним розповсюдженням. Штами і ізоляти, які належать до групи IA і II поширені рівномірно по всьому світу, при цьому представники групи I зустрічаються частіше та інколи становлять близько 80% усіх ізолятів [116].

Представники групи IB трапляються в основному в Східній Азії, яка вважається їх батьківщиною [17]. Вони розповсюджені також в середземноморському регіоні, Каліфорнії, Австралії та Греції [80]. Вважається, що на ці території штами групи IB були занесені зі Східної Азії [160].

Представники груп IA і IB характеризуються широким температурним оптимумом, зустрічаються у тропіках і субтропіках, де завдають великих збитків і викликають епідемії [156]. Ізоляти II групи

викликають слабші за проявом симптоми на рослинах та зазвичай поширені в країнах з помірним кліматом [116].

Ізоляти однієї групи виявляють >90% подібності нуклеотидних послідовностей. Подібність нуклеотидних послідовностей представників I та II груп становить приблизно 67 – 77% . Подібність нуклеотидних послідовностей між ізолятами груп IA та IB – 92 – 94% [149].

Подібність нуклеотидних послідовностей штамів однієї групи відрізняються на 2-3% [116]. Між групами спостерігається різниця більша, зокрема подібність послідовностей представників групи IB у порівнянні з групою IA варіює у діапазоні на 7-12% за подібністю нуклеотидних послідовностей [116].

У агроценозах України CMV регулярно виявляється протягом останніх сорока років. Однак, до початку наших досліджень, ні філогенетичного аналізу послідовностей виявлених ізолятів, ні встановлення їх групової приналежності жодного разу не проводилося. А це має дуже важливе значення з огляду на високу патогенність та убіквітарність вірусу. Адже встановлення штамової та групової приналежності, вивчення генетичної різноманітності та філогенетичних взаємозв'язків циркулюючих у агроценозах ізолятів CMV допоможуть попередити розвиток епідемій, проникнення нових штамів на територію України та виникнення на їх основі більш патогенних ізолятів.

Для генетичної характеристики популяцій вірусу огіркової мозаїки та встановлення групової і штамової приналежності циркулюючих ізолятів було отримано і проаналізовано нуклеотидні послідовності ділянки гену капсидного білку, білку руху та білку 2b ізолятів CMV, виявлених у різних регіонах нашої держави.

Для здійснення цієї мети спочатку тотальна нуклеїнова кислота була виділена із зразків рослин, які продемонстрували позитивний результат в ІФА. Після цього було проведено ЗТ-ПЛР з використанням тотальної РНК як матриці та праймерів, специфічних до гену капсидного

білку (СР), білку руху (МР) та білку 2b CMV. У результаті було отримано кДНК розміром 500 п.о. для СР (рис. 8.8).

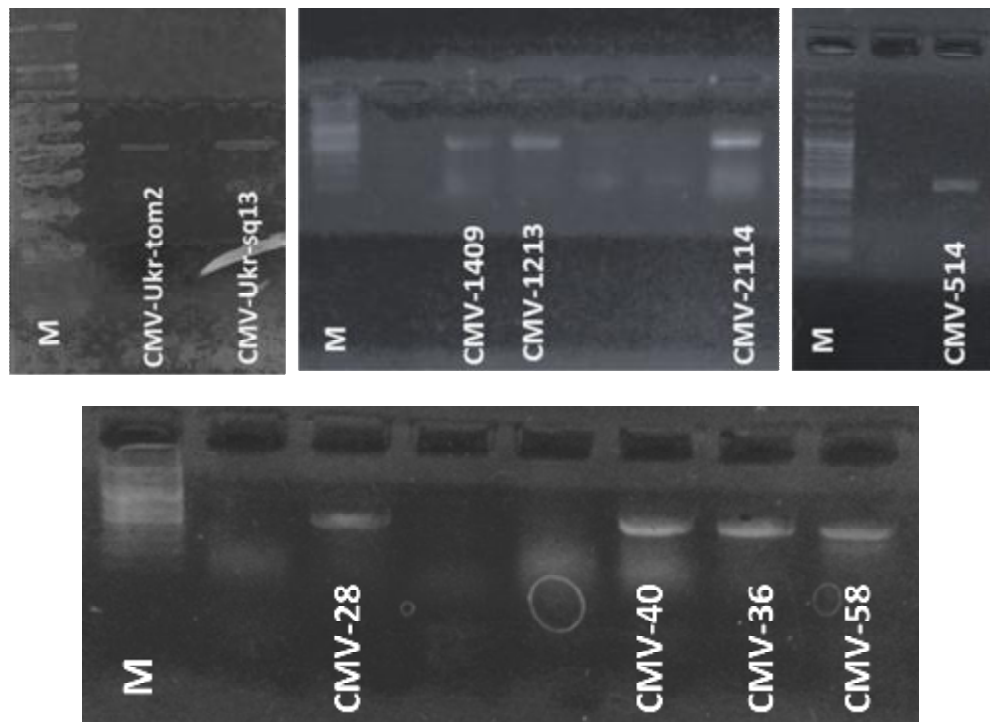


Рисунок 8.8 - Електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР: М - маркери (100 п.о., Fermentas); CMV-Ukr-tom2, CMV-Ukr-sq13, CMV-1409, CMV-1213, CMV-2114, CMV-514, CMV-28, CMV-40, CMV-36, CMV-58 – продукти розміром 500 п.о.

Після цього провели сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів. Було отримано нуклеотидні послідовності наступної довжини:

- 500 п.о. для послідовностей капсидного білку ізолятів CMV-Ukr-tom2, CMV-Ukr-sq13, CMV-1409, CMV-1213, CMV-2114, CMV-514, CMV-28, CMV-40, CMV-36, CMV-58;

- 800 п.о. для послідовностей білку руху ізолятів CMV-28-МР, CMV-36-МР, CMV-58МР;

- 300 п.о. для послідовностей білку 2b ізолятів CMV-28-2b, CMV-36-2b, CMV-58-2b.

У результаті ЗТ-ПЛР з праймерами для МР і 2b було отримано кДНК довжиною 800 п.о. і 300 п.о. відповідно (рис.8.9).

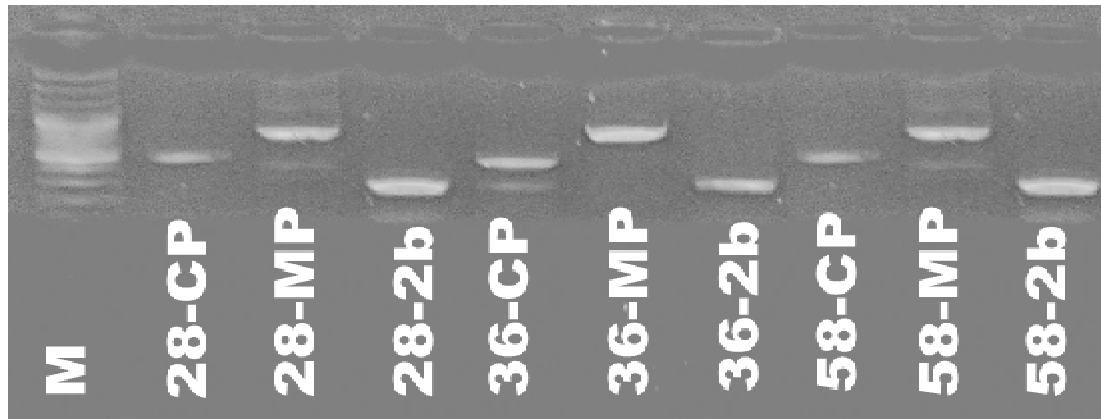


Рисунок 8.9 - Електрофорез продуктів після ЗТ-ПЛР: М - маркери (100 по, Fermentas); 28-МР, 36-МР, 58-МР – продукти розміром 800 бр, 28-2b, 36-2b, 58-2b - продукти розміром 300 п.о., 28-СР, 36-СР, 58-СР – продукти розміром 500 п.о.

Усі послідовності було депоновано в Генбанк, ідентифікаційні номери, присвоєні їм, вказані нижче (табл. 8.9).

Таблиця 8.9 - Характеристика українських ізолятів CMV

Ізолят, номер з Genbank	Рослина	Симптоми	Регіон	Дата відбору зразків
CMV-1409 (KT199741)	огірок сорт «Ніженський» (<i>Cucumis sativum L.</i>)	Жовта мозаїка	Полтавська область	2009

Ізолят, номер з Genbank	Рослина	Симптоми	Регіон	Дата відбору зразків
CMV-1213 (KT199743)	кабачок (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	Темно-зелена мозаїка, деформація листіків	Полтавська область	2013
CMV-8 (KT199742)	кабачок сорт «скворушка» (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	Жовто-зелена мозаїка	Полтавська область	2011
CMV-514 (KT199739)	гарбуз (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	Скручування листіків, пожовтіння, затримка росту	Львівська область	2014
CMV-2114 (KT199740)	кабачок (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	Світло-зелена мозаїка, гофрування жилок, деформація плодів	Черкаська область	2014
CMV-Ukr- sq13 (KJ921837)	кабачок сорт «домашній» (<i>Cucurbita</i>	Темно-зелена мозаїка вздовж жилок	Полтавська область	2011

Ізолят, номер з Genbank	Рослина	Симптоми	Регіон	Дата відбору зразків
	<i>perо L.)</i>			
Ізолят, номер з Genbank	Рослина	Симптоми	Регіон	Дата відбору зразків
CMV-Ukr- tom2 (KJ921838)	помідор <i>(Lycopersicon esculentum L.)</i>	Жовті плями, скручування листіків	Полтавська область	2013
CMV-28	Кабачок <i>(Cucurbita perо L.)</i>	Жовто-зелена мозаїка, скручування листіків, пожовтіння, деформація і пухирці на плодах	Львівська область	2015
CMV-28MP				
CMV-28-2b				
CMV-40	Огірок <i>(Cucumis sativum L.)</i>	Жовто-зелена мозаїка	Полтавська область	2015
CMV-36	Огірок	Світло-зелена	Полтавська	2015

Ізолят, номер з Genbank	Рослина	Симптоми	Регіон	Дата відбору зразків
CMV-36MP	<i>(Cucumis sativum L.)</i>	мозаїка,	область	
CMV-36-2b		бугристість плоду		
CMV-58	Кабачок	Деформація	Черкаська	2015
CMV-58MP	<i>(Cucurbita pepo L.)</i>	плоду	область	
CMV-58-2b				

На наступному етапі був проведений філогенетичний аналіз отриманих послідовностей. Як видно з попередньої таблиці, ізоляти були виявлені в різних областях України у різні роки та мають різних хазяїв.

Філогенетичний аналіз був проведений на основі нуклеотидних послідовностей гену капсидного білку ізолятів CMV, виявлених протягом вегетаційних сезонів 2009, 2011, 2013, 2014 та 2015 років (табл. 8.11). Дані ізоляти були виділені із зразків рослин з родин *Cucurbitaceae* (*Cucumis sativum L.*, *Cucurbita pepo L.*) та *Solanaceae* (*Lycopersicon esculentum L.*) у Львівській, Черкаській та Полтавській областях. Наявність антигенів вірусу в даних зразках попередньо була підтверджена в ІФА.

За ступенем подібності нуклеотидних послідовностей гену капсидного білка українські ізоляти CMV можна поділити на 2 групи I і II, з внутрішньогруповою подібністю більше 99% (табл. 8.10). Подібність нуклеотидних послідовностей капсидного білка представників різних груп становила приблизно 93-94%.

Таблиця 8.10 - Подібність нуклеотидних послідовностей гену капсидного білка ізолятів CMV у відсотках

Ізоляти	CMV-14/09	CMV-Ukr-sq13	CMV-Ukr-tom2	CMV-8	CMV-12/13	CMV-5/14	CMV-21/14	CMV-28	CMV-36	CMV-40
CMV-Ukr-sq13	99,4									
CMV-Ukr-tom2	99,7	99,7								
CMV-8	99	100	99,7							
CMV-12/13	94	94	93,7	94						
CMV-5/14	94,3	94,3	94	94,3	99,7					
CMV-21/14	93,3	93,3	93	93,3	99,4	99				
CMV-28	99,4	100	99,7	100	94	94,3	93,3			
CMV-36	99,7	99,7	100	99,7	93,7	94	93	99,7		
CMV-40	93,3	94	93,7	94	99,4	99	99,4	94	94	
CMV-58	98,7	93,4	99	93,4	94	94,3	93,3	99,4	99	94

Отримані результати вказують на те, що дані ізоляти є представниками різних груп CMV, тому для встановлення їх групової приналежності було проведено порівняння українських ізолятів з відомими з Генбанку послідовностями гену капсидного білку різних штамів (табл. 8.11) за допомогою NCBI/BLAST. Обрані для філогенетичного аналізу

штами були знайдені у різних країнах, відрізняються за своїми біологічними, серологічними властивостями та груповою приналежністю.

Таблиця 8.11 - Перелік штамів CMV, обраних для філогенетичного аналізу

Штам	Група	Хазяїн (якщо вказаний)	Номер	Країна
ABI	IB		L36525	Корея
banana	IA	<i>Musa acuminata</i>	U43888	Ізраїль
Fny	IA	Огірок	AB188233	Японія
G10	IB	Тютюн з зеленою мозаїкою	AY541691	Греція
G2	IB	Тютюн з жовтою мозаїкою	AY450854	Греція
I17F	IA		Y18137	Франція
K	IB		AF127977	США
Le02	IA	<i>Lycopersicon esculentum L.</i>	AM114273	Угорщина
Legume	IA		D16405	Японія
LS	II		AF127976	США
M	IA	Огірок	AB368498	Японія
ON	IA	<i>Momordica charantia L.</i>	AB248752	Японія
PerY	IA	<i>Nicotiana benthamiana</i>	AB369271	Південна Корея
R	II		Y18138	Франція
S	II	<i>Lycopersicon esculentum L.</i>	AF172841	США
SD	IB		AB008777	Китай
SO	IA		AF103992	Японія
Twa	IA	<i>Capsicum sp.</i>	AJ585522	Австралія
Vir	IB	<i>Capsicum sp.</i>	HE962480	Італія
KT	II	<i>Lycopersicon esculentum L.</i>	AB176847	Японія
P1	IA		AJ006988	Китай
P	IA		AJ006989	Китай

Штам	Група	Хазяїн (якщо вказаний)	Номер	Країна
Q	II		AJ585523	Австралія
T19	IB	Диня (<i>Cucumis melo L.</i> <i>var. Inodorus</i>)	KP406634	Китай
T35	IB	Диня (<i>Cucumis melo L.</i> <i>var. Inodorus</i>)	KP406632	Китай
Z1	IA	<i>Cucurbita pepo L.</i>	GU327368	Південна Корея
TN	II	<i>Lycopersicon esculentum L.</i>	AB176847	Японія
Ri-8	IA	<i>Lycopersicon esculentum L.</i>	AM183119	Іспанія
16	IB		EU329007	Тайвань
22	IB		EU329010	Тайвань
242	IA		AJ585520	Австралія
243	IB	Маракуйя	AJ585521	Австралія

Філогенетичне дерево було побудоване за допомогою методу найближчих сусідів у програмі MEGA 6 з використанням моделі Джукса-Кантора (рис. 8.10).

На філогенетичному дереві чітко виокремлюються два кластери, які відповідають I і II групам CMV. Українські ізоляти були представлені лише у кластері групи I, але при цьому були розділені між субкластерами, які відповідають групам IA і IB.

I група CMV є більш дивергентною, ніж II група. На філогенетичному дереві кластер, який відповідає цій групі, складався з двох субкластерів, що склались із штамів груп IA та IB. Українські ізоляти CMV-514, CMV-1213, CMV-2114, CMV-40, згруповані разом, розташовувались у кластері IA.

Ізоляти ABI (Корея), SDI (Китай) та CMV-28, CMV-36, CMV-58, CMV-1409, CMV-8, Ukr-tom2 і Ukr-sq13 розміщувались у субкластері IB групи.

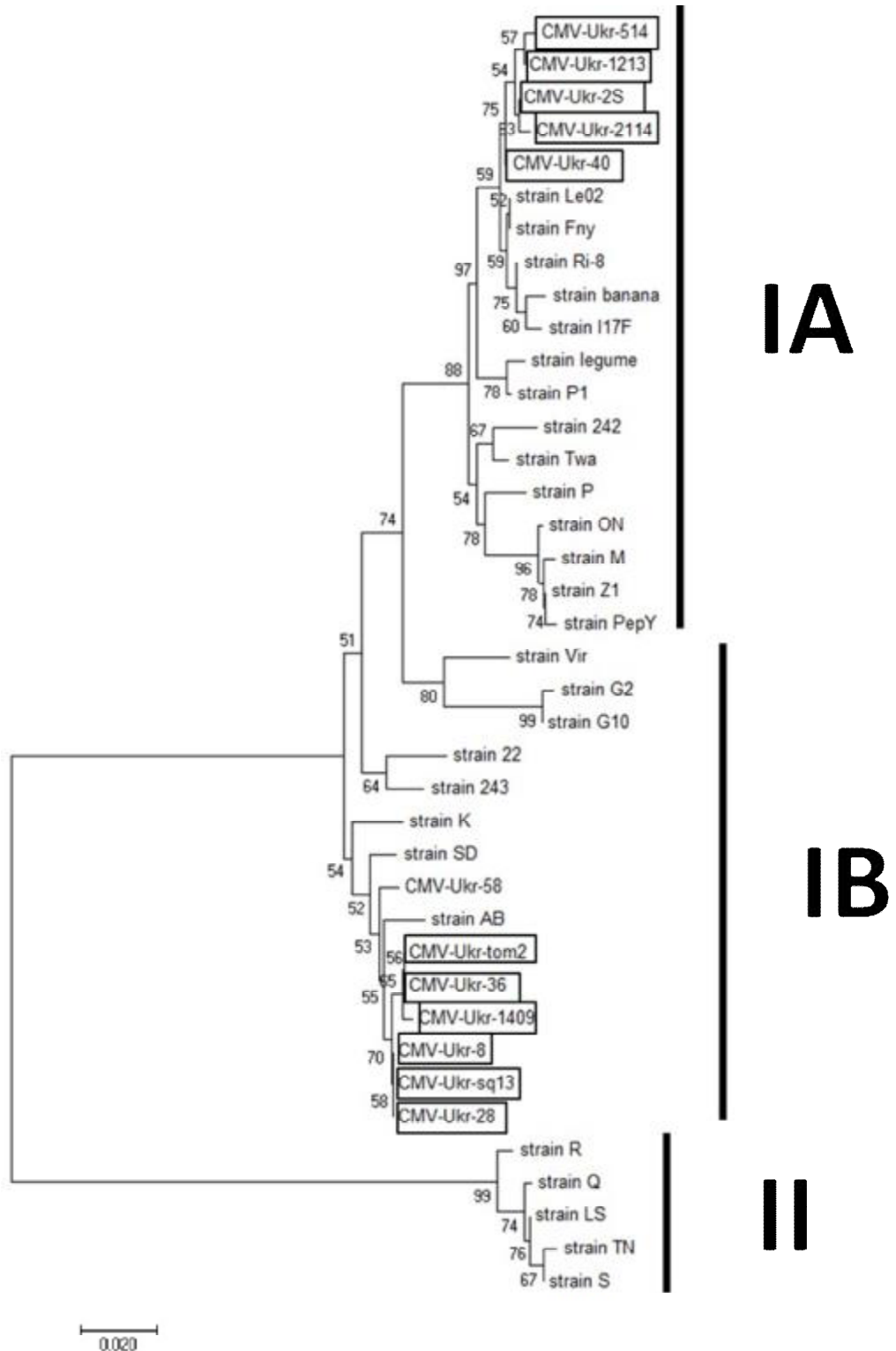


Рисунок 8.10 - Філогенетичні відносини ізолятів CMV. Дерево побудоване за геном капсидного білка методом NJ. Українські ізоляти виділені прямокутниками. Бутстреп-підтримка вказана над гілками

Подібність нуклеотидних послідовностей українських ізолятів і штамів групи ІА варіювала у діапазоні 96-99% для CMV-514, CMV-1213, CMV-2114, CMV-40 та 92-95% - CMV-28, CMV-36, CMV-58, CMV-1409, CMV-8, CMV-Ukr-tom2 і CMV-Ukr-sq13 (табл. 8.12). Звідси випливає, що CMV-514, CMV-1213, CMV-2114, CMV-40 є ізолятами групи ІА.

Таблиця 8.12 - Подібність нуклеотидних послідовностей гену капсидного білку українських ізолятів та відомих штамів з Генбанку

Ізоляти	CMV-14/09	CMV-Ukr-sq13	CMV-Ukr-tom2	CMV-8	CMV-12/13	CMV-5/14	CMV-21/14	CMV-28	CMV-36	CMV-40	CMV-58
І група											
CMV-Le02	93	93,7	93,3	93,7	99	98,7	99	93,7	93,3	99,7	93,7
CMV-Fny	92,9	93,7	93,3	93,7	99	98,7	99	93,7	93,3	99,7	93,4
CMV-legume	94	94	94,3	94	98	97,7	97,4	94	94,3	98,1	94
CMV-Ri-08	92,6	93,3	93	93,3	98,7	98,4	98,7	93,3	93	99,4	93,3
CMV-P	93	93,7	93,3	93,7	97	97,4	97	93,7	93,3	97	93,7
CMV-I117F	91,9	92,6	92,2	92,6	98	97,7	98	92,6	92,2	98,7	92,6

Ізоляти	CMV-14/09	CMV-Ukr-sq13	CMV-Ukr-tom2	CMV-8	CMV-12/13	CMV-5/14	CMV-21/14	CMV-28	CMV-36	CMV-40	CMV-58
Banana	92,2	92,9	92,6	92, 9	98, 4	98	97, 7	92, 9	92, 6	98, 4	92, 9
CMV- Twa	93,3	94	93,7	94	97, 4	97, 7	97	94	93, 7	97, 7	94
Z1	93,6	94,3	94	94, 3	96, 4	96, 7	95, 7	94, 3	94	96, 4	94, 3
M	93,4	94	93,6	94	96	96, 4	95, 4	94	93, 6	96	94
242	92,6	93,3	92,6	93, 3	96, 7	96, 4	96	93, 3	93	96, 7	93, 3
РерУ	93,3	94	93,6	94	96	96, 4	95, 4	94	93, 6	96	94
SD	98,4	99	98,7	99	93, 6	94	92, 9	99	98, 7	93, 7	99
AB	98	98,7	98,4	98, 7	93, 3	93, 6	92, 6	98, 7	98, 4	93, 3	98, 7
T35	95,3	96	95,7	96	94	94, 3	93, 3	96	95, 7	94	96
ON	92,9	93,6	93,3	93, 6	96, 4	96, 7	95, 7	93, 6	93, 6	96, 4	93, 6
243	96	96,7	96,4	96,	94,	94,	94,	96,	96,	95,	96

Ізоляти	CMV-14/09	CMV-Ukr-sq13	CMV-Ukr-tom2	CMV-8	CMV-12/13	CMV-5/14	CMV-21/14	CMV-28	CMV-36	CMV-40	CMV-58
				7	7	3	7	7	4	4	
22	95,4	96	95,7	96	94	94, 3	93, 3	96	95, 7	94	95, 4
G2	94	94,7	94,3	94, 7	93, 3	92, 9	92, 6	94, 7	94, 7	94, 3	94
G10	94,3	95	94,7	95	93, 6	93, 3	93	95	94, 7	93, 6	94, 3
P1	93,3	93,3	93,7	93, 3	98	97, 7	97, 4	93, 3	93, 7	98	93, 3
Vir	93,7	94,4	94	94, 4	94, 7	95	94	94, 4	94	94, 7	93, 7
II група											
R	76	76,9	76,4	76, 9	73	73, 5	72	76, 9	76, 4	73	77, 3
LS	75,4	76,4	75,9	76, 4	72, 6	73	71, 7	76, 4	75, 9	72, 7	76, 8
TN	74,6	75,5	75	75, 5	71, 7	72, 2	70, 8	75, 5	75	71, 8	75, 9
Q	75,3	76,3	75,8	76, 3	72, 5	73	71, 6	76, 3	75, 8	72, 6	76, 7
S	75,3	76,3	75,8	76, 7	72	72, 7	71, 7	76, 7	75, 7	72, 7	76, 7

Ізоляти	CMV-14/09	CMV-Ukr-sq13	CMV-Ukr-tom2	CMV-8	CMV-12/13	CMV-5/14	CMV-21/14	CMV-28	CMV-36	CMV-40	CMV-58
				3		5	1	3	8	1	3

У субкластері представників групи ІВ спостерігалось групування штамів з Австралії та Тайваню (штами 243, 16, 22), окремий субкластер утворювали штами з Китаю (Т19, Т35). Стосовно українських ізолятів групи ІВ потрібно відзначити, що вони утворювали третій субкластер разом із штамми К (США), SD (Китай), АВІ (Корея).

Подібність нуклеотидних послідовностей ізолятів CMV-1409, CMV-8, CMV-Ukr-tom2, CMV-Ukr-sq13, CMV-28, CMV-36, CMV-58 та представників групи ІВ становила >95% (табл. 8.14), що ще раз підтверджує їх приналежність до групи ІВ.

Окремий кластер утворювали штами ІІ групи. Серед проаналізованих ізолятів не виявлено представників групи ІІ: подібність нуклеотидних послідовностей українських ізолятів з ними становить приблизно 73-78% (табл. 8.12). Проте ізоляти цієї групи були виявлені у 2011 році у Тернопільській (Заліський район) і Чернівецькій областях (Хотинський район) та ідентифіковані на основі різниці довжини продуктів ЗТ-ПЛР з використанням праймерів, специфічних до гену капсидного білка [41].

Ми припускаємо, що представники групи ІІ не були детектовані при проведенні даного дослідження у зв'язку з наступними причинами. По-перше, штами ІІ групи представлені в інфікованих рослинах у низьких концентраціях, занадто малих для їх легкого детектування за допомогою ІФА [200]. У порівнянні з серологічними методами ЗТ-ПЛР є більш чутливою [217], проте у нашому випадку вона використовувалась лише для зразків, які показали високий титр вірусних антигенів CMV у ІФА.

По-друге, вважається, що штами I групи переважають у порівнянні з представниками II групи. Близько 80% популяції CMV представлена штамми I групи [82]. Хоча китайські вчені поставили під сумнів дане твердження і у 2008 році провели порівняльне дослідження конкурентної здатності ізолятів I і II групи в уражених рослинах тютюну, використовуючи метод ІФА [111, 112]. При цьому враховувались такі показники: частота розповсюдження інфекції та співвідношення між кількістю рослин з моноінфекцією та змішаною інфекцією. Виявилось, що ізолят ZL II групи є більш конкурентоспроможним, ніж ізолят YQ I групи, проте спричинені ним симптоми є слабші при моноінфекції рослин тютюну. У той же час ізоляти I групи NX та YQ є сильнішими, ніж представник I групи ізолят AG. Автори вказують на те, що поширення штамів II групи протягом недавнього часу у Китаї є результатом спрямованої конкуренції представників різних груп при змішаних інфекціях.

По-третє, історично вважалось, що штамми II групи більш розповсюджені в тропічних регіонах. Хоча серед бразильських ізолятів CMV також не було виявлено представників II групи, не зважаючи на те, що дослідження проводилось на території з тропічним кліматом. Подібні результати було отримано також при вивченні CMV у Ірані. У цій країні CMV представлений штамми та ізолятам IA та IB підгруп [117]. При чому штамми групи IB є близькоспорідненими до штамів зі Східної Азії, і походять з цієї території. В Ірані штамми групи IB були виявлені відносно недавно, імовірними причинами появи їх на території цієї держави можуть бути інтродукція нових сортів культурних рослин, зміни в популяції CMV пов'язані з природними причинами, використання контамінованого насіння [12].

При порівнянні українських ізолятів, які належать до групи IA, подібність нуклеотидних послідовностей становила 99-99,5%. Виявлено кілька положень, у яких відбулись заміни нуклеотидів. В ізоляту CMV-5/14

спостерігається транзиція С→Т у позиції 429 та 703. Заміна в 703 позиції виявлена тільки у CMV-5/14. Стосовно позиції 429, то з-поміж штамів групи ІА нуклеотиди представлені як цитозином, так і тиміном. У всіх українських ізолятів, окрім CMV-21/14, спостерігається транзиція Т→С. В інших штамів, у тому числі і в типового штаму цієї групи Fny у даній позиції наявний цитозин. У ізоляту CMV-21/14 спостерігається унікальна транзиція А→G у позиції 624. У інших штамів заміни у цьому положенні не спостерігається. У позиції 751-752 спостерігається делеція 2 нуклеотидів у ізолятів CMV-21/14 і CMV-5/14, в ізоляту CMV-12/13 спостерігається делеція 1 нуклеотида.

Серед українських ізолятів групи ІВ найбільша подібність нуклеотидних послідовностей спостерігалась між CMV-Ukr-sq13, CMV-28 та CMV-8 – 100%. Інші ізоляти цієї групи відрізнялись поодинокими нуклеотидними замінами. Зокрема в позиції 351 ізолятів CMV-Ukr-tom2, CMV-36 і CMV-14/09 наявний С, а у ізолятів CMV-Ukr-sq13 та CMV-8 – Т. З-поміж проаналізованих ізолятів переважають штами з тиміном у цьому положенні, цитозин наявний лише у представника групи ІА штаму CMV-legume (Японія).

У позиції 713 ізоляту CMV-14/19 спостерігалась трансверсія А→Т. Дана заміна є унікальною, оскільки у всіх інших штамів і ізолятів тут наявний аденін. В ізолятів CMV-Ukr-tom2 і CMV-14/09 в позиції 685 наявний А, в той же час у інших українських ізолятів цієї групи – G. У інших штамів цієї групи у цій позиції зустрічаються обидва нуклеотиди, зокрема у близькоспоріднених до українських ізолятів штамів CMV-ABI, CMV-SD та CMV-K – тут розташований А, а от у штамів CMV-Vir, CMV-16, CMV-T35 – G.

Порівняння амінокислотних послідовностей українських ізолятів також було проведено. Амінокислотні послідовності не відрізняються як і представників однієї групи, так і у представників різних груп, тобто всі заміни в нуклеотидних послідовностях є синонімічними. На основі всього

вищесказаного можна зробити висновок, що популяція CMV на території України включає представників груп IA та IB, при чому у виявлених нами ізолятів як IA, так і IB груп спостерігається високий ступінь генетичної однорідності.

Не зважаючи на те, що для РНК-вмісних вірусів характерні високий рівень мутацій, швидка реплікація та великі розміри популяцій, що забезпечують великий потенціал для генетичної варіації, деякі рослинні РНК-вмісні віруси залишаються більш генетично стабільними, ніж їхні аналоги у тварин. Цей феномен може бути пов'язаний з нижчим рівнем мутацій та зниженим рівнем фіксації вигідних несинонімічних мутацій через відсутність/слабку імунну селекцію. Крім того, ефект горла пляшки також може відігравати певну роль у формуванні генетичного різноманіття через системну інфекцію та горизонтальне перенесення за допомогою тлі [47, 48].

Філогенетичні дерева, побудовані на основі амінокислотних послідовностей різних відкритих рамок зчитування (ORF), є неконгруентними, що вказує на окрему еволюційну історію для трьох сегментів РНК вірусу огіркової мозаїки, яка пов'язана з реасортацією геномів. У 2001 Roossinck M.J. з колегами побудували філогенетичні дерева для усіх ORF, і встановили, що їх кластери є неконгруентними і більше того, вони не повністю відображають класифікацію на групи, яка була зроблена на основі гену капсидного білка [149].

Під час проведення філогенетичних досліджень видима різниця у структурі дерев спостерігається лише між генами капсидного білка і За (РНК 3). Вона проявляється у ступені галуження (вищий у За) та довжині гілок (довші у капсидного білку), особливо тих, що ведуть до субгруп I та II. Ці відмінності відображають певні обмеження у тої чи іншої ORF на можливість еволюціонувати [146]. Як відомо, капсидні білки взаємодіють між собою та з нуклеїновою кислотою, і в меншій мірі з хазяїном. Взаємодія з векторами є мінімальною і здебільшого неспецифічною,

оскільки 75 різних видів тлі можуть бути переносниками для даного вірусу, крім того CMV з мутантним капсидним білком переносяться тлею. У той же час, білок 3a задіяний у транспорті вірусу і взаємодіє з плазмодесмами. Тобто хазяїн накладає деякі еволюційні обмеження для 3a, сприяючи меншій радіальній дивергенції від предкової форми та утворення більш компактного філогенетичного дерева [147].

Білок 2a, РНК-залежна РНК-полімераза, містить GDD мотив і формує РНК-полімеразний комплекс разом з протеїном 1a та багатьма клітинними факторами. Якщо порівняти філогенетичні дерева для даних генів, то спостерігатимемо щось подібне як у випадку з 3a і капсидним білком. З цього випливає, що еволюція білка 2a не обмежена взаємодіями вірус-хазяїн, тобто 2a не з'єднується з клітинними факторами під час реплікації [147].

Відкрита рамка зчитування 2b перекривається з карбоксильним кінцем білка 2a. Імовірно, регіон перекривання є високопластичною ділянкою 2a ORF. Відкрита рамка зчитування у цій ділянці характерна для роду *Cucumovirus*, а також для ще одного представника родини *Bromoviridae* - роду *Ilarvirus*. У всіх ізолятів CMV ініціаторний кодон гена 2b розташований у гомологічному положенні. Рівень спорідненості по амінокислотній послідовності білку 2b є низьким в порівнянні з іншими ORF серед представників родини *Cucumovirus*. У той же час, рівень спорідненості послідовності нуклеїнових кислот є вищою, ніж амінокислотної. У сумі ці дані вказують на те, ген 2a є предковим, а відкрита рамка зчитування 2b виникла багаторазово у одній і ті ж найбільш варіабельній ділянці геному.

3'-NTR є найбільш консервативною серед всіх ділянок геному CMV. 3'-NTR включає промотор для синтезу мінус-ланцюга РНК у ході вірусної реплікації. NTR взаємодіє з репліказою (білки 1a, 2a, клітинні фактори хазяя). Ця ділянка відіграє основну роль у регуляції трансляції, оскільки 1a і 2a експресуються у малих кількостях. У штучно синтезованих

і природноіснуючих реасортантів роду *Cuscutovirus* 3-ділянка РНК 3 замінена на відповідну РНК 1 або РНК 2, мала здатність краще взаємодіяти з репліказою.

У подальших дослідженнях було отримано нуклеотидні послідовності генів капсидного білка, білка руху та 2b трьох ізолятів CMV-28, CMV-36 і CMV-58, вибраних рандомним шляхом з різних областей: Черкаська, Полтавська та Львівська область, де регулярно проводився відбір зразків протягом 2013-2016 рр.

Гени, які аналізуються у даній роботі, знаходяться у різних РНК трипартитного геному CMV: CP та MP у РНК3, а 2b – РНК2. Як уже згадувалось, основним шляхом еволюції CMV є реасортація, яка відбувається при коінфекції рослини різними штамми. Тому топологія філогенетичних дерев для цих генів та їх подібність з іншими ізолятами по цих генах може відрізнятись.

Також потрібно підкреслити відмінність функцій даних генів, адже CP та MP беруть участь у процесах транспортування віріонів, як всередині рослини, так і за допомогою векторів, у той же час 2b є детермінантою патогенності, відповідає за механізм посттранскрипційного мовчання генів у рослини-хазяїна [149], інгібуючи його ініціацію і таким чином дозволяючи CMV розповсюджуватись на великі відстані, продовжувати вражати молоді тканини і викликати інфекцію в них. Взаємодією з консервативними білками і пояснюється низька варіабельність білка 2b у порівнянні з високою варіабельністю CP і MP.

Порівнюючи українські ізоляти між собою, виявили, що подібність нуклеотидних послідовностей білків 2b ізолятів CMV-28 та CMV-58 становить 99,6%, хоча інші ділянки геному характеризуються низькою подібністю (табл. 8.13).

Протилежна картина спостерігалась для ізолятів CMV-36 і CMV-58: висока подібність генів CP і MP (99% і 99,2% відповідно) і 95% для гену 2b.

Імовірними причиною цього є реасортація. Також у першому випадку, можливо, висока подібність гену 2b ізолятів CMV-28 та CMV-58 пов'язана з їхнім спільним хазяїном – *Cucurbita pepo* L. та здатністю уражувати його. Хазяєм CMV-36 є *Cucumis sativus* L.

Таблиця 8.13 - Подібність різних генів виділених ізолятів CMV

CP			
Ізолят	CMV-Ukr-28	CMV-Ukr-36	CMV-Ukr-58
CMV-Ukr-36	99,7%		
CMV-Ukr-58	98,4 %	99%	
CMV-Ukr-2114	93%	92,7%	93%
MP			
Ізолят	CMV-Ukr-28	CMV-Ukr-36	CMV-Ukr-58
CMV-Ukr-36	97,4%		
CMV-Ukr-58	96,7%	99,2%	
CMV-Ukr-2114	90,2%	96%	96,4%
2b			
Ізолят	CMV-Ukr-28	CMV-Ukr-36	CMV-Ukr-58
CMV-Ukr-36	95,4%		

CMV-Ukr-58	99,6%	95%	
CMV-Ukr-2114	88%	85%	88%

У послідовностях гену білка 2b були виявлені унікальні амінокислоти. У ізолятів CMV-28 і CMV-58 присутній ізолейцин у 42 положенні, у всіх інших ізолятів тут міститься серин. У ізолята CMV-36 у 62 положенні міститься лейцин (рис. 8.11), в той же час у інших ізолятів тут присутній серин.

28	M V E A K K Q R R R S H K Q N R R E R G H K S P I E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
36	M V E A K K Q R R R S H R Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L L R F L P F Y Q I D G L E L
58	M V E A K K Q R R R S H K Q N R R E R G H K S P I E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
AN (pepper)	M M E V K R Q R R R S H K K N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q I D G S E L
EF H80 4 1 (tobacco)	M V E A K R Q R R R S H K K N R R E R C Y K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
Cah1 (Canna)	M V E A K R Q R R R S H K K N R R E R C Y K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
CMV-W4 (pepper)	M V E A K R Q R R R S H K K N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q I D G S E L
CMV-XB (pepper)	M V E A K R Q R R R S H K K N R R E R C Y K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G L E L
CMV-Y1 (cucumber)	M V E A K R Q R R R S H K K N R R E R C H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
CTL (Brassica)	M V E A K R R R R R S H K K N R R E R C H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
LWY (tobacco)	M V E A K R Q R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G P E L
ML-25 (melon)	M M E V K R R R R K S H K M N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
N5 (pepper)	M M E A K R L R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G L E L
N7 (pepper)	M M E A K R L R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
ND1 (pepper)	M V E A K R Q R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
ND2 (pepper)	M V E A K R Q R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
P522 (pepper)	M V E V K R Q R R R S H M K N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
PRC (tobacco)	M V E A K R Q R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
QZ (tobacco)	M V E A K R Q R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
RF1 (pepper)	M V E A K K R R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
RF12 (pepper)	M V E A K R Q R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
RPDJ (Rorippa palustris)	M V E A K R Q R R R S H K K N R R E R C Y K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
S17 (solanum)	M V E A K R Q R R R S H K K N R R E R C H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y R V D G S E L
S20 (solanum)	M V E A K R Q R R R S H K K N R R E R C H K S P S E R A R S S P R L F R F L P F Y R V D G S E L
SFQT1-2 (tomato)	M V E V K R Q R R R S H K K N R R E R C Y K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q I D G S E L
SNK (cucumber)	M M E V K R R R R K S H K T N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
Vr (pepper)	M V E V K R Q R R R S H K K N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L
WN1 (pepper)	M V E A K R Q R R R S H K Q N R R E R G H K S P S E K A R S N L R L F R L L P F Y Q V D G A E L
WXM-1 (banana)	M L E V K R Q R R K S H K M N R R E R G H K S P S E R A R S N L R L F R F L P F Y Q V D G S E L

Рисунок 8.11 - Унікальні заміни амінокислот у білку 2b українських ізолятів CMV

Ми припустили, що такі унікальні заміни можуть бути пов'язані з рослиною-хазяїном, адже ізоляти CMV-28 і CMV-58 виділені з *Cucurbita pepo* L. Проте на філогенетичному дереві ізолятів з різними хазяїнами, не спостерігалось жодної статистично достовірної кореляції (рис. 8.12).

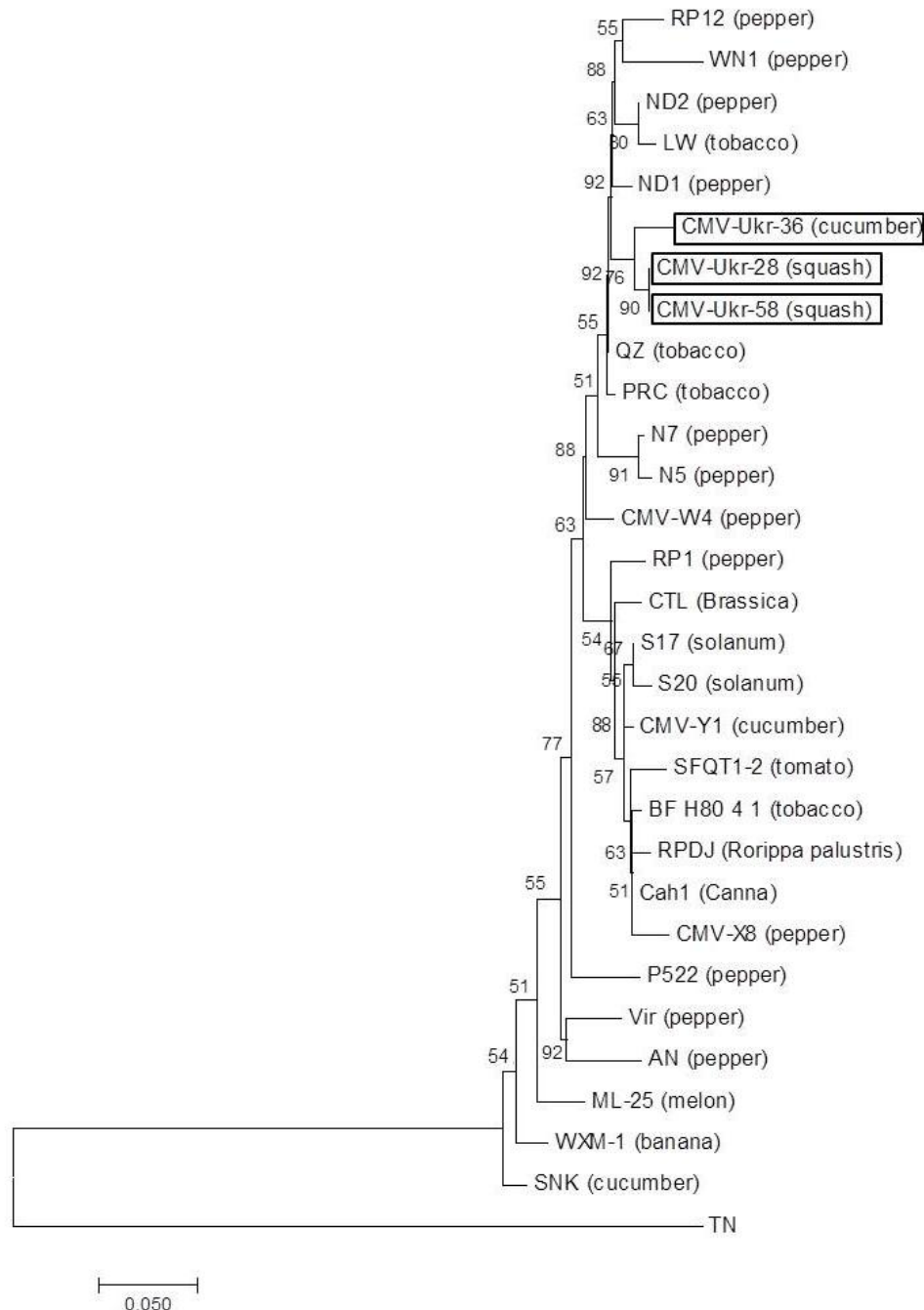


Рисунок 8.12 - Філогенетичні відносини штамів та ізолятів CMV, виділених з різних рослин-хазяїв. Дерево побудоване за геном капсидного білка. методом NJ. Українські ізоляти виділені прямокутниками. Еволюційні відстані розраховано з використанням моделі Джукса-Кантора

Для даного філогенетичного дерева було обрано всі штами та ізоляти групи ІВ, для яких відоме джерело виділення. У якості аутгрупи було використано штам CMV-TN (AB176847), що належить до групи ІІ CMV. На наступному етапі було побудовано та проаналізовано філогенетичні дерева для нуклеотидних послідовностей капсидного білка, білка руху та 2b.

Філогенетичне дерево для нуклеотидних послідовностей капсидного білка уже наводилось у попередньому підрозділі. У ньому присутні також послідовності даних ізолятів. Проте, на жаль, не для всіх штамів та ізолятів, використаних у попередньому дереві отримано нуклеотидні послідовності генів білка руху та 2b, тому у даному розділі наводиться дерево з іншим набором штамів та ізолятів (табл. 8.14).

Таблиця 8.14 - Перелік штамів та ізолятів обраних для філогенетичного аналізу

Штам	Група	Хазяїн (якщо вказаний)	Номер		
			CP	MP	2b
WN1	ІВ	<i>Piper nigrum L.</i>	KT004544	KT004544	KT004543
D8		Японська редиска	AB004781	AB004781	AB179765
CTL	ІВ	<i>Brassica chinensis</i>	EF213025	EF213025	EF213024
Phy			DQ412732	DQ412732	DQ412731
Cb7	ІВ	<i>Lycopersicon esculentum</i>	EF216867	EF216867	DQ785470
Lucknow		<i>Lycopersicon esculentum</i>	EF153734	EF153734	EU516322
New Delhi		<i>Lycopersicon esculentum</i>	GU111229	GU111229	GU111228
ND1		<i>Nicotiana sp.</i>	EU414785	EU41485	EU414798
Pf		<i>Passiflora edulis</i>	AF368192		AB368500

Штам	Група	Хазяїн (якщо вказаний)	Номер		
			CP	MP	2b
P1	IA		AJ006988		
Ri-8	IA	<i>Lycopersicon esculentum L.</i>	AM183119		AM183118
I17F	IA		Y18137		HE793684
Vir	IB	<i>Capsicum sp.</i>	HE962480	DQ006805	HE962479
Mf		<i>Melandryum firmum</i>	AJ276481	AJ276481	AJ276480
Rb		<i>Rudbeckia hirta var. pulcherrima</i>			GU327364
P1		<i>Nicotiana tabacum</i>			AB920778
ZM		<i>Zea mays</i>	JN180311	JN180310	JN1803101
M	IA	<i>Cucumis sativus L.</i> Лабораторна рослина - <i>Nicotiana rustica</i>			EU294145

Як видно з попередньої таблиці, для філогенетичного аналізу було відібрано штами та ізоляти групи I, бо попередній філогенетичний аналіз встановив, що ці ізоляти належать до підгрупи IB. У якості аутгрупи було використано штам CMV-TN (AB176847), що належить до групи II CMV.

Новостворене філогенетичне дерево для нуклеотидних послідовностей гену капсидного білка подано на рис. 8.13.

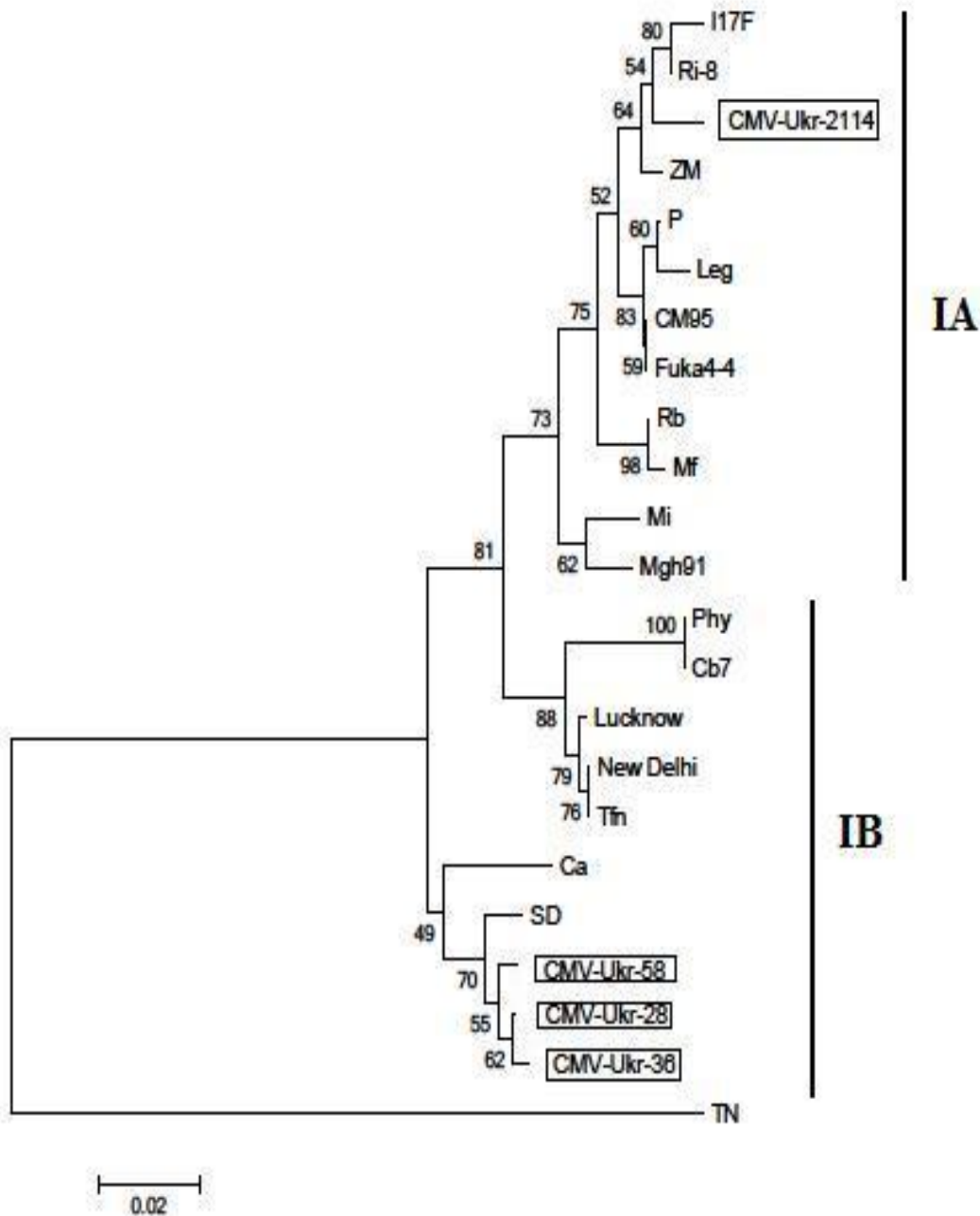


Рисунок 8.13 - Філогенетичне дерево ділянки гену капсидного білка представників IA та IB груп CMV, побудоване за допомогою методу найближчих сусідів у програмі MEGA 6. Еволюційні відстані розраховано з використанням моделі Джукса-Кантора. Українські ізоляти виділені прямокутниками, бутстреп-підтримка вказана над гілками

На філогенетичному дереві, побудованому на основі послідовностей гену транспортного білка, українські ізоляти

розташовувались у кластері групи IB (рис. 8.14). Найбільша подібність спостерігалась з ізолятом SD, як і в капсидних білків цих ізолятів.

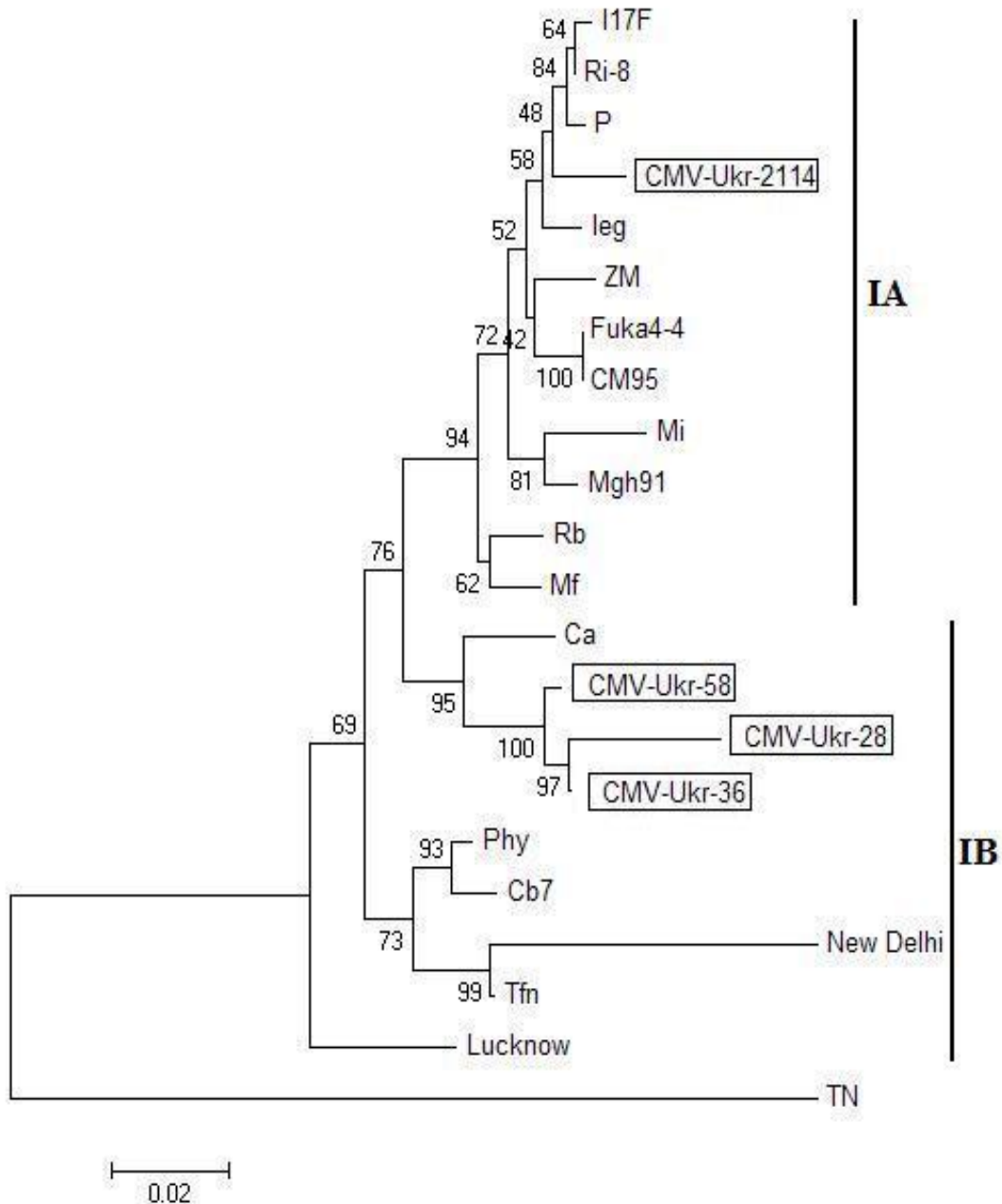


Рисунок 8.14 - Філогенетичне дерево ділянки гену транспортного білка представників IA та IB груп CMV, побудоване за допомогою методу найближчих сусідів у програмі MEGA 6. Еволюційні відстані розраховано з використанням моделі Джукса-Кантора.

На філогенетичному дереві для нуклеотидних послідовностей білка 2b українські ізоляти також розташовувались у кластері групи IB (рис. 8.15).

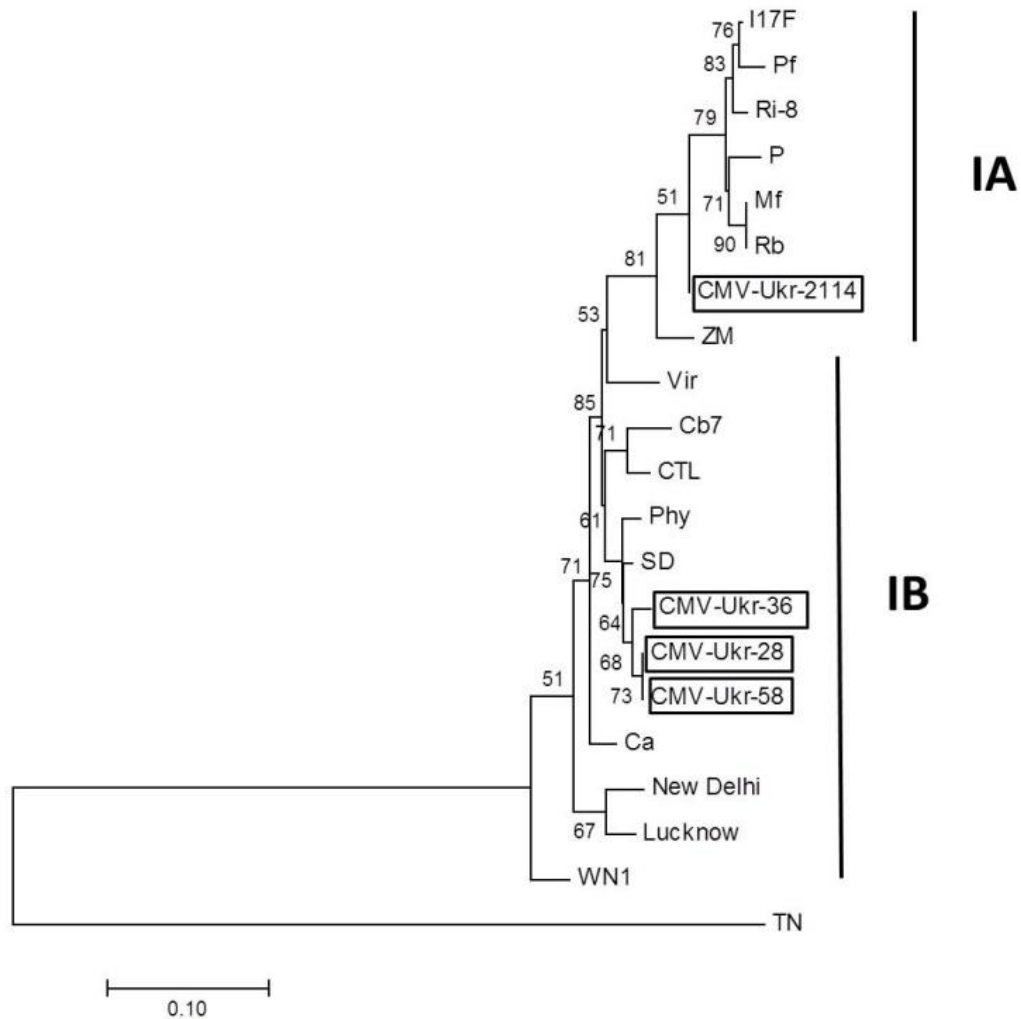


Рисунок 8.15 - Філогенетичне дерево ділянки гену білка 2b представників IA та IB груп CMV, побудоване за допомогою методу найближчих сусідів у програмі MEGA 6. Еволюційні відстані розраховано з використанням моделі Джукса-Кантора

Найбільша подібність нуклеотидних послідовностей спостерігалась з ізолятом SD, як і в гені капсидного білка цих ізолятів, так в гені транспортного білка і білка 2b (табл. 8.15).

Таблиця 8.15 - Подібність нуклеотидних послідовностей генів CP, MP і 2b українських ізолятів та штамів з Генбанку у відсотках

Штами	CP			MP			2b		
	CMV- 28	CMV- 36	CMV- 58	CMV- 28	CMV- 36	CMV- 58	CMV- 28	CMV- 36	CMV- 58
WN1	95	95	94	93	96	96	90	89	90
D8	94	94	94	91	94	94	95	94	95
CTL	94	94	94	91	94	94	93	91	94
Phy	94	94	94	92	95	96	97	94	96
Cb7	94	94	94	92	95	95	92	90	92
Lucknow	95	94	95	90	93	93	87	86	87
New Delhi	95	95	95	85	89	89	87	86	87
<u>SD</u>	<u>97</u>	<u>96</u>	<u>96</u>	<u>95</u>	<u>98</u>	<u>98</u>	<u>96</u>	<u>96</u>	<u>95</u>
Ca	97	96	96	94	96	96	90	88	90
Pf	94	95	94	91	93	94	86	85	86
P1	93	94	93	90	94	94	87	84	87

Ri-8	93	93	93	91	94	94	87	85	88
I17F	92	92	92	91	94	94	88	86	87
Vir	94	94	94	91	93	94	90	89	91
Mf	93	93	93	92	94	94	88	85	87
Rb	94	93	94	92	94	95	88	95	87
P1	93	94	93	90	94	94	87	84	87
ZM	94	93	94	91	93	93	91	89	91
M	94	94	94	91	94	94	87	85	88

Топологія дерев для послідовностей генів білків CP, MP та 2b відрізнялась лише розташуванням ізоляту D8, що, скоріш за все, пов'язано з тим, що даний ізолят є реасортантом, і збігається з літературними даними. Стосовно українських ізолятів, то їхнє розташування на трьох деревах відрізняється лише взаємним розташуванням у межах кластеру групи IB. Такий результат може говорити про те, що дані ізоляти не є реасортантними, а відмінності у подібності можна пояснити імовірними рекомбінаціями у відповідних ділянках геному.

Отже, вірус огіркової мозаїки у агроценозах України представлений геногрупами IA і IB, що належать до групи I CMV. Геногрупа IB більш чисельна і об'єднує ізоляти CMV-Ukr-28, CMV-Ukr-36, CMV-Ukr-58, а до геногрупи IA входить один ізолят CMV-Ukr-2114. Нуклеотидні послідовності українських ізолятів в межах кожної з геногруп характеризуються високою подібністю між собою та з іншими відомими

штамами CMV. Що стосується українських ізолятів, то найвища подібність за нуклеотидними послідовностями генів CP і MP була у CMV-Ukr-36 і CMV-Ukr-58: 99% і 99,2% відповідно. Тоді як подібність нуклеотидної послідовності гену 2b для вищевказаних ізолятів була дещо меншою і становила 95%. Імовірною причиною цього є реасортація. В протипагу, найвища подібність нуклеотидної послідовності гену 2b була у ізолятів CMV-Ukr-28 та CMV-Ukr-58 і становила 99,6%, хоча інші ділянки геному цих ізолятів (CP, MP) характеризувалися значно нижчою подібністю. Таку ситуацію можна пояснити специфікою рослини-хазяїна з якої був виділений ізолят. Так, ізоляти CMV-Ukr-28 та CMV-Ukr-58 були ізольовані з рослини *Cucurbita pepo*, а CMV-Ukr-36 – з *Cucumis sativus*.

Отже, встановлено, що CMV на території України представлений ізолятами групи IA, які зустрічаються в низці інших європейських країн, та IB, які рідше виявляються у даному регіоні.

Виявлено унікальні заміни у амінокислотних послідовностях білка 2b ізолятів CMV-28 і CMV-58, які не пов'язані з рослиною-хазяїном.

Що стосується найбільш вірогідних шляхів потрапляння CMV на територію України, то можна припустити, що ізоляти геногрупи IB в агроценози нашої країни було занесено з Китаю, оскільки подібність між українськими ізолятами і китайським ізолятом SD складає 98%. Ізоляти ж геногрупи IA, у даному разі представником якої є CMV-Ukr-2114, могли потрапити в Україну з країн Середземномор'я, оскільки подібність між даним українським ізолятом і найбільш близькоспорідненими штамми з Іспанії та Франції становить більше 98%.

Ймовірно на територію нашої країни вірус огіркової мозаїки із вищевказаних країн потрапив з вірусінфікованим насінням. Тому необхідно здійснювати ретельний контроль та сертифікацію насіння при імпорті його в Україну.

8.4 Філогенетичний аналіз ізолятів *Tomato mosaic virus*

На сьогодні вірус мозаїки томатів (ToMV), що належить до роду *Tobamovirus* родини *Virgaviridae* знайдено практично в усіх куточках земної кулі. Його ідентифікують в тепличних і польових умовах на багатьох видах рослин на всіх континентах, окрім Антарктиди. Вірус мозаїки томатів здатен уражувати не лише покритонасінні, а і голонасінні рослини, його у великій кількості виділяють з льодовикової та річкової води. Однак, найбільш часто ToMV детектують на рослинах з родини пасльонових і її найтипівіших представниках: томатах, перці, баклажанах, картоплі [65]. Симптоми проявляються на будь-якій стадії росту рослини, як на вегетативних, так і на генеративних органах.

Вірус мозаїки томатів спричиняє серйозні висококонтагіозні захворювання овочевих культур, а якщо рослини розвиваються з вірусінфікованого насіння, то може призвести і до повної втрати врожаю. Подібно до вірусу мозаїки тютюну, ToMV здатен протягом багатьох років зберігатися в ґрунті і залишках рослинного матеріалу, він ефективно передається насінням, через контакт рослин, робочий інвентар, а також з допомогою дрібних тварин та птахів в процесі їх харчування [64].

Зважаючи на високу контагіозність та убіквітарність ToMV, дослідження його в агроценозах України наразі є дуже актуальним. До того ж, на сьогодні немає жодної інформації стосовно штамового різноманіття ToMV в умовах України, таким чином було цікаво порівняти українські ізоляти вірусу мозаїки томатів з уже відомими штамми і ізолятами цього вірусу.

Протягом останніх років ми детектували ToMV виключно в умовах відкритого ґрунту на рослинах томатів, перцю та баклажанів. В основному, це була моноінфекція, однак траплялася і змішана інфекція з Y-вірусом картоплі [171].

В агроценозах України, при ураженні ToMV, на вірусінфікованих рослинах перцю розвивалися симптоми жовтої кільцевої мозаїки та жовто-зеленої листкової мозаїки, плоди при цьому деформувалися; рослини баклажанів демонстрували системну некротичну реакцію, а на листі томатів розвивалася темно-зелена і жовто-зелена мозаїка, а також спостерігалася деформація листкової пластинки з засиханням країв листка та скручуванням листкової пластинки. На плодах томатів спостерігалися світлі плями у вигляді кілець [164].

У наших попередніх дослідженнях велику увагу було приділено перевірці комерційного насіння овочевих культур на наявність антигенів ToMV. Імуноферментним методом було проаналізовано різні сорти насіння томатів, перцю овочевого і баклажанів та виявлено значний відсоток вірусконтамінованого насіння [171]. Таким чином, доцільно припустити, що вірусінфіковане комерційне насіння може бути однією з причин появи і розповсюдження ToMV в агроценозах України. Більш того, з вірусінфікованого насіння було виділено ізолят VMTo (ToMV-ukr3) та депоновано його послідовність гену каспидного білка до Ген Банку.

Для виділення тотальної РНК використовували рослини томатів з агроценозів Полтавської та Черкаської областей, які в ІФА позитивно реагували з тест-системою до вірусу мозаїки томату. Ізолят ToMV-ukr-5 було виділено з рослин томатів відкритого ґрунту Черкаської області, а ізолят ToMV-ukr-10 – з Полтавської області.

Після виділення тотальної РНК з інфікованих рослин проводили зворотньютранскрипційну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ–ПЛР) [204, 217] зі специфічними праймерами до ділянки РНК, яка кодує капсидний білок вірусу мозаїки томату:

Дані праймери ампліфікують фрагмент розміром 700 п.о., який відповідає гену капсидного білка вірусу [222].

У результаті проведення ЗТ–ПЛР було отримано продукти ампліфікації розміром 700 п.о., що відповідає за розміром ділянці геному, яка кодує капсидний білок вірусу (рис. 8.16).

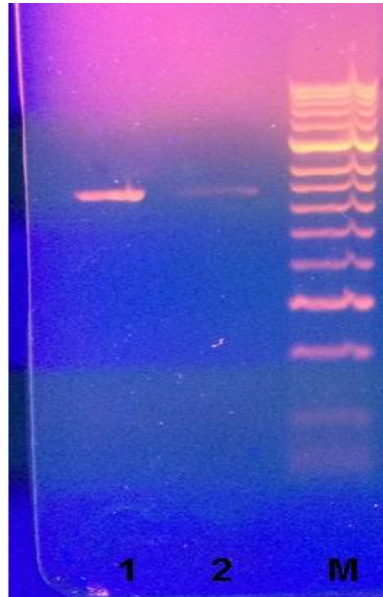


Рисунок 8.16 - Електрофореграма отриманих продуктів кДНК українських ізолятів вірусу мозаїки томату. М – маркер молекулярних мас HyperLadder™ 50по (Bioline); 1 – кДНК капсидного білка ізоляту ToMV-ukr-5; 2 – кДНК капсидного білка ізоляту ToMV-ukr-10, 700 п.о.

Після сиквенування кДНК українських ізолятів вірусу мозаїки томату проводили порівняння сиквенованих нуклеотидних послідовностей капсидного білка українських ізолятів ToMV-ukr-5 і ToMV-ukr-10 між собою та з такими ж відомих штамів і ізолятів ВМТо. Послідовності штамів та ізолятів ВМТо було взято з Генбанку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Штами та ізоляти з Генбанку ми відбирали таким чином, щоб охопити, по можливості, всі країни та всі види рослин, на яких було виявлено вірус мозаїки томатів. Нами було проаналізовано 10 штамів та 20 ізолятів з Генбанку (табл. 8.16).

Таблиця 8.16 - Штами та ізоляти ToMV з Генбанку, які були використані у філогенетичному аналізі

Назва штамів/ ізоляту	Реєстраційний номер послідовності	Джерело виділення	Країна
Ізолят G2	JX025566	<i>Gomphrena globosa</i>	Китай
Ізолят T1	JX025564	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Китай
Ізолят P2	JX025563	<i>Solanum muricatum</i>	Китай
Ізолят SL-1	KY912162	tomato	Словакія
Штам camellia	AJ417701	camellia	Китай
Ізолят mutoko	KX711903	<i>Solanum lycopersicum</i>	Зімбабве
Ізолят Hemerocallis	DQ230836	<i>Hemerocallis</i>	Бразилія
Ізолят ukr3	KP861861	tomato seeds	Україна
Ізолят 99-1	KR537870	<i>Jasminum multiflorum</i>	США, Флорида
Ізолят Penghu	KJ207374	<i>Solanum muricatum</i>	Тайвань
Ізолят Kh-C239	KC914400	<i>Cucumis sativus</i>	Іран

Ізолят Sm-T107	KC914397	<i>Solanum lycopersicum</i>	Іран
Ізолят Нам. Том. 19	JX112025	tomato	Іран
Ізолят Queensland	NC_002692	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Grosse Lisse	Австралія
Ізолят S14	JF810437	tomato	Іспанія
Ізолят Ls-K	HM623426	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Південна Корея
Ізолят ToMV-tom	EU885417	tomato	Південна Корея

Аналіз нуклеотидного сиквенсу проводили за допомогою програми MEGA 6 [232]. Для вирівнювання нуклеотидних послідовностей використовували метод CLUSTAL W. Побудову філогенетичних дерев ізолятів проводили за допомогою програми MEGA 6, використовуючи метод зв'язування найближчих сусідів [236]. Для перевірки достовірності дерев застосовували бутстреп аналіз (1000 реплікацій) [238].

Побудова комплексного філогенетичного дерева дозволила об'єднати досліджувані штами і ізоляти ToMV у два окремі кластери (рис. 8.17).

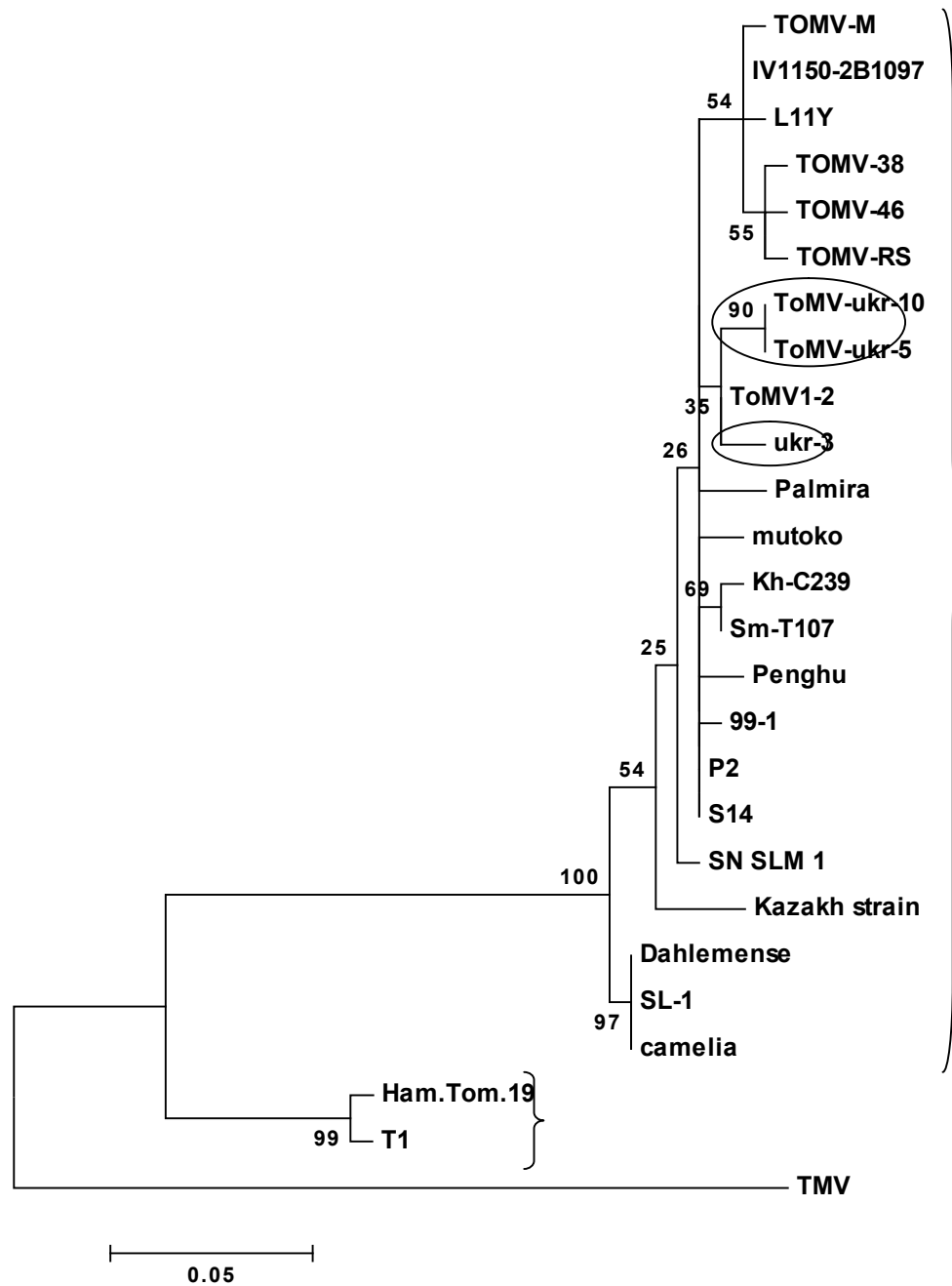


Рисунок 8.17 - Філогенетичні відносини ізолятів ToMV. Дерево побудоване за геном капсидного білка методом NJ. Українські ізоляти виділені овалом. В якості кореня використано китайський ізолят Віїє-2 (HE818414) вірусу тютюнової мозаїки

До першого, найбільш багаточисельного кластера, увійшли майже всі досліджувані штами та ізоляти вірусу, а до другого – лише два

представники вірусу мозаїки томату – ізолят T1 та ізолят Нам.Том.19, які з українськими ізолятами були подібними на 79,4%. Обидва ізоляти було виділено з рослин томату: T1 – в Китаї, а Нам.Том.19 в Ірані.

Досліджувані українські ізоляти ToMV-ukr-5 та ToMV-ukr-10 були подібними на 100% та увійшли до першого кластера. Окрім двох українських ізолятів сюди увійшли ще 28 досліджуваних штамів та ізолятів, подібність у відсоток у яких з українськими ізолятами становила від 96 до 98,9%.

У межах першого кластера чітко виділяються два субкластера. До першого субкластера входять штами та ізоляти, у яких подібності з українськими ізолятами становить більше 96,7%, а до другого – три штами та ізоляти з подібністю 96,1% по відношенню до українських ізолятів. Це словацький ізолят SL-1, виділений з рослин томатів, китайський штам *camellia*, виділений із декоративної рослини камелії та германський ізолят *Dahlemense DSMZ PV-0135*.

Як показали результати філогенетичного аналізу, українські ізоляти ToMV-ukr-5 та ToMV-ukr-10, виділені з рослин томату, мали дуже високу (більше 98,4%) подібність зі штамами та ізолятами вірусу мозаїки томату, виділеного з рослин не лише томатів, але і пепіно, і навіть декоративних рослин, що належать до різних родин. Дуже цікавим є факт, що українські ізоляти є подібними до бразильського ізоляту *Neurocallis*, виділеного з декоративної рослини лілійника родини Ксанторієвих, або китайського ізоляту G2, виділеного з рослини *Gomphrena globosa* родини Амарантових. Також слід згадати про ізоляти вірусу, ізольовані з рослин томатів, які мали саму різноманітну географічну локацію: єгипетський AN4, австралійський Queensland, південно-корейські ToMV-tom та Ls-K, іспанський S14 та великобританський штам FERA_160205.

Дещо меншу спорідненність, а саме від 97,2 до 97,8%, український ізолят ukr-3, ізольованим нами раніше з насіння томату, мав з томатними ізолятами Palmira з Колумбії, mutoko з Зімбабве, Sm-T107 з Ірану та

штамом TOMV-M з Малайзії . Поряд з цим прослідковувалась висока спорідненість з японським штамом з тютюну (L11Y), індійським (SN SLM 1) та тайванським (Penghu) ізолятами з пасльону, і навіть іранським ізолятом з огірків. Дуже цікаво, що українські ізоляти були близькоспорідненими зі штамом IV1150-2B1097, ізольованим дослідниками з талої льодовикової води у Гренландії, а також з ізолятом 99-1, виділеним з рослини жасміну у Сполучених Штатах Америки.

І нарешті, подібність в межах від 96,1 до 96,7% українські ізоляти мали зі штамми з США, ізольованими з водного середовища у штаті Нью-Йорк: TOMV-38 – зі струмка на горі Вайтфейс та TOMV-46 – озера на горі Катамаунт, а також зі штамом TOMV-RS, виділеним з ялини червоної (родина Соснові), що відноситься до голонасінних рослин. Штами із США, виділені із нетипових джерел, разом з малайзійським томатним штамом TOMV-M та японським тютюновим штамом L11Y формують окремий невеликий субсубкластер у межах першого субкластера.

Аналізуючи отримані результати, можна стверджувати про дуже високу подібність українських ізолятів з відомими штамми і ізолятами вірусу мозаїки томатів. Причому, висока, а це більше 96% подібність, прослідковується незалежно від джерела виділення вірусу чи виду рослини-хазяя, а тим паче їх географічного поширення. Як бачимо, вірус мозаїки томату може легко долати міжвидові бар'єри, уражуючи як овочеві, так і декоративні рослини. Більш того, маючи за природного хазяя пасльонові культури, вірус мозаїки томату легко уражує хвойні рослини. Його у великій кількості виділяють з талої льодовикової, струмкової та озерної води. Все це вказує на убіквітарні властивості вірусу.

Прослідкувати шляхи потрапляння в Україну вірусу мозаїки томату і встановити джерело інфекції наразі дуже важко. Дослідження та аналіз філогенетичних дерев, на жаль, не можуть надати вичерпної інформації з цього приводу. На сьогодні ареал вірусу значно розширився і його

детектують у багатьох країнах світу на всіх континентах, окрім Антарктиди.

Що стосується України, то протягом останніх років ми виявляли вірус мозаїки томатів у агроценозах відкритого ґрунту на культурах томату, перцю овочевого та баклажанів. У тепличних же умовах на території України даний вірус не зустрічався. Враховуючи той факт, що на ринку України наявне насіння, контаміноване вірусом мозаїки томатів, можна припустити, що саме в такий спосіб даний вірус поширюється в агроценозах країни і не виключено, що разом з інфікованим насінням вірус мозаїки томатів був завезений в Україну.

Таким чином, три ізоляти вірусу мозаїки томатів: ukr-3, ToMV-ukr-5 і ToMV-ukr-10 було виділено з насіння та рослин томатів відкритого ґрунту різних регіонів України. У філогенетичному аналізі було показано високу спорідненість за геном капсидного білка українських ізолятів між собою та з уже відомими штамми та ізолятами цього вірусу. Найбільш високу подібність, більше 98%, українські ізоляти мали з бразильським ізолятом *Hemerocallis*, виділеним з декоративної рослини лілійника родини Ксанторієвих, китайським ізолятом G2, виділеним з рослини *Gomphrena globosa* родини Амарантових та томатними ізолятами: єгипетським AN4, австралійським Queensland, південно-корейськими ToMV-tom і Ls-K, іспанським S14 та великобританським штамом FERA_160205. Двадцять вісім із тридцяти проаналізованих штамів та ізолятів ВМТо були більше ніж на 96% подібні українським ізолятам, причому така подібність прослідковувалась незалежно від джерела виділення вірусу, виду рослини-хазяя та їх географічного поширення.

У результаті проведеного філогенетичного аналізу та порівняння ToMV-ukr3, ToMV-ukr5, ToMV-ukr10 з охарактеризованими штамми ВМТо встановлено, що виділений патоген споріднений зі штамми ToMV-1-2, ToMV-G26 і ToMV-G6. Показано, що виявлений ізолят не належить до

високошкодочинних штамів, які можуть долати стійкість сортів до даного вірусу

8.5 Філогенетичний аналіз ізолятів Pepper mild mottle virus

Задля встановлення нуклеотидної послідовності гену капсидного білку українських ізолятів РММoV спочатку проводили процедуру виділення тотальної РНК, яку у подальшому використовували у постановці ЗТ-ПЛР (рис. 8.18 (А)).

Отриману тотальну РНК використовували у ЗТ-ПЛР.

Опрацювавши літературні дані та обравши специфічні праймери до гену капсидного білку РММoV, була проведена ЗТ-ПЛР (рис. 8.18).

Послідовності праймерів:

5'-TAC TTC GGC GTT AGG CAA TC-3'(forward);

5'-GGA GTT GTA GCC CAG GTG AG-3' (reverse) [223].

У результаті постановки ЗТ-ПЛР для зразків з перцю овочевого та помідору звичайного були отримані продукти ампліфікації відповідного розміру - 387 по, які у подальшому використовувалися для сиквенування та побудови філогенетичного дерева.

Оскільки, за результатами імуноферментного аналізу вірус слабкої крапчатості перцю був ідентифікований у зразках рослин перцю овочевого і помідору звичайного, то процедуру виділення тотальної РНК, ЗТ-ПЛР, сиквенування та філогенетичний аналіз було проведено для обох зразків рослин.

На сьогодні відомо 13 штамів вірусу слабкої крапчатості перцю, які були ідентифіковані з різних країн, з різних рослин [11, 73,76].

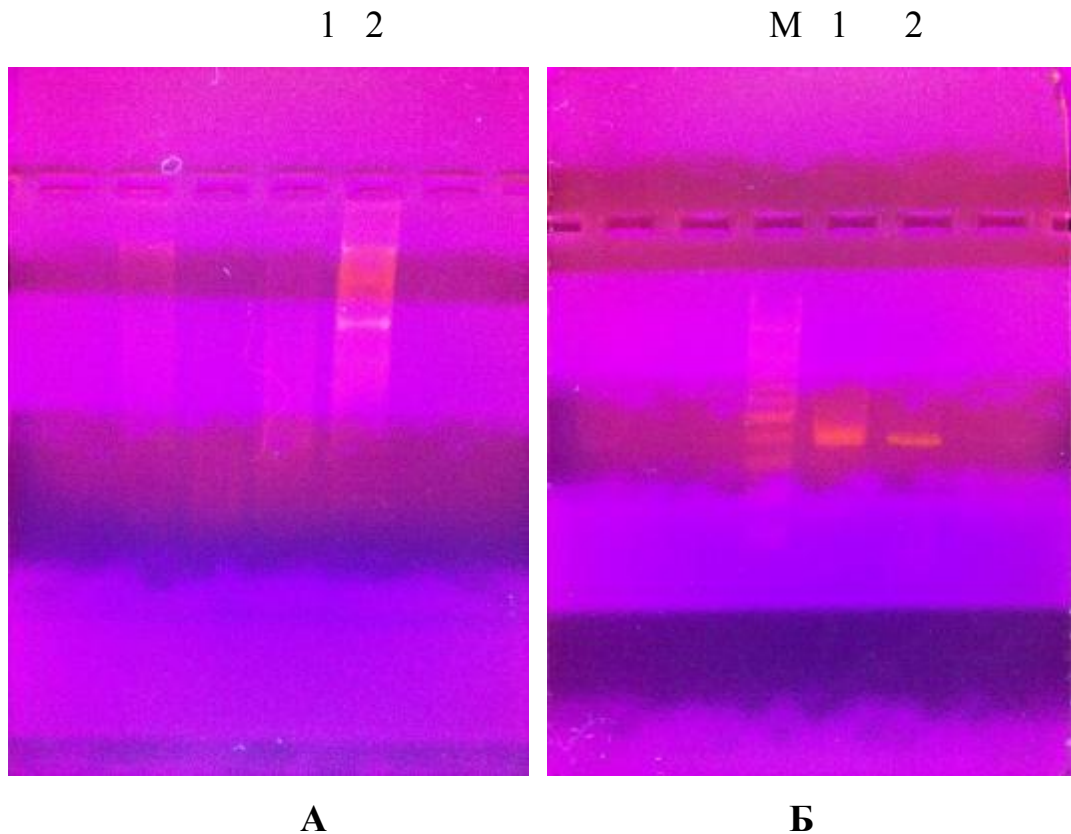


Рисунок 8.18 - Електрофореграма: А-тотальної РНК, виділеної з рослини перцю овочевого (1) та помідору звичайного (2), Б- продуктів ЗТ-ПЛР РММoV: М – маркер (100по, Fermentas); 1 – кДНК гену капсидного білку РММoV (з перцю овочевого); 2 – кДНК гену капсидного білку РММoV (з помідору звичайного)

Оскільки був ідентифікований вірус слабкої крапчатості перцю, який раніше не детектували на території України, то був проведений філогенетичний аналіз кДНК його капсидного білку розміром 387 по двох ізолятів (з перцю овочевого та помідору звичайного) (рис. 8.19) з метою визначення штамової приналежності українських ізолятів

Філогенетичне дерево побудоване з використанням методу Neighbor-Joining у програмі MEGA. Попередньо була проведена ЗТ-ПЛР та сиквенс отриманого продукту.

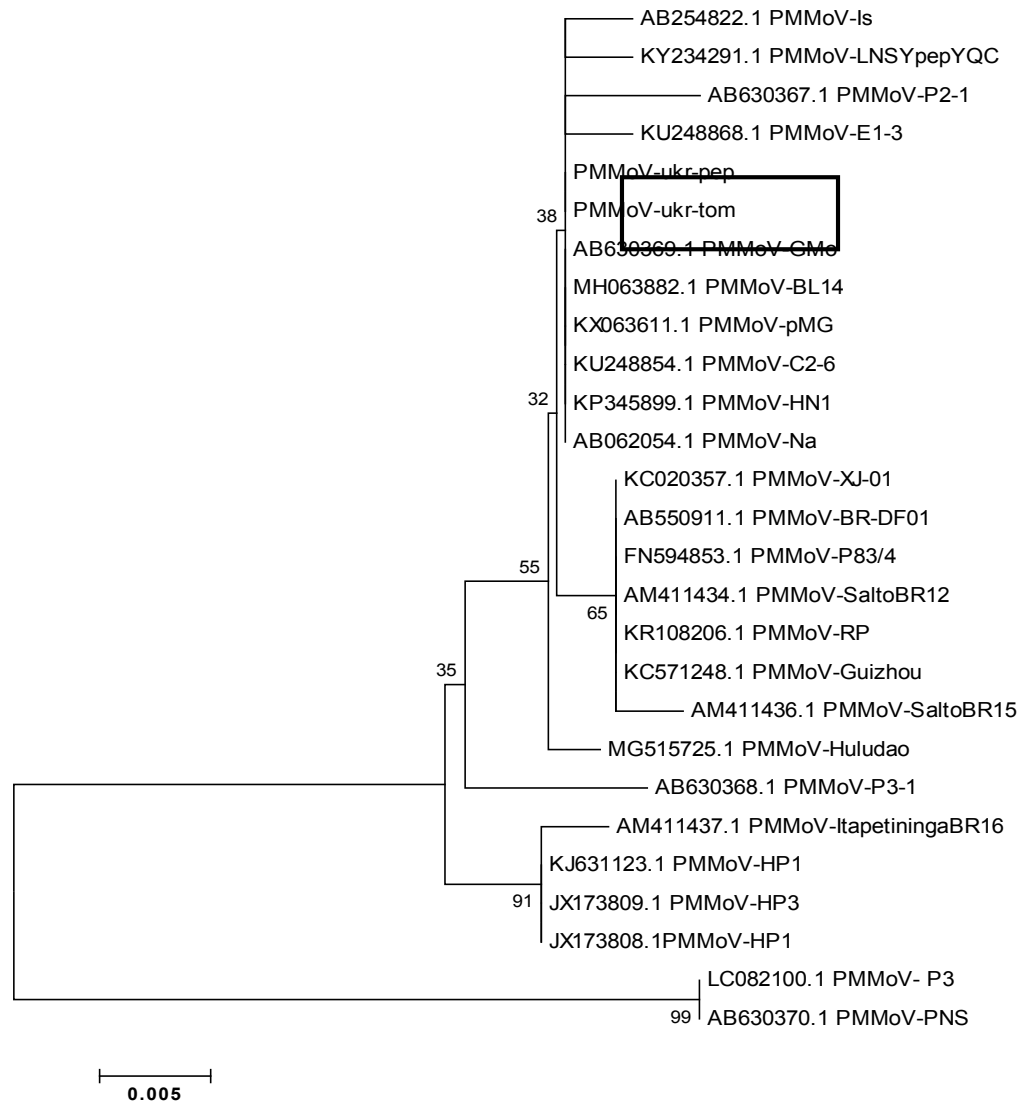


Рисунок 8.19 - Філогенетичні відносини ізолятів PMMoV. Дерево побудоване за геном капсидного білка методом NJ. Українські ізоляти виділені прямокутниками

Отже, українські ізоляти PMMoV з рослин перцю овочевого та помідору звичайного належить до кластера штамів Іспанії та Японії, згідно отриманої філограми.

Окрім того, було визначено подібність у відсотках (нуклеотидну та амінокислотну) вже існуючих штамів з українськими ізолятами (табл. 8.17).

Таблиця 8.17 - Подібність нуклеотидних та амінокислотних послідовностей українських ізолятів РММoV з відомими на сьогодніштами РММoV

Штами РММoV	Країна/хазяїн	Подібність нуклеотидних послідовностей, %		Подібність амінокислотних послідовностей, %	
		РММoV_UKR (перець)	PMMV_UKR (томат)	РММoV_UKR (перець)	PMMV_UKR (томат)
BR- DF01	Бразилія/ перець	99,7	99,4	100	99
E2	Єгипет/перець	99,4	99,3	100	100
Israel	Ізраїль/перець	99,4	99,3	99	99
Is	Японія/перець	99,4	99,4	99	99
S	Іспанія/перець	98,5	98,6	99	99
P3-1	Корея/перець	97,9	97,6	97	96
Iw	Японія/перець	97,2	97,4	96	97
L4BV	Японія/ помідор	96,6	96,8	93,9	91,9
P0	Корея/ помідор	96,3	96,7	89,6	90,3

P2	Корея/ помідор	94,4	94,5	97,6	97,5
Italia	Італія/перець	94	94	98,3	98,1
PNS3-2	Корея/ помідор	93,7	93,9	99,3	99,4
PNS	Корея/перець	94,2	94,4	96,4	96,6

При порівнянні ділянок нуклеотидного сиквенсу кДНК капсидного білка виділених ізолятів (з перцю та томату) РММV між собою встановлено, що подібність становить більше ніж 99%. Відомим є той факт, що якщо подібність нуклеотидних послідовностей вірусів становить 95% і більше, то вони є ізолятами одного штаму, якщо ж менше 90% - то це різні штами одного вірусу. Отже, українські ізоляти РММV належать до одного і того ж штаму.

Філогенетичний аналіз кДНК гену капсидного білка українських ізолятів РММoV з рослин перцю овочевого та помідору звичайного виявив приналежність їх до кластерів штамів вірусів Бразилії, Іспанії, Єгипту та Японії та встановив високу подібність між собою за геном капсидного білку не залежно від хазяїна.

8.6 Філогенетичний аналіз ізолятів *Turnip mosaic virus*

Вірус мозаїки турнепсу (*Turnip mosaic virus* (TuMV)) є типовим представником роду *Potyvirus*, який належить до найбільшої родини вірусів рослин – *Potyviridae*. TuMV характеризується гнучкими

ниткоподібними віріонами приблизно 700-750 нм у довжину, які містять одноланцюгову смислову геномну РНК розміром приблизно 10,000 нт [11]. Подібно до інших потівірусів, геном TuMV має одну відкриту рамку зчитування (ORF), при трансляції якої утворюється один великий поліпротеїн, який надалі розщеплюється вірус-кодованими ферментами у 10 функціональних білків [36]. Як і більшість потівірусів, для TuMV притаманне вкрай широке коло хазяїв, хоча найчастіше даний вірус інфікує представників родини хрестоцвітних (*Brassicaceae*) и викликає системні симптоми (мозаїку, плямистість, хлоротичні ураження та ін.). Для культурних рослин роду *Brassica* вірус мозаїки турнепсу вважається одним з найбільш шкочочинних і економічно важливих вірусів [37]. TuMV передається головним чином різними видами попелиць, а також механічно від рослини до рослини, але не передається насінням, хоча нещодавно це було поставлене під сумнів для одного з ізолятів цього вірусу [51].

Вірогідно, TuMV поширений в усьому світі і був знайдений як у помірних, так і у субтропічних регіонах Африки, Азії, Європи, Океанії, а також у Північній та Південній Америках [39-41]. У Європі TuMV детектований у Великобританії [43], Іспанії [42], Італії [44], Греції [46, 303], Німеччині [45], Нідерландах, Чеській Республіці [47], Угорщині [48], Болгарії [50], Польщі [49] та Росії [40].

Україна є однією з найбільших країн Європи і займає стратегічне логістичне положення поблизу «воріт» північного Шовкового шляху між країнами ЄС та Чорноморським/Близькосхідним регіоном, де вірус мозаїки турнепсу був також нещодавно описаний у Туреччині [311] та Ірані [312]. Незважаючи на географічне розташування України та широке культивування різних хрестоцвітних культур протягом століть, TuMV ніколи не був виявлений в нашій країні на культурних рослинах незахищеного ґрунту. Дивним чином, у єдиному повідомленні щодо детекції даного вірусу в Україні описане його виявлення у одному зразку

дикорослої орхідеї *Orchis purpurea*, відібраної в АР Крим у 2004 р. Однак на той час ізолят вірусу не був відновлений на рослинах-хазяях [313].

Базуючись на реакції типових рослин-індикаторів, розрізняють чотири патотипи ізолятів TuMV за їх біологічними властивостями: тип (B) – ізоляти, які здатні інфікувати рослини роду *Brassica* латентно та нерегулярно, і які не інфікують рослини роду *Raphanus*; тип В – ізоляти, які інфікують більшість рослин роду *Brassica*, викликають системну мозаїку на неінокульованих листках, але не інфікують рослини роду *Raphanus*; тип В(R) – ізоляти, які інфікують більшість рослин роду *Brassica*, викликають системну мозаїку на неінокульованих листках, але лише зрідка інфікують рослини роду *Raphanus*, де викликають латентну інфекцію; тип BR – ізоляти, які інфікують як рослини роду *Brassica*, так і представників роду *Raphanus*, і викликають системну мозаїку на неінокульованих листках [314].

Нещодавні філогенетичні дослідження з використанням геномних послідовностей різних ізолятів даного вірусу з усього світу показали, що ізоляти TuMV можна розділити на чотири основних геногрупи, які називаються *basal-Brassica* (*basal-B*; базисна група ізолятів, які уражують рослини роду *Brassica*), *basal-Brassica/Raphanus* (*basal-BR*; базисна група ізолятів, які уражують рослини родів *Brassica/Raphanus*), *Asian-Brassica/Raphanus* (*Asian-BR*; група азіатських ізолятів, які уражують рослини родів *Brassica/Raphanus*) та *world-Brassica* (*world-B*; світова група ізолятів, які уражують рослини роду *Brassica*) [40]. До групи *basal-B* віднесені вірусні ізоляти патотипів (B) чи В. Дана група характеризується найбільшою варіабельністю, не є монофілетичною (тобто походить від різних ізолятів/штамів/видів вірусу (-ів)), її представники виділені як з хрестоцвітних, так і з інших рослин у Євразії. Найбільш спорідненою до цієї групи є монофілетична група *basal-BR*, до якої входять євразійські ізоляти патотипу BR. До третьої найменш варіабельної групи *Asian-BR* входять ізоляти патотипу BR, виділені головним чином з рослин роду

Raphanus у Східній Азії. Нарешті, група world-B містить ізоляти патотипу В, виділені головним чином з рослин роду *Brassica* з усіх континентів.

Дослідження показали, що рекомбінація відіграє важливу роль в еволюції TuMV. Вочевидь, TuMV коеволюціонував з рослинами роду *Brassica* і, вірогідно, походить від однієї з давніх євразійських вірусних субпопуляцій з регіонів Європи / Середземномор'я / Малої Азії [40, 46]. У цих регіонах хрестоцвітні культури є важливим компонентом місцевого сільського господарства. При цьому культури роду *Brassica* є більш типовими для Європи, тоді як у регіоні Малої Азії та Євразії комерційно важливими є культури як *Brassica*, так і *Raphanus*. Це може свідчити, що ізоляти, оптимально адаптовані до хрестоцвітних культур роду *Brassica*, більш ефективно поширюються із розвитком сучасного сільського господарства у порівнянні з ізолятами, які пристосовані до інших видів рослин. З іншого боку, це може також вказувати на те, що більш давні популяції TuMV генетично більш різноманітні і тому містять більше варіантів вірусу, здатних інфікувати рослини інших родів, окрім *Brassica*. У такому контексті ізоляти TuMV, які належать до груп роду *Brassica*, вважаються більш стародавніми, а ізоляти групи *Brassica-Raphanus* – більш сучасними в еволюційному розумінні.

Філогеографічний аналіз продемонстрував, що TuMV вірогідно походить з західної Євразії та/чи Північної Африки від вірусу, що уражував однодольні рослини, можливо, орхідні [315]. В свою чергу, ізоляти TuMV, здатні інфікувати хрестоцвітні рослини (тобто, відносно «нещодавні» ізоляти), могли дивергувати від вірусів, які інфікують орхідні рослини та утворюють окрему монофілетичну та еволюційно давню групу ізолятів [314].

У даному контексті Україна є одним з потенційних кандидатів для пошуку «центру походження» TuMV, оскільки у нас зростає багато різних природних видів орхідей, головним чином на заході (Карпатський регіон) та півдні (Кримський півострів), але не виключно. Окрім того, значний

перелік видів орхідей української природної флори включає *Orchis militaris* – одне з вірогідних «джерел» виникнення TuMV [314]. Виявлення TuMV в дикорослій орхідеї *Orchis purpurea* [313] може свідчити на користь такої гіпотези.

Для проведення філогенетичного аналізу було відібрано 27 ізолятів TuMV з природно інфікованих рослин, всі з яких належали до родини *Brassicaceae*. Вперше секвеновано повний геном одного з таких ізолятів (який за біологічними особливостями належить до патотипу BR) та визначено його філогенетичні властивості у порівнянні з відомими ізолятами TuMV. Отримані результати свідчать про широке поширення вірусу мозаїки турнепсу в Україні, де даний вірус інфікує культурні рослини, бур'яни та інтродуковані види.

Відбір зразків обмежувався регіонами комерційного вирощування сільськогосподарських культур у Київській обл. та різними ділянками у м. Київ, де зростали/культивувалися рослини родини *Brassicaceae*, в тому числі дикорослі. У м. Київ зразки відбиралися у двох ботанічних садах (Ботанічному саді Київського національного університету імені Тараса Шевченка та Ботанічному саді НАН України), центрі міста, Національному музеї народної архітектури та побуту України (де не ведеться сільськогосподарська діяльність) та на приватних присадибних ділянках, де регулярно вирощувалися хрестоцвітні культури. Відбір зразків у Київській обл. проводився на декількох великих полях поблизу селищ Лука та Гореничі, на яких вирощувалися промислові посіви капусти. Хрестоцвітні рослини (капуста, червоний редис, гірчиця та ін.) аналізували візуально, зразки відбирали з рослин з TuMV-подібними симптомами, які включали мозаїку, плямистість, набухання листкових жилок та/чи деформацію листків. Керуючись попередніми повідомленнями щодо інших рослин-хазяїв TuMV [40], також були відібрані деякі симптоматичні дикорослі рослини інших родин. З кожної рослини відбирали декілька листків у позначені герметичні пластикові пакети, заповнені сілікагелем з

кольоровим індикатором (Merck, Germany), надалі зразки транспортувалися у сухому стані до лабораторії. Для ефективної дегідратації рослинних зразків сілікагель у пакетах декілька разів міняли на свіжий, поки його гранули не змінювали свій початковий колір.

Окрім цього, у двох регіонах України були відібрані декілька зразків дикорослих орхідей природної флори з вірусоподібними симптомами. Ці зразки були привезені до лабораторії у свіжому стані у паперових пакетах.

Всі відібрані зразки були надалі проаналізовані методом імуноферментного аналізу (ІФА) у модифікації «сендвіч» [199, 200] на предмет наявності антигенів вірусу мозаїки турнепсу. Загалом було відібрано та проаналізовано 54 зразки хрестоцвітних рослин з TuMV-подібними симптомами мозаїки та плямистості. Окрім того, на наявність антигенів TuMV були проаналізовані 10 зразків орхідей природної флори з вірусоподібними симптомами, відібрані у Київській та Черкаській областях.

Для подальших досліджень ізолят TuMV UKR9 був відібраний на приватній присадибній ділянці у м. Київ та виділений зі зразка рослини *B. oleracea* var. *capitata* (капусти), яка була неінфікована CMV, мала чіткі симптоми набухання жилок листків та характеризувалася високим титром TuMV в ІФА. Надалі ізолят UKR9 був обраний для детального вивчення його біологічних властивостей із використанням спектру типових рослин-індикаторів з родин *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* та *Asteraceae* (табл. 8.18).

Таблиця 8.18 - Результати біологічного тестування ізоляту UKR9 вірусу мозаїки турнепсу

Рослина-індикатор	Типова назва	Джерело насіння	Симптом
Asteraceae			
<i>Calendula officinalis</i> cv. Orange star	Календула	Чилі	LI/M (12/12)
<i>Lactuca sativa</i> cv. Emrap 231	Латук	США	-/- (12/12)
<i>L. sativa</i> cv. Salinas 88	Латук	США	-/- (12/12)
Brassicaceae			
<i>Brassica juncea</i> cv. Hakarashina	Гірчиця	Італія	LI/sM ^a (6/6)
<i>B. napus</i> cv. Norin-32 go	Рапс	Японія	LI/M (6/6)
<i>B. parinosa</i> cv. Tatsuai	Капуста китайська розеткова	Австралія	LI/sM (5/6), -/- (1/6)
<i>B. oleracea</i> var. botrytis cv. Snow crown	Цвітна капуста	Австралія	-/- (6/6)
<i>B. oleracea</i> var. botrytis cv. Snow queen	Цвітна капуста	Чилі	-/- (6/6)
<i>B. oleracea</i> var. capitata cv. Ryozan-2go	Капуста	Японія	LI/Мо, VC (6/6)
<i>B. oleracea</i> var. capitata cv. Shinsei	Капуста	Японія	LI/Мо, VC (5/6), - /- (1/6)

Рослина-індикатор	Типова назва	Джерело насіння	Симптом
<i>B. oleracea</i> var. capitata cv. Sosyu	Капуста	Японія	(LI/Mo, VC) (3/6), -/- (3/6)
<i>B. oleracea</i> var. Grand duke	Кольрабі	Італія	LI/M, VC (6/6)
<i>B. oleracea</i> var. italica cv. Challenger	Броколі	Японія	(LI/CS, Mo) (2/6), -/- (4/6)
<i>B. oleracea</i> var. italica cv. Endever	Броколі	Японія	(LI/Mo, VC) (3/6), -/- (3/6)
<i>B. oleracea</i> var. italica cv. Pixcel	Броколі	Чилі	(LI/Mo, VC) (3/6), -/- (3/6)
<i>B. pekinensis</i> cv. Kyoto- 3go	Капуста китайська	Японія	LI/M (6/6)
<i>B. pekinensis</i> cv. Nozaki- 1go	Капуста китайська	Японія	LI/M (6/6)
<i>B. pekinensis</i> cv. Nozaki- 2go	Капуста китайська	Японія	LI/M (5/6), -/- (1/6)
<i>B. rapa</i> cv. Nakatasuwari	Турнепс	Японія	LI/sM (6/6)
<i>Camelina sativa</i> cv. Calena	Рижій	Австрія	LI/M (6/6)
<i>Eruca sativa</i> cv. Odyssey	Рукола	Італія	LI/sM (6/6)
<i>Matthiola incana</i> cv.	Матіола сива	Японія	LI/M (6/6)

Рослина-індикатор	Типова назва	Джерело насіння	Симптом
Christmas rouge			
<i>Raphanus. sativus</i> cv. Everest	Редис китайський	США	LI/sM (6/6)
<i>R. sativus</i> cv. Taibyosobutori	Редис японський	Нова Зеландія	LI/sM (6/6)
Solanaceae			
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Тютюн	Японія	LI/M (6/6)
<i>N. clevelandii</i>	Тютюн	Японія	NS/- (6/6)
<i>N. glutinosa</i>	Тютюн	Японія	NS/Mo, VC (6/6)
<i>Petunia hybrid</i> cv. F1 duo red	Петунія	США	LI/M (6/6)
<i>P. hybrid</i> cv. F1 rond white imp	Петунія	Чилі	LI/M (6/6)
Chenopodiaceae			
<i>Chenopodium. amaranticolor</i>	<i>Chenopodium album</i> var. album	Японія	CS/CS (2/2)
<i>C. quinoa</i>	Quinoa	Японія	CS/CS (3/3)

^aРеакція інокульованих листків/верхніх (системних) листків.

CS; хлоротичні плями, M; мозаїка, Mo; плямистість, NS; некротичні плями, Ru; зморшкуватість, S; карликовість, sM; сувора мозаїка, VC; повітління жилок, -; не інфікується, (); іноді/нерегулярно.

Ізолят UKR9 викликав системну реакцію на різних рослинах родів *Brassica* (капусті, китайській капусті, кольрабі, гірчиці, рапсі, турнепсі та

ін.) та *Raphanus* (китайському та японському редисі) (реакція окремих рослин-індикаторів показана на рисунку 8.20.

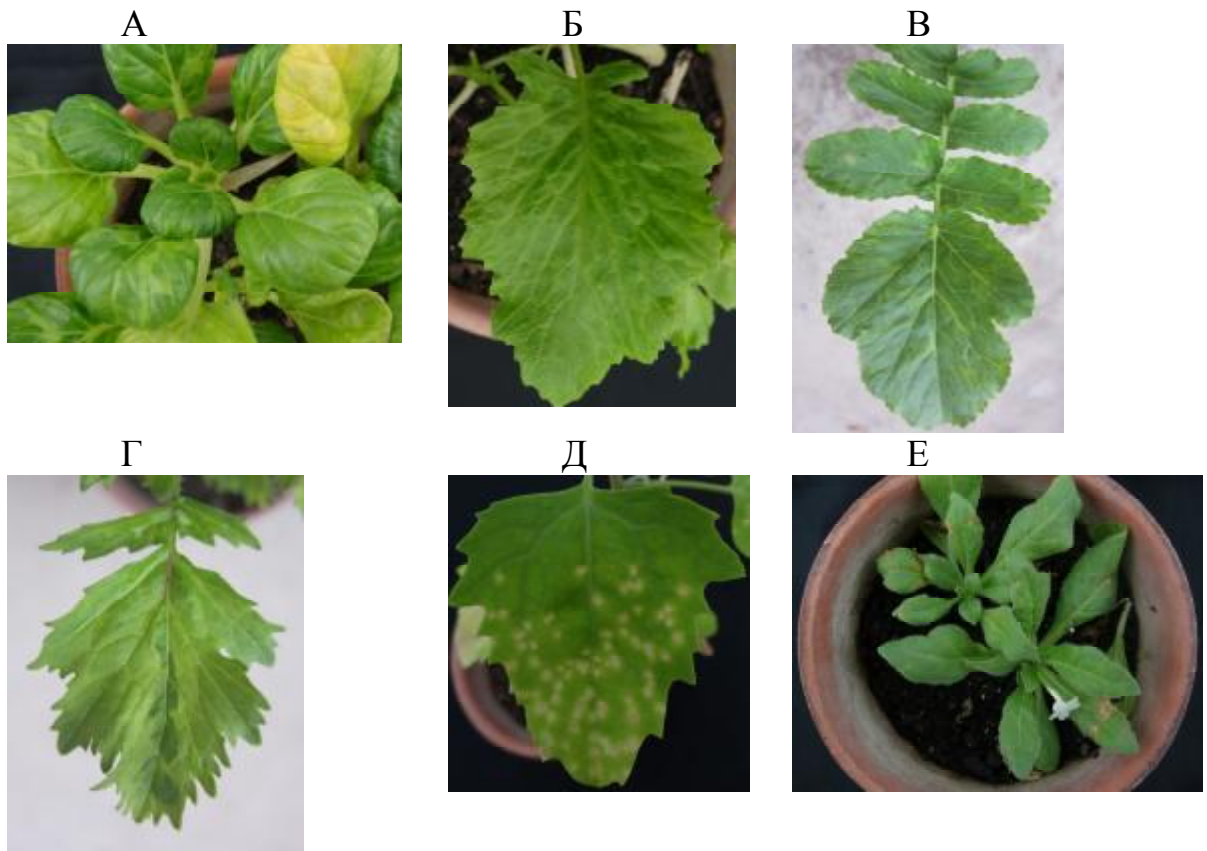


Рисунок 8.20 - Реакція рослин-індикаторів на інокуляцію ізолятом UKR9: (А) - *B. narinosa* cv. Tatsuai; (Б) - *B. rapa* cv. Nakatasuwari; (В) - *R. sativus* cv. Taiyo-sobutori; (Г) - *B. juncea* cv. Nakarashina; (Д) - *C. quinoa*; (Е) - *N. cleavelandii*

Цікаво, що ізолят UKR9 лише зрідка був здатен інфікувати різні сорти броколі та взагалі не інфікував цвітну капусту. Таким чином, за біологічними властивостями ізолят UKR9 належить до патотипу BR.

Надалі вперше в Україні було проведено сиквенування повного геному вірусу рослини (ізоляту TuMV UKR9), розмір якого склав 9833 нт. У сиквенованій послідовності були знайдені всі мотиви, відомі для генів

потівірусів, та визначені гени, що кодують білки P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb та CP.

Еволюція потівірусів часто пов'язана з рекомбінаційними подіями. Для проведення рекомбінаційного та еволюційного аналізів були використані 238 повнорозмірних геномних послідовностей TuMV, які депозитовані у Генбанку, та сиквенована нами повнорозмірна послідовність геному ізоляту TuMV UKR9.

Для коректного вирівнювання всіх послідовностей (які мають різний розмір) з метою упередження зсуву рамок зчитування та правильного усунення проміжків (гепів) всі кодуючі нуклеотидні послідовності (за виключенням 5'- та 3'-нетрансльованих ділянок) були надалі трансльовані за допомогою пакету CLUSTAL X2 та алгоритму TRANSALIGN програми BioEdit v.7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) у амінокислотні послідовності. Надалі коректно вирівнені амінокислотні послідовності були знову зворотньо трансльовані у нуклеотидні послідовності, до яких потім знову «додавали» відповідні попередньо вилучені 5'- та 3'-нетрансльовані ділянки. В результаті була отримана база правильно вирівнених повнорозмірних геномних послідовностей всіх відомих ізолятів TuMV, включаючи UKR9. Така база даних застосовувалася для подальшого рекомбінаційного та філогенетичного аналізу.

Для проведення рекомбінаційного аналізу використовувався програмний пакет RDP4 та вбудовані в нього алгоритми. При проведенні аналізу керувалися вихідними налаштуваннями програмного пакету для лінійних послідовностей зі значенням $P = 0.01$. Достовірними вважалися такі рекомбінаційні події, які були підтверджені принаймні 3 алгоритмами.

Надалі всі послідовності, ідентифіковані як вірогідні рекомбінанти, додатково перевірялися за допомогою оригінального програмного забезпечення SISCAN версії 2 (яке вільно надається Fourment Mathieu, University of Sydney, Australia) із застосуванням «вікон» у 100 та 50 нт.

Такий аналіз також дозволяє визначити нерекомбінантні послідовності (тобто, ізоляти), які містять генетичні регіони, найбільш гомологічні до відповідних регіонів рекомбінантних послідовностей. Іншими словами, це дозволяє встановити вірогідні батьківські лінії, які стали донорами генетичних регіонів для рекомбінантних послідовностей.

Рекомбінантна природа українського ізоляту UKR9 вірусу мозаїки турнепсу та його походження від різних генетичних груп ізолятів були підтверджені різними алгоритмами RDP4 (зі значеннями P менше 1×10^{-6}): RDP (3.68×10^{-21}), BOOTSCAN (2.83×10^{-21}), MAXCHI (3.12×10^{-11}), CHIMAERA (2.14×10^{-13}) та SISCAN (6.42×10^{-14}), а алгоритм GENECONV показав вірогідне рекомбінантне походження ізоляту UKR9 (3.76×10^{-2}).

Ці результати були надалі підтверджені оригінальним програмним забезпеченням SISCAN версії 2, яке показало, що ізолят UKR9 є вірогідним рекомбінантом, дозволило ідентифікувати його сайт рекомбінації та генетичні послідовності, які є його вірогідними батьківськими формами («батьківські послідовності» ізоляту UKR9) (рис.8.21).

Послідовність ізоляту UKR9 характеризувалася значною подібністю (значення $Z > 3.0$) з послідовністю ізоляту Rn98 у регіоні від N-кінця гену *PI* до N-кінця гену *HC-Pro* (нуклеотиди 1–1374 у повнорозмірній послідовності – від 5'-кінця геному вірусу до сайту рекомбінації). Однак, від С-кінця гену *HC-Pro* і до С-кінця гену *CP* (нуклеотиди 1375–9833 у повнорозмірній послідовності – від сайту рекомбінації до 3'-кінця геному) ізолят UKR9 характеризувалася найбільшою подібністю з ізолятом TUR9.

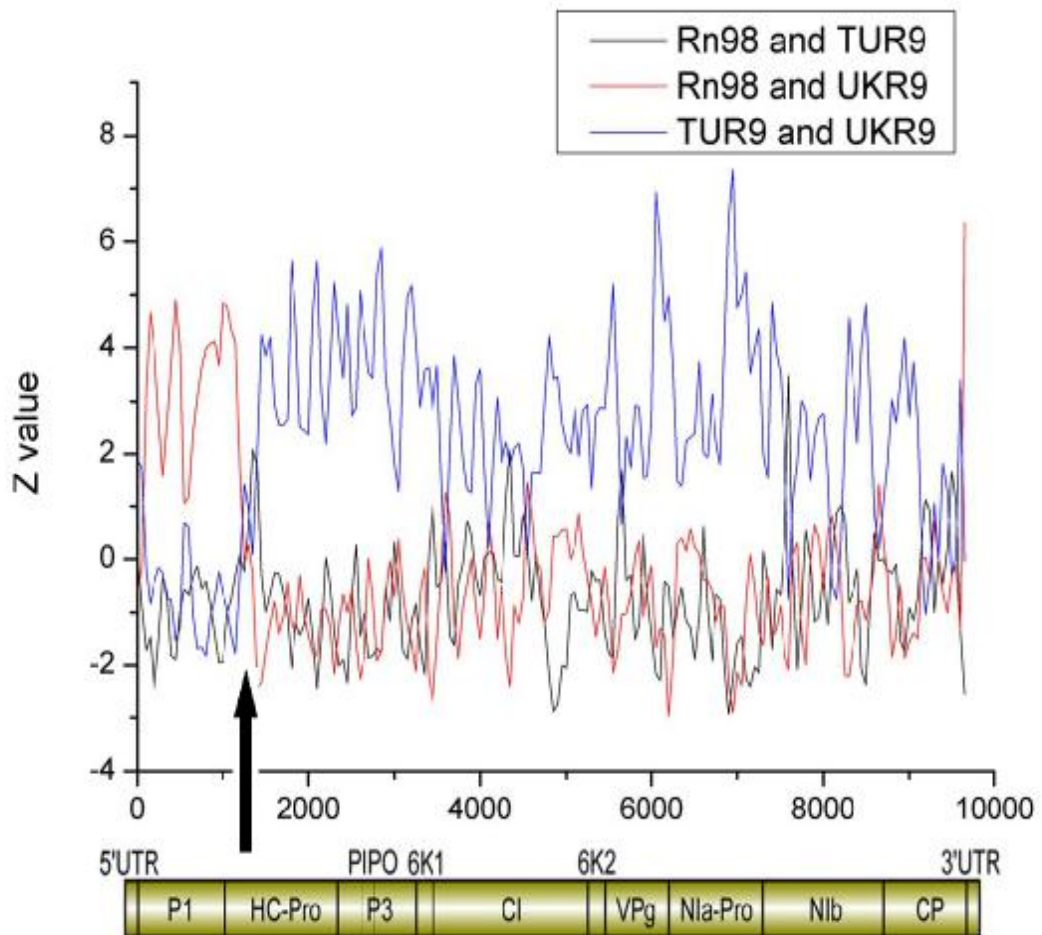


Рисунок 8.21 - Результати аналізу поліпротеїнової послідовності ізоляту UKR9 вірусу мозаїки турнепсу та його порівняння з ізолятами Rn98 (червона лінія) та TUR9 (блакитна лінія). Послідовності Rn98 і TUR9 є вірогідними батьківськими послідовностями UKR9. «Вікно» порівняння становило 100 нт з кроком у 50 нт між «вікнами». Стрілкою вказаний сайт рекомбінації

Представлені результати є доказом того, що ізолят UKR9 є принаймні одиничним рекомбінантом (має один сайт рекомбінації) та таким рекомбінантом, що походить від різних генетичних груп вірусу – групи World-B (ізолят Rn98 - мінорний батьківський ізолят) та групи Asian-BR (ізолят TUR9 - головний батьківський ізолят).

У даному контексті на увагу заслуговує той факт, що ізолят TUR9, нещодавно описаний в Туреччині, не є рекомбінантом [311]. В цей же час італійський ізолят Rn98 є рекомбінантним та був виділений в Італії

(Лігурия) з нетипового хазяя – отруйної рослини жовтеця азіатського (*Ranunculus asiaticus*) родини *Ranunculaceae* ще у 1997 р. [40]. На рисунку 8.22 представлена схема рекомбінації українського ізоляту UKR9.

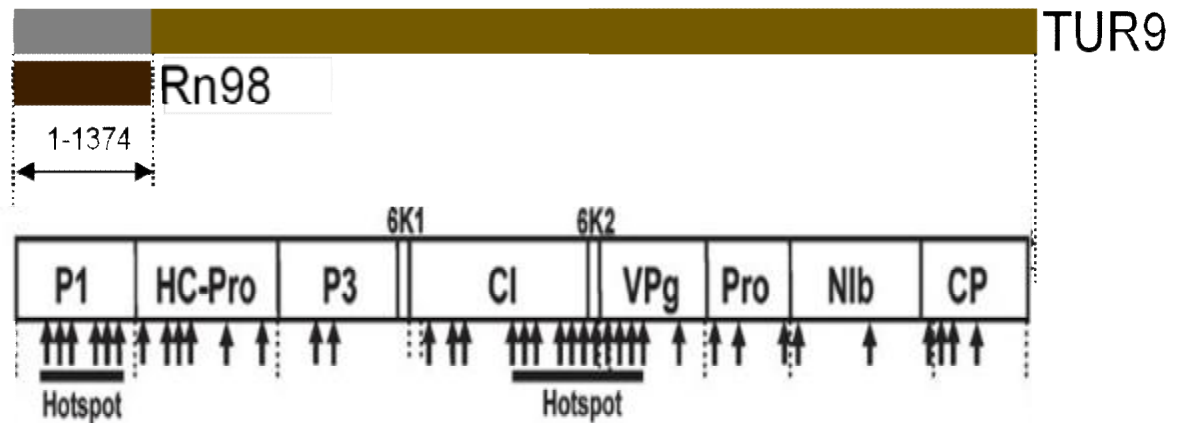


Рисунок 8.22 - Схема рекомбінації в геномі ізоляту TuMV UKR9

Філогенетичні відносини вирівнених часткових та повних геномних послідовностей відомих ізолятів вірусу мозаїки турнепсу та ізоляту UKR9 вивчалися методом максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood, ML) з використанням програмного забезпечення PhyML v.3 Для аналізу методом ML була використана загальна модель зворотного відліку часу (general time-reversible (GTR)) нуклеотидних заміни. Для оцінки варіації сайтів використовувалося гамма-розподілення, також оцінювалися інваріантні сайти (модель GTR+I+r4). Така модель була обрана в алгоритмі R [232]. Підтримка при побудові гілок визначалася за допомогою бутстреп-аналізу з використанням 1000 псевдореплік (повторів) [238]. Для побудови дерев використовували програмні пакети FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Для множинного та коректного вирівнювання послідовностей використовували програмні пакети TRANSALIGN та CLUSTAL X (як у випадку описаного вище рекомбінаційного аналізу) [234]. Послідовності одного ізоляту вірусу

мозаїки цибулі-шалоту (ScMV), трьох ізолятів вірусу мозаїки японського батату (JYMV) та п'яти ізолятів вірусу жовтої штрихуватості нарцису (NYSV) були використані в якості кореневих (неспоріднених) генетичних груп. Для оцінки подібності нуклеотидних та амінокислотних послідовностей були використані, відповідно, двохпараметричний метод Кімури [203] та матриця Дейхофа PAM250.

Для описаного вище аналізу та побудови дерев спочатку були використані депозитовані у Генбанку геномні послідовності 239 ізолятів вірусу мозаїки турнепсу, включаючи рекомбінантів. Тим не менше, отримані дерева характеризувалися низькою достовірністю та бутстреп-підтримкою, що вже було показано раніше [40, 314, 316]. Тому для побудови дерев нами були використані повні геномні послідовності лише 37 ізолятів, які гарантовано не були рекомбінантними (за виключенням послідовності батьківського ізоляту Rn98). Філогенетичні відносини цих ізолятів досліджувалися методами максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood, ML) та з'єднання найближчих сусідів (Neighbor-Joining, NJ). Дерево, побудоване методом ML, наведене на рис. 8.23.

Як видно з рисунку 8.23, більшість послідовностей на дереві розподілені у відомі чотири геногрупи: Basal-B, Basal-BR, Asian-BR та World-B, як повідомлялося раніше [314]. Такий розподіл характеризувався високими значеннями бутстреп-підтримки.

Як і очікувалося, на філогенетичному дереві ізолят UKR9 угруповувався з головним батьківським ізолятом TUR9 – нерекомбінантним ізолятом з геногрупи Asian-BR. Подібно до попередніх досліджень [311], на філогенетичному дереві ізолят TUR9 був розташований поряд з іншими представниками цієї геногрупи (ізолятами HRD та CH6), але утворив окрему гілку з новим українським ізолятом UKR9.

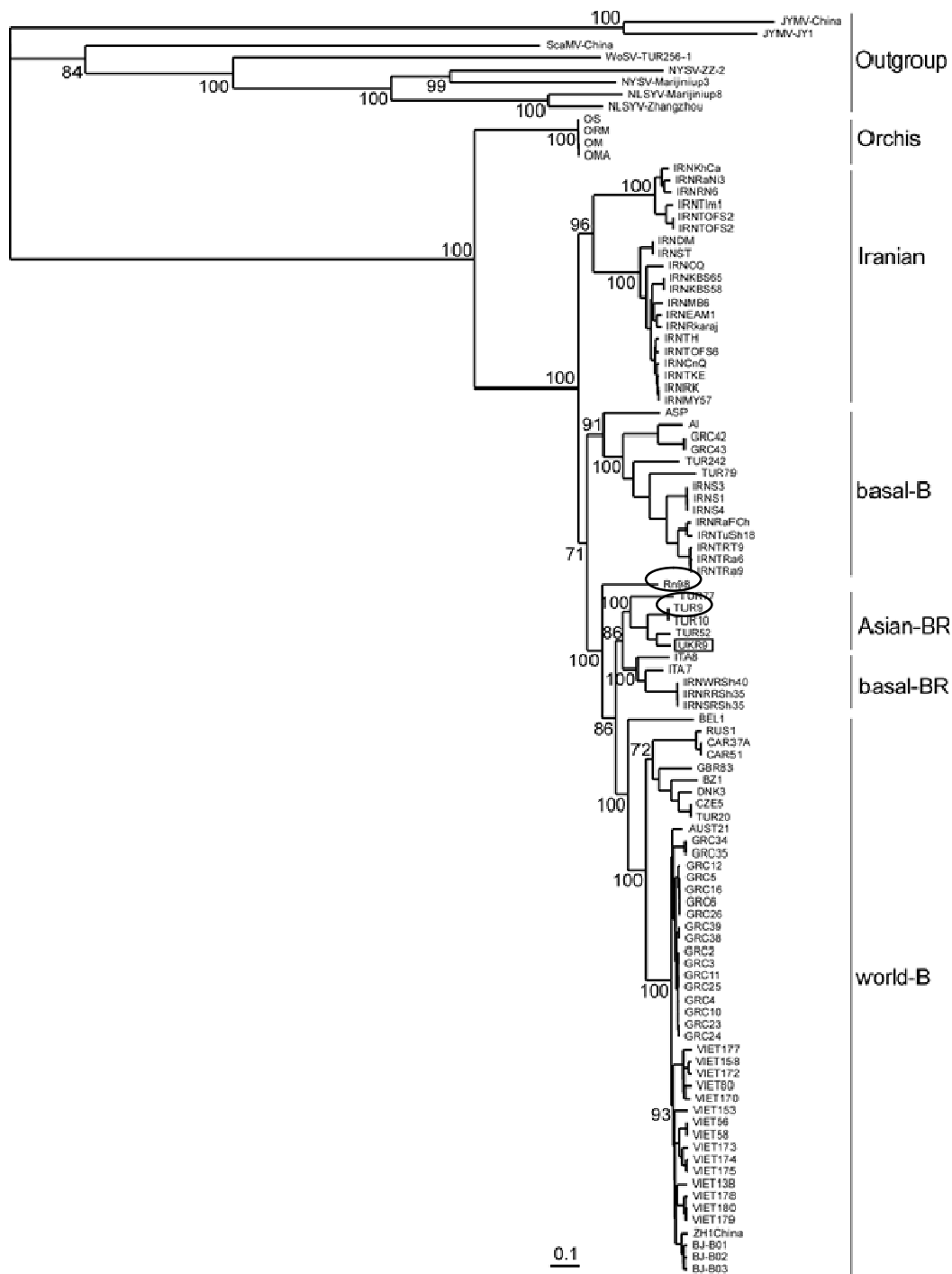


Рисунок 8.23 - Філограма ізолятів вірусу мозаїки турнепсу (за виключенням рекомбінантних). Метод ML, бутстреп = 1000, UKR9 показаний у рамці, батьківські ізоляти TUR9 та Rn98 – у овалах

Міnorний батьківський ізолят Rn98 (рекомбінант між представниками різних геногруп World-B та Basal-B) розташовувався поблизу ізолятів батьківської групи World-B (рис. 8.23).

Досить значний ступінь подібності ізолятів UKR9 та TUR9 (90% за розрахунками BLAST), які до того ж є географічно близькими, може свідчити про обмін генетичним матеріалом між еволюційними гілками TuMV у минулому за рахунок вірогідного занесення вірусу з рослинним матеріалом (найбільш імовірно – до України). Тим не менше слід відмітити, що за канонічними визначеннями [206], ізоляти UKR9 та TUR9 є достатньо відмінними один від одного, щоб їх можна було вважати окремими штамми, вірогідною причиною чого є описані вище рекомбінаційні події в еволюції ізоляту UKR9 (рис. 8.22, 8.23).

Узагальнюючи проведені дослідження слід ще раз відмітити, що нами був проведений скринінг для виявлення потенційних джерел вірусу мозаїки турнепсу – одного з найбільш шкочинних патогенів хрестоцвітних культур, який на сьогодні підтверджений у більшості країн Європи, але не в Україні. Вперше продемонстровано, що TuMV широко поширений в нашій країні та був детектований в усіх видах рослин родини *Brassicaceae*, які вважаються природними для флори України. Загальна частота інфекції TuMV склала 42.4% для симптоматичних зразків (з урахуванням інтродукованих та орхідних рослин) (табл. 5.5). Польові дослідження підтвердили, що в обстежених регіонах України TuMV здатен в рівній мірі інфікувати рослини як роду *Brassica*, так і *Raphanus*. Детальне вивчення кола хазяїв одного з виділених українських ізолятів TuMV UKR9 показало, що він здатний викликати системну інфекцію у рослин родів *Brassica* та *Raphanus*, що свідчить про приналежність даного ізоляту до патотипу BR.

У місцях відбору зразків, які використовувалися для культивування хрестоцвітних культур, основними хазяями вірусу мозаїки турнепсу були *B. oleracea* var. *capitata* (капуста), *R. sativas* (редис), *B. juncea* (гірчиця) та *S. alba* (біла гірчиця). Це досить несподівано, оскільки лише капуста вважається найбільш важливою їстівною хрестоцвітною культурою, яка широко культивується в Україні. Вирощування інших перелічених культур

має сезонний характер і вони вживаються менше. Вочевидь, необхідно враховувати інші фактори, наприклад, наявність наразі неідентифікованих рослин-резервуарів, літаючих векторів та ін.

Очікувано, різні ділянки відбору зразків характеризувалися різною частотою трапляння TuMV, яка, однак, сягала вкрай високого значення (до 50% у симптоматичних рослин). Тим не менше, у даному аспекті нашу особливу увагу привернули декілька факторів. У випадку двох полів з промисловими насадженнями капусти, які знаходилися у сусідніх селах у Київській обл. на відстані лише 5 км, частота інфекції TuMV варіювала від 17% до 42%, що на нашу думку може відображати ефективність підтвердженого регулярного знищення хворих рослин на першому полі. Дуже високий рівень поширення TuMV на приватних присадибних ділянках (58%) може пояснюватися повторним вирощуванням сприйнятливих культур з року в рік. Тим не менше, найвища частота інфекції TuMV у 89% була притаманна Ботанічному саду НАН України (м. Київ). Вірогідною причиною цього є відбір зразків на ділянці, яка регулярно використовується науковими підрозділами ботсаду у селекційних цілях.

Значна частина (22%) проаналізованих рослин, що були інфіковані вірусом мозаїки турнепсу, також містила антигени вірусу огіркової мозаїки (CMV), що узгоджується з результатами інших дослідників. Зокрема, було показано, що TuMV здатний стимулювати реплікацію CMV [317, 318], комплементувати системний транспорт дефектних штамів цього вірусу [319] та викликати більш суворі симптоми на рослинах *Nicotiana benthamiana* у випадку змішаної інфекції [320].

Рекомбінація відіграє вкрай важливу роль як у мінливості РНК і ДНК, так і у адаптивній еволюції вірусів. На прикладі потівірусів відомо, що 63% всіх повнорозмірних геномних послідовностей Y-вірусу картоплі (*Potato virus Y*) є рекомбінантними [321], що вказує на еволюційну важливість такого механізму. У цій роботі нами описаний новий ізолят

UKR9, який є принаймні одиничним рекомбінантом (має один сайт рекомбінації) та таким рекомбінантом, що походить від різних генетичних груп вірусу (груп World-B та Asian-BR) та описаних раніше ізолятів Rn98 і TUR9. Виходячи з опублікованих даних, знайдений нами рекомбінаційний сайт ізоляту UKR9 (нуклеотиди 1374/75 у повнорозмірній послідовності) є новим та не був раніше описаний [40, 316, 321, 322, 323]. Отримані нами результати доповнюють попередні дані, згідно яких рекомбінантні ізоляти World-B x Asian-BR є типовими для Південної та Східної Азії [40, 306], але вкрай рідко зустрічаються у Європі.

Найпростіша інтерпретація філогенетичного аналізу відомих з усього світу [40, 316, 3324] ізолятів вірусу мозаїки турнепсу полягає у тому, що найбільш варіабельна та чисельна генетична група Basal-B є вірогідним попередником всіх інших геногруп. Детальний аналіз українського ізоляту UKR9 підтвердив його угруповання з турецьким ізолятом TUR9, який був раніше віднесений до геногрупи Asian-BR ізолятів вірусу мозаїки турнепсу [311, 314]. Український ізолят UKR9 формував окремий кластер з ізолятом TUR9. Отримані результати свідчать, що поява нових рекомбінантних ізолятів TuMV може значно змінити наше уявлення про структуру популяцій та еволюцію цього вірусу.

В якості узагальнення слід відзначити, що нами підтверджено високу частоту інфекції TuMV як на міських, так і на сільськогосподарських ділянках в Україні, а середня частота інфекції для симптоматичних рослин становила 50%. Такі високі показники, широке коло видів рослин-хазіїв та різноманітність місць їх відбору, вочевидь, є наслідком широкого поширення вірусу та відсутності системи регулярного вірусного скринінгу в Україні – країні, яка є одним з найбільших логістичних хабів між Європою та Азією, і, вірогідно, також є одним з місць інтенсивної (мікро)еволюції вірусу мозаїки турнепсу.

Не зважаючи на те, що нами був детально описаний ізолят вірусу мозаїки турнепсу UKR9 (рекомбінант двох різних геногруп World-B x

Asian-BR), наразі лишається невідомим, чи є цей ізолят домінуючим в вивчених екосистемах та Україні в цілому. Для вирішення такого питання необхідний масштабний скринінг багатьох регіонів країни та різних культур з подальшим еволюційним порівнянням багатьох ізолятів з усього світу. Тим не менше, наші дослідження вперше підтверджують широке поширення та висвітлюють біологічні, молекулярно-філогенетичні характеристики, екологічні та епідеміологічні особливості українського ізоляту вірусу мозаїки турнепсу в Україні [310].

Результати, викладені у розділі, опубліковано в наступних роботах: [302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310].

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Віруси рослин є вагомим економічним чинником і спричинюють втрати 15-100% врожаю сільськогосподарських культур. Вірусні хвороби викликають зниження товарної якості продукції та її значне нецінення. Єдиним ефективним механізмом запобігання втрат урожаю нетрансгенних культур від вірусів є їх своєчасна діагностика молекулярними методами та оцінка епідемічного потенціалу, що дозволить розробити тест-системи, специфічні саме до найбільш шкочинних штамів вірусів.

Наразі у світі практично немає наукових груп, які б займалися комплексним моніторингом вірусів культурних рослин. Завдяки новітнім метагеномним технологіям активно розвивається тематика з вивчення вірусів дикорослих рослин, які сьогодні розглядаються як засіб еволюції та «епідеміологічного пристосування» вірусів культурних рослин до змін довкілля. Нещодавня оцінка поширення вірусів злакових культур також підтвердила, що сьогодні культурні рослини уражуються вірусами, які невідомі науці. Такі результати підкреслюють необхідність як регулярної оцінки видового складу вірусів у агроєкосистемах, так і вивчення біологічних властивостей еволюційно «пластичних» фітовірусів.

Виходячи з цього, питання мінімізації ризиків завжди привертало увагу вчених, оскільки вірусні хвороби не лише є причиною значних втрат врожаю, але й слугують чи не єдиним прикладом захворювань, які не можна вилікувати або ж лікування яких не є рентабельним. При цьому вірусні хвороби, фактично, є невиліковними, що обумовлює необхідність комплексних профілактичних дій, включаючи системи управління екологічними ризиками та економічного планування.

Відомі два основні підходи до контролю вірусних захворювань рослин. Перший полягає у системному моніторингу вірусних інфекцій рослин на предмет їх ураженості вірусами. Така робота передбачає регулярне обстеження значних площ, відбір великої кількості зразків різних рослин та їх подальший аналіз для діагностики різних вірусних хвороб. Такий підхід раніше використовувався лише для окремих с/г культур стратегічного значення та лише для обмеженого кола їх патогенів. Його очевидними недоліками є надзвичайно великий об'єм робіт, що потребує фінансового забезпечення, часу та мережі окремих спеціалізованих установ. Ситуація ускладнюється тим, що останніми роками підтверджена наявність величезної кількості невідомих раніше вірусів рослин, для яких не розроблені методи діагностики. Другий підхід відрізняється спрямованістю щодо факторів, які впливають на динаміку конкретного вірусного захворювання на певній культурі і за відповідних умов.

Зважаючи на це, автор пропонує зосередитися на низці основних факторів ризику з урахуванням епідемічного ланцюгу вірусів рослин і особливостей екосистеми, відомих та нових в Україні вірусних патогенів, шляхів їх передачі та збереження в екосистемі, наявності сприйнятливих дикорослих та культурних рослин, та інших факторах.

У науковій літературі останнім часом спостерігається сплеск публікацій, які всебічно висвітлюють та розвивають уявлення про епідеміологічно-генетичні взаємодії як всередині вірусних популяцій, так і при взаємодії вірус-хазяїн на різних рівнях. Також наразі активно розвивається паралельна тематика з вивчення вірусів дикорослих рослин, які не були відомі раніше, та їх ролі в якості «генетичного пулу» вірусних геномів у рослинах дикої флори. Актуальність даної тематики пояснюється можливістю перехресного обміну вірусами між дикорослими та культурними рослинами за допомогою векторів, агротехнічних засобів та ін., та вірогідною рекомбінацією вірусів між

собою з непередбачуваними епідемічними наслідками. Іншими словами, віруси дикорослих рослин розглядаються як засіб еволюції та «епідеміологічного пристосування» вірусів культурних рослин до змін довкілля.

До недавнього часу вважалося, що більшість вірусів рослин (які мають одноланцюговий «+» РНК-геном) є високомутабельною і відповідно повинна дуже швидко еволюціонувати. Однак за останні декілька років накопичено багато свідчень протилежної тенденції, що вочевидь пов'язано з необхідністю стабілізації геному вірусів до певних умов клітини-хазяїна (включаючи дію стресових факторів антропогенно модифікованого довкілля), де швидка зміна їх молекулярно-біологічних характеристик буде скоріше перешкоджати, ніж приводити до позитивних наслідків. З іншого боку, саме зміна умов існування (характеристик клітини/рослини господаря) здатна приводити до утворення нових штамів чи навіть видів вірусів, при умові що геном даного вірусу має потенціал до такого пристосування. Таким чином, віруси рослин вимушені постійно балансувати між підтриманням консервативності свого геному для збереження ознак, цінних для виживання популяції, та його варіабельністю для пристосування до умов, які суттєво відрізняються від попередніх. Така гіпотеза знайшла широке визнання у сучасному науковому світі, підкріплена фактичними результатами і, власне, є підґрунтям актуальності вивчення епідемічного потенціалу вірусів на основі їх молекулярного типування й порівняння. Дослідження молекулярно-біологічних характеристик, і зокрема нуклеотидних послідовностей геному, має як теоретичну складову – можна прослідкувати філогенетичні зв'язки даного вірусу з іншими представниками цього царства, встановити його еволюційну історію та перспективи, так і абсолютно практичне значення – і для розробки високочутливих методик діагностики на основі ПЛР, і для прогнозування можливих змін і набуття нових властивостей циркулюючими в певному

ареалі штамами або ізолятами з метою профілактики їх розповсюдження та зниження шкодочинності.

Таким чином, з розвитком сучасних підходів, що базуються на сиквенуванні геномів, стає можливим досліджувати нуклеотидні послідовності геномів вірусів рослин, встановлювати їх ступінь спорідненості, але, що найголовніше, використовувати отримані дані для встановлення епідеміологічних зв'язків.

Виходячи з аналізу сучасних тенденцій вірусології необхідно відмітити актуальність моніторингу вірусів культурних рослин, який обумовлений вірогідною появою нових ізолятів та вірусів, відмінністю екологічних умов та необхідністю їх систематичного опису. Моніторинг вірусів має стратегічне значення для біобезпеки держави, сталого виробництва рослинної продукції, харчування людей.

Овочеві культури займають вагоме місце в сільськогосподарському секторі України та інших країнах Європи, Сполучених штатах Америки, Австралії [1, 2]. Суттєві втрати врожаю та економічні збитки може спровокувати епіфітотія вірусу жовтої мозаїки цукіні (ZYMV), який (англ. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)) належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae* [11]. Він виявлений у багатьох країнах світу, а в 22 країнах на п'яти континентах часто спричинює спустошливі епіфітотії [12, 174]. Такі країни, як Франція, Італія, США, Австралія сильно страждають від епіфітотій ZYMV, тому приділяють вивченню цього вірусу багато уваги.

Вірус жовтої мозаїки цукіні здатний уражувати практично всі види гарбузових рослин, як культурних, так і дикорослих. Щільне розміщення культур та наявність бур'янистих рослин в агроценозах створює ідеальні умови для розповсюдження інфекції за допомогою різних видів попелиць [11]. Крім того, вірус здатний передаватись за допомогою насіння, проте з нижчою частотою передачі [183].

За деякими оцінками, кожен третій вірус рослин здатний передаватись насінням [203]. Саме здатність передаватись насінням формує генетичну структуру вірусних популяцій. Активний торговельний обмін між країнами значно полегшує та прискорює поширення вірусу жовтої мозаїки цукіні на значні відстані.

На основі порівняння нуклеотидних послідовностей усі штами й ізоляти CMV розділяють на групи IA, IB, II (відповідають серологічним групам DTL, Co і ToRS). Для визначення групової приналежності можна застосовувати рослини-індикатори, серологічні методи [111], зворотньоотранскрипційну полімеразно-ланцюгову реакцію [112], поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів [113], філогенетичний аналіз [114].

Групи CMV характеризуються неоднорідним розповсюдженням. Штами й ізоляти, які належать до групи IA і II поширені рівномірно по всьому світу, при цьому представники групи I зустрічаються частіше та інколи становлять близько 80% усіх ізолятів [115].

Представники групи IB трапляються в основному в Східній Азії, яка вважається їх батьківщиною [115]. Вони трапляються також в середземноморському регіоні, Каліфорнії, Австралії та Греції [114]. Вважається, що на ці території штами групи IB були занесені з Східної Азії [115].

Представники груп IA і IB характеризуються широким температурним оптимумом, зустрічаються у тропіках і субтропіках, де завдають великих збитків і викликають епідемії [114]. Ізоляти II групи викликають слабші за проявом симптоми на рослинах, зазвичай поширені в країнах з помірним кліматом [114].

Ізоляти однієї групи виявляють >90% подібності нуклеотидних послідовностей. Подібність нуклеотидних послідовностей представників I та II груп становить приблизно 67-77% [116]. Подібність нуклеотидних послідовностей між ізолятами груп IA та IB – 92-94% [117].

Подібність нуклеотидних послідовностей штамів однієї групи відрізняються на 2-3% [118]. Між групами дана різниця більша, зокрема подібність послідовностей представників групи ІВ у порівнянні з групою ІА варіює у діапазоні на 7-12% за подібністю нуклеотидних послідовностей [117].

Штами WMV-2 можна теж розділити на 3 групи. До 1999 року у Франції переважали штамми, які викликали слабкі симптоми, і не виявляли загрози для продукції гарбузових культур. Але починаючи з 2000 року у Південно-східній Франції почали детектувати емерджентні штамми, які мали змінену патогенність, спричинювали розвиток симптомів більшої тяжкості. Дані штамми є філогенетично віддаленими від класичних та відрізняються біологічними властивостями.

Подібність амінокислотних послідовностей гену капсидного білка між різними штамми WMV-2 становить більше 90%, не включаючи варіабельну N-кінцеву ділянку. При подібності менше 70% штамми вважаються представниками різних видів [123].

Емерджентні та класичні штамми уражують однакове коло хазяїв, також вони мають спільних резервуарів серед бур'янів (*C. bursa-pastoris*, *Senecio vulgaris*, *Lamium amplexicaule*) для переживання несприятливих умов [124].

Перенесення за допомогою попелиць *M. persicae* варіює від 17% (для емерджентного ізоляту FMF00-LL1) до 70% (для класичного штамму C05-465). Хоча суттєвої різниці при підрахунку середньої ефективності перенесення за допомогою попелиць не виявлено, навпаки середні значення були подібними для класичних і емерджентних штамів [124].

Часто спостерігається коінфекція класичними та емерджентними ізолятами, що є нетиповим для вірусів впринципі, оскільки зазвичай емерджентні штамми витісняють класичні. У випадку з WMV-2 штамми-партнери взаємодіють один з одним, надаючи нових властивостей [125]. При дослідженні ефективності передачі за допомогою

попелиць у різних рослин було показано, що при змішаній інфекції загальна ефективність передачі залишається однаковою, хоча при змішаній інфекції вона дещо менша. В той же час ефективність передачі емерджентних ізолятів є вищою при змішаній інфекції, ніж при моноінфекції [126].

Для WMV-2, як і для всіх РНК-вмісних вірусів, характерна велика частота мутацій. Крім того, WMV-2 належить до одного з вірусів роду *Potyvirus*, для яких характерні рекомбінації геному [130]. Рекомбінації призводять до виникнення нових штамів, які часто мають змінені властивості [124, 128, 129, 130].

На сьогодні у Генбанку [131] представлені штами WMV-2 що були виявлені в таких країнах як: США, Франція, Єгипет, Ізраїль, Пакистан, Тонга, Китай, Індія, Іран, Японія, Південна Корея та Боснія і Герцеговина [132-136].

Отже, невеликий перелік штамів ВМК 2 свідчить про перспективність досліджень направлених на їх визначення та характеристику.

Штами та ізоляти вірусу жовтої мозаїки цукіні відрізняються симптоматикою, колом чутливих хазяїв, патогенністю, ефективністю розповсюдження за допомогою попелиць.

Говорячи про генетичну неоднорідність вірусу жовтої мозаїки цукіні, потрібно згадати N-кінцеву ділянку капсидного білка, найбільш варіабельну ділянку геному, відому для більшості представників роду *Potyvirus*. Дану ділянку використовують для диференціації ізолятів та штамів ZYMV.

На сьогодні для вірусу жовтої мозаїки цукіні в Генбанку наявні нуклеотидні послідовності близько 400 штамів і ізолятів. Як відомо з літературних джерел висока генетична мінливість у представників роду *Potyvirus* характерна для N-кінцевій ділянці капсидного білку.

Багато досліджень проводили з нуклеотидними послідовностями ZYMV у біогеографічному контексті. У 2002 році Desbiez з колегами виділила 2 групи ZYMV – А і В, аналізуючи 250-нуклеотидні фрагменти 160 вірусних ізолятів, відібраних у 23 географічних регіонів [138]. При чому перша група підрозділялась на 3 кластери.

Подальший аналіз капсидного білка виявив три головні групи з різним географічним поширенням [139]. Перша група (I) включала в основному європейські ізоляти, а також деякі ізоляти з Китаю та Японії, і єдиний каліфорнійський ізолят. Група II була сформована з ізолятів з Азії, а III група складалась з китайських ізолятів. Потрібно відмітити, що ізоляти I та II групи викликали мозаїку на листкових пластинках, в той час як III група не спричинювала жодних симптомів на плодах, але викликала сильну мозаїку на листкових пластинках.

Більш філогенетично віддалені ізоляти ZYMV були детектовані в Сінгапурі і острові Реюньон, а також на інших островах в Індійському океані, які представлені в групі В за класифікацією Desbiez [138].

Більш локальні філогеографічні дослідження проводились в Центральній Європі. Однак, ізоляти із прилеглих локацій не завжди були близькоспоріднені. Такі результати свідчать про те, що структура популяції ZYMV визначається міжнародною торгівлею інфікованим насінним матеріалом [140, 141].

Отже, як видно з усього вищесказаного жодна робота не давала повної картини філогенетичного розподілення наявних ізолятів за групами та наявності/присутності географічного компоненту у цій філогенетичній класифікації.

Найбільш повний аналіз провели Coutts з колегами [195]. Вони використали 143 повногеномні нуклеотидні послідовності капсидних білків. Загалом, топологія філогенетичного дерева була подібною на отриману в дослідженні Ha et al. [145], які назвали їх I-III. Але оскільки групи були названі А і В у дослідженні Desbiez та її колеги [138], тому їх

класифікація була взята за основу. Третю групу, яка була відсутня в Desbiez, було названо С. Відповідно групи А, В та С відповідають групам І (всесвітньо поширена група), ІІ (ізоляти з В'єтнаму, Реюньйону та Сінгапуру) та ІІІ (ізоляти з В'єтнаму та Китаю) класифікації На, група С також відповідає групі ІІІ за класифікацією Simmons та його колег.

До кластеру 1 входять штами, які найчастіше виявлялися по всьому світі. Більшість з них належать до серогрупи 1. Запропонований типовий представник цього кластеру є ZYMV-NAT.

Для кластеру 2 характерна не дуже висока бутстреп-підтримка, а також його виокремлення спостерігалось при використанні трьох методів аналізу і було доволі очевидним при вирівнюванні нуклеотидних послідовностей. Серологічно, представники цього кластеру не можуть бути відокремлені від кластеру 1, оскільки мутації присутні в представників кластерів 1 і 2 є синонімічними і штами не відрізняються на амінокислотному рівні.

Штами, які відносяться до 3 кластеру являють собою лише малу частину ZYMV ізолятів, які були знайдені на чотирьох континентах та пов'язані з іншими штамами з інших кластерів, як зокрема з ізолятами з Австрії, Італії та Іспанії.

Група В розділялась на підгрупи VI та VII. Підгрупа VI включала ізоляти, виявлені у В'єтнамі, Сінгапурі та Реюньйоні. У той час група VII складалась з австралійських ізолятів. Група С складалась із ізолятів, виявлених у Китаї, Польщі та В'єтнаму.

Цікавим є також питання про близьку спорідненість ізолятів в межах певної території та відносна стабільність вірусних популяцій впродовж доволі тривалого часу. Адже з одного боку популяції РНК вірусів характеризуються високим рівнем мутацій, великим розміром популяцій та швидкою реплікацією, що надає їм широку генетичну мінливість.

З іншого боку деякі вірусні популяції залишаються відносно стабільними. Це відбувається завдяки ефекту «пляшкового горлишка», що визначає генетичну різноманітність популяції через системну інфекцію та горизонтальне перенесення за допомогою попелиць [146, 147].

CMV здатний уражувати широкий спектр рослин: 1300 видів, які є представниками близько 500 родів із 100 родин [11]. Хазяїнами CMV є важливі овочеві й декоративні культури. Багато видів рослин, серед яких є багато бур'янистих рослин, можуть бути резервуарами для CMV [148]. CMV швидко й успішно пристосовується до нових хазяїв та умов середовища, тому кожного року для нього описуються нові хазяї [149].

Найбільш типовим симптомом інфекції CMV є мозаїка [150]. Також CMV може спричиняти хлорози, плямистість, зменшення розмірів листової пластинки, некрози на листі і плодах [151]. Тяжкість захворювання може варіювати від відсутності видимих симптомів до смерті хазяя [152-156].

CMV проявляє особливу патогенність на представниках родин гарбузових, пасльонових і бобових, призводячи до ураження 30-50% рослин в роки епіфітотій.

Надзвичайно різноманітні симптоми, спричинені CMV, можуть бути пов'язані з багатьма факторами (вид, вік, фізіологічний стан рослини, штам вірусу, температура та ін.), одним з яких є змішані інфекції з іншими вірусами [151].

CMV може спостерігатись у змішаних інфекціях з вірусом жовтої мозаїки цукіні (ZYMV) та вірусом мозаїки кавуна – 2 (WMV-2). Хоча ці віруси відрізняються за багатьма параметрами, зокрема форма віріону (WMV-2 і ZYMV мають нитковідні вірусні часточки, а у CMV - сферичні), тип нуклеїнової кислоти (у WMV-2 і ZYMV РНК монопартитна, а у CMV вона трипартитна і також присутня субгеномна

РНК), при змішаних інфекціях відбуваються синергетичні взаємодії між ними.

Коінфекція ZYMV та вірусу огіркової мозаїки проявляється у синергетичному ефекті на прояв симптомів, накопичення обох вірусів до вищих титрів у рослині. У результаті спостерігаються більші втрати врожаю, ніж при моноінфекції [157].

При коінфекції CMV та ZYMV спостерігається посилення симптомів та розповсюдження по рослині. На противагу цьому, інша велика родина вірусів, що інфікують овочеві культури, а саме потівіруси - передаються механічним шляхом і відносяться до групи неперсистентних вірусів. У широкому розповсюдженню серед культурних та дикоростучих рослин допомагають попелиці багаточисельних видів, але зустрічаються віруси, які можуть передаватися кліщами, наприклад, вірус штрихуватої мозаїки пшениці або вірус мозаїки пирію [161].

Окремі представники потігрупи передаються насінням хворих рослин (вірус мозаїки квасолі, мозаїка коров'ячого гороху, мозаїка сої тощо). Однак для більшості потівірусів даних про насінневу передачу немає. У заражених вірусом жовтої мозаїки квасолі гороху, бобів, білої конюшини, жовтого та білого люпину процент насінневої передачі складає 3 – 6%. Резерватами потівірусів можуть бути коренеплоди цукрового буряка, бульби картоплі, цибулини тюльпану, цибулі тощо.

Коло рослин-хазяїв для одних потівірусів велике (вірус мозаїки турнепсу, УВК), для інших, особливо ті, які передаються через насіння, навпаки дуже вузьке (мозаїка гіпеастрому, мозаїка сої).

Набагато менше відомо про синергетичні взаємодії, що відбуваються в баштанних видах подвійно інфікованих CMV і потівірусами. Інфекції баштанних видів таких як ZYMV, WMV-2 або CMV дуже поширені, і завдають значної шкоди в усьому світі, у вигляді важких епідемій баштанних полів, чи в поодинокій чи в подвійній інфекції. Значного економічного збитку було завдано Кореї від подвійної

інфекції вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка і WMV-2 що викликали некрози у кавунів. У комплексно інфікованих клітинах рослинах кавуна і огірка виникала специфічна девятикутна ультраструктура, викликана взаємодією двох патогенів – WMV-2 і CGMMV. Одна частинка WMV-2 була оточена 9 частинками CGMMV [170]. Накопичена CGMMV РНК при змішаній інфекції з WMV-2 в деяких гарбузових була вище, ніж при зараженні тільки CGMMV. Крім того, рівень капсидного білка CGMMV збільшилася при змішаній інфекції. Тим не менш, рівень WMV-2, не показував істотного підвищення порівняно з поодиначою інфекцією. Поодиначна інфекція WMV-2 або CGMMV в тих самих хазяях проявлялася лише посвітлішенням жилок, утворенням пухирців, системній мозаїці чи плямистості на верхніх листках і подібні симптоми розвивалися після подвійної інфекції [171]. Вірус жовтої мозаїки цукіні має велике економічне значення в середземноморських країнах, центральній Європі та Сполучених штатах Америки. Гарбузові рослини, які культивуються в українських агроценозах, також чутливі до вірусу жовтої мозаїки цукіні, який трапляється як у моноінфекції, так і в змішаній інфекції з вірусом мозаїки кавуна-2.

Широке розповсюдження ZYMV у всьому світу піднімає питання про його способи поширення та збереження в той час, коли сприйнятливі культивовані гарбузані культури не вирощуються.

До сих пір було виявлено дуже мало потенційних резервуарів вірусу, хоча в експериментальних умовах були зареєстровані інфікованими деякі бур'яни (*Ranunculus sardous*, *Lamium amplexakule*) або сільськогосподарські культури (*Sesamum indicum*). Для ZYMV було встановлено, що вірус може передатися насінням з механічно заражених *Ranunculus sardous*. ZYMV був ізольований з дикого багаторічного представника Cucurbitacea - *Melothria pendula* в Флориді. Деякі дикі види рослин також були інфіковані ZYMV в США або Судані. У Йорданії *Moluccella laevis* був описаний як природний резервуар ZYMV [291].

До теперішнього часу в помірних регіонах не було виявлено природних резервуарів ZYMV. Для перезимування вірусу важливу роль може відігравати розширення періоду культивування Гарбузових з розвитком тепличних господарств в Середземноморському басейні. За цих умов ранні саджанці можуть зростати поряд з пізньо інфікованими культурами. У пустельних долинах Каліфорнії джерела ZYMV були чітко визначені як старі гарбузяні культури, що вижили в житлових районах [324].

Як тільки ZYMV потрапляє до однієї рослини на певній посадковій площі, його поширення на решту поля, як правило, є дуже швидким. Це може статися з поширенням інших вірусів, що переносяться попелицями. Нещодавнє дослідження показало, що не колонізуючі попелиці (наприклад, *A. craccivora*) мали як підвищену ефективність передачі, так і вищу схильність до поширення ZYMV, ніж *A. gossypii*, який колонізує гарбузові [340].

Незважаючи на те, що потівіруси переносяться попелицями, не переселяючись у них, у 30-годинний період після потрапляння вірусу до *M. persicae* і 10-20-годинний після потрапляння до *A. gossypii* спостерігається рівень трансмісії ZYMV у 1%. Це може сприяти дальньому розповсюдженню вірусу у тілі попелиці, що розноситься вітром [192, 328].

Іншим фактором, який може сприяти швидкому поширенню ZYMV, є передача насінням [174, 175, 332].

Частота передачі вірусу за допомогою насіння варіює в межах 0 до 18.9% [173]. Такий діапазон пов'язаний з використання різних методів детекції вірусних антигенів та використанням різних видів рослин.

Деякі з повідомлених варіацій в оцінці передачі насінням ZYMV, безсумнівно, є наслідком відмінностей у методах детекції. Наприклад, за допомогою ІФА виявили, що 18% (246 з 1,299) саджанців *S. perov* були заражені ZYMV [175]. Аналогічно, використовуючи DAS-ELISA

спостерігали передачу ZYMV насінням у 3,5% *C. maxima* [176]. Тим не менш, їх результати слід інтерпретувати з обережністю, оскільки вони також спостерігали 2% передачі ZYMV в їх контролі.

Використовуючи DAS-ELISA, було виявлено ZYMV в 2 з 1000 безсимптомних *Cucumis sativus* L. (огірок), *C. pepo* L. і *C. maxima*, які виростили з насіння заражених рослин, в той час як ZYMV був виявлений в 1.4% (15 з 1,031) саджанців *C. pepo* з допомогою суміщення обох DAS-ELISA та ЗТ-ПЛР [176]. Визначення швидкості передачі ZYMV насінням має фундаментальне значення для розуміння епідеміології цього вірусу.

Кілька експериментів, які проводилися в різних лабораторіях з суперечливими результатами щодо можливості передавання вірусу через насіння. Шрїйнверкерс С. та ін. [294] показав, що ZYMV був переданий насінням у *C. pepo*, хоча і з дуже низькою ефективністю. ZYMV, можливо, залишаються на зовнішній оболонці насінини, тому інфекція може виникати за проростання насіння. ZYMV-інфіковані рослини зазвичай виробляють дуже мало життєздатного насіння, але навіть невелика кількість насіння, яке може передати вірус, може забезпечити первинне ураження врожаю, яке є достатнім для ініціювання руйнівних епідемій [173, 330]. На сьогодні немає відомостей про передачу вірусу насінням для *C. melo* або *C. sativus*.

В Україні вірус жовтої мозаїки цукіні виявляється щорічно, спричинюючи характерні симптоми нитковидності листкової пластинки та бугристість плодів, які при цьому повністю втрачають свій торговельний вигляд. Проте передача його за допомогою насіння не була зафіксована в нашій країні й частота такої передачі не визначалась. Ці дані є необхідними при розробці та запровадженні стратегій контролю даного захворювання на території нашої держави.

Вірусні захворювання в цілому можуть бути викликані однією, або змішаною інфекцією двох чи більше вірусів. Одночасна інфекція викликана різними вірусами або різними штамами одного й того самого

виду вірусу нерідко зустрічається в природі [165]. У рослинах, одночасне інфікування різними вірусами може призвести до явища, описаного як нейтралізм, коли віруси не заважають реплікації, накопиченню і передачі один одного [167]. Періодично, це може привести до антагонізму, коли один вірус знижує інфекцію або накопичення іншого вірусу [168], або синергізму, коли коінфекція призводить до збільшення проявів симптомів та/або збільшення концентрації вірусу. Синергичні взаємодії між вірусами рослин можуть призвести до збільшення захворюваності у посівах, які сприйнятливі до різних вірусних комбінацій [167, 178]. Крім того, вірусна синергія може призвести до резистентності або обмеженого поширення іншого вірусу. Значне збільшення симптомів при подвійній інфекції в порівнянні з поодинокую інфекцією було помічено в кількох дослідженнях за участю комбінації потівірусів і вірусів, що належать до інших родів [179].

Набагато менше відомо про синергетичні взаємодії, що відбуваються в баштанних видах подвійно інфікованих CMV і потівірусами. Інфекції баштанних видів таких як ZYMV, WMV-2 або CMV дуже поширені, і завдають значної шкоди в усьому світі, у вигляді важких епідемій баштанних полів, чи в поодинокій чи в подвійній інфекції. Значного економічного збитку було завдано Кореї від подвійної інфекції вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка і WMV-2 що викликали некрози у кавунів. Накопичена CGMMV РНК при змішаній інфекції з WMV-2 в деяких гарбузових була вище, ніж при зараженні тільки CGMMV. Крім того, рівень капсидного білка CGMMV збільшилася при змішаній інфекції. Тим не менш, рівень WMV-2, не показував істотного підвищення порівняно з поодинокую інфекцією. Поодинокі інфекції WMV-2 або CGMMV в тих самих хазях проявлялася лише посвітлінням жилок, утворенням пухирців, системній мозаїці чи плямистості на верхніх листках і подібні симптоми розвивалися після подвійної інфекції [169].

Синергізм спостерігається між WMV-2 та іншими вірусами, що вражають Гарбузові, які можуть виражатися або збільшенням темпів розмноження вірусів або більш важкими симптомами. Коли WMV-2 знаходиться в змішаній інфекції з полеровірусами, наприклад, вірус пожовтіння огірка, що передається попелицями, швидкість розмноження ВПО та інтенсивність його симптомів збільшуються.

Взаємодія WMV-2 і ZYMV, двох близькоспоріднених потівірусів (*Potyviridae*), представляє особливий інтерес, тому що ці генетично різні вірусні види відносяться до однієї й тієї ж підгрупи і займають подібні екологічні ніші, що дозволяє припустити, що конкуренція між цими вірусами може бути важливим фактором, що впливає на їх еволюцію. WMV-2 і ZYMV мають подібні діапазони хазяїв (в першу чергу – гарбузові), викликають подібні симптоми і передаються (не завжди) тими ж видами попелиць, хоча і з різною ефективністю. Як і інші потівіруси, WMV-2 і ZYMV мають уніпартидний одноланцюговий (+) РНК геном (подібні за розміром і організацією, що кодує поліпротеїни, і обидва використовують допоміжний компонент білка для перенесення на попелицях. Коінфекція WMV-2 і ZYMV в одних і тих же популяціях хазяїна і в окремих рослинах зустрічається однаково часто як для культурних так і для диких видів хазяїв. Але інфекція, не викликає таких важких синергетичних ефектів, як повідомлялося для подвійних інфекцій деяких вірусів в роду *Potyvirus* разом з вірусами з інших родів, таких як *Cucumovirus* (родина *Bromoviridae*) або *Potexvirus* (родина *Alphaflexiviridae*) - подібні ефекти насправді, як видається, відносно рідкісні, і коінфекція вірусів в природі частіше відображає слабшу взаємодію [166].

З перших згадок виявилось, що ZYMV володіє важливим біологічним різноманіттям: польові ізоляти з південного заходу Франції викликали м'які симптоми, в той час як ізоляти з південного сходу Франції викликали гострі, а також обидва систематично відрізнялися від

штамів Італії. Подібна варіабельність спостерігалась серед ізолятів з різних частин США. Симптоми деяких ізолятів нагадують PRSV-W або WMV2, запобігаючи надійній польовій діагностиці на основі симптоматики.

У 1986 р. був виділений м'який ізолят з механічно зараженої дині, що представляє гілку з ослабленими симптомами [7, 138]. Цей слабкий штам був названий ZYMV-WK. Він використовується для перехресного захисту у агропромисловості.

Деякі штами також відрізнялися здатністю індукувати швидке вянення мускусної дині сорту «Дублін», що несе ген Fп. Два патотипи, F (вянення) і NF (не вянення), визначалися відповідно до реакції «Дубліна». Ця реакція спостерігалася з багатьма іншими сортами, оскільки ген Fп часто зустрічається серед гарбузових [324]. Співвідношення між патотипами F і NF подібне в групах ізолятів ZYMV, що походять з помірних, а також субтропічних або тропічних областей [226].

Штами ZYMV володіють різним діапазоном експериментальних хазяїв. Деякі штами можуть інфікувати сорти *Pisum sativum* без будь-яких видимих симптомів. *Phaseolus vulgaris* сорту «Пінто» інфікується ліванським штамом ZYMV, але не інфікується штамми з Франції та США. Різні штами ZYMV індукують як генералізовану інфекцію, так і обмежену органом інокуляції у *Nicotiana benthamiana*. Було також виявлено ізолят, що викликає важку мозаїку та деформацію листя вирощених у теплицях, механічно заражених рослин *N. benthamiana*.

Крім того, спостерігається різноманіття у взаємодії з деякими стійкими лініями гарбузових культур. Можна визначити три патотипи щодо здатності штамів інфікувати мускусну диню, що володіє геном резистентності *Zym*. Штами патотипу 0 не викликають системної інфекції, симптоми відсутні або наявні лише локальні ураження в місцях інокуляції; штами патотипу 1 індукують хлоротичні або некротичні ураження на системно інфікованих листах, тоді як штами патотипу 2

викликають сильні системні симптоми мозаїки, затримки росту та деформації листя [32].

У ході виконань досліджень було проаналізовано за симптомами вірусні хвороби овочевих культур в Україні, ідентифіковано віруси що інфікують рослини овочевих культур, встановлено відсоток моно- та змішаних інфекцій у рослин овочевих культур, досліджено варіабельність окремих ділянок геному вірусів, виділених з овочевих культур, проаналізовано філогенетичні зв'язки отриманих ділянок геномів ізолятів: РММoV, ToMV, ZYMV, WMV-2 та CMVта досліджено насінневий шлях передачі вірусів овочевих культур в Україні, як одне з джерел вірусів в агроценозах.

У роботі представлені результати досліджень 12 вірусів, які є найбільш розповсюдженими серед овочевих культур (табл. 9.1).

Таблиця 9.1 - Віруси, що уражують овочеві культури

Родина	Рід	Представник
<i>Alfalexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i> - X-вірус картоплі
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y</i> - Y-вірус картоплі
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> – вірус жовтої мозаїки цукіні
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Watermelon mosaic virus 2</i> - вірус мозаїки кавуна 2
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Turnip mosaic virus</i> – вірус мозаїки турнепса
<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>	<i>Tomato ring spot virus</i> – вірус

Родина	Рід	Представник
		кільцевої плямистості томату
<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> – вірус огіркової мозаїки
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Pepper mild mottle virus</i> – вірус слабкої крапчатості перцю
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobravirus</i>	<i>Tobacco rattle virus</i> - вірус погрімковості тютюну
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> - вірус зеленої крапчастої мозаїки огірку
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> - вірус тютюнової мозаїки
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tomato mosaic virus</i> - вірус мозаїки томату

У зразках рослин з вірусоподібними симптомами методом ІФА детектовані антигени WMV2, ZYMV, CMV, CGMMV, PVY, PVX, PMMoV, TRV і ToMV. Частота виявлення вірусів варіювала у межах 1-30%. PMMoV та CGMMV рідко зустрічаються на овочевих культурах України у відкритому ґрунті. Частота виявлення зразків зі змішаною інфекцією становила 2-34 % для різних вірусів. CMV зустрічався у коінфекції з вірусом жовтої мозаїки цукіні та вірусом мозаїки кавуна-2, викликаючи при цьому сильніший прояв симптомів. ToMV зустрічався у коінфекції з Y-вірусом картоплі та CMV.

На прикладі деяких вірусів, встановлено, що насіння овочевих культур є одним з джерел вірусів в агроценозі. Небезпечним є поширення

саме вірусів із широким колом рослин-хазяїв, які детектувались в насіння, а саме CMV та ToMV. Вперше в Україні виявлено здатність ZYMV передаватися за допомогою насіння кабачка з частотою 2,6%. Отже, встановлено нове джерело інфекції на території України (ZYMV).

Ізолят ZYMV-14P належить до групи AI, яка включає ізоляти, поширені в усьому світі. Подібність нуклеотидних послідовностей з ізолятами цієї підгрупи становить 97-100%.

Український ізолят ZYMV демонстрував високу подібність як за нуклеотидними, так і за амінокислотними послідовностями (99-100% та 100%, відповідно).

Отримано нуклеотидні послідовності шести ізолятів WMV-2. Показано, що їх ідентичність за геном капсидного білка не залежить від місця відбору – ізоляти 3ch та 4ch Черкаської області менш споріднені між собою (94,3%), ніж з представниками інших регіонів. Найвища подібність спостерігалася між ізолятом 21w (Полтавська обл) та 4K (АР Крим). Всі ізоляти WMV-2 належать до представників групи G1 і споріднені з ізолятами з Франції, Італії та Іспанії. Виявлено рекомбінацію між українським ізолятом WMV-3ch та штамом WMV-Fr із Франції.

Філогенетичний аналіз кДНК гену капсидного білка українських ізолятів PMMoV з рослин перцю овочевого та помідору звичайного виявив приналежність їх до кластерів штамів вірусів Бразилії, Іспанії, Єгипту та Японії та встановив високу подібність їх між собою за геном капсидного білка не залежно від хазяя.

Вірус мозаїки томатів спричиняє серйозні висококонтагіозні захворювання овочевих культур, а якщо рослини розвиваються з вірусінфікованого насіння, то може призвести і до повної втрати врожаю. Подібно до вірусу мозаїки тютюну, ToMV здатен протягом багатьох років зберігатися в ґрунті і залишках рослинного матеріалу. Цей вірус ефективно передається насінням, через контакт рослин, робочий інвентар,

а також з допомогою дрібних тварин та птахів в процесі їх харчування [64].

Зважаючи на високу контагіозність та убіквітарність ВМТо, дослідження його в агроценозах України на разі є дуже актуальним. До того ж, на сьогодні немає жодної інформації стосовно штамового різноманіття ToMV в умовах України. Було доцільно порівняти українські ізоляти з уже відомими штамми та ізолятами цього вірусу.

Протягом останніх років ми детектували ВМТо виключно в умовах відкритого ґрунту на рослинах томатів, перцю та баклажанів. В основному, це була моноінфекція, однак траплялася і змішана інфекція з Y-вірусом картоплі [171].

В агроценозах України, при ураженні ВМТо, на вірусифікованих рослинах перцю розвивалися симптоми жовтої кільцевої мозаїки та жовто-зеленої листкової мозаїки, плоди при цьому деформувалися; рослини баклажанів демонстрували системну некротичну реакцію, а на листі томатів розвивалася темно-зелена і жовто-зелена мозаїка, а також спостерігалася деформація листкової пластинки з засиханням країв листка та скручуванням листкової пластинки. На плодах томатів спостерігалися світлі плями у вигляді кілець [64, 65].

Аналізуючи отримані результати, можна стверджувати про високу подібність українських ізолятів з відомими штамми і ізолятами вірусу мозаїки томатів. Причому, висока, а це більше 96% подібність, прослідковується незалежно від джерела виділення вірусу чи виду рослини-хазяїна, а тим паче від їх географічного поширення. Як бачимо, вірус мозаїки томату може легко долати міжвидові бар'єри, уражуючи як овочеві, так і декоративні рослини. Прослідкувати шляхи потрапляння в Україну вірусу мозаїки томату і встановити джерело інфекції наразі дуже важко. Дослідження та аналіз філогенетичних дерев, на жаль, не можуть надати вичерпної інформації з цього приводу. На сьогодні ареал вірусу

значно розширився і його детектують у багатьох країнах світу на всіх континентах, окрім Антарктиди.

Що стосується України, то протягом останніх років ми виявляли вірус мозаїки томатів у агроценозах відкритого ґрунту на культурах томату, перцю овочевого та баклажанів. У тепличних же умовах на території України даний вірус не зустрічався. Враховуючи той факт, що на ринку України наявне насіння, контаміноване вірусом мозаїки томатів, можна припустити, що саме в такий спосіб даний вірус поширюється в агроценозах країни і не виключено, що разом з інфікованим насінням вірус мозаїки томатів був завезений в Україну.

У результаті проведеного філогенетичного аналізу та порівняння ToMV-ukr3, ToMV-ukr5, ToMV-ukr10 з охарактеризованими штамми ВМТо встановлено, що виділений патоген споріднений зі штамми ToMV-1-2, ToMV-G26 і ToMV-G6. Показано, що виявлений ізолят не належить до високошкодочинних штамів, які можуть долати стійкість сортів до даного вірусу.

На території України СМV виявляється щороку протягом тривалого часу, проте філогенетичний аналіз послідовностей виявлених ізолятів та встановлення групової приналежності виявлених ізолятів не проводилися. Різні групи СМV викликають різний прояв симптомів та мають різне географічне поширення [80, 82, 86].

Встановлення штамової та групової приналежності, вивчення генетичної різноманітності та філогенетичних взаємозв'язків циркулюючих у агроценозах ізолятів СМV допоможуть попередити розвиток епідемій, проникнення нових штамів на територію України та виникнення більш патогенних ізолятів.

Встановлено, що СМV на території України представлений ізолятами групи ІА, які зустрічаються в низці інших європейських країн, та ІВ, які рідше виявляються у даному регіоні. Виявлено унікальні заміни

у амінокислотних послідовностях білка 2b ізолятів CMV-28 і CMV-58, які не пов'язані з рослиною-хазяїном.

Україна є однією з найбільших країн Європи і займає стратегічне логістичне положення поблизу «воріт» північного Шовкового шляху між країнами ЄС та Чорноморським/Близькосхідним регіоном, де вірус мозаїки турнепсу був також нещодавно описаний у Туреччині [312] та Ірані [313]. Незважаючи на географічне розташування України та широке культивування різних хрестоцвітних культур протягом століть, TuMV ніколи не був виявлений в нашій країні на культурних рослинах незахищеного ґрунту. Дивним чином, у єдиному повідомленні щодо детекції даного вірусу в Україні описане його виявлення у одному зразку дикорослої орхідеї *Orchis purpurea*, відібраної в АР Крим у 2004 р [314]. Однак на той час ізолят вірусу не був знайдений на рослинах овочевих культур.

Базуючись на реакції типових рослин-індикаторів, розрізняють чотири патотипи ізолятів TuMV за їх біологічними властивостями: тип (B) – ізоляти, які здатні інфікувати рослини роду *Brassica* латентно та нерегулярно, і які не інфікують рослини роду *Raphanus*; тип B – ізоляти, які інфікують більшість рослин роду *Brassica*, викликають системну мозаїку на неінокульованих листках, але не інфікують рослини роду *Raphanus*; тип B(R) – ізоляти, які інфікують більшість рослин роду *Brassica*, викликають системну мозаїку на неінокульованих листках, але лише зрідка інфікують рослини роду *Raphanus*, де викликають латентну інфекцію; тип BR – ізоляти, які інфікують які рослини роду *Brassica*, так і представників роду *Raphanus*, і викликають системну мозаїку на неінокульованих листках [315].

Нещодавні філогенетичні дослідження з використанням геномних послідовностей різних ізолятів даного вірусу з усього світу показали, що ізоляти TuMV можна розділити на чотири основних геногрупи, які називаються *basal-Brassica* (*basal-B*; базисна група ізолятів, які уражують

рослини роду *Brassica*), basal-*Brassica/Raphanus* (basal-BR; базисна група ізолятів, які уражують рослини родів *Brassica/Raphanus*), Asian-*Brassica/Raphanus* (Asian-BR; група азіатських ізолятів, які уражують рослини родів *Brassica/Raphanus*) та world-*Brassica* (world-B; світова група ізолятів, які уражують рослини роду *Brassica*) [40]. До групи basal-B віднесені вірусні ізоляти патотипів (B) чи В. Дана група характеризується найбільшою варіабельністю, не є монофілетичною (тобто походить від різних ізолятів/штамів/видів вірусу (-ів)), її представники виділені як з хрестоцвітних, так і з інших рослин у Євразії. Найбільш спорідненою до цієї групи є монофілетична група basal-BR, до якої входять євразійські ізоляти патотипу BR. До третьої найменш варіабельної групи Asian-BR входять ізоляти патотипу BR, виділені головним чином з рослин роду *Raphanus* у Східній Азії. Нарешті, група world-B містить ізоляти патотипу B, виділені головним чином з рослин роду *Brassica* з усіх континентів.

Дослідження показали, що рекомбінація відіграє важливу роль в еволюції TuMV. Вочевидь, TuMV коєволюціонував з рослинами роду *Brassica* і, вірогідно, походить від однієї з давніх євразійських вірусних субпопуляцій з регіонів Європи / Середземномор'я / Малої Азії [40, 45]. У цих регіонах хрестоцвітні культури є важливим компонентом місцевого сільського господарства. При цьому культури роду *Brassica* є більш типовими для Європи, тоді як у регіоні Малої Азії та Євразії комерційно важливими є культури як *Brassica*, так і *Raphanus*. Це може свідчити, що ізоляти, оптимально адаптовані до хрестоцвітних культур роду *Brassica*, більш ефективно поширюються із розвитком сучасного сільського господарства у порівнянні з ізолятами, які пристосовані до інших видів рослин. З іншого боку, це може також вказувати на те, що більш давні популяції TuMV генетично більш різноманітні і тому містять більше варіантів вірусу, здатних інфікувати рослини інших родів, окрім *Brassica*. У такому контексті ізоляти TuMV, які належать до груп роду *Brassica*,

вважаються більш стародавніми, а ізоляти групи *Brassica-Raphanus* – більш сучасними в еволюційному розумінні.

Філогеографічний аналіз продемонстрував, що TuMV вірогідно походить з західної Євразії та/чи Північної Африки від вірусу, що уражував однодольні рослини, можливо, орхідні [316]. У свою чергу, ізоляти TuMV, здатні інфікувати хрестоцвітні рослини (тобто, відносно «нещодавні» ізоляти), могли дивергувати від вірусів, які інфікують орхідні рослини та утворюють окрему монофілетичну та еволюційно давню групу ізолятів [315].

У даному контексті Україна є одним з потенційних кандидатів для пошуку «центру походження» TuMV.

Відібраний для досліджень ізолят UKR9 викликав системну реакцію на різних рослинах родів *Brassica* (капусті, китайській капусті, кольрабі, гірчиці, рапсі, турнепсі та ін.) та *Raphanus* (китайському та японському редисі).

Цікаво, що цей ізолят лише зрідка був здатен інфікувати різні сорти броколі та взагалі не інфікував цвітну капусту. Таким чином, за біологічними властивостями ізолят UKR9 належить до патотипу BR.

За результатами аналізу сиквенсу повного геному українського ізоляту вірусу мозаїки турнепсу встановлено, що ізолят UKR9 є нетиповим для Європи рекомбінантом двох різних генетичних груп World-B та Asian-BR. Ізолят UKR9 має один рекомбінаційний сайт у гені *HC-Pro* (нуклеотиди 1374/75 у повнорозмірній послідовності), який не був раніше описаний. У філогенетичному відношенні український ізолят UKR9 вірусу мозаїки турнепсу достовірно відмінний від обох батьківських ізолятів (Rn98 та TUR9) і найбільш подібний (90% ідентичності) до nereкомбінантного турецького ізоляту TUR9 (свого головного батьківського ізоляту), з яким утворює окремий кластер на філогенетичному дереві.

Не зважаючи на те, що нами був детально описаний ізолят вірусу мозаїки турнепсу UKR9 (рекомбінант двох різних геногруп World-B x Asian-BR), наразі лишається невідомим, чи є цей ізолят домінуючим в вивчених екосистемах та Україні в цілому. Для вирішення такого питання необхідний масштабний скринінг багатьох регіонів країни та різних культур з подальшим еволюційним порівнянням багатьох ізолятів з усього світу. Тим не менше, наші дослідження вперше підтверджують широке поширення та висвітлюють біологічні, молекулярно-філогенетичні характеристики, екологічні та епідеміологічні особливості українського ізоляту вірусу мозаїки турнепсу в Україні.

Узагальнюючи отримані дані можна сформулювати наступні основні положення концепції контролю вірусних інфекцій овочевих культур:

1. Постійний моніторинг вірусологічної ситуації в Україні з метою виявлення високо шкочинних видів і штамів.

2. Ідентифікація і всебічне вивчення структурно-морфологічних, біологічних, біохімічних, серологічних, епідеміологічних та молекулярно-генетичних властивостей виявлених вірусів на основі власних досліджень та джерел літератури.

3. Розроблення ефективних заходів захисту рослин, заснованих на глибокому розумінні механізмів і факторів специфічної взаємодії конкретних штамів вірусів і сортів рослин у конкретних умовах довкілля.

На сьогодні (на сучасному рівні знань про властивості вірусів овочевих культур) найбільш перспективними засобами захисту рослин вбачаються: передпосівне видалення партій насіння, уражених вірусами з високим рівнем насінневої передачі (ToMV, CMV, ZYMV), а також постійний пошук і видалення супутніх рослин та бур'янів з симптомами враження широко розповсюдженими, високо мінливими і шкочинними вірусами – TuMV та CMV. Для ефективного захисту овочевих культур від інших вірусів доцільно (за нашою концепцією) розроблювати захисні

заходи для конкретної системи штам-сорт на основі загальних (традиційних) заходів захисту рослин від вірусних хвороб (рис. 9.1).

Концепція контролю вірусних інфекцій овочевих культур України



Рисунок 9.1 - Базисні положення концепції контролю вірусних інфекцій овочевих культур України

До них відносяться: застосування агротехнічних (обробка землі), агрономічних (планування сівозмін), та фітосанітарних заходів запобігання передачі вірусів шляхом міжрослинних контактів, через ґрунт, поливну воду та знаряддя праці; запобігання (контроль) векторної передачі вірусів шляхом ізолювання овочевих культур захисними

бар'єрами вірусостійких рослин, використання спеціальних пасток, репелентів та пестицидів; забезпечення умов вирощування рослин, оптимальних для овочевих культур і не сприятливих для вірусів (особливо в теплицях) за рахунок вибору ґрунту, дозування добрив, мікроелементів, вологості, температури, освітленості тощо; застосування стійких сортів і гібридів, а також стимуляторів росту та антивірусних препаратів, високо ефективних щодо конкретних сортів овочевих культур, що відносяться до певних геногруп вірусостійкості (рис. 9.1).

При виконанні дисертаційної роботи відібрані ізоляти високошкодочинних вірусів овочевих культур, створені описи симптомів розвитку інфекції на різних видах та сортах. Проведено діагностику, виділення та накопичення таких ізолятів, їх структурно-морфологічний та біохімічний аналіз. Визначені «маркерні» послідовності геномів ізолятів визначених вірусів та розроблені олігонуклеотидні проби. Шляхом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією отримані бібліотеки кДНК визначених (суб)геномних послідовностей вірусів. З використанням сучасних методів аналізу нуклеотидних послідовностей отримані сіквенси маркерних ділянок вірусних геномів та проведено їх біоінформаційний аналіз.

Відібрані віруси, які становлять найбільшу небезпеку в карантинному та епідемічному аспектах. Проведено молекулярне типування шкодочинних вірусів овочевих культур та оцінку епідемічного потенціалу отриманих ізолятів (в тому числі з урахуванням екологічних факторів) на основі їх спорідненості з описаними в світових базах даних. Вивчено філогенетичні властивості українських ізолятів вірусів з використанням молекулярно-генетичних та біоінформаційних підходів.

Досліджено епідемічний потенціал українських ізолятів вірусів рослин і підтверджено його кореляцію як з біотичними (переносник, вид, сорт рослини), так і з антропогенними факторами. На основі отриманих молекулярно-генетичних даних визначені біологічно значущі механізми

еволюційної адаптації таких вірусів, які були порівняні з іншими відомими системами «вірус-рослина».

Вперше доведено значне поширення окремих вірусів овочевих культур в міських екосистемах, де супутні культурні та дикорослі рослини є резервуарами для збереження популяцій вірусу та його передачі механічно та літаючими векторами. Показано, що урбанізовані екосистеми мають виключно важливе значення для епідеміології вірусів в Україні, не зважаючи на ефективність класичних заходів контролю вірусних захворювань.

На основі проведеної роботи з діагностики вірусів рослин, аналізу їх нуклеотидних послідовностей та філогенетичного аналізу запропоновані практичні шляхи емпіричного вдосконалення існуючих тест-систем для їх діагностики.

Базуючись на міжнародному Генбанку, створений унікальний об'єктно орієнтований інформаційний банк генетичних послідовностей вірусів рослин України, в якому представлена інформація, що відноситься виключно до вірусів рослин, виділених в Україні.

Таким чином, проведена масштабна робота з молекулярної епідеміології вірусів рослин. Встановлений ряд фундаментальних закономірностей. Серед них можна виокремити наступні.

В Україні представлений широкий видовий склад вірусів овочевих культур різного ступеню агресивності та небезпеки. Вперше виявлені та охарактеризовані небезпечні патогени, які раніше не зустрічалися в Україні: віруси мозаїки турнепсу, жовтої мозаїки цукіні, мозаїки кавуна [259, 261, 263, 267, 310]. Підтверджено, що одним із актуальних джерел вірусів овочевих культур в Україні є насіння. Вперше доведено, що в агроценозах України циркулює ізолят ZYMV, який ефективно передається насінням.

Встановлено роль супутніх дикорослих та культурних рослин у підтриманні популяцій вірусів овочевих культур та вперше доведено значну роль саме урбанізованих міських екосистем у даному процесі.

Продемонстрована кореляція біологічних ознак, генетичних властивостей та епідеміологічних особливостей вірусів овочевих культур в Україні.

Закладені основи вивчення епідемічної ролі екологічних факторів і підтверджено, що антропогенне навантаження може підсилювати агресивність вірусів. Депозитовано ряд вірусів для створення і вдосконалення діагностичних систем [337, 338].

Зазначимо, що створений банк ізолятів вірусів та інфобанк відповідають положенням Закону України «Про карантин рослин» № 3349-ХІІ (редакція від 01.01.2016 р.), Указу Президента України «Про приєднання України до Міжнародної конвенції про захист рослин» №81/2006 від 31.01.2006 р. та Наказу Міністерства аграрної політики та продовольства України «Про затвердження Положення щодо здійснення аналізу ризиків для розробки та/або перегляду фітосанітарних заходів» №339 від 11.06.2012 р.

Окремо слід відмітити, що Міжнародні стандарти з фітосанітарних заходів (МСФЗ № 2, 6, 11, 14, 21, 23) [354] адаптовані лише для регульованих та карантинних (тобто, нечисельних) патогенів. Іншими словами, абсолютна більшість вірусів рослин залишається поза увагою, що підкреслює важливість проведених досліджень.

Отримані результати свідчать про прогресуючу загрозу для рентабельного вирощування існуючих та перспективних культур, і обумовлюють необхідність розробки такої системи, яка б дозволила проводити оцінку та попереджати ризик появи та/або поширення кодочинних вірусів і відповідала вимогам Міжнародної конвенції про захист рослин.

Виходячи з отриманих здобутків, пропонується зосередити подальші зусилля на розробці простої та ефективної у використанні системи заходів для зниження біологічного та екологічного ризику, зменшення потенційних втрат врожаю, більш ефективного планування господарчої діяльності та підвищення рентабельності виробництва. Така система надалі може бути не тільки впроваджена у виробництво, але й інкорпорована до баз знань різних рівнів та предиктивно-аналітичних алгоритмів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені нові підходи до вирішення актуальної науково-біологічної проблеми, а саме - розроблена концепція контролю вірусних інфекцій овочевих культур, що базується на встановлених молекулярно-біологічних властивостях вірусів та епідеміологічних закономірностях розвитку і поширення вірусних інфекцій.

1. Вперше встановлений спектр вірусів, що є представниками родин *Virgaviridae* (PMMoV, ToMV, CGMMV, TRV), *Bromoviridae* (CMV), *Potyviridae* (PVY, ZYMV, WMV-2, TuMV) та *Alphaflexiviridae* (PVX), які з урахуванням екологічних умов та біологічних властивостей є актуальними та шкочинними для овочевих культур України та Європи. Вперше в Україні описані віруси PMMoV та TuMV, встановлені їх рослини-хазяї та вивчені способи передачі вірусів, які є небезпечними для широкого кола рослин агроценозів.

2. Вперше показано поширення змішаних вірусних інфекцій, які супроводжуються більш суворими візуальними симптомами захворювання і втратами комерційної продукції, та встановлені типові групи вірусів, що їх викликають в Україні: ZYMV/WMV-2, CMV/ZYMV/WMV-2, CMV/ToMV/PVY та TuMV/CMV. Частота виявлення вірусів у моноінфекції варіює у межах 1-30%, а у змішаній інфекції – 2-34% для різних вірусів, що визначається їх епідеміологічними властивостями, видом рослин-хазяїв, а також умовами вирощування культури.

3. Вперше в Україні встановлено нове джерело ZYMV та підтверджено здатність вірусу передаватися насінням з

ефективністю у 2,6%. Обґрунтовано, що насіння овочевих культур є одним із важливих та недооцінених джерел вірусів в екосистемах. Встановлено, що в екологічних умовах України насінневий шлях передачі є актуальним, потребує відповідного контролю для ряду вірусів (CGMMV, ZYMV, ToMV та CMV) і становить особливу небезпеку для вірусів із широким колом рослин-хазяїв, а саме CMV та ToMV.

4. Продемонстрована консервативність генетичних послідовностей більшості вивчених вірусів. Підтверджена домінуюча роль точкових мутацій, синонімічних амінокислотних замін та стабілізуючого добору в еволюції вірусних популяцій в Україні.

5. Встановлена генетична однорідність українських популяцій вірусів WMV-2, ZYMV, PMMoV та ToMV, і подібність їх ізолятів до відомих штамів цих вірусів. Виявлені унікальні амінокислотні заміни білка 2b у українських ізолятів CMV і продемонстровано, що популяція цього вірусу в Україні є більш гетерогенною, ніж у інших європейських країнах і представлена різними генетичними групами.

6. Вперше встановлено, що філогенетична спорідненість українських ізолятів вірусів овочевих культур не залежить від географічного походження та рослини-хазяя, що має епідеміологічне значення, свідчить про інтенсивну циркуляцію вірусів в Україні і може бути використане для оптимізації діагностичних тест-систем.

7. Вперше знайдені нові рекомбінантні ізоляти шкочинних вірусів WMV-2 та TuMV, що свідчить про активні еволюційні процеси та обмін генетичним матеріалом вірусів в Україні. За результатами аналізу послідовності повного геному встановлено,

що український ізолят TuMV UKR9 є нетиповим для Європи рекомбінантом двох різних генетичних груп і має один рекомбінаційний сайт у гені *HC-Pro*, який не був описаний раніше. Показано, що рекомбінантний український ізолят TuMV UKR9 здатний системно інфікувати рослини двох основних родів хрестоцвітих *Brassica* та *Raphanus*, і становить потенційну небезпеку в епідеміологічному аспекті.

8. Підтверджено кореляцію генетичних ознак українських ізолятів вірусів з їх вірулентністю щодо овочевих культур. Встановлено, що українські ізоляти ZYMV, WMV-2, PMMoV не належать до високовірулентних штамів. За комплексом біологічних та молекулярно-епідеміологічних ознак встановлено, що ToMV, TuMV та CMV потенційно є найбільш небезпечними вірусами, які загрожують вирощуванню овочевих культур в Україні.

9. Вперше доведено значне поширення TuMV в міських екосистемах, де супутні культурні та дикорослі рослини є резервуарами для збереження популяції вірусу та його передачі механічно та літаючими векторами. Показано, що даний фактор має виключно важливе значення для епідеміології TuMV в Україні, не зважаючи на ефективність класичних заходів контролю вірусних захворювань.

10. Розроблений концептуальний підхід до ефективного та рентабельного контролю вірусних інфекцій овочевих культур України з урахуванням епідеміологічних властивостей вірусів, їх епідеміологічного потенціалу (способами передачі і збереження у довкіллі, вірулентністю та ін.), типом сприйнятливої культури та умовами її вирощування, і включає контроль насінневого матеріалу на вірусозійство; тестування супутніх дикорослих рослин, які

можуть виступати резервуарами вірусів з широким спектром рослин-хазяїнів в екосистемах; та тестування культурних рослин для видалення інфікованих рослин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hanssen IM, Lapidot M, Thomma BP. Emerging viral diseases of tomato crops. *MPMI*. 2010;23(5):539-548.
2. Roossinck MJ. Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology*. 2015;479-480:271-7.
3. Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. Fundamentals of genetic epidemiology. New York: Oxford University Press; 1993. 383p.
4. Slatter M Dictionary of epidemiology. New York: Oxford University Press; 2008. 320p.
5. García-Arenal F, Escriu F, Aranda MA, Alonso-Prados JL, Malpica JM, Fraile A. Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus Res*. 2000;71(1-2):1-8.
6. Moury B, Desbiez C, Jacquemond M, Lecoq H. Genetic diversity of plant virus populations: towards hypothesis testing in molecular epidemiology. *Adv Virus Res*. 2006;67:49-87.
7. Lecoq H, Wipf-Scheibel C, Nozeran K, Millot P, Desbiez C. Comparative molecular epidemiology provides new insights into Zucchini yellow mosaic virus occurrence in France. *Virus Res*. 2014;186:135-43.
8. Simmons HE, Holmes EC, Stephenson AG. Rapid evolutionary dynamics of Zucchini yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol*. 2008;89:1081-1085.
9. Інформаційно-аналітичний портал АПК України. <https://minagro.gov.ua> (дата звернення 29 листопада 2018).
10. Державна служба статистики України. <http://www.ukrstat.gov.ua/> (дата звернення 29 листопада 2018).
11. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus taxonomy*. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. 2012;1327.

12. Lecoq H, Katis N. Control of cucurbit viruses. *Adv Virus Res.* 2014;90:255-96.
13. Gal-On A. Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity -the tails of two proteins. *Mol Plant Pathol.* 2007;8(2):139-50.
14. Mishchenko LT, Dunich AA, Skrypkinia IYa, Kozub NO. Phylogenetic analysis of two Ukrainian isolates of Wheat streak mosaic virus *Biopolymers and Cell.* 2019;35(1):64–77.
15. Snihur H, Pozhylov I, Budzanivska I, et al. First report of High Plains wheat mosaic virus on different hosts in Ukraine *J Plant Pathol.* 2019.
16. Asad A, Tomohide N. Watermelon mosaic virus. *Plant Viruses. Global Science Books.* 2007;1(1):80-84 :[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0706/PV_1\(1\)/PV_1\(1\)80-84o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0706/PV_1(1)/PV_1(1)80-84o.pdf)/(дата звернення 12 листопада 2018).
17. Gallitelli D. The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Res.* 2000;71(1-2):9-21.
18. Jones RA. Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. *Virus Res.* 2004;100(1):5-30.
19. Desbiez C, Joannon B, Wipf-Scheibel C, Chandeysson C, Lecoq H. Recombination in natural populations of watermelon mosaic virus: new agronomic threat or damp squib. *J Gen Virol.* 2011;92(8):1939-48.
20. Yasaka R, Fukagawa H, Ikematsu M, Soda H, Korkmaz S, Golnaraghi A, Katis N, Ho SYW, Gibbs AJ, Ohshima K. The Timescale of Emergence and Spread of Turnip Mosaic Potyvirus. *Scientific Reports.* 2017;7(4240):1-14.

21. Lisa V, Boccardo G, D'Agostino G, Dellavalle G. and D'Aquilio M. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology*. 1981;71(7):667-672.
22. Lisa V, Lecoq H. Zucchini yellow mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. 1984;282.
23. Desbiez C, Lecoq H. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*. 1997;46(6):809-829.
24. Blua MJ, Perring TM. Effect of zucchini yellow mosaic-virus on development and yield of cantaloupe (*Cucumis-Melo*) *Plant Disease*. 1989;73(4):317–320.
25. Bananej K. Biological and molecular variability of Zucchini yellow mosaic virus in Iran. *J. Phytopathol*. 2008;156:654–659.
26. Katis NI, Tsitsipis JA, Lykouressis DP, Papapanayotou A, Margaritopoulos JT, Kokinis GM, Perdikis DC, Manoussopoulos IN. Transmission of zucchini yellow mosaic virus by colonizing and non-colonizing aphids in Greece and new aphid species vectors of the virus. *Journal of Phytopathology*. 2006;154(5):293–302.
27. Castle SJ, Perring TM, Farrar CA, Kishaba AN. Field and laboratory transmission of watermelon mosaic virus-2 and zucchini yellow mosaic-virus by various aphid species. *Phytopathology*. 1992;82(2):235–240.
28. Mahgoub HA, Desbiez C, Wipf Scheibel, C Dafalla, Lecoq H. Characterization and occurrence of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Sudan. *Plant Pathol*. 1997;46(5):800-805.
29. Sako N, Ogata K. Different helper factors associated with aphid transmission of some potyviruses. *Virology*. 1981;112(2):762-5.
30. Asad A, Tomohide N, Okuda S. Identification and molecular characterization of viruses infecting cucurbits in Pakistan. *Journal of Phytopathology*. 2004;152:677-682.

31. McKern NM, Strike PM, Barnett OW, Ward CW, Shukla DD. Watermelon mosaic virus-Morocco is a distinct potyvirus. *Arch Virol.* 1993;131(3-4):467-73.
32. Shukla DD, Ward CW, Brunt AA. *The Potyviridae.* CAB International. Wallingford, UK. 1994;516.
33. Schroeder WT, Provvidenti R. A Common Gene for Resistance to Bean Yellow Mosaic Virus and Watermelon Mosaic Virus 2 in *Pisum sativum*. *Phytopathology.* 1971;61:846-848.
34. Wang YY, Beck DL, Gardner RC, and Pearson MN. Nucleotide sequence, serology and symptomatology suggest that vanilla necrosis potyvirus is a strain of watermelon mosaic virus II. *Archives of Virology.* 1993;129:93–103.
35. Witcher W, Smith FH. Control of Watermelon mosaic virus on summer squash with oil. *Phytopathology.* 1980;70(6):572-573.
36. Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research.* 2001;74:157–175.
37. Walsh JA, Jenner CE. Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology.* 2002; 3:289–300.
38. Scholthof KBG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 2011;12(9):938–954.
39. Provvidenti R, Zitter A, Hopkins DL, Thomas CE. Diseases caused by viruses. Pages in: *Compendium of Cucurbit Diseases.* T American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 1996;37-45.
40. Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, Hamamoto T, Tomimura K, Tan Zh, Sano T, Azuhata F, Walsh JA, Fletcher J, Chen J, Gera A, Gibbs A. Molecular evolution of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology.* 2002;83:1511–1521.

41. Schwinghamer MW, Schilg MA, Walsh JA, Bambach RW, Cossu RM, Bambridge JM, Hind-Lanoiselet TL, McCorkell BE, Cross P. Turnip mosaic virus: potential for crop losses in the grain belt of New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathol.* 2014;43:663-678.
42. Segundo E, Martin-Bretones G, Ruiz L, Velasco L, Janssen D, Cuadrado IM. First Report of Turnip mosaic virus in *Pisum sativum* in Spain. *Plant Dis.* 2003; 87:103.
43. Pallett DW, Cooper JI, Wang H, Reeves J, Luo Z, Machado R, Obermeier C, Walsh JA, Kearsey MJ. Variation in the pathogenicity of two Turnip Mosaic virus isolates in wild UK *Brassica rapa* provenances. *Plant Pathology.* 2008;57 (3):401–407.
44. Guglielmone L, Jenner CE, Walsh JA, Ramasso E, Marian D, Roggero P. An unusual isolate of turnip mosaic potyvirus from *Abutilon theophrasti* in Piedmont, Italy. *Phytoparasitica.* 2000;28(2):149-152.
45. Tomimura K, Spak J, Katis N, Jenner CE, Walsh JA, Gibbs AJ, Ohshima K. Comparisons of the genetic structure of populations of Turnip mosaic virus in West and East Eurasia. *Virology.* 2004;330:408–423.
46. Tomimura K, Gibbs AJ, Jenner CE, Walsh JA, Ohshima K. The phylogeny of Turnip mosaic virus comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent ‘emergence’ in East Asia. *Mol Ecol.* 2003;12:2099–2111.
47. Petrzik K, Lehmann P. Classification of turnip mosaic virus isolates according to the 3'-untranslated region. *Acta Virol.* 1996; 40(3):151-155.
48. Horvath J, Juretic N, Besada WH, Mamula D. Natural occurrence of turnip mosaic virus in Hungary. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 1975; 10:77-88.

49. Kozubek E, Irzykowski W, Lehmann P. Genetic and molecular variability of a Turnip mosaic virus population from horseradish (*Cochlearia armoracia* L.). *J Appl Genet.* 2007;48(3):295-306.
50. Kovachevsky I.C. Turnip mosaic virus disease on crucifer and other plants in Bulgaria. *Plant Sci. Bulgaria.* 1975;12:171.
51. Zubareva IA, Vinogradova SV, Gribova TN, Monakhos SG, Skryabin KG, Ignatov AN. Genetic diversity of turnip mosaic virus and the mechanism of its transmission by Brassica seeds. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2012;450(1):119-122.
52. Izadpanah, K. Squash mosaic virus as the cause of melon vein banding mosaic in Iran. *J. Phytopathol.* 1983;120:278-283.
53. Nontajak S, Vulyasevi S, Jonglaekha N, Smitamana P. Detection of Cucumber Green Mottle Mosaic Tobamovirus (CGMMV) in Three Growth Stages of Japanese Cucumber in the Highland Area of Northern Thailand. *International Journal of Agricultural Technology.* 2014;10(1): 277-287.
54. Білик МО, Євтушенко МД, Марютін ФМ. Захист овочевих культур від хвороб і шкідників у закритому ґрунті. Навчальний посібник. Харків: Еспада; 2003.
55. Constable F, Daly F, Terras MA, Penrose L, Dall D. Detection in Australia of Cucumber green mottle mosaic virus in seed lots of cucurbit crops. *Australasian Plant Disease Notes.* 2018;13:18.
56. Karen-Beth G. Scholthof. Tobacco mosaic virus: A Model System for Plant Biology . *Phytopathology.* 2005;42(4):13–22.
57. Andrew MQ, King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens. Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Wien Springer. Verlag. 2012;1139.
58. Кеглер Х. Борьба с вирусными болезнями растений. Агропромиздат. 1986;326 с.

59. Tobias I, Rast A. Th. B, Maat DZ. Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: Comparative host reactions and serological relationships. *European Journal of Plant Pathology*. 2001;88(6):257–268.
60. Гольдин МИ. Вирусные включения в растительной клетке и природа вирусов. АН СССР. 1963;158.
61. Harrison BD, Wilson TMA. Tobacco mosaic virus: Pioneering research for a century. *Phil. Transact. Royal Soc. London B*. 1999;354:517-685.
62. Tobias I, Rast ATB, Maat DZ. Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: comparative host reactions and serological relationships. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1982;88(6):257-268.
63. Candilo MDi, Faccioli G, Grassi G, Faeti V. Effect of Tomato mosaic virus (ToMV) on yield of machine-harvested processing. *Phytopathologia Mediterranea*. 1992;31(1):32-36.
64. Broadbent L. Epidemiology and control of tomato mosaic virus. *Annual Review of Phytopathology*. 1976;14:75–96.
65. Станчева Й. Атлас болезней сельскохозяйственных культур. Болезни овощных культур. София: ПЕНСОФТ. 2005;(1):182.
66. Gaspar JO, Vega J, Costa AS. An ultrastructural study of particle distribution during microsporogenesis in tomato plants infected with the Brazillian tobacco rattle virus. *Journal of Botany*. 1984;62(5):372–378.
67. MacFarlane SA. MacFarlane S.A. Molecular biology of the Tobraviruses *J. Gen. Virol*. 1999;80:2799–2807.
68. Ratcliff FG. MacFarlane SA, Baulcombe DC. Gene silencing without DNA. rna-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*. 1999;11(7):1207-1216.

69. Ratcliff F, Montserrat Martin-Hernandez A, Baulcombe DC. Technical Advance: Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*. 2001;237–245.
70. Visser PB, Brown DJ, Brederode FT, Bol JF. Nematode transmission of tobacco rattle virus serves as a bottleneck to clear the virus population from defective interfering RNAs. *Virology*. 1999;263(1):155–65.
71. Sudarshana MR, Berger PH. Nucleotide sequence of both genomic RNAs of a North American tobacco rattle virus isolate . *Arch. Virol*. 1998;143:1535–1544.
72. Visser PB, Mathis A, Linthorst HJ. Tobraviruses. *Encyclopedia of virology*. Academic Press, SanDiego; 1999.1784–1789 p.
73. Alonso E, García-Luque I, de la Cruz A, et Al. Nucleotide Sequence of the Genomic RNA of Pepper Mild Mottle Virus. *Juornal of General Virology*. 1991;36(72):2875–2884.
74. Cohen S, Ben-Josef R. Biochemical properties of tobamoviruses. *Hassadeh*. 1989;70:394.
75. Svoboda J, Červena G, Rodova J, JokesM. First report of Pepper mild mottle virus in pepper seeds produced in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci*. 2006;42:34–37.
76. Wetter C, Conti M. AAB Description plant viruses. 1987;330.
77. Layssa M. de Oliveira, Alice K. Inoue-Nagata, Tatsuya Nagata Complete genome nucleotide sequence of Pepper mild mottle virus isolated in the Federal District. *Tropical Plant Pathology*. 2010;35(6):361.
78. Tsuda S, Kubota K, Kanda A. Pathogenicity of Pepper mild mottle virus Is Controlled of Its Replication Protein but Not the Viral Accumulation. 2007; 97(4):412–420.

79. Zhang T, Breitbart M, Lee WH., et al. RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses. *PLoS Biology*. 2009;4(4):378.
80. Jacquemond M. Cucumber mosaic virus. *Adv Virus Res*. 2012;84:439-504.
81. Ding SW. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*. 1994;198:593–601.
82. García-Arenal F, Escriu F, Aranda MA, Alonso-Prados JL, Malpica JM, Fraile A. Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus Res*. 2000;71(1-2):1-8.
83. Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC. Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of Cucumber mosaic virus on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell & Environment*. 2014;37:1427-1439.
84. Ali A, Kobayashi M. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. *Journal of Virological Methods*. 2010;163:234-237.
85. Arafati N, Farzadfar S, Pourrahim R. Characterization of coat protein gene of Cucumber mosaic virus isolates in Iran. 2013;11(2):109-114.
86. Roossinck M. J. Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of virology*. 2002;76(7):3382-3387.
87. Massumi H. Occurrence, distribution, and relative incidence of seven viruses infecting greenhouse-grown cucurbits in Iran. *Plant* . 2007;91(2):159-163.
88. Arli-Sokmen M. Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*. 2005;33:347-358.

89. Hollings M, Stone OM. Tomato aspermy virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 1971;79:4.
90. Чуюн АХ, Крылов АВ. Вирус аспермии томатов из хризантемы в Приморском крае и его свойства. Бюллетень Главного Ботанического сада. 1979;114:84–92.
91. Raj SK, Kumar S, Verma DK, Snehi SK. First report on molecular detection and identification of Tomato aspermy virus naturally occurring on gladiolus in India. *Journal of Phytopathology*. 2011; 39(3):127.
92. Martelli GP, Adams MJ, Kreuze J F, Dolja VV. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2007;45:73–100.
93. CABI. Potato virus X. *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK. CAB International. 2017. Доступно: www.cabi.org/isc/datasheet/43759 (дата звернення 29 січня 2018).
94. Bance VB. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology*. 1991 Jun;182(2):486-94.
95. Shukla, Ward, Brunt & Berger. AAB Descriptions of Plant Viruses. 1998;366.
96. Milne RG. *The Plant Viruses. The filamentous plant viruses*. New York: Plenum Press. 1988;4:333.
97. Kerlan C. Potato virus Y. *Database of plant viruses*. Association of Applied Biologists. 2006;316.
98. Shukla, Ward & Brunt. *The Potyviridae*. Wallingford: CAB International. 1995. 516
99. Adam G, Kegler H. Tomato spotted wilt virus and related tospoviruses. *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*. 1994;28(6):483–504.

100. German TL, Ullman DE, Moyer JW. Tospoviruses: Diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. *Annu. Phytopathol.* 1992;30:315-348.
101. Marchoux G, Gebre-Selassie K, Villevieille M. Detection of tomato spotted wilt virus and transmission by *Franklinella occidentalis* in France. *Plant Pathol Plant.* 2007;40(3):347-351.
102. Pappu H, Jones R, Jain R. Global status of Tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research.* 200;141:219–236.
103. Mumford RA, Barker I, Wood KR. The biology of the tospoviruses. *Annals of Applied Biology.* 1996;128:159-183.
104. Moriones E, Aramburu J, Riudavets J, Arnó J, Laviña A. Effect of plant age at time of infection by tomato spotted wilt virus on the yield of field-grown tomato. *European Journal of Plant Pathology.* 1998;104(3):295-300.
105. Tehrani B, Allen WR, Matteoni JA. Update on the incidence of tomato spotted wilt virus in greenhouses. *Can. Plant Dis. Surv.* 1990;70:102-103.
106. Farooq AA, Akanda AM. Symptoms and prevalence of Tomato spotted wilt virus (TSWV) infection in Bangladesh. *Intl. J. Sustain. Crop Prod.* 2007;2(5):51-58.
107. Antignus J, Gera A, Perslmen M. Tomato spotted wilt, a new disease of flowers and vegetables in Israel. *Phytoparasitica.* 1994;22(1):86–87.
108. Власов ЮИ. Ларина ЭИ. Сельскохозяйственная вирусология. М.: Колос;1982. 150–156 с.
109. Мэтьюз Р. Вирусы растений. М.: Мир; 1973. 600 с.
110. Daughtrey ML. Detection and identification of tospoviruses in greenhouses. *Acta Horticulturae.* 1996;431(14):90-98.

111. Hsu HT, Barzuna L, Hsu YH, Bliss W, Perry KL. Identification and subgrouping of Cucumber mosaic virus with mouse monoclonal antibodies. *Phytopathology*. 2000;90(6):615-620.
112. Berniak H, Malinowski T, Kaminska M. Comparison of ELISA and RT-PCR assays for detection and identification of cucumber mosaic virus (CMV) isolates infecting horticultural crops in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 2009;17(2):5–20.
113. Zhang L, Hanada K, Palucaitis P. Mapping local and systemic symptom determinants of Cucumber mosaic virus in tobacco. *The Journal of General Virology*. 1994;75:3185-3191.
114. Arafati N, Farzadfar S, Pourrahim R. Characterization of coat protein gene of Cucumber mosaic virus isolates in Iran. *Iran J. Biotech*. 2013;11(2):109-114.
115. Sclavounos AP, Voloudakis AE, Arabatzis Ch, Kyriakopoulou PE. A Severe Hellenic CMV Tomato Isolate: Symptom Variability in Tobacco, Characterization and Discrimination of Variants. *Europ. J. Plant Pathol*. 2006; 115(2):163-172.
116. Palukaitis P, García-Arenal F. Cucumoviruses. *Adv Virus Res*. 2003;62:242-323.
117. Kumari R, Bhardwaj P, Singh L, Zaidi AA, Hallan V. Biological and molecular characterization of Cucumber mosaic virus subgroup II isolate causing severe mosaic in cucumber. *Indian J of Virology*. 2013;24(1):27-34.
118. Gallitelli D. The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research*. 2000;71:9-21.
119. White PS, Morales FJ, Roossinck MJ. Interspecific reassortment in the evolution of a cucumovirus. *Virology*. 1995;207:334–337.

120. Perry KL, Zhang L, Shintaku MH, Palukaitis P. Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by *Aphis gossypii*. *Virology*. 1994;205:591–595.
121. Ding SW, Anderson BJ, Haase HR, Symons RH. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*. 1994; 198:593–601.
122. Morse SS, Domingo E, Holland JJ. The Evolutionary Biology of Viruses. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. New York: Raven Press. 1994;161–184.
123. Shukla DD, Ward CW, Brunt AA. The potyviridae. CAB International. Wallingford, UK. 1994;515.
124. Lecoq H. Search for factors involved in the rapid shift in Watermelon mosaic virus (WMV) populations in South-eastern France. *Virus Research*. 2011;159:115–123.
125. Martin S, Elena S. Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. *J. Gen. Virol.* 2009;90:2815–2820.
126. Fabre F, Chadoeuf J, Costa C, Lecoq H, Desbiez C. Asymmetrical over-infection as a process of plant virus emergence. *J Theory Biology*. 2010;265:377-388.
127. Mbanzibwa DR, Tian Y, Mukasa SB, Valkonen JPT. Cassava brown streak virus (Potyviridae) encodes a putative Maf/HAM1 pyrophosphatase implicated in reduction of mutations and a P1 proteinase that suppresses RNA silencing but contains no HC-Pro. *J. Virol.* 2009;83:6934–6940.
128. Larsen RC, Miklas PN, Druffel KL, Wyatt SD. Kstrain is a stable and naturally occurring interspecific recombinant derived from Bean common mosaic necrosis virus and Bean common mosaic virus. *Phytopathology*. 2005;95:1037–1042.

129. Van der Walt E, Rybicki EP, Varsani A, Polston JE, Billharz R, Donaldson L, Monjane AL, Martin DP. Rapid host adaptation by extensive recombination. *J. Gen. Virol.* 2009;90:734–746.
130. Desbiez C, Lecoq H. Evidence for multiple intraspecific recombinants in natural populations of watermelon mosaic virus (WMV, potyvirus). *Arch Virol.* 2008;153:1749–1754.
131. National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. /(дата звернення 9 квітня 2018).
132. Ali A, Mohammad O, Khattab A. Distribution of viruses infecting cucurbit crops and isolation of potential new virus-like sequences from weeds in Oklahoma. *Plant Dis.* 2012;96:243–248.
133. Bananej K, Orfanidou CG, Maliogka VI, Katis NI. First Report of Moroccan Watermelon Mosaic Virus in Zucchini in Iran. *Plant Dis.* 2018;2047-2048
134. McKern NM, Strike PM, Barnett OW, Ward CW, Shukla DD. Watermelon mosaic virus-Morocco is a distinct potyvirus. *Arch Virol.* 1993;131(3-4):467-73.
135. Rajbanshi N, Ali A. First Complete Genome Sequence of a Watermelon Mosaic Virus Isolated from Watermelon in the United States. *Genome Announc.* 2016;4(2):229-235.
136. Niu Y, Pang X, Cheng Y, Wang D, Guo S, Liu Y. Molecular detection of watermelon mosaic virus associated with a serious mosaic disease on *Cucurbita pepo* L. in Shanxi, China. *Virus disease.* 2017 Sep;28(3):315-319.
137. Tóbiás L, Palkovics L. Characterization of Hungarian isolates of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, potyvirus) transmitted by seeds of *Cucurbita pepo* var. *Pest Manag Sci.* 2003;59(4):493-497.
138. Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Lecoq H. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of Zucchini

yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus) with special reference to the Caribbean. *Virus Res.* 2002;85:5-16.

139. Zhao MF, Chen J, Zheng HY, Adams MJ, Chen JP. Molecular analysis of Zucchini yellow mosaic virus isolates from Hangzhou, China. *J. Phytopathol.* 2003;151:307–311.

140. Glasa M, Pittnerova S. Complete genome sequence of a Slovak isolate of Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) provides further evidence of a close molecular relationship among Central European ZYMV isolates. *J Phytopathol.* 2006;154:436–440.

141. Glasa M, Svoboda J, Novakova S. Analysis of the molecular and biological variability of Zucchini yellow mosaic virus isolates from Slovakia and Czech Republic. *Virus Genes.* 2007;35:415–421.

142. Simmons HE, Holmes EC, Stephenson AG. Rapid evolutionary dynamics of zucchini yellow mosaic virus. *Journal of General Virology.* 2008;89:1081–1085.

143. Bananej K, Keshavarz T, Vahdat A, Salekdeh GH, Glasa M. Biological and molecular variability of Zucchini yellow mosaic virus in Iran. *J. Phytopathol.* 2008;156:654–659.

144. Johansen E. , Edwards M.C., Hampton R.O. Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2009;32:363–386.

145. Ha C, Revill P, Harding RM, Vu M, Dale JL. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. *Arch. Virol.* 2008;153(1):45–60.

146. Li H, Roossinck M. Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *J. Virol.* 2004;78:10582–10587.

147. Ali A, Li H, Schneider WL, Sherman DJ, Gray S, Smith D, Roossinck MJ. Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of Cucumber mosaic virus. *J Virol*. 2006;80(17):8345–8350.
148. Arli-Sokmen M, Mennan H, Sevilik M, Ecevit O. Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*. 2005; 33(4):347-358.
149. Roossinck MJ. Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of virology*. 2002;76(7):3382-3387.
150. Massumi H, Samei A, Pour AH, Shaabani M, Rahimian H. Occurrence, distribution, and relative incidence of seven viruses infecting greenhouse-grown cucurbits in Iran. *Plant disease*. 2007;1(2):159-163.
151. Delmiglio C, Pearson MN. Effects and incidence of Cucumber mosaic virus, Watermelon mosaic virus and Zucchini yellow mosaic virus in New Zealand's only native cucurbit, *Sicyos australis*. *Australasian Plant Pathology*. 2006; 35:29-35.
152. Zitikaitė I, Staniulis J, Urbanavičienė L, Žižytė M. Cucumber mosaic virus identification in pumpkin plants. *Žemdirbystė Agriculture*. 2011;98(4):421-6.
153. Kim MK, Kwak HR, Jeong SG, Ko SJ, Lee SH, Kim JS, Kim KH, Choi JK, Choi HS, Cha BJ. Characteristics of Cucumber mosaic virus infecting Zucchini in Korea. *Journal of Plant Pathology*. 2010;26(2)139-148.
154. Rasoulpour R, Izadpanah K. Properties and taxonomic position of hoary cress strain of Cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Pathology*. 2008;90(1):97-102.
155. Chen YK, Yang CC. Characterization of an isolate of Cucumber mosaic virus associated with allamanda mosaic. *Plant Pathology Bulletin*. 2006;15:77-82.

156. Koolivand D, Basir NS, Mozafari J. Serological and molecular detection of newly isolated Cucumber mosaic virus variants from Iran. *International Journal of Agriculture*. 2012;2:933-941.
157. Zeng R, Liao Q, Feng J, Li D, Chen J. Synergy between cucumber mosaic virus and zucchini yellow mosaic virus on Cucurbitaceae hosts tested by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Biochim, Biophys. Sin.* 2007;39(6)431-437.
158. Wang Y, Gaba V, Yang J, Palukaitis P, Gal-On A. Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and Potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology*. 2012;92:51-58.
159. Arli-Sokmen M, Mennan MH, Sevik A, Ecevit O. Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*. 2005; 33:347-358.
160. Ali A, Kobayashi M. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. *Journal of Virological Methods*. 2010;163:234-237.
161. Снігур ГО, Будзанівська ІГ, Поліщук ВП. Моніторинг вірусів злакових в агроценозах України. *Мікробіологічний журнал*. 2005; 67(5):88-95.
162. Webb SE, Linda SB. Effect of oil and insecticide on epidemics of potyviruses in watermelon in Florida. *Plant Disease*. 1993;77:869–874.
163. Marco S. Incidence of aphid-transmitted virus infections reduced by whitewash sprays on plants. *Phytopathology*. 1986;76:1344–1348.
164. Brian WJ, Mahy, Marc HV van Regenmortel. *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Academic Press. 2009;632.
165. Gil-Salas FM, Peters J, Boonham N, Cuadrado IM, Janssen D. Co-infection with Cucumber vein yellowing virus and Cucurbit yellow

stunting disorder virus leading to synergism in cucumber. *Plant Pathology*. 2011;61(3)468-478.

166. Smith KM. *Plant Viruses* 6th ed. Chapman and Hall Ltd. London, UK; 1977.

167. Wang, Y, Gaba V, Yang J, Palukaitis P, Gal-On A. Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology*. 2002;92:51–58.

168. Wang Y, Lee KC, Gaba V, Wong SM, Palukaitis P, Gal-On A. Breakage of resistance to Cucumber mosaic virus by co-infection with Zucchini mosaic virus: enhancement of CMV accumulation independent of symptom expression. *Archives of Virology*. 2004;379–396.

169. Cho JD. Ultrastructural aspects of watermelon necrosis disease caused by mixed infection with watermelon mosaic potyvirus and cucumber green mottle mosaic tobamovirus. A thesis for the degree of Master of Science. Seoul National University: Korea; 1998.

170. Толкач ВМ, Чернявская НМ, Гнутова РВ. Вирус мозаики арбуза – новый патоген для дальневосточного региона России поражающий тыкву. *Защита растений*; 2001.3:40.

171. Dixon GR. *Vegetable Crop Disease*. AVI Publishing Co;1981.

172. Trkulja V, Jošić Kovačić D, Mihić Salapura J, Stanković I, Vučurović A, Bulajić A, Krstić B. First Report of Zucchini yellow mosaic virus in Watermelon in Bosnia and Herzegovina. *Plant Dis*. 2014;98(6):858.

173. Simmons HE, Dunham JP, Zinn KE, Munkvold G P, Holmes EC, Stephenson A G. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *Virus Res*. 2013;176(1-2):259-264.

174. Desbiez C, Lecoq H. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathol*. 2007;46:809-829.

175. Simmons H.E. Experimental verification of seed transmission of Zucchini yellow mosaic virus / H.E. Simmons. *Plant Disease*. 2011;95:751-754.
176. Fletcher JD, Wallace AR, Rogers BT. Potyviruses in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): yield and quality effects of ZYMV and WMV 2 virus infections. *N. Z. J. Crop Hort.* 2010;28(1):17-26.
177. Zeng R, Liao Q, Feng J, Li D, Chen J. Synergy between Cucumber Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus on Cucurbitaceae Hosts Tested by Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2007;39(6):431-437.
178. Salvaudon L, De Moraes CM, Mescher MC. Outcomes of co-infection by two potyviruses: implications for the evolution of manipulative. *Proc. Biol. Sci.* 2013;13:280-286.
179. Delmiglio C, Pearson MN. Effects and incidence of Cucumber mosaic virus, Watermelon mosaic virus and Zucchini yellow mosaic virus in New Zealand's only native cucurbit, *Sicyos australis*. *Australas Plant Pathol.* 2012;35:29–35.
180. Spadotti DMA, Wassano DT, Rezende JAM, Camargo LEA, Inoue NAK. Biological and molecular characterization of Brazilian isolates of Zucchini yellow mosaic virus. *Sci. Agric.* 2011;72(2):187-191.
181. Blua MJ, Perring TM. Alatae production and population increase of aphid vectors on virus-infected host plants. *Oecologia.* 1992;92(1):65-70.
182. Gal-On A. A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *Journal of General Virology.* 2013;73:2183-2187.

183. Tóbiás I, Kovács G. Seed transmission of Zucchini Yellow Mosaic Virus – new viral pathogen – on cucurbitaceous plants. *Növényvédelem*. 2001;37:29-31.
184. Rybicki EP, Pietersen G. Plant virus disease problems in the developing world. *Adv Virus Res*. 1999;53:127–175
185. Munkvold GP. Seed pathology progress in academia and industry. *Phytopathol*. 2009;47:285-311.
186. Simmons HE. Experimental verification of seed transmission of Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Disease*. 2011;95:751-754.
187. Fletcher JD, Wallace AR, Rogers BT. Potyviruses in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): yield and quality effects of ZYMV and WMV2 virus infections. *New. J. Crop Hortic. Sci*. 2010;28:17-26.
188. Pachner M, Paris HS, Lelley T. Genes for resistance to zucchini yellow mosaic in tropical pumpkin. *J Hered*. 2011;102(3):330-5.
189. Danin-Poleg Y, Tadmor Yaakov, Tzuri Galil, Reis Noa, Hirschberg Joseph, Katzir Nurit. Construction of a genetic map of melon with molecular markers and horticultural traits, and localization of genes associated with ZYMV resistance. *Euphytica*. 2002;125:373-384.
190. Nováková S, Flores-Ramírez G, Glasa M, Danchenko M, Fiala R, Skultety L. Partially resistant *Cucurbita pepo* showed late onset of the Zucchini yellow mosaic virus infection due to rapid activation of defense mechanisms as compared to susceptible cultivar. *Front Plant Sci*. 2015;6:263.
191. Blua MJ, Perring TM. Effects of zucchini yellow mosaic virus on colonization and feeding behavior of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) *alatae*. *Environ. Entomol* . 1992;2(3):578-585.

192. Lisa V, Boccardo G, D'Agostino G, Dellavalle G, d'Aquilio M. Characterization of a potyvirus that causes Zucchini yellow mosaic. *Phytopathol.* 1981;71:667-672.
193. Romay G, Lecoq H, Geraud-Pouey F, Chirinos DT, Desbiez C. Current status of cucurbit viruses in Venezuela and characterization of Venezuelan isolates of Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology.* 2014;63(1):78-87.
194. Cantliffe DJ, Shaw NL, Stoffella PJ. Current trends in cucurbit production in the U.S. *Acta. Hortic.* 2007;731:473-478.
195. Coutts BA, Jones RAC. Incidence and distribution of viruses infecting cucurbit crops in the Northern Territory and Western Australia. *Crop and Pasture Science.* 2005; 56:847-858.
196. Келдыш МА, Червякова ОН. Особенности мониторинга вирусных инфекций в экосистемах овощных культур. *Гавриш; 2004.* 2:22-24 с.
197. Мельничук МД, Кожухало ВЄ, Смирнова СО, Мартин ГГ. Лабораторний практикум з загальної фітовірусології. К.: НАУ; 2002. 260с.
198. Hill SA. *Methods in plant virology.* Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1984. 167p.
199. Wang M, Gonsalves D. ELISA detection of specific antisera to structural proteins of the virus. *Plant Disease.* 1990;74(2):154-158.
200. Crowther JR. *ELISA. Theory and practice.* NY: Hamana Press; 1995. 223p.
201. Поліщук ВП, Будзанівська ІГ, Шевченко ТП. та ін. Вірусологія. Навчальний посібник для лабораторних занять. К.: ТОВ "Центр поліграфії "КОМПРИНТ"; 2017. 262 с.
202. Міщенко ЛТ, Дуніч АА, Кандаурова КФ, Кондратюк ОА. Насіннева передача вірусів рослин: основи, принципи та методика її визначення. *Карантин і захист рослин; 2018.* 1-2:9-14 с.

203. Albrechtsen SE. Testing methods for seedtransmitted viruses: principles and protocols. CABI Publishing; 2006.268 p.
204. Dijkstra J, Cees PJ. Practical Plant Virology: Protocols And Exercises. Berlin: – Springer. Verlag and Heidelberg GmbH & Co; 1998. 459 p.
205. Birtić S, Kranner I. Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharide- and lipid-rich seeds. *Phytochem Anal.* 2006;17:144-8
206. Matthews REF. Fundamentals of plant virology. San Diego, California: Academic Press. 1992;403 p.
207. Іванська НВ, Кислих ОМ, Максименок ОВ. Практичний посібник з імуноферментного аналізу. К.; 2005. 65 с.
208. Бойко АЛ, редактор. Практикум із загальної вірусології. К.: Київський університет; 2000. 265 с.
209. Гнутова РВ. Иммунологические исследования в фитовирусологии. М.: Наука; 1985. 183 с.
210. Полан Дж, Ван Норден. Введение в иммунохимию: современные методы и проблемы. М. : Мир; 1987. 172 с.
211. Кетти Д, редактор. Антитела. Методы. М.: Мир;1991.2:286.
212. Атабеков ИГ. Практикум по общей вирусологии. М.: Издательство Московского Университета;1998. 192 с.
213. Королев МБ. Электронно-микроскопические методы выявления вирусов. Итоги науки и техники. Вирусология; 1980. 9(178):119–120 с.
214. www.promega.com/protocols/(дата звернення 19 листопада 2018).
215. RNeasyR. Mini Handbook. RNeasyR. Qiagen; 2006. 83 p.

216. Остерман ЛА. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование: [практическое пособие]. М.:Наука; 1981. 288 с.
217. QIAGENR. One step RT-PCR Kit Handbook. Qiagen;2002. 39p
218. Bariana HS, Shannon AL, Chu PW, Waterhouse PM. Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive Multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology*. 1994;84:1201-1205.
219. Barba M, Jelkman W, Martin R. Detection of virus and virus-like diseases of fruit trees and small fruit crops. *Acta Hortic*. 1998;472:759-783.
220. Ahmed AA, Fath-Allah MM. Double infection with Cucumber mosaic virus and Plum pox virus (sharka) in apricot trees. *International journal of virology*. 2012;8(1):50-60.
221. Kim M. Characteristics of Cucumber mosaic virus Infecting Zucchini in Korea. *Plant Pathol. J*. 2010;26(2):139-148.
222. Letschert B, Adam G, Lesemann DE. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *Journal of Virological Methods*. 2002;106:1–10.
223. Jarret RL, Gillaspie AG, Pinnow DL, Barkley NA. The Occurrence and Control Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) in the USDA/ARS Capsicum Germplasm Collection. *Seed Technology*. 2008;30(1) 27–36.
224. Sharifi M, Massumi H, Heydarnejad J, Hosseini Pour A, Shaabani M, Rahimian H. Analysis of the biological and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from Iran. *Virus Genes*. 2008;37(3):304-13.
225. Zohren Moradi. Diagnosis and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from North, East, North-East, and

North-West regions of Iran. *Asian Journal of Plant Pathology*. 2011;5(3):115–125.

226. Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Granier F, Robaglia C, Delaunay T, Lecoq H. Biological and molecular variability of Zucchini yellow mosaic virus in the island of Martinique. *Plant Disease*.1996;80:203–207.

227. Yakoubi S, Desbiez C, Fakhfakh H. Molecular, biological and serological variability of Zucchini yellow mosaic virus in Tunisia. *Plant Pathology*. 2008;57:1146-54.

228. Kamberoglu MA, Caliskan AF, Desbiez C. Current Status of Some Cucurbit Viruses in Cukurova Region (Adana and Mersin Provinces) of Turkey and Molecular Characterization of Zucchini Yellow Mosaic Virus Isolates Romanian Biotechnological Letters. 2016;21(4):11709-11719.

229. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. 1989; 259 p.

230. Maniatis T, Edward F. Sambrook J, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory;1982.

231. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*.1980;16:111–120.

232. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013 Dec;30(12):2725-9.

233. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673–4680.

234. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947–2948.
235. Huelsenbeck JP, Rannala B. Maximum likelihood estimation of phylogeny using stratigraphic data. *Paleobiology*. 1997;23(2):174-180.
236. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987;4:406-425.
237. Liò P, Goldman N. Models of molecular evolution and. *Genome Res*. 1998;8:1233-1244.
238. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39:783-791
239. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*. 2010;26:2462–2463.
240. Martin DP, Rybicki E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*. 2000;16:562–563.
241. Sawyer SA. GENECONV: a computer package for the statistical detection of gene conversion. Distributed by the author. Department of Mathematics. Washington University, St Louis;1999.
242. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995;11:1423–1425.
243. Smith JM. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol*. 1992;34:126–129.
244. Posada D, Crandall KA. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:13757–13762.

245. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*. 2000;16:573–582.
246. Лакин ГФ. Биометрия. М.: Высшая школа; 1980. 293с.
247. Келдыш МА, Червякова ОН. Особенности мониторинга вирусных инфекций в экосистемах овощных культур. *Защита растений. журн.* 2004;34(2):22.
248. Виллемсон СВ, Агур МО. Вирусные болезни овощных культур. *Защита и карантин растений.* 1999;1:40–41.
249. Поликсенова ВД. Особенности распространения, патогенеза и биологии возбудителей томатов. *Вестник БГУ. Беларусь, Минск.* 1996;2:33–36.
250. Гнутова РВ, Толкач ВФ, Чернявская НМ. Штаммовое разнообразие вирусов, поражающих овощные культуры семейств *Curbitaceae* и *Solanaceae*. *Бюл. Гл. Бот. Сада.* 2003;184:189–193.
251. Ахатов АК, Ганнибал ФЮ, Мешков ЮИ, Джалилов ФС, Чижов ВН, Игнатов АН, Полищук ВП, Шевченко ТП, Борисов БА, Стройков ЮМ, Белошапкина ОО. *Болезни и вредители овощных культур и картофеля.* М.: Товарищество научных зданий КМК; 2013. 463 с.
252. Бойко АЛ, Поліщук ВП, Руднева ТО, Шевченко ТП. *Вірусні хвороби перцю солодкого в Україні: діагностика та методи боротьби. Методичні рекомендації.* К.: ЦОП «Глобус»; 2012. 20 с.
253. Бойко АЛ, Поліщук ВП, Руднева ТО, Шевченко ТП. *Вірусні хвороби томатів в Україні: діагностика та методи боротьби. Методичні рекомендації.* К.: ЦОП «Глобус»; 2012. 24с.
254. Boltovets PM, Snopok VA, Boyko VR, Shevchenko TP, Dyachenko NS, Shirshov YuM. Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies. *J Virol Methods.* 2004;121(1):101-106.

255. Chiuoaru M, Hoza G, Manafu D. Preliminary research concerning the identification of resistance genotypes on Cucurbitaceae family in artificial infection conditions with CMV (Cucumber mosaic virus). *Scientific Papers, Series B, Horticulture*. 2012;56:240-244.
256. Московець СМ, Бобир АД, Глушак ЛЮ, Онищенко АМ. Вірусні хвороби сільськогосподарських культур. К.: Урожай; 1975. 152 с.
257. Московець СМ, Фегла ГІ, Глушак ЛЮ. Деякі вірусні захворювання гарбузових культур в південних областях. *Мікробіологічний журнал*. 1970;32(6):735–738.
258. Шамрайчук ВО, Цвигун ВО, Руднева ТА, Бысов АС, Шевченко ТП. Новые вирусные инфекции овощных культур на территории Украины. *Биология наука XXI века: 16 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Собрание тезисов*. К; 2012. 50-51 с.
259. Руднева ТО, Шевченко ТП, Бойко АЛ. Властивості вірусу жовтої мозаїки цукіні, ізольованого з рослин родини Cucurbitaceae *Агроєкологічний журнал. Спеціальний випуск*. 2008;205–207.
260. Руднева ТО, Шевченко ТП, Бисов АС, Поліщук ВП. Поширення вірусних захворювань рослин родини Cucurbitaceae на території України. *Агроєкологічний журнал*. 2008;2:62–66.
261. Tsvygun V, Shamraichuk V, Bysov A, Rudnieva T, Shevchenko T, Polischuk V, Vabishchevich V, Blotskaya Zh. Novel viral pathogens of vegetable crops in ukraine and belarus . *Bulletin of Taras Shevchenko' Kyiv National University. Biology*. 2012;62:54-56.
262. Руднева ТО, Шевченко ТП, Цвигун ВО, Поліщук ВП. Моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської та Полтавської областей. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2013;4(24):55-62.

263. Shamraichuk V, Shevchenko T, Bysov A, AlDalayn Emad, Budzanivska I. Novel Tobatovirus isolated from vegetable crops in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2013;3(65):66–68.
264. Руднева ТО, Шевченко ТП, Цвігун ВО, Будзанівська ІГ, Поліщук ВП. Філогенетична спорідненість українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2014;4(28):15-25.
265. Al Dalain E, Bysov A, Shevchenko O, Shevchenko T, Polischuk V. Several viral diseases of *Lycopersicon esculentum* circulating in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2014;68(3):96-98.
266. Алдалаін Е, Шевченко ТП, Поліщук ВП, Міщенко ЛТ. Ефективність діагностики вірусних хвороб томатів. *Вісник аграрної науки*. 2015;6:29-32.
267. Shevchenko T, Tymchyshyn O, Kosenko I, Budzanivska I, Polischuk V. Potyviruses infecting vegetable crops in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2016;2(72):48-52.
268. Polischuk VP, Shevchenko OV, Budzanivska IG, Shevchenko TP. Abiotic environmental factors: effects on epidemiology of plant virus infections. *Virus Diseases and Crop Biosecurity (NATO Series)*. 2006;121-132.
269. Руднева Т, Шевченко Т, Шевченко О, Будзанівська І. Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка в агроценозах України. *Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер: Біологія*. 2018;2(76):71-79.
270. Руднева ТО, Будзанівська ІГ, Рижкова АЄ, Шевченко ТП, Дем'яненко ФП, Поліщук ВП. Характеристика ізолятів вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка, виділених з різних регіонів

України. Мікробіологічний журнал. 2005;67(6):96-103. PMID16493891 <http://pubget.com/paper/16493891>(Scopus).

271. Rudneva TO, Shevchenko TP, Budzanivska IG, Shevchenko OV, Polischuk VP. Virus diseases of Cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine. *Plant Science*. 2006;43:508-510.

272. Shevchenko T, Rudneva T, Tsvigun V, Shevchenko O, Budzanivska I. Biodiversity of Plant Viruses Endangering Vegetable Crops in Ukraine. The 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity. Kiev, Ukraine; 2018 03-06 July; 2018, 337 p.

273. Shevchenko T. Potyviruses infecting vegetable crops in Ukraine. VIII International conference «Bioresources and viruses». Kyiv, Ukraine; 2016 12-14 of September; 2016, 18-19 p

274. Руднева ТА, Будзанівська ІГ, Шевченко ТП, Поліщук ВП. Новый штамм вируса зеленой крапчатой мозаики огурца на территории Украины. Стратегия и тактика защиты растений. Сборник научных трудов. Выпуск 30, часть 1. М; 2006. 303–306 с.

275. Руднева ТО, Шевченко ТП, Поліщук ВП. Вірусні хвороби овочевих культур закритого ґрунту на території України. Біоресурси та віруси: V Міжнародна конференція. Збірник тез. К; 2007 10-13 вересня; 2007, 189 с.

276. Barker H, McGeachy KD, Ryabov EV, Commandeur U, Mayo MA, Taliansky M. Evidence for RNA-mediated defense effects on the accumulation of Potato leafroll virus. *J. Gen. Virol.* 2001;82: 3099-3106.

277. Mochizuki T, Nobuhara S, Nishimura M, Ryang BS, Naoe M, Matsumoto T, Kosaka Y, Ohki ST. The entry of cucumber mosaic virus into cucumber xylem is facilitated by co-infection with zucchini yellow mosaic virus. *Arch. Virol.* 2016;161(10):2683-2692.

278. Sano Y, Kojima M. Increase in cucumber mosaic virus concentration in Japanese radish plants coinfecting with turnip mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1989;55:296-302.

279. Ishimoto M, Sano Y, Kojima M. Increase in cucumber mosaic virus concentration in Japanese radish plants coinfecting with turnip mosaic virus (11) Electron microscope and immunological observations. *Annual Phytopathological Society. Japan.* 1990;56:63-72.

280. Takeshita M, Takanami Y. Defective Long-distance Transport of Cucumber mosaic virus in Radish Is Efficiently Complemented by Turnip mosaic virus. *Journal of General Plant Pathology.* 2000;66(3):254-257.

281. Rudnieva T, Shevchenko T, Polischuk V. Viruses infecting vegetable crops in Ukraine. Conference: Responses of Plants to Environmental Stresses: Programme and Abstracts. Elena; 2008 May 12–18; 2008, 67–68 p

282. Руднева ТО, Шевченко ТП. Шляхи передачі вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка у тепличних господарствах України. XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Ужгород, Україна; 2009 25-30 травня; 2009, 463 с.

283. Shevchenko TP, Budzanivska IG, Rudnieva TO, AlDalaunEmad, Bysov AS, Polischuk VP. Viruses of vegetable crops Circulating in Ukraine. XIII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського. Ялта, Україна; 2013 1-6 жовтня. 2013, 439 с.

284. Shamraichuk V, Rudnieva T, AlDalaunEmad, Bysov A, Shevchenko T. Distribution of tobamoviruses among plants of Solanaceae family. VII International conference «Bioresources and viruses». Kyiv, Ukraine; 2013 10-13 of September; 2013, 96 p.

285. Фомічов АД, Руднева ТО, Шевченко ТП, Шевченко ОВ, Будзанівська ІГ. Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка у агроценозах України. Мікробіологія в сучасному

сільськогосподарському виробництві. Чернігів; 2018 24-25 жовтня; 2018, 20-23 с.

286. Polischuk VP, Budzanivska IG, Shevchenko TP, Oliynik SV. Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007;59:409-417.

287. Budzanivska IG, Rudneva TO, Shevchenko TP, Boubriak I, Polischuk V P. Investigation of Ukrainian isolates of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV). *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 2007;56:376-380.

288. Shevchenko AV, Budzanivska IG, Shevchenko TP, Polischuk VP, Spaar D. Plant virus infection development as affected by heavy metal stress *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 2004 May;37(2):139-146.

289. Rudneva TO, Shevchenko TP, Budzanivska IG, Shevchenko OV, Polischuk VP. Virus diseases of cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine. 70-th Anniversary of plant protection institute and annual Balkan week of plant health. Book of abstracts. Kostinbrod; 2006 May 28–31; 2006, 14 p.

290. Mishchenko LT, Dunich AA, Danilova OI, Polischuk VP. Properties of Potato virus M and Potato virus Y tomato isolates in Ukraine. *Mikrobiol. Zhurnal.* 2013;75:89–97.

291. Al-Musa AM. Severe mosaic caused by zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Jordan. *Plant Pathol.* 1989;38(4):541-546.

292. Perring TM, Farrar CA, Blua M, Mayberry K. Research reveals pattern of cucurbit virus spread. *Calif. Agric.* 1992;46(2):35-40.

293. Fereres A, Blua MJ, Perring TM. Retention and transmission characteristics of zucchini yellow mosaic virus by *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 1992;85(3):759-765.

294. Schrijnwerkers, C. C. F. M., Huijberts, N. and Bos, L. Zucchini yellow mosaic virus; two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1991; 97(3):187-191.
295. Руднева ТО, Шевченко ТП, Нацевич ВО, Поліщук ВП, Бойко АЛ. Контроль насінневої вірусної інфекції у рослин родини Cucurbitaceae та її профілактики. *Агроекологічний журнал*. 2011;2:85-88.
296. Цвігун ВО, Шамрайчук ВО, Руднева ТО, Шевченко ТП, Бисов АС, Поліщук ВП. Насіннева вірусна інфекція рослин родини Solanaceae. *Агроекологічний журнал*. 2012;3:131-133.
297. Руднева ТО, Шевченко ТП, Цвігун ВО, Шамрайчук ВО, Бисов АС, Поліщук ВП. Віруси перцю солодкого у агроценозах України та насінневому матеріалі. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2012;4(20):29-35.
298. AlDalain E, Bondar OS, Tymchyshyn OV, Shevchenko TP, Budzanivska IG, Polishchuk VP. Phylogenetic analysis of tomato mosaic virus isolated from seeds of *Lycopersicon esculentum*. *Наукові доповіді "НУБІП"*. 2015;(51):1-7. Доступно: http://nd.nubip.edu.ua/2015_2/12e.pdf
299. Альдалаін Е, Бондар ОС, Богуславець О., Шевченко ТП, Поліщук ВП. Вірусна контамінація насіння овочевих культур в Україні. *Карантин і захист рослин*. 2015;224:5-9.
300. Tymchyshyn O, Kosenko Yu, Shevchenko T, Shevchenko O. Phylogenetic analysis of seed-transmitted isolate of Zucchini yellow mosaic virus. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'*. 2017;2(74):46-50.
301. Tymchyshyn O, Kosenko I, Shevchenko T. Biological and molecular characterization of Ukrainian isolates of Zucchini yellow mosaic

virus. VIII International Scientific Agriculture Symposium “AGROSIM 2017”. Jahorina. Bosnia and Herzegovina; 2017 5-8 October; 2017, 742 p.

302. Budzanivska I.G., Shevchenko T.P., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of RNA viruses of plants. *Acta Microbiologica Bulgarica*. 2016. V.32, N.3. P.10-19.

303. Пожилов І, Руднева Т, Шевченко Т, Шевченко О, Цвігун В. Філогенетичний аналіз гена капсидного білка ізолятів вірусу мозаїки томату, що циркулюють в Україні. *Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер: Біологія*. 2019.1(77):71-79.

304. Shevchenko TP, Tymchyshyn OV, AlDalain E, Bysov AS, Budzanivska IG, Shevchenko OV, Polishchuk VP. The first evidence of subgroup IB isolates of Cucumber mosaic virus in Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2015;31(1):57-62.

305. Tsvigun VO, Rudneva TO, Shevchenko TP, Budzanivska IG, Polishchuk VP. Strain attribution of Ukrainian isolates of Zucchini yellow mosaic virus and their occurrence in Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2016;32:3:235-241.

306. Shevchenko TP, Tymchyshyn OV, Kosenko IA, Budzanivska IG, Shevchenko OV, Polishchuk VP. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of Cucumber mosaic virus based on the partial sequences of three genes. *Biopolymers and Cell*. 2018;34(1):32-40.

307. Tymchyshyn O, Shevchenko T, Budzanivska I, Polishchuk V. Viruses Infecting Cucurbits In Ukraine And Their Phylogenetic Analysis. 13th International Plant Virus Epidemiology Symposium. Avignon, France; 2016 6-10 June; 2016, 148 p.

308. Shevchenko T, Tymchyshyn O, Kosenko I, Pichurina T, Shevchenko O, Budzanivska I. Genetic diversity of most harmful viral

pathogens of vegetable crops in Ukraine. XV З'їзд товариства мікробіологів України. Збірник тез; 2017 11-15 вересня; 2017, 305 с.

309. Budzanivska I.G., Shevchenko T.P., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of RNA viruses of plants. *Acta Microbiologica Bulgarica*. 2016. V.32, N.3. P.10-19

310. Shevchenko O, Yasaka R, Tymchyshyn O, Shevchenko T, Ohshima K. First evidence of the occurrence of Turnip mosaic virus in Ukraine and molecular characterization of its isolate. *Journal of Phytopathology*. 2018;166.(6):429-437.

311. Jenner CE, Walsh JA. Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathol*. 1996;45:848–856.

312. Korkmaz S, Tomitaka Y, Onder S, Ohshima K. Occurrence and molecular characterization of Turkish isolates of Turnip mosaic virus. *Plant Pathology*. 2008;57:1155–1162.

313. Farzadfar S, Tomitaka Y, Ikematsu M, Golnaraghi AR, Pourrahim R, Ohshima K. Molecular characterisation of Turnip mosaic virus isolates from Brassicaceae weeds. *Eur J Plant Pathol*. 2009;124:45–55.

314. Korotieieva HV, Polishchuk VP. Viruses of orchids of the natural flora in Ukraine. *Mikrobiol Z*. 2004; 66(2):74-80.

315. Nguyen HD, Tomitaka Y, Ho SYW, Duchene S, Vetten HJ., Lesemann D, Walsh JA, Gibbs AJ, Ohshima K. Turnip Mosaic Potyvirus Probably First Spread to Eurasian Brassica Crops from Wild Orchids about 1000 Years Ago. *PLOS ONE*. 2013;8(I.2):1-13.

316. Gibbs AJ, Ohshima K. Potyviruses in the digital age. *Annu Rev Phytopathol*. 2010;48:205–223.

317. Ohshima K, Tomitaka Y, Wood JT, Minematsu Y, Kajiyama H, Tomimura K, Gibbs AJ. Patterns of recombination in turnip

mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. *Journal of General Virology*. 2007;88:298–315.

318. Takeshita M, Koizumi E, Noguchi M, Sueda K, Shimura H, Ishikawa N, Matsuura H, Ohshima K, Natsuaki T, Kuwata S, Furuya N, Tsuchiya K, Masuta C. Infection dynamics in viral spread and interference under the synergism between Cucumber mosaic virus and Turnip mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact*. 2012;25(1):18-27.

319. Ogawa T, Tomitaka Y, Nakagawa A, Ohshima K. Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Research*. 2008;131:199–212.

320. Tomitaka Y, Ohshima K. A phylogeographic study of the Turnip mosaic virus population in East Asia reveals an ‘emergent’ lineage in Japan. *Molecular Ecology*. 2006;15:4437-4457.

321. Ohshima K, Akaishi S, Kajiyama H, Koga R, Gibbs AJ. Evolutionary trajectory of turnip mosaic virus populations adapting to a new host. *J Gen Virol*. 2010;91:788–801.

322. Yasaka R, Ohba K, Schwinghamer MW, Fletcher J, Ochoa-Corona FM, Thomas JE, Ho SYW, Gibbs AJ, Ohshima K. Phylodynamic evidence of the migration of turnip mosaic potyvirus from Europe to Australia and New Zealand. *Journal of General Virology*. 2015;96:701–713.

323. Adlerz WC. Cucurbit potyvirus transmission by alate aphids (Homoptera: Aphididae) trapped alive. *J. Econ. Entomol*. 1987;80(1): 87-92.

324. Al-Shahwan I M, Abdalla OA, Al-Saleh MA. Response of greenhouse-grown cucumber cultivars to an isolate of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV). *Plant Disease*. 1995;79(9):898-901.

325. Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith T H, Vance VB. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95(22):13079-13084.
326. Baker CA, Hiebert E, Marlow GC, Wisler GC. Comparative sequence analysis of the Reunion isolate of zucchini yellow mosaic virus. *Phytopathology.* 1992;82:1176.
327. Balint R, Plooy I, Steele C. The nucleotide sequence of zucchini yellow mosaic potyvirus. *Abstr. VIII Int. Cong. Virol.* 1990;8: 84-107.
328. Bourdin D, Lecoq H. Increase in cucurbit aphid borne yellows virus concentration by co-infection with sap-transmissible viruses does not increase its aphid transmissibility. *J. Phytopathol.* 1994;141(2):143-452.
329. Chare ER, Holmes EC. Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. *J. Gen. Virol.* 2004;85:. 3149-3157.
330. Francki RIB, Hatta T, Milne RG. *An atlas of plant viruses.* Boca Raton: CRC press; 1985.
331. Granier F, Durand-Tardif M, Casse-Delbart F, Lecoq H, Robaglia C. Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* 1993;74:2737-2742.
332. Harth JE, Simmons HE, Stephenson AG. Vertical infection of Zucchini yellow mosaic virus via pollen transmission occurs at a lower frequency than ovule transmission. *Eur. J. Plant Pathol.* 2017;147(3):717-720.
333. Hellmann GM, Shaw JG, Rhoads RE. In vitro analysis of tobacco vein mottling virus NIa cistron: evidence for a virus-encoded protease. *Virology.* 1988;163(2):554-562.

334. Huet H, Gal-On A, Meir E, Lecoq, Raccah, B. Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* 1994;75:1407-1414.

335. Hughes AL, Hughesm MAK. More Effective Purifying Selection on RNA Viruses than in DNA Viruses. *Gene.* 2007; 404(1-2):117-125.

336. Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J. Mol. Evol.* 2002;54(2):156-65.

337. Будзанівська ІГ, Шевченко ОВ, Міщенко ЛТ, Снігур ГО, Шевченко ТП, Дуніч АА, Руднева ТО, Бисов АС. Свідоцтво №76810 про реєстрацію авторського права на літературний письмовий твір наукового характеру «Філогенетичний аналіз та встановлення механізмів еволюційної адаптації у системі «вірус-рослина» з використанням молекулярно-генетичних та біоінформаційних підходів», Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. 13.02.2018 р.

338. Будзанівська ІГ, Шевченко ОВ, Міщенко ЛТ, Молчанець ОВ, Шевченко ТП, Дуніч АА, Іутинська ОА, Бисов АС. Свідоцтво №76811 про реєстрацію авторського права на літературний письмовий твір наукового характеру «Молекулярне типування шкочинних вірусів комерційно важливих культур і дикорослих рослин та оцінка їх епідемічного потенціалу у різних екологічних умовах», Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. 13.02.2018 р.

339. Green SK, Kim JS. Characteristics and control of viruses infecting peppers: a literature review. *Asian Vegetable Research and Development Center. Technical Bulletin.* 1991;18:60.

340. Yuan C, Ullman DE. Comparison of efficiency and propensity as measures of vector importance in zucchini yellow mosaic potyvirus transmission by *Aphis gossypii* and *A. craccivora*. *Phytopathology*. 1996; 86(7):698-703.
341. Maroon-Lango C J, , Hoy JW, Comstock JC, Grisham MP, Mock R, Hale A, Afghan S, Croft BJ, Cueva F de la, Hoffmann H, Kennedy A, Orozco H, Sauntally S, Victoria J, Viswanathan R. Current knowledge and practices related to seed transmission of sugarcane pathogens and movement of seed. *J. Amer. Soc. Sugar Cane Technol*. 2013; 33:20-29.
342. Choi Gug-Seoun. Occurrence of Two Tobamovirus Diseases in Cucurbits and Control Measures in Korea. *Plant Pathology journal*. 2001; 17(5):243–248.
343. Constable F, Daly A, Terras MA, Penrose L, Dall D. Detection in Australia of Cucumber green mottle mosaic virus in seed lots of cucurbit crops. *Australasian Plant Disease Notes*. 2018;13–18.
344. Kim SM, Nam SH, Lee JM. Destruction of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus by Heat Treatment and Rapid Detection of Virus Inactivation by RT-PCR. *Mol. Cells*. 2003;16(3):338–342.
345. Dombrovsky A, Tran-Nguyen LTT, Jones RAC. Cucumber green mottle mosaic virus: Rapidly Increasing Global Distribution, Etiology, Epidemiology, and Management. *Annual review of phytopathology*. 2017;55(4):231–256.
346. Lecoq H, Desbiez C. *Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin*. London: Academic Press;2012.
347. Ling KS, Zhang RLW. First Report of Cucumber green mottle mosaic virus Infecting Greenhouse Cucumber in Canada. *Disease Notes*. 2014;98(5):701.

348. Глушак ЛЮ. Вирусные заболевания огурцов на Украине. [Автореферат]. Институт микробиологии и вирусологии им. акад. Заболотного Д.К. К;1969. 24 с.
349. Rao ALN, Varma A. Transmission Studies with Cucumber Green Mottle Mosaic Virus. *Journal of Phytopathology*. 2008;109(4):325–331.
350. Reingold V, Lachman O, Blaosov E, Dombrovsky A. Seed disinfection treatments do not sufficiently eliminate the infectivity of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) on cucurbit seeds. *Plant Pathology*. 2015;(64):245–255.
351. Tian T, Posis K, Maroon-Lango CJ, Mavrodieva V, Haymes S, Pitman TL, Falk BW. First Report of Cucumber green mottle mosaic virus on Melon in the United States. *Plant disease*. 2014;98(8):1163.
352. Finetti-Sialer, M. Matilde, Mascia, T., Cillo, F., Vovlas, C., & Gallitelli, D. Biological and molecular characterization of a recombinant isolate of Watermelon mosaic virus associated with a watermelon necrotic disease in Italy. *European journal of plant pathology*. 2012;132:317-322.
353. Desbiez, C., Joannon, B., Wipf-Scheibel, C., Chandeysson, C., and Lecoq H. 2009. Emergence of new strains of Watermelon mosaic virus in South-eastern France: evidence for limited spread but rapid local population shift. *Virus Res*. 2009;141:201-208
354. Guidelines for pest risk analysis, 1996. ISPM Pub. No. 2, FAO, Rome.

ДОДАТОК А

**ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА
ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ***Монографія:*

1. Ахатов А.К., Ганнибал Ф.Ю., Мешков Ю.И., Джалилов Ф.С., Чижов В.Н., Игнатов А.Н., Полищук В.П., **Шевченко Т.П.**, Борисов Б.А., Стройков Ю.М., Белошапкина О.О. Болезни и вредители овощных культур и картофеля. М.:Товарищество научных зданий КМК. 2013. 463 с.

Посібники

1. Бойко А.Л., Полищук В.П., Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.** Вірусні хвороби перцю солодкого в Україні: діагностика та методи боротьби. *Методичні рекомендації*. К.:ЦОП «Глобус». 2012. 20.

2. Бойко А.Л., Полищук В.П., Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.** Вірусні хвороби томатів в Україні: діагностика та методи боротьби. *Методичні рекомендації*. К.:ЦОП«Глобус». 2012. 24с.

Авторські свідоцтва

1. Будзанівська І.Г., Шевченко О.В., Міщенко Л.Т., Снігур Г.О., **Шевченко Т.П.**, Дуніч А.А., Руднева Т.О., Бисов А.С. Свідоцтво №76810 про реєстрацію авторського права на літературний письмовий твір наукового характеру «Філогенетичний аналіз та встановлення механізмів еволюційної адаптації у системі «вірус-рослина» з використанням молекулярно-генетичних та біоінформаційних підходів», Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. 13.02.2018 р. (Заявка №77482 від 20.12.2017 р., Київський національний університет імені Тараса Шевченка).

2. Будзанівська І.Г., Шевченко О.В., Міщенко Л.Т., Молчанець О.В., **Шевченко Т.П.**, Дуніч А.А., Іутинська О.А., Бисов А.С. Свідоцтво №76811 про реєстрацію авторського права на літературний письмовий твір наукового характеру «Молекулярне типування шкочочинних вірусів комерційно важливих культур і дикорослих рослин та оцінка їх епідемічного потенціалу у різних екологічних умовах», Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. 13.02.2018 р. (Заявка №77483 від 20.12.2017 р., Київський національний університет імені Тараса Шевченка).

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, А.Л. Бойко. Властивості вірусу жовтої мозаїки цукіні, ізольованого з рослин родини Cucurbitaceae *Агроєкологічний журнал*. 2008. Спеціальний випуск. С. 205–207.

2. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Бисов А.С., Поліщук В.П. Поширення вірусних захворювань рослин родини Cucurbitaceae на території України. *Агроєкологічний журнал*. 2008. № 2. С.62–66.

3. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Нацевич В.О., Поліщук В.П., Бойко А.Л. Контроль насінневої вірусної інфекції у рослин родини Cucurbitaceae та її профілактики. *Агроєкологічний журнал*. 2011. №2. С. 85-88.

4. Цвігун В.О., Шамрайчук В.О., Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Бисов А.С., Поліщук В.П. Насіннева вірусна інфекція рослин родини Solanaceae. *Агроєкологічний журнал*. 2012. №3. С. 131-133.

5. Руднева Т.О., **Шевченко Т.П.**, Цвігун В.О., Шамрайчук В.О., Бисов А.С., Поліщук В.П. Віруси перцю солодкого у агроценозах України та насіннеСМVу матеріалі . *Мікробіологія і біотехнологія*. 2012. №4 (20). С.29-35.

6. Tsvygun V., Shamraichuk V., Bysov A., Rudnieva T., **Shevchenko T.**, Polischuk V. Vabishchevich V., Blotskaya Zh.. Novel viral

pathogens of vegetable crops in ukraine and belarus . *Bulletin of Taras Shevchenko' Kyiv National University. Biology.* 2012. №. 62. P. 54-56.

7. Руднєва Т.О., **Шевченко Т.П.**, Цвігун В.О., Поліщук В.П. Моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської та Полтавської областей. *Мікробіологія і біотехнологія.* 2013. №4 (24). С.55-62.

8. Shamraichuk V., **Shevchenko T.**, Bysov A., AlDalayn Emad, Budzanivska I. Novel Tobamovirus isolated from vegetable crops in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'.* 2013. V.3 (65). P. 66 – 68.

9. Руднєва Т. О., **Шевченко Т. П.**, Цвігун В. О., Будзанівська І. Г., Поліщук В. П. Філогенетична спорідненість українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2. *Мікробіологія і біотехнологія.* 2014. №4 (28). С.15-25.

10. Al Dalain E., Bysov A., Shevchenko O., **Shevchenko T.**, Polischuk V. Several viral diseases of *Lycopersicon esculentum* circulating in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'.* 2014. V.68(3). P.96-98.

11. Алдалаін Е., **Шевченко Т.П.**, Поліщук В.П., Міщенко Л.Т. Ефективність діагностики вірусних хвороб томатів. *Вісник аграрної науки.* 2015. №6. С.29-32.

12. AlDalain E., Bondar O.S., Tymchyshyn O.V., **Shevchenko T.P.**, Budzanivska I.G., Polishchuk V.P. Phylogenetic analysis of tomato mosaic virus isolated from seeds of *Lycopersicon esculentum*. *Наукові доповіді "НУБІП"* [http://nd.nubip.edu.ua/2015_2/12e.pdf]. 2015. Т.2(51). С.1-7.

13. Альдалаін Е., Бондар О.С., Богуславець О.О., **Шевченко Т.П.**, Поліщук В.П. Вірусна контамінація насіння овочевих культур в Україні . *Карантин і захист рослин .* 2015. Т.224. С.5-9.

14. **Shevchenko T.**, Tymchyshyn O., Kosenko I., Budzanivska I., Polischuk V. Potyviruses infecting vegetable crops in Ukraine . *Bulletin of*

Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'. 2016. V.2 (72). P.48-52.

15. Tymchyshyn O., Kosenko Yu., **Shevchenko T.**, Shevchenko O. Phylogenetic analysis of seed-transmitted isolate of Zucchini yellow mosaic virus. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series 'Biology'. 2017. V.2(74). P.46-50.*

16. Руднева Т., **Шевченко Т.**, Шевченко О., Будзанівська І. Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка в агроценозах України. *Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер: Біологія. 2018. 2 (76):71-79.*

17. Пожилов І., Руднева Т., **Шевченко Т.**, Шевченко О., Цвігун В. Філогенетичний аналіз гена капсидного білка ізолятів вірусу мозаїки томату, що циркулюють в Україні. *Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер: Біологія. 2019. 1 (77):71-79.*

Статті у наукових фахових виданнях України,

які входять до міжнародних наукометричних баз даних:

1. Руднева Т.О., Будзанівська І.Г., Рижкова А.Є., Шевченко Т.П., Дем'яненко Ф.П., Поліщук В.П. Характеристика ізолятів вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка, виділених з різних регіонів України. *Мікробіологічний журнал. 2005.Т.67. №6.с.96-103. PMID16493891 <http://pubget.com/paper / 16493891>(Scopus).*

2. **Shevchenko T.P.**, Tymchyshyn O.V., AlDalain E., Bysov A.S., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. The first evidence of subgroup IB isolates of Cucumber mosaic virus in Ukraine. *Biopolymers and Cell. 2015. V.31, N.1. P.57-62. (Scopus)*

3. Tsvigun V.O., Rudneva T.O., **Shevchenko T.P.**, Budzanivska I.G., Polishchuk V.P. Strain attribution of Ukrainian isolates of Zucchini yellow mosaic virus and their occurrence in Ukraine. *Biopolymers and Cell. 2016. V.32. N.3. P.235-241. (Scopus)*

4. **Shevchenko T.P.**, Tymchyshyn O.V., Kosenko I.A., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of Cucumber mosaic virus based on the partial sequences of three genes. *Biopolymers and Cell*. 2018. V.34(1). P.32-40 (Scopus).

Статті в іноземних виданнях:

1. Boltovets P. M., Snopok B. A., Boyko V. R., **Shevchenko T.P.**, Dyachenko N. S., Shirshov Yu. M. Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies. *J Virol Methods*. 121(1):101-6 (2004) PMID 15350739. <http://pubget.com/paper/15350739> (Scopus)

2. Shevchenko, A.V., Budzanivska, I.G., **Shevchenko, T.P.**, Polishchuk, V.P., Spaar, D. Plant virus infection development as affected by heavy metal stress *Archives of Phytopathology and Plant Protection* Volume 37, Issue 2, May 2004. P.139-146 (Scopus)

3. Rudneva T.O., Shevchenko T.P., Budzanivska I.G., Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Virus diseases of Cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine. *Plant Science*. 2006, N43 – p.508-510

4. Budzanivska I. G., Rudneva T. O., **Shevchenko T.P.**, Boubriak I., Polishchuk V. P. Investigation of Ukrainian isolates of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2007. №56. P.376-380. (Scopus)

5. Polishchuk V.P., Budzanivska I.G., **Shevchenko, T.**, Oliynik S.V. Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007. V.59. pp.409-417. (Scopus)

6. Budzanivska I.G., **Shevchenko T.P.**, Shevchenko O.V., Polishchuk V.P. Phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of RNA viruses of plants. *Acta Microbiologica Bulgarica*. 2016. V.32, N.3. P.10-19.

7. Shevchenko O., Tymchyshyn O., **Shevchenko T.** Traditional cultivation practices may efficiently prevent the virus spread in susceptible crops: a case study of Turnip mosaic virus in Ukraine . *AGROFOR International Journal*. 2017. V.2, N3. P.84-91.

8. Shevchenko O., Yasaka R., Tymchyshyn O., **Shevchenko T.**, Ohshima K. First evidence of the occurrence of Turnip mosaic virus in Ukraine and molecular characterization of its isolate. *Journal of Phytopathology*. 2018. V.166.N6. P 429-437(Scopus)

Статті в інших виданнях:

1. Polischuk V.P., Shevchenko O.V., Budzanivska I.G., **Shevchenko T.P.** Abiotic environmental factors: effects on epidemiology of plant virus infections.. *Virus Diseases and Crop Biosecurity (NATO Series)*. pp.121-132. In: Cooper J.I. et al –Springer, 2006.

Тези наукових доповідей:

1. Руднева ТА, Будзанівська ІГ, Шевченко ТП, Полищук ВП. Новый штамм вируса зеленой крапчатой мозаики огурца на территории Украины. Стратегия и тактика защиты растений. Сборник научных трудов. Выпуск 30, часть 1. М; 2006. 303–306 с.

2. Rudneva TO, Shevchenko TP, Budzanivska IG, Shevchenko OV, Polischuk VP. Virus diseases of cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine . 70-th Anniversary of plant protection institute and annual Balkan week of plant health. Book of abstracts. Kostinbrod; 2006 May 28–31. 14 p.

3. Руднева ТО, Шевченко ТП, Полищук ВП. Вірусні хвороби овочевих культур закритого ґрунту на території України. Біоресурси та віруси: V Міжнародна конференція. Збірник тез. К; 2007 10-13 вересня. 189 с.

4. Rudnieva T, Shevchenko T, Polischuk V. Viruses infecting vegetable crops in Ukraine. Conference: Responses of Plants to Environmental Stresses: Programme and Abstracts. Elena; 2008 May 12–18. 67–68 p.

5. Руднєва ТО, Шевченко ТП. Шляхи передачі вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка у тепличних господарствах України. XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, Ужгород, Україна; 2009 25-30 травня. 463 с.

6. Шамрайчук ВО, Цвигун ВО, Руднева ТА, Бысов АС, Шевченко ТП. Новые вирусные инфекции овощных культур на территории Украины. Биология наука XXI века: 16 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Собрание тезисов. К; 2012. 50-51 с.

7. Shevchenko TP, Budzanivska IG, Rudnieva TO, AlDalaynEmad, Bysov AS, Polischuk VP. Viruses of vegetablecrops Circulating in Ukraine. XIII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського. Ялта, Україна; 2013 1-6 жовтня. 439 с.

8. Shamraichuk V, Rudnieva T, AlDalaynEmad, Bysov A, Shevchenko T. Distribution of tobamoviruses among plants of Solanaceae family. VII International conference «Bioresources and viruses». Kyiv, Ukraine; 2013 10-13 of September. 96 p.

9. Shevchenko T. Potyviruses infecting vegetable crops in Ukraine. VIII International conference «Bioresources and viruses». Kyiv, Ukraine; 2016 12-14 of September. 18-19 p.

10. Tymchyshyn O, Shevchenko T, Budzanivska I, Polishchuk V. Viruses Infecting Cucurbits In Ukraine And Their Phylogenetic Analysis. 13th International Plant Virus Epidemiology Symposium. Avignon, France; 2016 6-10 June. 148 p.

11. Shevchenko T, Tymchyshyn O, Kosenko I, Pichurina T, Shevchenko O, Budzanivska I. Genetic diversity of most harmful viral pathogens of vegetable crops in Ukraine. XV З'їзд товариства мікробіологів України. Збірник тез; 2017 11-15 вересня. 305 с.

12. Tymchyshyn O, Kosenko I, Shevchenko T. Biological and molecular chracterization of Ukrainian isolates of Zucchini yellow mosaic virus. VIII International Scientific Agriculture Symposium “AGROSYM 2017”. Jahorina. Bosnia and Herzegovina; 2017 5-8 October. 742 p.

13. Shevchenko T, Rudneva T, Tsvigun V, Shevchenko O, Budzanivska I. Biodiversity of Plant Viruses Endangering Vegetable Crops in Ukraine. The 4th International Symposium on EuroAsian Biodiversity. Kiev, Ukraine; 2018 03-06 July. 337 p.

14. Фомічов АД, Руднева ТО, Шевченко ТП, Шевченко ОВ, Будзанівська ІГ. Вірус зеленої крапчастої мозаки огірка у агроценозах України. Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві. Чернігів; 2018 24-25 жовтня; 2018. 20-23 с.



Додаток 4

Проректор з наукової роботи
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

В.С. Мартинюк

1 грудня 2016 р.

АКТ

впровадження результатів виконаної науково-дослідної роботи
у навчальний процес

По НДР № 16БФ036-02 «Молекулярне типкування та механізми еволюційної адаптації вірусів культурної і дикорослої флори України», I-й етап «Молекулярне типкування шкочинних вірусів комерційно важливих культур і дикорослих рослин та оцінка їх епідемічного потенціалу у різних екологічних умовах»
(назва теми, етапу)

виконаної в період з 01.03.2016 р. по 31.12.2016 р.

по Комплексній науковій програмі Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Біологічні, біомедичні та біоекологічні проблеми життєдіяльності людини»
(назва програми)

розроблено

Відібрані ізоляти шкочинних вірусів культурних та дикорослих рослин, описані симптоми інфекції на різних рослинах. Вивчені біологічні, морфологічні та біохімічні властивості таких ізолятів. Визначені «маркерні» послідовності геномів ізолятів окремих вірусів, підібрані оптимальні олігонуклеотидні проби та отримані бібліотеки кДНК визначених субгеномних та геномних послідовностей вірусів. Проведено біоінформаційний аналіз отриманих сиквенсів маркерних ділянок вірусних геномів та молекулярне типкування ізолятів вірусів рослин, виділених в природних та штучних екосистемах України. Оцінено епідемічний потенціал більшості отриманих ізолятів, в тому числі вірусів дикорослої флори та з антропогенно трансформованих регіонів. Вперше доведено значну роль штучних екосистем в епідеміології вірусів рослин, де супутні культурні та дикорослі рослини є резервуарами для збереження популяції вірусів і підвищують їх епідемічний потенціал в Україні, який корелює не тільки з біотичними факторами, але й з антропогенними.

Комісія в складі:

Голова комісії:

Директор ННЦ «Інститут біології та медицини», д.б.н., проф. Остапченко Л.І.
(голова Вченої ради факультету/інституту, ПІБ)

Члени комісії:

Зав. кафедри мікробіології та загальної імунології, д.б.н. Сківка Л.М.
(завідуючі кафедрами, ПІБ)

Зав. кафедри загальної та молекулярної генетики, д.б.н., проф. Демидов С.В.

Зав. кафедри фізіології людини та тварин, д.б.н., проф. Макарчук М.Ю.

В.о. зав. кафедри біофізики, д.б.н., проф. Жолос О.В.

Зав. кафедри цитології та гістології, д.б.н., проф. Дзержинський М.Е.

встановила впровадження в навчальний процес наступних результатів досліджень та місце їх використання:

(назва курсу (спекурсу), лабораторних робіт, семінарських занять, число годин тощо)

- Лекційний курс «Віруси архей, мікоплазм та ціанобактерій» - 16 год., практичні - 16 год, для магістрів 2 р.н. (доц., к.б.н. Шевченко Т.П.);
- Лекційний курс «Віруси мікроскопічних еукаріотів» - 16 год., практичні - 16 год, для магістрів 2 р.н. (доц., к.б.н. Шевченко Т.П.);
- Лекційний курс «Філософські аспекти у вірусології» - 16 год., практичні - 32 год, для магістрів 2 р.н. (проф., д.б.н. Поліщук В.П.);
- Лекційний курс «Ендогенні віруси» - 16 год., практичні - 32 год, для магістрів 2 р.н. (проф., д.б.н. Поліщук В.П.);
- Лекційний курс «Противірусні вакцини» - 16 год., практичні - 32 год, для магістрів 2 р.н. (доц., к.б.н. Харіна А.В.);
- Лекційний курс «Морфологія та морфогенез вірусів» - 16 год., практичні - 32 год, для магістрів 2 р.н. (доц., к.б.н. Компанець Т.А.);
- Лекційний курс «Емерджентні вірусні інфекції» - 16 год., практичні - 32 год, для магістрів 2 р.н. (доц., к.б.н. Коротеєва Г.В.);
- Лекція «Біобезпека та стан здоров'я нації» - 2 год, до спецкурсу «Віруси і біобезпека», для магістрів 1 р.н. (доц., к.б.н. Андрійчук О.М.).

“12” грудня 2016 р.

Голова комісії:		<u>Л.І. Остапченко</u>
	(підпис)	(прізвище)
Члени комісії:		<u>Л.М. Сківка</u>
	(підпис)	(прізвище)
		<u>С.В. Демидов</u>
	(підпис)	(прізвище)
		<u>М.Ю. Макарчук</u>
	(підпис)	(прізвище)
		<u>О.В. Жолос</u>
	(підпис)	(прізвище)
		<u>М.Е. Дзержинський</u>
	(підпис)	(прізвище)

Додаток 4



Проректор з наукової роботи
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

В.С. Мартинюк

Грудня 2018 р.

АКТ

впровадження результатів виконаної науково-дослідної роботи
у навчальний процес

По НДР № 16БФ036-02 «Молекулярне типкування та механізми еволюційної адаптації вірусів культурної і дикорослої флори України», III-й етап «Створення об'єктно орієнтованого інформаційного банку генетичних послідовностей вірусів рослин України та вдосконалення тест-систем для їх молекулярної діагностики»

виконаної в період з 01.01.2018 р. по 31.12.2018 р.

по Комплексній науковій програмі Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Біологічні, біомедичні та біоекологічні проблеми життєдіяльності людини»

Відібрані ізоляти високошкодочинних вірусів культурних рослин та дикорослої флори України, вивчено їх біологічні, структурно-морфологічні та біохімічні властивості. Визначені «маркерні» послідовності геномів та створено бібліотеки кДНК виділених вірусів. Секвеновано та проведено біоінформаційний аналіз часткових та повних генетичних послідовностей вірусів. Проведено філогенетичний аналіз отриманих ампліконів та їх порівняння з відомими генетичними послідовностями. Встановлено напрями та біологічно значущі механізми мікроеволюційної адаптації українських ізолятів вірусів рослин. Оцінено епідемічний потенціал українських ізолятів вірусів рослин та вивчено його кореляцію з біотичними та абіотичними факторами. Розроблено і вдосконалено існуючі тест-системи для молекулярної діагностики окремих вірусів рослин. Створено унікальний об'єктно орієнтований інформаційний банк генетичних послідовностей вірусів рослин України.

Комісія в складі:

Голова комісії:

Директор ННЦ «Інститут біології та медицини», д.б.н., проф. Остапченко Л.І.

(голова Вченої ради факультету/інституту, ПІБ)

Члени комісії:

Зав. кафедри мікробіології та імунології, д.б.н.

(позначити кафедрами, ПІБ)


Сківка Л.М.


Зав. кафедри загальної та медичної генетики, д.б.н., проф. Демидов С.В.
Зав. кафедри фізіології та анатомії, д.б.н., проф. Макарчук М.Ю.
Зав. кафедри біофізики та медичної інформатики, д.б.н., проф. Жолос О.В.
Зав. кафедри цитології, гістології та репродуктивної медицини, д.б.н., проф. Держинський М.Е.

встановила впровадження в навчальний процес наступних результатів досліджень та місце їх використання:


1. Практичні заняття «Віруси і біобезпека», 14 год, Магістри 2 р.н. (доц., к.б.н. Андрійчук О.М.)
2. Лекційний курс «Екологічна біотехнологія», 12 год, 4 курс, бакалаври (доц., к.б.н. Харіна А.В.)
3. Лекційний курс «Основи організації сучасної біотехнологічної лабораторії», 28 год, лабораторні – 88 год, 3 курс, бакалаври (доц., к.б.н. Андрійчук О.М.)
4. Лабораторні заняття «Методи сучасних біологічних досліджень», 78 год, Магістри 1 р.н. (доц., к.б.н. Шевченко Т.П.)
5. Лекційний курс «Епідеміологія» - 28 год, лабораторні – 14 год, 3 курс, бакалаври (доц., к.б.н. Андрійчук О.М.)
6. Лекційний курс «Принципи біологічної безпеки у вірусологічній лабораторії» - 30 год, 4 курс, бакалаври (доц., к.б.н. Андрійчук О.М.)
7. Лекційний курс «Механізми персистенції вірусів» - 26 год, практичні – 12 год, Магістри 2 р.н. (доц., к.б.н. Молчанець О.В.)


“___” грудня 2018 р.


Голова комісії:  Л.І. Остапченко
 (підпис) (прізвище)

Члени комісії:  Л.М. Сківка
 (підпис) (прізвище)

 С.В. Демидов
 (підпис) (прізвище)

 М.Ю. Макарчук
 (підпис) (прізвище)

 О.В. Жолос
 (підпис) (прізвище)

 М.Е. Держинський
 (підпис) (прізвище)