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

СОВІНСЬКА РОКСОЛАНА СТЕФАНІВНА

УДК 582.579.2: 578.864.3+578.856.1

ДИСЕРТАЦІЯ

БІОЛОГІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ ВЛАСТИВОСТІ ВІРУСІВ, ЩО УРАЖАЮТЬ РОСЛИНИ *GLADIOLUS HYBRIDUS*

Спеціальність – 091 «Біологія»
Галузь знань – 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біології

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____Совінська Р. С.
Науковий керівник: Міщенко Лідія Трохимівна, доктор біологічних наук, професор.

Київ – 2022

АНОТАЦІЯ

Совінська Р. С. **Біологічні та молекулярні властивості вірусів, що уражають рослини *Gladiolus hybridus*** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії (кандидат біологічних наук) за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія) – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України, – Київ, 2022.

Дисертаційна робота присвячена виявленню та дослідженню вірусів, що інфікують гладіолуси на території України. Встановлене поширення вірусів огіркової мозаїки та жовтої мозаїки квасолі на рослинах гладіолусів у різних областях України, досліджені біологічні та молекулярні властивості виявлених ізолятів, проведено філогенетичний аналіз їх послідовностей та встановлено штамову приналежність гладіолусних вірусних ізолятів.

Гладіолуси (*Gladiolus hybridus*) належить до цінної квіткової культури родини *Iridaceae* і є популярними насадженнями у приватному секторі, мають естетичну цінність та потенційно цікаві з огляду на розвиток квітникарської галузі в Україні. Актуальність теми кваліфікаційної роботи зумовлена необхідністю дослідити питання наявності та поширеності вірусних інфекцій гладіолусів на території України, оскільки дані рослини хворіють на небезпечні для сільськогосподарських культур вірусні інфекції, а, відтак, моніторинг, профілактика та запобігання розповсюдження хворих бульбоцибулин має неабияке практичне значення.

Відомо 12 видів вірусів, що здатні інфікувати гладіолуси, серед них найбільшої уваги заслуговують вірус огіркової мозаїки (cucumber mosaic virus, CMV) та вірус жовтої мозаїки квасолі (bean yellow mosaic virus, BYMV). Ці патогени поширені на всіх континентах, де вирощуються рослини, мають широке коло рослин-хазяїв, а також значну кількість видів векторів, які

здійснюють розповсюдження вірусів, представляючи потенційну небезпеку не тільки для рослин гладіолусів, а й для сільськогосподарських культур України.

Не зважаючи на циркуляцію CMV та BYMV на деяких сільськогосподарських рослинах в Україні, вивчення поширеності і детальний аналіз вірусу жовтої мозаїки квасолі й вірусу огіркової мозаїки у насадженнях гладіолусів раніше не проводились. Метою дисертаційної роботи було дослідити рослини гладіолусів на ураженість вірусами, їх ідентифікація та вивчення біологічних і молекулярних властивостей виявлених ізолятів.

У ході виконання дисертаційної роботи було здійснено аналіз наявності BYMV і CMV в приватних насадженнях гладіолусів у різних областях України використовуючи візуальні, серологічні та молекулярні методи дослідження та проаналізовано генетичне різноманіття українських гладіолусних ізолятів BYMV і CMV. У дослідженні було використано зразки гладіолусів 26-ти сортів вітчизняної і зарубіжної селекції, які були відібрані в період з 2019-2021 рр. Найбільш поширеним виявленим симптомом вірусної інфекції була штрихувата мозаїка на листках гладіолусів, що спостерігались у всіх досліджуваних областях, а саме - в Київській, Полтавській, Сумській, Львівській, Житомирській, Херсонській областях.

У роботі використані класичні і молекулярні методи дослідження вірусів: візуальна діагностика, метод біологічного тестування, трансмісійна електронна мікроскопія, імуноферментний аналіз в модифікації «подвійний сендвіч» (DAS-ELISA), виділення тотальної РНК, зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР), секвенування за Сенгером, філогенетичний аналіз, статистичні методи обробки даних.

За результатами аналізу встановлена інфекційна природа виявлених симптомів на гладіолусах. Наявність вірусів у зразках гладіолусів була доведена методами DAS-ELISA та ЗТ-ПЛР. Вірус жовтої мозаїки квасолі був виявлений у Київській, Полтавській, Сумській, Львівській, Херсонській областях. В той час як вірус огіркової мозаїки виявлений у Київській, Полтавській, Житомирській, Львівській, Херсонській областях. Вперше в Україні встановлено факт

інфікування двома вірусами BYMV+CMV гладіолусів у Київській, Полтавській, Херсонській областях.

Встановлено сортову специфічність прояву симптомів гладіолусів, а також відібрано сорти (Йелов Ейдж, Наталка Полтавка, Лебедина Зграя, Рожевий Каскад, Фаворит), що є не чутливими до ураження BYMV, CMV і тому можуть представляти потенційний інтерес для селекції та створення нових сортів гладіолусів.

Дослідження морфології вірусних часток показали, що у соці гладіолусів із симптомами штрихуватої мозаїки виявлені ниткоподібні віріони довжиною 720-750 нм та діаметром близько 11-13 нм, що є характерним для BYMV. Інша група віріонів - сферичні, близько 30 нм у діаметрі з електронно щільним центром, що характерно для CMV.

В ході тестування на видах рослин, чутливих до досліджуваних вірусів, підтверджено вузьку специфічність гладіолусних ізолятів BYMV і CMV. Так, гладіолусний ізолят вірусу жовтої мозаїки квасолі в ході механічної інокуляції уразив квасолю (*Phaseolus vulgaris*) сорту Червона Шапочка, сою (*Glycine max*) сорту Грімо. Гладіолусний ізолят вірусу огіркової мозаїки інфікував гарбуз (*Cucurbita maxima*) сорту Берегиня.

Вперше отримано послідовності ділянки гена капсидного білка (*CP*) дев'яти українських гладіолусних ізолятів вірусу огіркової мозаїки розміром 443 нт та восьми ізолятів вірусів жовтої мозаїки квасолі довжиною 578 нт. Послідовності цих ізолятів депоновано до світового Генбанку під номерами: BYMV-Gl-SV-20 (MZ286966), BYMV-Gl-Skv-20 (MZ286967), BYMV-Gl-FHL-20 (MZ286968), BYMV-Gl-LeK-19 (MZ286969), BYMV-Gl-MIW1-20 (MZ286970), BYMV-Gl-MIW2-20 (MZ286971), BYMV-Gl-KP-20 (MZ286972), GlMP-18 (MK416160), CMV-Gl-LeK-19 (MW847707), CMV-Gl-MP-19 (MW847708), CMV-Gl-SV-20 (MW847709), CMV-Gl-Skv-20 (MW847710), CMV-Gl-Lv-20 (MW847711), CMV-Gl-Zt-20 (MW847712), CMV-Gl-SK-20 (MW847713), CMV-Gl-SkvP-20 (MW847714), CMV-Gl-Kh-20 (MW847715).

Вперше в Україні проведено філогенетичний аналіз гладіолусних ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі. Встановлено, що сім ізолятів належать до філогенетичної групи Monocot та мають ідентичність з ізолятами цієї групи 94,8% - 99,4% за нуклеотидною послідовністю (нт) та 95,3% - 100% за амінокислотною (ак) ділянки гена капсидного білка. Ізолят BYMV-Gl-FHL-20 кластеризується зі філогенетичною групою General, маючи ідентичність з її представниками 92,0%-99,6% за нт і 93,2%-100% за ак послідовністю.

Найвищі показники ідентичності за нуклеотидною і амінокислотною послідовностями гена *CP* (100%) мають між собою ізоляти BYMV-Gl-MIW1-20 і BYMV-Gl-MIW2-20, які відібрані на території однієї приватної колекції із двох різних сортів. Варто зауважити, що симптоми на кожному зі сортів різнились, що може свідчити про сортову специфічність симптомів на гладіолусах.

Найвищий відсоток ідентичності (100% за нуклеотидними і амінокислотними послідовностями гена *CP*) виявлено між ізолятами BYMV, виділеними із територіально віддалених областей країни. Це ізоляти BYMV-Gl-LeK-19 (Київська область) і BYMV-Gl-KP-20 (Полтавська область), а також GlMP-18 (Полтавська область) і BYMV-Gl-SV-20 (Сумська область). Отримані дані свідчать про ймовірне поширення гладіолусних ізолятів BYMV посадковим матеріалом.

Вперше в Україні проаналізовано послідовності гена *CP* гладіолусних ізолятів CMV. Встановлено, що сім досліджуваних ізолятів належать до філогенетичної підгрупи IA та мають ідентичність з ізолятами цієї групи 94,8% - 99,4% за нт та 83,0% -100% за ак послідовністю. Ізолят CMV-G1-SkvP-20 відноситься до філогенетичної підгрупи IB, маючи ідентичність з ізолятами цієї підгрупи 95,8% - 100% за нт і 96,0% - 100% за ак послідовністю. Ізолят CMV-Gl-Zt-20, виділений із сорту Пітер пірс у Житомирській області, належить до підгрупи II (ідентичність з ізолятами цієї підгрупи 97,8% - 99,3% за нт і 95,8% - 99,2% за ак послідовністю). Це перше повідомлення про гладіолусний ізолят вірусу огіркової мозаїки, який належить до підгрупи II, а також, перше в Україні повідомлення про циркуляцію у країні CMV, що належить до цієї рідкісної

філогенетичної групи. Таким чином, встановлено, що ізоляти CMV входять до трьох філогенетичних підгруп IA, IB і II, що вказує на значну штамову різноманітність циркулюючих в Україні гладіолусних ізолятів цього вірусу.

Інфікування двома вірусами BYMV+CMV виявлено у трьох сортах гладіолусів Легенди Києва, Пам'ять, Вікторія Сквирська, що було підтверджено DAS-ELISA та ЗТ-ПЛР. Найбільш поширеним симптомом при змішаній інфекції вказаними вірусами на гладіолусах були хлоротична штрихувата мозаїка на листках і «розрив кольору» квітки.

Перелічені вище тези несуть не лише теоретичне, а й мають практичне значення. Так, встановлено сортову специфічність до прояву інфекції, спричиненої CMV і BYMV. Ймовірна толерантність до вірусу жовтої мозаїки квасолі спостерігалась на гладіолусах сортів Прісцилла і Міс Грін, які не проявляли візуальних ознак інфікування, хоч, за даними імуноферментного аналізу, у зразках виявлені антигени BYMV. Гладіолуси сортів Йелов Ейдж, Наталка Полтавка, Лебедина Зграя, Рожевий Каскад, Фаворит в ході дослідження проявили нечутливість до інфікування BYMV, CMV в природніх умовах, таким чином, дані сорти можуть бути рекомендовані як джерела стійкості до досліджуваних вірусів при створенні нових сортів.

Підтверджено, що в ході вегетативного розмноження гладіолусів відбувається передача вірусної інфекції від материнської рослини, що слугує фактором поширення вірусів на нові території через збут та вирощування неперевіреної та несертифікованої продукції бульбоцибулин гладіолусів. Встановлено векторну передачу попелицями вірусу огіркової мозаїки на гладіолуси з овочевих або інших культур, що зростали в одному агроценозі. Таким чином, продемонстровано можливі шляхи інфікування гладіолусів досліджуваними вірусами та їх потенційну роль як рослин-резерваторів вірусної інфекції в агроценозах.

Ключові слова: гладіолус, вірус жовтої мозаїки квасолі, вірус огіркової мозаїки, імуноферментний аналіз, полімеразно ланцюгова реакція, сиквенування, філогенетичний аналіз

SUMMARY

R.S. Sovinska **Biological and molecular properties of viruses affecting *Gladiolus hybridus* plants -** Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy (Candidate of Biological Sciences) in the specialty 091 "Biology" (09 - Biology) - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine - Kyiv, 2022.

The dissertation is devoted to the detection and study of viruses that infect gladiolus in Ukraine. The spread of cucumber mosaic and bean yellow mosaic viruses on gladiolus plants in different regions of Ukraine was established, biological and molecular properties of detected isolates were studied, phylogenetic analysis of their sequences was performed and strain affiliation of gladiolus viral isolates was established.

Gladiolus (*Gladiolus hybridus*) belongs to the valuable flower culture of the *Iridaceae* family, is popular in private plantings, has aesthetic value and is potentially interesting given the development of the flower industry in Ukraine. Topicality of the qualification work lays in the need to investigate the presence and prevalence of gladioli viral infections in Ukraine, as these plants suffer from viral infections dangerous to agricultural plants, thus, monitoring, prophylaxis and prevention of spread of infected corms is of great practical importance.

There are 12 viruses known to infect gladioli, the most notable of which are cucumber mosaic virus and bean yellow mosaic virus. These pathogens are common on all continents where plants are grown, have a wide range of host plants, as well as a large number of species of vectors that spread viruses, posing a potential threat not only for gladiolus plants, but also for other crops in Ukraine.

Despite the circulation of CMV and BYMV on some agricultural plants in Ukraine, the study of the prevalence and detailed analysis of bean yellow mosaic virus and cucumber mosaic virus in gladiolus plantings in Ukraine has not been conducted before. The aim of the dissertation was to study gladiolus for virus infection, their

identification and the study of biological and molecular properties of the identified isolates.

In the course of work on the dissertation the analysis of BYMV and CMV presence in private gladiolus plantings in different regions of Ukraine was performed using visual, serological and molecular research methods and the genetic diversity of Ukrainian gladiolus isolates of BYMV and CMV was analyzed. Samples of 21 varieties of gladiolus of domestic and foreign selection, which were collected in the period from 2019 to 2021 were used in the study. The most common symptom of viral infection was streaked mosaic on gladiolus leaves, which was observed in all studied regions, namely - in Kyiv, Poltava, Sumy, Lviv, Zhytomyr, Kherson regions.

Classical virological and molecular methods were used in the study: visual diagnostics, biological testing method, transmission electron microscopy, double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), total RNA extraction, reverse transcription polymerase chain reaction, Sanger sequencing, phylogenetic analysis, statistical methods of data processing.

According to the results of the analysis, the infectious nature of the detected symptoms on gladioli was established. The presence of viruses in gladiolus samples was proved by DAS-ELISA and RT-PCR. Bean yellow mosaic virus was detected in Kyiv, Poltava, Sumy, Lviv, Kherson regions, while cucumber mosaic virus was detected in Kyiv, Poltava, Zhytomyr, Lviv, Kherson regions. For the first time in Ukraine, the fact of infection of gladiolus with both BYMV + CMV was established in Kyiv, Poltava and Kherson regions.

Varietal peculiarities of gladiolus symptom manifestations have been established, and varieties (Yellow Age, Natalka Poltavka, Lebedina Zgraya, Rozheviy Kaskad, Favorit) that are insensitive to BYMV, CMV and therefore may be of potential interest for selection and creation of new gladiolus varieties have been selected.

The study of the morphology of viral particles in the juice of gladioli with symptoms of streaked mosaic revealed filamentous virions 720-750 nm long and about 11-13 nm in diameter, which is characteristic of BYMV. Another group of viral

particles icosahedral, about 30 nm in diameter with an electronically dense center, which is characteristic of CMV.

The narrow specificity of BYMV and CMV gladiolus isolates was confirmed during testing on plant species sensitive to the studied viruses. Thus, gladiolus isolate of bean yellow mosaic virus after mechanical inoculation infected beans (*Phaseolus vulgaris*) of the Chervona Shapochka variety, soybean (*Glycine max*) of the Grimo variety. Gladiolus isolate of cucumber mosaic virus infected pumpkin (*Cucurbita māxima*) of Berehynia variety.

For the first time, the sequences of the capsid protein (CP) gene region of nine Ukrainian gladiolus isolates of cucumber mosaic virus with a size of 443 nt and eight isolates of bean yellow mosaic virus with a size of 578 nt were obtained. The sequences of these isolates were submitted to the world GenBank: BYMV-Gl-SV-20 (MZ286966), BYMV-Gl-Skv-20 (MZ286967), BYMV-Gl-FHL-20 (MZ286968), BYMV-Gl-LeK-19 (MZ286969), BYMV-Gl-MIW1-20 (MZ286970), BYMV-Gl-MIW2-20 (MZ286971), BYMV-Gl-KP-20 (MZ286972), GlMP-18 (MK416160), CMV-Gl-LeK-19 MW847707), CMV-Gl-MP-19 (MW847708), CMV-Gl-SV-20 (MW847709), CMV-Gl-Skv-20 (MW847710), CMV-Gl-Lv-20 (MW847711), CMV-Gl -Zt-20 (MW847712), CMV-Gl-SK-20 (MW847713), CMV-Gl-SkvP-20 (MW847714), CMV-Gl-Kh-20 (MW847715).

For the first time in Ukraine, phylogenetic analysis of gladiolus isolates of bean yellow mosaic virus was performed. Seven isolates were found to belong to the phylogenetic group Monocot and have a capsid protein gene region identity with isolates of this group of 94.8%-99.4% by nucleotide sequence (nt) and 95.3%-100% by amino acid (aa). The BYMV-Gl-FHL-20 isolate is clustered with the General phylogenetic group, having an identity with its representatives of 92.0%-99.6% by nt and 93.2%-100% by aa sequence.

The isolates of BYMV-Gl-MIW1-20 and BYMV-Gl-MIW2-20, which were selected in one private collection from two different varieties, have the highest indicators of identity by nucleotide and amino acid sequences (100%). It should be

noted that the symptoms on each of the varieties were different, which may indicate the varietal specificity of the symptoms on gladioli.

The highest percentage of identity (100% by nucleotide and amino acid sequences of the *CP* gene) was found between BYMV isolates isolated from geographically remote regions of the country. These are isolates BYMV-Gl-LeK-19 (Kyiv region) and BYMV-Gl-KP-20 (Poltava region), as well as GlMP-18 (Poltava region) and BYMV-Gl-SV-20 (Sumy region). The obtained data indicate the probable spread of gladiolus isolates of BYMV with planting material.

For the first time in Ukraine, the CP gene sequences of gladiolus CMV isolates were analyzed. Seven of the studied isolates were found to belong to the phylogenetic subgroup IA and have an identity with the isolates of this group of 94.8% - 99.4% by nt and 83.0% - 100% by aa sequence. The CMV-G1-SkvP-20 isolate belongs to the phylogenetic subgroup IB, having identity with the isolates of this subgroup of 95.8% - 100% by nt and 96.0% - 100% by aa sequence. Isolate CMV-Gl-Zt-20, isolated from the Peter Pierce variety in the Zhytomyr region, belongs to subgroup II (identity with isolates of this subgroup 97.8% - 99.3% by nt and 95.8% - 99.2% by aa sequence). This is the first report of gladiolus isolate of cucumber mosaic virus, which belongs to subgroup II, as well as the first in Ukraine report of circulation in the country of CMV, which belongs to this rare phylogenetic group. Thus, it was found that CMV isolates belong to three phylogenetic subgroups IA, IB and II, which indicates a significant strain diversity of gladiolus isolates of this virus circulating in Ukraine.

Infection with both BYMV + CMV viruses was detected in three varieties of gladiolus: Lehendy Kiyeva, Pam'yat, Victoria Skvyrska, which was confirmed by DAS-ELISA and RT-PCR. The most common symptoms of mixed infection with these viruses on gladiolus were chlorotic streaked mosaics on the leaves and color break of the flowers.

The above thesis is not only theoretical but also practical. Thus, varietal specificity to the manifestation of CMV, BYMV infection has been established. Probable tolerance to bean yellow mosaic virus was observed in Gladiolus of Priscilla and Miss Green varieties, which did not show visual signs of infection, although,

according to enzyme-linked immunosorbent assay, BYMV antigens were detected in the samples. Gladioli of Yellow Age, Natalka Poltavka, Lebedina Zgraya, Rozheviy Kaskad, Favoryt varieties in the study showed insensitivity to natural infections with BYMV and CMV, so these varieties can be recommended as sources of resistance to the studied viruses in the creation of new varieties.

It has been confirmed that during the vegetative reproduction of gladioli happens a transmission of viral infection from the mother plant, which is a factor in the spread of viruses to new areas through the sale and cultivation of untested and uncertified production of gladiolus corms. The path of vector transmission of cucumber mosaic virus by aphids that transmitted the virus from vegetable or other crops growing in this agrocenosis to gladiolus has been identified. Thus, possible ways of infection with the studied gladiolus viruses and their potential role as reservoir plants for viral infection in the agrocenosis have been established.

Key words: gladiolus, bean yellow mosaic virus, cucumber mosaic virus, enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction, sequencing, phylogenetic analysis.

Список публікацій здобувача

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. L. Mishchenko, A. Dunich, A. Smertenko, A. Dashchenko, **R. Sovinska**, H. Korotieieva. First report of bean yellow mosaic virus infecting Gladiolus sp. in Ukraine. Journal of Plant Pathology. 2020. 102: 923-924. DOI:10.1007/s42161-020-00500-x (*Дисертантом взято участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів, написанні статті*) (Scopus, Web of Science)
2. **R. Sovinska**, A. Dunich, L. Mishchenko. Phylogenetic analysis of two Ukrainian isolates of cucumber mosaic virus from gladioli grown under different agroecological conditions. Agriculture and Forestry. 2021. 67(4): 51-59. DOI: 10.17707/AgricultForest.67.4.05 (*Дисертантом взято участь в експериментальній частині роботи, написанні статті)* (Scopus, Web of Science)
3. **R. Sovinska**, A. Dunich, L. Mishchenko. Co-infection of bean yellow mosaic virus and cucumber mosaic virus in Gladiolus sp. plants: phylogenetic analysis of Ukrainian isolates. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2022. 55(3): 303-330. DOI: 10.1080/03235408.2021.2017189 (*Дисертантом взято участь в експериментальній частині роботи, написанні статті)* (Scopus, Web of Science)
4. **R. Sovinska**, A. Dunich, L. Mishchenko. Affection of Gladiolus plants with Bean Yellow Mosaic Virus, Cucumber Mosaic Virus and Tobacco Ringspot Virus in some Northern and Central regions of Ukraine. Вісник Київського національного університету. Біологія. 2020. 2(81): 36-42. DOI: http://dx.doi.org/10.17721/1728_2748.2020.81.36-42 (*Дисертантом проведено відбір зразків, експериментальна частина роботи, аналіз та обговорення результатів, написання статті*)
5. **Совінська Р.С.**, Міщенко Л.Т. Дуніч А.А., Віруси, що уражають гладіолуси (*Gladiolus hybridus*), та їх шкодочинний вплив на

сільськогосподарські культури. Карантин і захист рослин. 2020. 10—12: 12-18. (*Дисертантом взято участь в експериментальній частині роботи, пошуку даних для огляду, написанні статті)*

Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. **Совінська Р.С.**, Дуніч А.А., Міщенко Л.Т. Гладіолуси – декоративні рослини з лікарськими властивостями та їх ураження вірусними хворобами. IV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Перспективні напрями наукових досліджень лікарських і ефіроолійних культур» 25.03.2020. Березоточа, Україна. Ст. 278-280.
2. **R. Sovinska**, A. Dunich, L. Mishchenko, Y. Lytvynova. Monitoring of gladiolus plantings in Kyiv, Poltava and Sumy regions for viral infections and identification of the pathogens. XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", 29.04.2020, Львів, Україна. Ст. 168-169.
3. **Совінська Р.С.**, Дуніч А.А., Міщенко Л.Т. Деякі біологічні властивості ізоляту вірусу жовтої мозаїки квасолі із гладіолусів. XVII Міжнародна наукова конференція студентів і молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки», 2020, Київ,Україна. Ст. 66-70.
4. **Совінська Р.С.**, Міщенко Л.Т. Ідентифікація та філогенетичний аналіз ізоляту вірусу огіркової мозаїки у зразках гладіолусів (*Gladiolus hybridus*) на території Львівської області. IX Всеукраїнська онлайн науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії».2021. Київ, Україна. Ст. 101-102.
5. **R. Sovinska**, L. Mishchenko, A. Dunich, A. Mishchenko, O. Tymchenko, A. Kyrychenko. Phylogenetic diversity and prevalence of cucumber mosaic virus isolates from ornamental plants Gladiolus sp. and Echinacea purpurea in Ukraine. The 5th Symposium on EuroAsian Biodiversity. Mugla, Turkey. 01-03 липня 2021. 268 p.

6. **R. Sovinska**, A. Dunich, L. Mishchenko. Bean yellow mosaic and cucumber mosaic viruses in Gladiolus hybridus plantations - risks for floriculture and agriculture. International Scientific and Practical Conference «Plant protection in the transition to precision farming». a/c Priluki, Republic of Belarus. 27-29 липня 2021. 115-118 p.

\

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……..... 17
ВСТУП…… 19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРТУРИ……... 25
1.1. Гладіолуси. Характеристика…….. 25
1.2. Віруси, що інфікують гладіолуси у світі…….. 28
1.3. Загальна характеристика вірусу жовтої мозаїки квасолі. Геномна організація. Біологічні властивості…… 36
1.4. Загальна характеристика вірусу огіркової мозаїки. Геномна організація. Біологічні властивості…… 41
1.5. Філогенетична характеристика вірусу жовтої мозаїки квасолі…….. 48
1.6. Філогенетична характеристика вірусу огіркової мозаїки…… 55
1.7. Характеристика змішаної інфекції у рослин…… 57
РОЗДІЛ 2. ОБ‘ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ……. 60
2.1. Об’єкти ……. 60
2.2. Матеріали, реактиви та прилади, які використовувались у роботі… 60
2.3. Візуальна діагностика …… 61
2.4. Імуноферментний аналіз……. 61
2.5. Виділення тотальної РНК……... 62
2.6. Зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція…… 63
2.7. Електрофорез нуклеїнових кислот…… 64
2.8. Трансмісійна електронна мікроскопія……... 65
2.9. Метод біологічного тестування ……. 65
2.10. Виділення ПЛР-продуктів з агарозного гелю. Сиквенування……. 67
2.11. Філогенетичний аналіз…… 67
2.12. Статистична обробка даних…… 68
РОЗДІЛ 3. БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАЇНСЬКИХ ГЛАДІОЛУСНИХ ІЗОЛЯТІВ BYMV І CMV……. 69
3.1. Виявлення вірусспецифічних симптомів у насадженнях гладіолусів... 69

3.2. Ідентифікація вірусів методами імуноферментного аналізу та ЗТ-ПЛР…….. 80
3.3. Ураженість рослин гладіолусів CMV і BYMV досліджуваних областях…….. 89
3.4. Встановлення інфекційної природи виявлених симптомів захворювання на гладіолусах…….. 92
3.5. Електронномікроскопічні дослідження гладіолусних ізолятів BYMV і CMV……. 94
3.6. Встановлення спектру чутливих рослин до гладіолусних ізолятів BYMV і CMV……. 95
РОЗДІЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНА ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАЇНСЬКИХ ГЛАДІОЛУСНИХ ІЗОЛЯТІВ BYMV І CMV……. 104
4.1. Філогенетичний аналіз гладіолусних ізолятів BYMV……. 106
4.2. Філогенетичний аналіз гладіолусних ізолятів CMV…… 121
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ…… 139
ВИСНОВКИ……... 145
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……..…... 147

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ	– антиген
ак	− амінокислота
АТ	– антитіло
ДНК	− дезоксирибонуклеїнова кислота
ЗТ-ПЛР	− зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція
ІФА	− імуноферментний аналіз
нт	− нуклеотид
РНК	− рибонуклеїнова кислота
ПААГ	− поліакриламідний гель
п.н.	− пара нуклеотидів
ArMV	− arabis mosaic virus
BYMV	− bean yellow mosaic virus
BLAST	− Basic Local Aligment Search Tool (система для порівняння нуклеотидних та амінокислотних послідовностей)
CMV	− cucumber mosaic virus
DAS-ELISA	− double antibody sandwich enzyme linked imunosorbent assay (імуноферментний аналіз в модифікації «сандвіч»)
ELISA	− enzyme linked imunosorbent assay-імуноферментний аналіз
kb	− kilobase
MEGA	− Molecular Evolution Genetic Analysis (Генетичний аналіз молекулярної еволюції)
NCBI	− National Center for Biotechnology Information (національний центр біотехнологічної інформації)
OrMV	− ornithogalum mosaic virus
TAV	− tomato aspermy virus
TBRV	− tomato black ring virus
TMV	− tobacco mosaic virus
TNV	− tobacco necrosis virus

TRSV − tobacco ringspot virus

TRV − tobacco rattle virus

TSV − tobacco streak virus

TSWV − tomato spotted wilt virus

ВСТУП

Гладіолуси (*Gladiolus*) належать до роду багаторічних бульбоцибулинних рослин родини *Iridaceae,* які походять з тропічних і субтропічних районів Африки та Євразії (Goldblatt & Manning, 2008). Гладіолуси мають декоративне значення і вирощуються задля красивих квітів, букетів, квіткових кошиків на продаж або для приватного використання.

Квітникарська галузь несе значні збитки через вплив фітопатогенів, значущу роль серед яких займають віруси, оскільки під дією вірусної інфекції рослина здатна втратити свої декоративні якості. Слід зазначити, що гладіолуси - це багаторічні рослини, які розмножуються вегетативно, а, отже, можуть слугувати рослинами-резерваторами для таких небезпечних вірусних захворювань рослин як вірус огіркової мозаїки (cucumber mosaic virus), вірус жовтої мозаїки квасолі (bean yellow mosaic virus), вірус плямистого в'янення томатів (tomato spotted wild virus), вірус погримкованості тютюну (tobacco rattle virus), вірус кільцевої плямистості тютюну (tobacco ringspot virus), вірус тютюнової мозаїки (tobacco mosaic virus), вірус мозаїки арабісу (arabis mosaic virus), а також передавати інфекцію з покоління в покоління, що призводить до втрати сортів рослини. Всі перелічені віруси здатні уражувати широкий спектр хазяїв, до яких входять і економічно важливі сільськогосподарські культури.

Вірус жовтої мозаїки квасолі (bean yellow mosaic virus), вірус огіркової мозаїки (cucumber mosaic virus) найчастіше ідентифікуються в насадженнях гладіолусів у різних частинах світу за літературними даними. Векторна передача здатна поширити ці віруси на такі цінні для сільського господарства культури як пасльонові, гарбузові, соя, квасоля, боби, що в свою чергу призводитиме до втрат врожаю та поширення вірусу на нові території.

Вірус жовтої мозаїки квасолі (BYMV) має широке коло рослин-хазяїв, інфікуючи понад 200 видів рослин з 14 родин (Hema et al., 2014). Вірус здатні передавати неперсистентно понад 50 видів попелиць (*Aphidoidea*) (Evans & Zettler, 1970). Вірус огіркової мозаїки (CMV) - один з найбільш небезпечних і поширених у світі вірусів рослин, який здатен інфікувати понад 1200 видів

рослин зі понад 100 родин. Від інфікованих рослин CMV передається неперситенстно понад 80 видами попелиць (*Aphidoidea*) (Tomlinson & Carter, 2008).

Прояв вірусної інфекції на гладіолусах знижують естетичну цінність рослин та призводить до виродження сортів, оскільки дані рослини розмножується у квітникарських господарствах вегетативно. Тому, варто дотримуватись правил купівлі та захисту рослинного матеріалу для запобігання розповсюдження вірусних фітопатогенів. Рекомендовано висаджувати лише сертифіковані бульбоцибулини гладіолусів, що мають помітку CVI (culture-virus-indexed). У разі прояву вірусспецифіних ознак на листках або квітах гладіолуса важливо утилізувати такі рослини й не використовувати інфіковані бульбоцибулини для подальшого вирощування та селекції. Рекомендується використовувати інсектициди для боротьби зі потенційними векторами вірусів. Найперспективнішим способом боротьби з вірусом огіркової мозаїки та вірусом жовтої мозаїки квасолі у насадженнях гладіолусів є створення стійких сортів рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами

Дисертаційна робота виконана в рамках теми наукових досліджень ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка № 21БФ036-02 «Вірусологічний менеджмент небезпечних захворювань рослин як складова біобезпеки України» (№ держреєстрації 0121U109863) та теми кафедри вірусології № 16КФ036-05 «Структура та функції вірусів при різних екологічних станах».

Мета та завдання дослідження

Метою дисертаційної роботи було дослідити рослини гладіолусів на ураженість вірусами, їх ідентифікація та вивчення біологічних і молекулярних властивостей виявлених ізолятів.

Відповідно до мети, було поставлено наступні **завдання**:

- Обстежити рослини гладіолусів на наявність симптомів, характерних для вірусних захворювань;

- Провести ідентифікацію вірусів, що уражують рослини гладіолусів;
- Дослідити біологічні, фізико-хімічні і молекулярні властивості гладіолусних ізолятів виявлених вірусів.
- Встановити штамову приналежність українських ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі, вірусу огіркової мозаїки.
- Встановити ідентичність за послідовністю гена капсидного білка гладіолусних ізолятів CMV та BYMV із іншими ізолятами цих вірусів, які циркулюють на території України.

Об'єкт дослідження: українські ізоляти вірусу жовтої мозаїки квасолі, вірусу огіркової мозаїки, виділені з гладіолусів (*Gladiolus hybridus*).

Предмет дослідження: біологічні і молекулярні властивості, штамове різноманіття українських гладіолусних ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі та вірусу огіркової мозаїки.

Методи дослідження:

1. Візуальна діагностика.
2. Метод трансмісійної електронної мікроскопії.
3. Метод імуноферментного аналізу в модифікації «подвійний сендвіч».
4. Метод біологічного тестування.
5. Виділення тотальної РНК.
6. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією.
7. Електрофорез нуклеїнових кислот.
8. Сиквенування ділянки гену капсидного білка вірусів.
9. Філогенетичний аналіз.
10. Статистичні методи обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів

Це перше дослідження вірусних інфекцій гладіолусів на території України. Вперше встановлено на рослинах гладіолусів інфікування вірусом жовтої мозаїки квасолі (BYMV) та вірусом огіркової мозаїки (CMV) рослин гладіолусів. Вперше в Україні встановлено факт інфікування BYMV+CMV гладіолусів.

Досліджено біологічні та молекулярні властивості українських гладіолусних ізолятів CMV і BYMV.

Вперше в Україні визначено нуклеотидні й амінокислотні послідовності гладіолусних ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі, вірусу огіркової мозаїки та депоновано у базу NCBI GenBank. Встановлено генетичне різноманіття та штамову приналежність українських гладіолусних ізолятів BYMV і CMV.

Вперше на території України показано циркуляцію штаму CMV, що належить до філогенетичної підгрупи II. Це перше повідомлення у світі про виявлення гладіолусного ізоляту CMV цієї філогенетичної групи.

Практичне значення

У ході дослідження було одержано дані про симптоматику захворювання, ймовірні шляхи передачі гладіолусних ізолятів BYMV і CMV у агроценозі, а також про чутливі види рослин, які вони уражують. Ці результати демонструють потребу створення механізмів регуляції і перевірки посадкового матеріалу гладіолусів не лише для приватних, але і для селекційних і наукових цілей та впорядкування правил закупівлі бульбоцибулин.

Виявлено сорти, які не уражаються у природних умовах BYMV, CMV. та можуть бути рекомендовані як джерела стійкості для селекції при створенні нових сортів: Йелов Ейдж, Наталка Полтавка, Лебедина Зграя, Рожевий Каскад, Фаворит.

Гладіолусні ізоляти CMV і BYMV поповнили колекцію вірусів рослин та базу даних українських ізолятів вірусів кафедри вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Результати, отримані у ході проведення роботи, впроваджено у навчальний процес ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка при викладанні лабораторних занять з вірусології та спецкурсу «Фітовіруси».

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є самостійним та оригінальним науковим дослідженням, виконаним на базі кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Постановка задач, опрацювання світової та вітчизняної літератури, розробка експериментальних схем дослідження та отримання експериментальних даних, аналіз та узагальнення результатів, їх статистична обробка, формулювання висновків дисертації зроблені автором особисто під керівництвом д.б.н., професора Л. Т. Міщенко.

Апробація результатів дисертації

Основні результати досліджень дисертаційної роботи були представленні на таких вітчизняних та міжнародних конференціях:

- IV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Перспективні напрями наукових досліджень лікарських і ефіроолійних культур», 23 березня, 2020, Березоточа, Україна.
- XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 29 квітня, 2020, Львів, Україна.
- XVII Міжнародна наукова конференція студентів і молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки», 2020, Київ, Україна.
- IX Всеукраїнська онлайн науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії». 20-21 травня, 2021, Київ, Україна.
- The 5th Symposium on EuroAsian Biodiversity. 01-03 June 2021. Mugla, Turkey.
- International Scientific and Practical Conference “Plant protection in the transition to precision farming”. 27-29 June 2021, a/c Priluki, Republic of Belarus.
- XII International Scientific Agriculture Symposium „AGROSYM 2020”, 07-10 October 2021, Bosnia and Herzegovina.

Публікації

За результатами наукових досліджень опубліковано 11 наукових праць, серед яких 2 статті у фахових періодичних виданнях, затверджених МОН України, 3 статті у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз

SCOPUS та WoS, та 6 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

Дисертаційна робота викладена на 168 сторінках машинопису і містить традиційні розділи: Вступ, Огляд літератури, Матеріали та методи досліджень, Результати та обговорення, Узагальнення результатів, Висновки, Список використаних джерел (посилань) та Додатки. Ілюстративний матеріал включає 44 рисунки та 15 таблиць.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гладіолуси. Характеристика.

Гладіолус (*Gladiolus*) – рід багаторічних бульбоцибулинних рослин родини *Iridacea*. Рід налічує 300 видів за даними World Checklist of Selected Plant Families станом на 2017 р (WCSP, 2022). Рослина має здебільшого декоративне значення. Всі види гладіолусів походять з тропічних і субтропічних районів Африки та Євразії. На території Африки, звідки відомо 163 види гладіолусів, де дані квіти широко використовуються в традиційній медицині (Manning & Goldblatt, 2008). Африканські етноси Зулу і Сото використовують подрібнені бульбоцибулини диких гладіолусів проти дизентерії, діареї та інших розладів шлунку. Хімічний аналіз бульбоцибулин *Gladiolus gregasius* показав наявність у них алкалоїдів, тритерпенів, глікозидів і кардіальних глікозидів. Подальші дослідження довели антибактеріальні та антигрибні властивості екстрактів гладіолусу (Roberts, 2007; Assob et al., 2011).

На території України і в світі гладіолуси вирощуються в декоративних цілях задля естетично привабливих квітів, створення букетів, квіткових кошиків на продаж або для приватного використання.

Практика вирощування гладіолусів, як цінної квітникарської культури, бере свій початок з другої половини XVI століття. На сьогоднішній день дослідження світового виробництва бульбоцибулин вказують, що представники родів *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Lilium*, *Narcissus*, *Tulipa* належать до одних зі найпопулярніших для вирощування квіткових культур, які в цілому займають 90% світових посівних площ, відведених під бульбоцибулинні квіткові культури (Ranjan et al., 2010). Міжнародний ринок квітів включає в себе продаж зрізаних квітів гладіолусів та бульбоцибулин, які користуються особливим попитом і слугують засобом вегетативного розмноження і поширення сортів (Manashen et al., 2015). Лідерами серед вирощування гладіолусів у світі є Сполучені Штати

Америки, Нідерланди, Франція, Португалія, Італія, Бельгія, Австралія та Індія (Azimi, 2020).

До найпоширеніших методів комерційного вирощування гладіолусів належать форсування (forcing), вирощування у тепличних умовах, вирощування у відкритому ґрунті та мульчування під пластиковим покриттям (production under plastic sheeting). Враховуючи особливості температурного режиму та освітлення, які необхідні для проростання і розвитку бульбоцибулин, вирощування за допомогою спеціально обладнаних теплиць або за допомогою мульчування забезпечують оптимальне проростання гладіолусів не лише у необхідний посівний сезон (Stoop Flowerbulbs, 2021).

Гладіолуси здобули свою популярність завдяки гнучкій селекції та широкій сортовій різноманітності. На сьогодні відомо близько 5000 сортів. Основною ознакою селекції даних рослин є те, що при вегетативному розмноженні життєздатність сорту поступово знижується, а середня тривалість життя окремого сорту складає близько десяти років. Основні гібридні групи гладіолусів отримані шляхом схрещування чотирьох або п’яти видів роду *Gladiolus* з подальшим добором: 'Grandiflorus', 'Primulines' та 'Nanus' (рис.1.1). Більшість видів роду *Gladiolus* є диплоїдні з 30 хромосомами (2n=30), але гібриди Grandiflora є тетраплоїдними і мають у своєму наборі 60 хромосом (2n=4x=60). Це пояснюється тим, що основним вихідним видом в селекції був *Gladiolus daleni*, який також є тетраплоїдним (Mujib, 2015).

Рис. 1.1. Основні гібридні групи сортових гладіолусів: 1 – представник гідрибної групи Grandiflorus гладіолус сорту «Грін Стар»; 2 – представник гібридної групи Primulines гладіолус сорту «Атомік»; 3 – представник гібридної групи Nanus гладіолус сорту «Вінтерхарт»; (The British Gladiolus Society website)

Висота стебел гладіолусів варіює від 40 см - 50 см до 120 см - 150 см. Листки тонкі, лінійні або мечоподібні 50-80 см завдовжки, блакитно-зеленого кольору, змикаються навколо стебла у кількості від одного до дев'яти, надаючи йому додаткової міцності. Найнижчий листок вкорочений до катафілу. У представників диких видів кількість квітів варіює від однієї до декількох штук, а діаметр квітки не перевищує 4см. Стосовно виведених сортових гладіолусів - квітки у них зібрані в однобічне, двостороннє або спіральне колосовидне суцвіття до 80 см довжиною, середньощільне або щільне. Квітки сидячі з простою лійкоподібною оцвітиною з шести неоднакових зрощених частин різної величини і форми (Goldblatt, 1990). Забарвлення квіток має найширшу гаму відтінків від чисто білого до майже чорного, темно пурпурного (рис. 1.2). Плід — тристулкова коробочка. Насіння кругле або овальне, коричневе. Бульбоцибулини округлі, поновлюються щорічно, вкриті плівчастими лусочками від білого до чорно-вишневого забарвлення (Manning & Goldblatt, 2008).

Рис. 1.2. Варіативність форм та забарвлення квітки сортових гладіолусів: 1 – гладіолус сорту «Етер» з блідо-рожевими квітами і гладкою формою пелюсток; 2 – гладіолус сорту «Ред Велвет» з насичено-рожевими квітами та складчастими пелюстками; 3 – гладіолус сорту «Пурпур Флора» з пурпурними квітами та гофрованими пелюстками (The British Gladiolus Society website).

Гладіолуси поділяють на групи за термінами цвітіння (в днях від висадки до початку цвітіння):

- Дуже ранні (ДР): 70 - 80 днів.
- Ранні (Р): 75 - 80 днів.
- Середньоранні (СР): 80 - 85 днів.
- Середні (С): 85-90 днів.
- Середньопізні (СП): 90 - 95 днів.
- Пізні (П): 95 - 100 днів.
- Дуже пізні (ДП): більше 100 днів.

Форма країв пелюсток гладіолусів буває: гладка, гофрована, складчаста, бахромчата.

За розміром квіток гладіолуси класифікують по групах:

- мініатюрні - 100 - квітка менша 6,5 см;
- дрібноквіткові - 200 - 6,5 см - 9 см;
- середньоквіткові - 300 - 9 см - 11,5 см;
- великоквіткові - 400 - 11,5 см - 14 см;
- гігантські - 500 - більше 14 см (Goldblatt, 1990).

Представники роду *Gladiolus* вразливі до трипсів і нематод. Також африканські оси *Dasyproctus bipunctatus*, здатні пошкоджувати стебла гладіолусу викликаючи їх руйнування і відмирання (Albajes, 2006). Молоді листки та стебла використовують для свого живлення представники лускокрилих (*Lepidoptera*), наприклад, совка велика стрічкова (*Noctua pronuba*), яка найбільше активна весною (Carter, 1984).

1.2. Віруси, що інфікують гладіолуси в у світі

Квітникарська галузь несе значні збитки через різні фітопатогени, вагому роль серед яких відіграють віруси, адже під дією вірусної інфекції рослина втрачає свої декоративні якості. На сьогоднішній день, за даними світової наукової літератури, рослини гладіолусів уражують 12 видів вірусів (табл. 1.1).

Більшість вірусних інфекцій гладіолусів призводять до затримки у рості і розвитку рослин, відсутності або затримки періоду цвітіння, деформації листкової пластинки, мозаїчних симптомів на листках і пелюстках квітів.

Табл. 1.1 - Коротка характеристика вірусів, що інфікують гладіолуси

№	Вірус	Таксономічне положення	Морфологія, розміри віріонів, нм	Територія ідентифікації на гладіолусах
1	tomato aspermy virus	рід *Cucumovirus*, родина *Bromoviridae*	Ікосаедрична, 29 nm	Індія (Raj et al., 2011)
2	tobacco rattle virus	рід *Tobravirus,* родина *Virgaviridae*	паличкоподібна, сегментована, 180-210 нм і 46-115 нм	Європа (Cremer & Schenk, 1967; Navalinskiene et al.,2004), Ізраїль, Єгипет, Індія (Katoch et al., 2004), Південна Корея (Shin et al., 2002)
3	tobacco ringspot virus	рід *Nepovirus,* родина *Secoviridae*	ікосаедрична, 28-30 нм	Європа (Navalinskiene et al., 2004; Loebenstein, 1995), Індія (Katoch M. et al., 2013), Сполучені Штати Америки (Brierly, 1970*)* Японія (Fukumoto, 1982)
4	arabis mosaic virus	рід *Nepovirus,* родина *Secoviridae*	ікосаедрична, 30 нм	Ізраїль (Loebenstein, 1995), Іран (Ghotbi et al., 2005)
5	tomato black ring virus	рід *Nepovirus,* родина *Secoviridae*	ікосаедрична, 26 нм	Італія (Bellardi & Pisi, 1985), Польща (Kamińska, 1978)
6	tobacco mosaic virus	рід *Tobamovirus*, родина *Virgaviridae*	паличкоподібна, 300x18 нм	Нідерланди (Asjes, 1986), Японія (Fukumoto et al., 1982)
7	tobacco necrosis virus	рід *Necrovirus*, родина *Tombusviridae*	ікосаедрична, 26-28 нм	Європа (Navalinskiene et al., 2004)

8	tomato spotted wilt virus	рід *Orthotospovirus* родина *Tospoviridae*	сферична, 80-110 нм	Австралія (Lee et al., 1979)
9	tobacco streak virus	рід *Ilarvirus*, родина *Bromoviridae*	ікосаедрична, 27, 30, 33 нм	Італія (Bellardi et al., 1987)
10	ornithogalum mosaic virus	рід *Potyvirus*, родина *Potyviridae*	ниткоподібна, 700x15 нм	Індія (Kaur et al., 2011), Південна Корея (Cho, 2016), Іран (Ghotbi, 2005)
11	bean yellow mosaic virus	рід *Potyvirus*, родина *Potyviridae*	ниткоподібна, 750x13 нм	Аргентина (Arneodo et al., 2005), Сполучені Штати Америки (Zettler and Abo El-nil, 1977), Канада (Berkeley, 1953), Чеська Республіка (Selvaraj et al., 2009), Литва (Navalinskiene et al., 2004), Нідерланди (Brunt, 1970), Італія (Bellardi and Pisi, 1985), Росія (Gnutova et al., 1989), Ізраїль (Stein et al., 1986), Іран (Kamran & Izadpanah, 1981), Індія (Katoch et al., 2003), Південна Корея (Park et al., 2002), Японія (Wada et al., 2000), Нова Зеландія (Fry, 1953)
12	cucumber mosaic virus	рід *Cucumovirus*, родина *Bromoviridae*	ікосаедрична, 28-30 нм	Аргентина (Arneodo et al., 2005), Сполучені Штати Америки (May et al., 1963), Індія (Dubey et al, 2010), Ізраїль (Gera et al. 1990),

				Нідерланди (Asjes et al., 1997), Чеська Республіка (Pokorny et al., 2009), Південна Корея (Park et al., 1998).

Tomato aspermy virus (TAV) належить до роду *Cucumovirus,* родини *Bromoviridae.* Віріони прості ізометричні, ікосаедричні близько 29 нм в діаметрі. Геном трипартитний, складається зі трьох одноланцюгових (+) РНК (РНК 1, 2, 3) і кодує п'ять відкритих рамок зчитування (Sota et al., 2018). Для вірусу характерна неперсистентна векторна передача попелицями. До кола хазяїв TAV входять переважно представники родини *Solanaceae* та *Asteraceae.* TAV викликає мозаїчні симптоми або некрози на рослинах томатів та деформації квітів у хризантем (Raj et al., 2007). На рослинах гладіолусів, які інфіковані вірусом аспермії томатів, відзначають системні некрози, зменшення кількості квітів у колосі зі симптомами «розриву кольору» на пелюстках (Raj et al., 2011).

Tobacco rattle virus (TRV) належить до родини *Virgaviridae* роду *Tobravirus*. Віріони паличковидні, спіральної симетрії, представлені віріонами двох довжин, які мають розміри 180-210 нм та 46-115 нм, відповідно. Геном сегментований, лінійний представлений одноланцюговою (+) РНК, яка є інфекційною. Розміри сегментів – 6.8 kb та 4.5 kb, кеповані, не поліаденільовані на 3`-кінці (He et al. 2018). Вперше вірус погримковості тютюну виявлено в 1931 році в Німеччині на рослинах *Nicotiana tabacum*. На сьогодні відомо, що вірус високопатогенний і здатен інфікувати понад 400 видів рослин з близько 50-ти родин. Векторами вірусу виступають нематоди родів *Trichodorus* і *Paratrichodorus*. До овочевих культур, які інфікує даний вірус, належить буряк, картопля, шпинат, перець, квасоля (Visser et al. 1999). Вірус інфікує і такі квіткові рослини як гладіолуси, нарциси, коралові дзвіночки, тюльпани, гіацинти, чорнобривці, барвінок, епімедіум (Cremer & Schenk, 1967; Kiambi et al. 2018). Також повідомляється про інфікування TRV гортензій (*Hydrángea*) та зозулиних черевичок справжніх (*Cypripedium calceolus*), яке характеризувалось

інтенсивними некрозами на листковій пластинці й загибеллю рослин (Baumann et al. 2020). Вірус погримковості тютюну має характерну симптоматику на рослинах гладіолусів. Вірусна інфекція на гладіолусах проявляється у зазубренні країв листкової пластинки, також бульбоцибулини менші у розмірах. Симптоми у вигляді зазубрених країв листків проявляються лиже у випадку інфікування молодих рослин у першому сезоні вирощування, у разі ураження дорослих рослин відбувається лише затримка у рості, а візуальні симптоми на листках проявляються лише у наступному сезоні (Cremer & Schenk, 1967).

Tobacco mosaic virus (TMV) належить до *Virgaviridae* роду *Tobamovirus*. Віріони прості, паличкоподібні розміром близько 300 нм у довжину і шириною 18 нм (Stryer, 1988). Геном представлений одноланцюговою молекулою «+» РНК. Джерелом первинної інфекції є рослинні рештки та сухі листки, вірус також передається неперсистентно попелицями. Симптоми інфікування TMV включають в себе мозаїку, некрози, пожовтіння та скручування листкової пластинки (Damayanti et al., 2020).

Вірус кільцевої плямистості тютюну (*Tobacco ringspot virus* - TRSV) належить до родини *Secoviridae,* роду *Nepovirus*. За морфологією віріони прості, ікосаедричні, 28-30 нм в діаметрі. Геном вірусу представлений інфекційною, сегментованою, двопартитною лінійною одноланцюговою (+) РНК, що складається з РНК-1 розміром 7.5 kb та РНК-2 розміром 3.9 kb. Кожен сегмент геному має VPg на 5`-кінці та poly(A) на 3'-кінці. РНК-1 та РНК-2 транслюють два поліпротеїни, які шляхом процесингу перетворюються у функціональні білки. РНК-1 кодує білки, необхідні для реплікації, а РНК-2 кодує білки капсиду та руху від клітини до клітини (Nepovirus, ViralZone). Вірус кільцевої плямистості тютюну був вперше описаний на території штату Вірджинія Сполучених Штатів Америки в 1927 році. На сьогодні відомо, що вірус здатен інфікувати понад 250 видів рослин з 54 родин (Beaver-Kanuya & Harper, 2021). Спектр хазяїв вірусу включає в себе трав'янисті та деревні рослини – це представники родин *Cucurbitaceae* (огірки, канталуп *(Cucumis melo),* гарбуз, диня)*, Rosales* (ожина (*Rubus fruticosus*), вишня), а також тютюн, виноград,

гладіолус, ірис, картопля, люпин (Stace-Smith & Hansen, 1974; Uyemoto et al., 1977; Asjes, 1979; Abdalla et al., 2012; Martin et al., 2013; Tabara et al., 2021; Mitra et al., 2021). Важливо зазначити, що даний патоген занесений до Переліку регульованих карантинних шкідливих організмів України (Документ Про затвердження Переліку регульованих шкідливих організмів z1300-06).

Вірус кільцевої плямистості тютюну поширюється векторами такими, як нематоди роду *Xiphinema*, здатен перебувати в тілі вектора добу й передається як дорослими особинами, так і на стадії личинки (Brown & Trudgill, 2008). До інших векторів також відносять попелиць, кліщів (*Varroa mites*) та європейських медоносних бджіл (*Apis mellifera*) (Li et al., 2014).

На чутливих рослинах вірус індукує системну реакцію. На листках тютюну утворюються візерунки у вигляді кілець, втім, це не призводить до серйозних врожайних втрат (Gooding, 1991). На винограді спостерігається затримка у рості, скорочення міжвузлів, листки дрібні, ягоди розвиваються нерівномірно, а форма грона не зберігається (McBride, 2017). Для гладіолусів характерна некротична або хлоротична кільцева плямистість, встановлено, що вірус не впливає на цвітіння.

Arabis mosaic virus (ArMV) належить до родини *Secoviridae,* роду *Nepovirus.* Геном представлений одноланцюговою (+) РНК, що складається з РНК-1 розміром 7.3 kb та РНК-2 розміром 3.8 kb. (Komorowska et al. 2018). У ході механічної інокуляції вдалось інфікувати ArMV 98 видів рослин з 28 родин (Schmelzer, 1963). Повідомляється про інфікування вірусом низки декоративних квіткових рослин: *Alstroemeria, Begonia, Dianthus, Crocus, Gladiolus, Hyacinthus, Lilium, Narcissus, Nerine, Roses, Tulip* (Loebenstein, 1995; Samuitienė et al., 2008). Для вірусу характерна насіннєва і механічна передачі, а також векторна нематодами *Xiphinema* і *Dorylamidae spp.* (Card et al., 2007). Гладіолуси, інфіковані ArMV, проявляють типові для неповірусної інфекції симптоми – некротичну або хлоротичну плямистість (Ghotbi et al., 2005).

Tomato black ring virus (TBRV) належить до родини *Secoviridae,* роду *Nepovirus.* TBRV має три ізометричні вірусні частки (B, M, T) діаметром 26 нм,

які місять 44%, 32%, 0% нк відповідно. Геном складається зі двопартитної лінійної одноланцюгової (+) РНК, що складається з РНК-1 розміром 7.4 kb та РНК-2 розміром 4.6 kb (Digiaro et al., 2015). Різні штами TBRV викликають «хвороби кільцевої плямистості» на бобах, буряку, малині, персиках, картоплі, цибулі (Al-Shudifat et al., 2021). Інфіковані TBRV гладіолуси, тюльпани і нарциси мають некротичні смуги або плями 1-2 мм діаметром по довжині листкової пластинки, затримку у рості і цвітінні. Нарциси і гладіолуси з білими квітами не мають симптомів на пелюстках (Bellardi & Pisi, 1985).

Tobacco necrosis virus (TNV) належить до родини *Tombusviridae* роду *Alphanecrovirus*. Віріони прості, ікосаедричні 26-28 нм у діаметрі з типом симетрії T=3. У деяких вірусних культурах присутні ікосаедричні частки діаметром 17 нм, які є вірусом-сателітом satTNV. Вірус-сателіт satTNV ідентифікований у європейських і північноамериканських штамів TNV, що інфікують бобові (Shuo, 2010). Геном монопартитний, представлений одноланцюговою (+) РНК розміром 4 kb. Вірус здатен інфікувати 88 родин дводольних і 37 родин однодольних рослин (Díaz-Cruz et al. 2017). Векторами передачі TNV є гриби роду *Olpidium* (Bhat & Rao, 2020). Симптоми на інфікованих рослинах проявляються у вигляді локальних некрозів. Для TNV не характерна системна інфекція (Díaz-Cruz et al. 2017). На листках інфікованих TNV проявляються світло-зелені плями та некрози, які з часом висихають і тріскаються. На рослинах-індикаторах (*N. glutinosa, C. ambrosioides, Cucumis sativus, Phaseolus vulgaris, Petunia hybrida*), що були інфіковані соком хворих гладіолусів, проявлялися локальні некрози (Navalinskiene et al.,2004).

Tomato spotted wilt virus (TSWV) – представник родини *Tospoviridae*, роду *Orthotospovirus*. Віріони з ліпопротеїновою оболонкою, ізометричні, діаметром 85 нм. Геном представлений трьома сегментами (-)РНК: S (2.9 kb), M (4.8 kb), L (8.9 kb) (Fontana et al., 2020). Переносниками вірусу є трипси. Вірус здатен інфікувати понад 1000 видів рослин, він є одним з найбільш економічно шкідливих вірусів у світі (Parrella et al. 2003). Симптоми залежать від видової приналежності та віку інфікованої рослини, а також від зовнішніх кліматичних

умов. Типовими симптомами вважаються кільцева плямистість, некрози листків і плодів та уповільнення у рості та розвитку рослини (Kil et al. 2020).

Tobacco streak virus (TSV) належить до роду *Ilarvirus*, родини *Bromoviridae.* Геном TSV одноланцюговий (+) РНК представлений РНК1 (3.5 kb), РНК2 (2.5 kb), РНК3 (2.2 kb), РНК4 (субгеномна). Три різні сферичні частки TSV 27, 30, 33 нм у діаметрі здатні набувати плеоморфної форми, що ускладнює кристалізацію вірусу для подальшого вивчення морфології (Gulati et al. 2016). Вірус здатен інфікувати понад 200 видів рослин, які здебільшого належать до родин *Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae* і *Solanaceae,* викликаючи врожайні втрати (Kumar et al., 2020). Для TSV характерна векторна передача трипсами, насіннєва і пилкова передача (Rabedeaux et al., 2005). Інфікування TSV проявляється у вигляді хлорозів і некрозів. Прояв симптомів залежить від температурних умов навколишнього середовища. Так, при температури близькій до 20 °C некротичні плями значно менші, ніж при температурі повітря вище 30 °C (Gulati et al., 2016). Хворі гладіолуси проявляють симптоми некрозів, хлоротичних кілець, шрихуватості листя (Bellardi et al., 1987).

Ornithogalum mosaic virus (OrMV) належить до родини *Potyviridae*, роду *Potyvirus*. Віріони прості, ниткоподібні довжиною близько 700 нм. Геном представлений дноланцюговою (+) РНК, яка є інфекційною, кодує один поліпротеїн, який нарізається на десять віруспецифічних протеїнів (King et al., 2011). OrMV є одним із найнебезпечніших патогенів для декоративних квіткових рослин, оскільки інфікує преставників родів *Gladiolus, Iris, Ornithogalum* і *Diuris* (Gao et al., 2018). Повідомляється і про інфікування вірусом рослин *Crocus sativus* (Liao et al., 2017). Ornithogalum mosaic virus викликає мозаїчні симптоми у інфікованих гладіолусів (Cho, 2016).

Інфікування вірусами рослин здатне призвести до втрати сорту, знищення колекцій гладіолусів у ботанічних садах, а також до ускладнення селективного добору при створенні сортових форм гладіолусів. Найбільш поширеними в насадженнях гладіолусів є вірус огіркової мозаїки і вірус жовтої мозаїки квасолі.

1.3 Загальна характеристика вірусу жовтої мозаїки квасолі. Геномна організація. Біологічні властивості

Вірус жовтої мозаїки квасолі, *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) – належить до родини *Potyviridae*, роду *Potyvirus*. Віріони прості, нитчасті довжиною близько 750 нм. Плавуча щільність віріонів становить від 1.31 г/ $см^{-3}$ у CsCl. Коефіцієнт седиментації складає $S_{20,w}$ = 137–160 S.

Віріони помірно імуногенні. Деякі моноклональні антитіла реагують з більшістю потівірусів, що передаються попелицями. Ідентичність амінокислотної послідовності CP вірусів, що передаються попелицями, складає 40-70%. Деякі віруси роду споріднені з *Rymovirus* та *Bymovirus* (*Genus: Potyvirus—ICTV*. (n.d.)).

Геном монопартитний, представлений одноланцюговою (+) РНК розміром близько 10 kb, яка є інфекційною, 3'-кінець має poly(A), 5'-кінець має білок VPg (рис. 1.3).

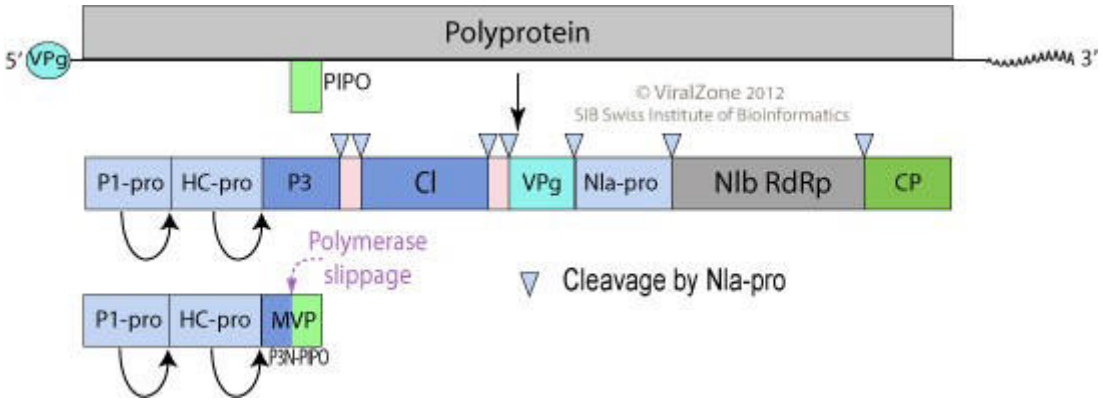

Рис.1.3. Геномна організація вірусу жовтої мозаїки квасолі (ViralZone, 2012)

Білок капсиду (CP) бере участь у передачі векторами, руху з клітини-до-клітини, інкапсидації вірусної РНК та в регуляції ампліфікації вірусної РНК. Білок ядерного включення B (Nuclear inclusion protein B) - РНК-залежна РНК-полімераза бере участь у реплікації вірусу. Цитоплазматичний білок включення (Cytoplasmic inclusion protein) має геліказну активність і бере участь у реплікації. Білок ядерного включення A (Nuclear inclusion protein A) має протеолітичну активність.

Вірусна РНК є інфекційна і слугує як геномною, так і месенджерною РНК. Геномна РНК транслюється в поліпротеїни, які процесуються під дією трьох кодованих вірусом протеїназ у функціональні продукти (RdRp білок та структурні білки). P3N-PIPO експресується з відкритої рамки зчитування гена P3 і, ймовірно, є білком руху. Реплікація відбувається в цитоплазматичних фабриках віріонів. ДлРНК синтезується з ол(+)РНК й транскрибується, реплікується утворюючи вірусні мРНК та нові ол(+)РНК геноми (*Potyvirus ~ ViralZone*. (n.d.)).

Вперше вірус жовтої мозаїки квасолі був описаний в 1900х роках у Північно-Східній частині Сполучених Штатів Америки в насадженнях *Pisum sativum* (Doolittle & Jones, 1925). Сьогодні вірус є широко розповсюдженим і трапляється у вигляді чисельних штамів та ізолятів (понад 2000).

Bean yellow mosaic virus має відносно широке коло рослин-хазяїв, його ізоляти відрізняються за своєю патогенністю та серологічними властивостями. Здатен інфікувати понад 200 видів рослин з 14-ти родин. Серед представників родини бобових найчастіше інфікує такі цінні сільськогосподарські рослини як стручкову квасолю (*Phaseolus vulgaris*), арахіс (*Arachis hypogaea*), сою (*Glycine max*), біб садовий (*Vicia faba*), декілька видів конюшини (*Trifolium hybridum, T. vesiculosum, T. incarnatum, T. pratense, T. repens, T. subterraneum*), люцерну (*Medicago sativa*), віку звичайну (*Vicia sativa*), люпин (*Lupinus luteus*), а також робінію звичайну (*Robinia pseudoacacia*), гуньбу сінну (*Trigonella foenum-graecum*) і *Crotalaria specbilis* (Sharma et al., 2015; Cook et al., 2002; Chu et al., 1990; Sofy et al., 2020; Kehoe et al., 2014). Щодо представників інших родин, то вірус інфікує гладіолуси (*Gladiolus sp.),* фрезію (*Fressia sp.*), мак *(Papaver somniferum*), канну (*Canna spp),* еустому Рассела *(Eustoma russellianum),* фізаліс перуанський *(Physalis peruviana)* та ваніль *(Vanilla planifolia*) (Kumari et al., 2015; Kumar et al., 2009; Chauhan et al., 2015; Uga et al., 2004; Wang et al., 2017).

Вірус жовтої мозаїки квасолі ідентифікований на території України в насадженнях квасолі, сої (Kyrychenko et al., 2017) та люпину (Пиріг та ін., 2012).

Симптоми включають в себе плямистість, мозаїку, деформацію листків. Троянди, інфіковані вірусом жовтої мозаїки квасолі, мають затримку у рості та мозаїку на листковій пластинці (рис.1.2. А) (Khattab, 2015). На бобі садовому і вігні симптоми проявляються у вигляді мозаїки та некрозів (рис. 1.2.В). На квасолі звичайній (*Phaseolus vulgaris*) спостерігається мозаїчна плямистість та некрози листків, дефектний розвиток плодів (рис. 1.4.С). На гороху (*Pisum sativum*) симптоми вірусної інфекції проявляються у вигляді некрозів на листках та стеблах і яскравої жовтої мозаїки на листках (Jagadeesh et al., 2022). Вірусна інфекція на рослинах конюшини проявляється у вигляді хлорозів на листках, затримці у рості рослин та деформаціях листкової пластинки (Nakazono-Nagaoka et al., 2009).

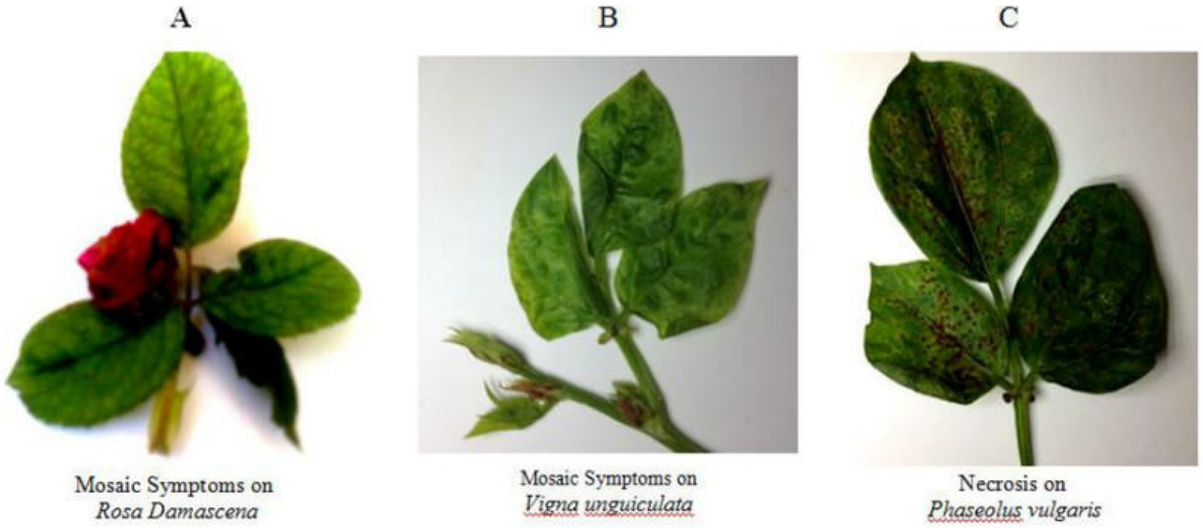

Рис. 1.4. Симптоми вірусу жовтої мозаїки квасолі: А – мозаїка на листках троянди; В – мозаїка на листках вігни; С – некрози і мозаїки на листках квасолі (Khattab & Abdelkader, 2015).

На гладіолусах проявляється темно-зелена смугастість листків, «розрив кольору» квітки при ураженні вірусом жовтої мозаїки квасолі (рис. 1.5). «Розрив кольору» квітки частіше постерігається у сортів зі блакитним, рожевим, фіолетовим, червоним, забарвленням пелюсток і, зазвичай, не помітний у сортів з білими або жовтавими квітами (Asjes, 1997). Прояв симптомів залежить від умов зростання гладіолусів, чутливості сорту до прояву інфекції або його

толерантності (Elmer & Kamo, 2016). Вірус жовтої мозаїки квасолі також знижує відбруньковування бульбоцибулин гладіолусів на 33%, інфіковані рослини мають менший період життя й більш чутливі до грибної інфекції (Navalinskiene et al., 2004).

Рис. 1.5. Штрихуватість листків гладіолусів при інфікуванні вірусом жовтої мозаїки квасолі (Elmer & Kammo, 2018).

Вірус жовтої мозаїки квасолі в насадженнях гладіолусів ідентифікований на всіх континентах в різних країнах: Аргентина (Arneodo et al., 2005), Сполучені Штати Америки (Zettler & Abo El-nil, 1977), Канада (Berkeley, 1953), Чеська Республіка (Selvaraj et al., 2009), Литва (Navalinskiene et al., 2004), Нідерланди (Brunt, 1970), Італія (Bellardi & Pisi, 1985), Росія (Gnutova et al., 1989), Ізраїль (Stein et al., 1986), Іран (Kamran & Izadpanah, 1981), Індія (Katoch et al. 2013), Південна Корея (Park et al., 2002), Японія (Wada et al., 2000), Нова Зеландія (Fry, 1953) та ін.

Відмінність симптомів різних ізолятів BYMV на рослинах-індикаторах продемонстрована у роботі А.М. Кириченко (Кириченко та ін., 2015). Специфіка гладіолусного ізоляту виявлена у роботах Гнутової, де зазначено, що гладіолусний ізолят вірусу жовтої мозаїки квасолі цікавий тим, що вважається досить вузькоспецифічним стосовно кола рослин-індикаторів й відмінними біологічними властивостями в порівнянні з іншими штамами вірусу (Гнутова та ін., 2008). Симптоми вірусної інфекції, спричені гладіолусними ізолятами BYMV, проявляються як і у вигляді системної реакції (*Phaseolus vulgaris*, *Pisum*

sativum, Vicia faba, Petunia hybrida), так і у вигляді локальних некрозів, хлоротичної плямистості (*Chenopodium album, Chenopodium quinoa, Chenopodium amaranticolor, Gomphrena globosa, Lupinus luteus*) (табл. 1.2.).

Табл. 1.2 - Симптоматика вірусної інфекції BYMV на рослинах-індикаторах

Рослина-індикатор	Симптоми
Горох посівний (*Pisum sativum L*)	Системне ураження, деформація верхівки, коротковузля; мозаїка, латентна інфекція; системна реакція, мозаїка
Гомфрена куляста (*Gomphrena globosa L*)	Локальні реакції, некрози
Люпин жовтий (*Lupinus luteus*)	Листкова мозаїка, локальні некрози
Біб кінський (*Vicia faba L.)*	Мозаїка, локальні некрози; некротична плямистість, некрози, мозаїка; системна мозаїка, затримка росту; локальні симпноти, мозаїка
Гуаровий біб (*Cyamopsis tetragonoloba)*	Мозаїка
Квасоля звичайна (*Phaseolus vulgaris L.)* *Phaseolus vulgaris* сорт Top Crop	Системна реакція, деформація листків, некротизація литків; некротична плямистість, мозаїка
Вігна променистa (*Vigna radiata*)	Некротична плямистість
Лобода біла *(Chenopodium album L*)	Локальна реакція, некрози, хлорози
Лобода рисова (*Chenopodium quinoa*)	Хлоротична плямистість, некротична плямистість
Шпинат новозеландський (*Tetragonia tetragonoides*)	Хлоротична плямистість, латентна інфекція
Шпинат городній (*Spinacia oleracea*)	Латентна інфекція
Лобода (*Chenopodium amaranticolor*)	Хлоротична плямистість листків; локальні некрози
Махорка (*Nicotiána rústica)*	Листкова мозаїка
Тютюн бенджаміна (*Nicotiana benthamiana*)	Латентна інфекція
Петунія гібридна	Системна реакція, мозаїка

(*Petunia hybrida)*	
Фізаліс *(Physalis peruviana)*	Системна реакція, мозаїка
Перець овочевий (*Capsicum annuum*)	Системна реакція, мозаїка

Для вдалої боротьби з вірусом жовтої мозаїки квасолі необхідно вживати заходи для зменшення кількості хворих рослин та боротись з поширенням вірусу, а саме використовувати виключно перевірений посадковий матеріал та використовувати стійкі до вірусу сорти рослин. Рекомендується висаджувати сертифіковані бульбоцибулини гладіолусів з поміткою CVI (culture-virus-indexed).

Дослідження свідчать, що трансгенні рослини гладіолусів, які містять капсидний білок (CP) супресують розвиток вірусної інфекції, але не є стійкими до інфікування BYMV.

Хімічна боротьба з векторами не вважається достатньо ефективною для вірусів, що передаються неперсистентно. Поширення вірусу можна також зменшити, контролюючи темпи росту бур'янів (Kamo et al., 2005).

Бажано уникати вирощування гладіолусу поряд з такими культурними рослинами як квасоля, горох, люпин, огірок, диня та конюшина, оскільки насіння даних рослин може бути інфіковане вірусами, що через векторів можуть передатись на рослини гладіолусів.

1.4 Загальна характеристика вірусу огіркової мозаїки. Геномна організація. Біологічні властивості

Cucumber mosaic virus (CMV) належить до родини *Bromoviridae*, роду *Cucumovirus*. Віріони прості, з ікосаедричним типом симетрії (T=3), близько 29 нм у діаметрі. Містять 3 геномні РНК 1 (~ 3 350 нуклеотидів), РНК 2 (~ 3,050 нуклеотидів) і РНК 3 (~ 2200 нуклеотидів) і 1 субгеномну (+) РНК. Кожна молекула РНК упакована в окрему білкову оболонку, таким чином зрілий вірус складається з трьох сферичних вірусних часточок (Bujarski et al., 2019).

Молекулярна маса віріонів (Mr) коливається від 3,5 до 6,9 × 10^6, залежно від вмісту нуклеїнової кислоти. Плавуча щільність віріонів становить від 1,35 до 1,37 г/$см^3$ у CsCl. Віріони руйнуються при дії РНКаз при нейтральному значені pH *in situ*. Віріони інактивуються при нагріванні вище +60 °C. Віруси стабільні у хлороформі, відносно стабільні до дії Triton X-100, але руйнуються при дії фенолів, легко руйнуються при дії додецилсульфату натрію (Kaper et al., 1965).

РНК-1 кодує один білок 1a необхідний для реплікації вірусного геному. Білок 1a має два функціональні домени: N-кінцевий і C-кінцевий домени. N-кінцевий домен має метилтрансферазну активність, тоді як C-кінцевий домен білка 1a є геліказою і розкручує вірусну дволанцюгову РНК під час вірусної реплікації.

РНК-2 кодує два білки, які називаються 2a та 2b. Білок 2a є N-проксимальним до білка 2b і бере участь у реплікації вірусного геному. Білок 2a необхідний для реплікації CMV і має характерні для РНК мотиви РНК-полімерази, тобто він використовує ланцюг РНК як шаблон для отримання додаткової ланцюга РНК. Також було показано, що білок 2a взаємодіє з білком 1a (також білком реплікації) і транслюється з окремого (субгеномного) ланцюга РНК, що називається РНК-4A. Білок 2b протидіє механізму мовчання генів.

РНК-3 кодує два білки, які називаються 3a і білок оболонки. Білок 3a (MP або білок руху) має важливе значення для руху вірусу "клітина-клітина" та мутації цього білка, визначають специфічність до хазяїна (рис. 1.6).

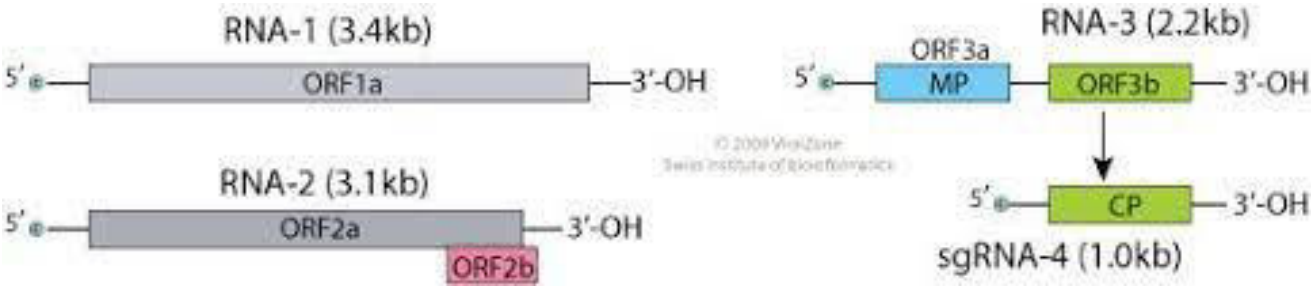

Рис. 1.6. Геномна організація cucumber mosaic virus (*Cucumovirus ~ ViralZone*. (n.d.)).

Перший етап реплікації включає в себе синтез (-) РНК, яка в подальшому буде використана для синтезу ланцюгів (+) РНК. Новосинтезовані (+) РНК використовуються для трансляції і є матрицями для подальшої транскрипції. Важливо зазначити, що реплікація асиметрична і у клітинах рослин накопичуються дволанцюгові РНК (dsRNA), функції яких залишаються не з'ясованими, втім їх використовують для діагностики вірусу. Накопичення (-) РНК досягає свого плато невдовзі після зараження, в той час як (+) РНК ланцюги продовжують накопичуватись і досягають рівня в 100 разів вищого, ніж (-) РНК ланцюги. Дослідження показали, що для синтезу (-) ланцюга необхідні білки 1a та 2a, в той час як для синтезу (+) ланцюга необхідний лише білок 2a. Ці дані показують наявність у цитоплазмі вільних білків 2a, фосфорилювання білка 2a запобігає його асоціації з білком 1a, що може бути одним з механізмів переключення з транскрипції на трансляцію (Seo et al., 2009).

Вірус інфікує близько 1200 видів рослин з більш ніж 100 родин, серед яких є економічно важливі культурні та сільськогосподарські рослини. Симптоми залежать від часу інфікування рослини. У рослин, що інфіковані на початку сезону, спостерігається неправильне формування листків, деформація форми стебел, плоди втрачають товарний вигляд, поганої якості. Спостерігається зміна кольору плодів у кабачків з появою зелених кілець. Аналогічні симптоми відмічено і на гарбузах (Gallitelli, 2000).

На території України вірус огіркової мозаїки у насадженнях сільськогосподарських культур детектується з 1970 року (Moskovets et al., 1970). На овочевих культурах детектовано ізоляти IA і IB підгруп (Shevchenko et al., 2018). На території Полтавської області зареєстрована наявність вірусу огіркової мозаїки на рослинах ехінацеї (Mishchenko et al., 2021).

Більше 70-ти видів попелиць *Aphidoidea* здатні передавати вірус несперсистентно. Комаха отримує вірус при харчуванні на хворій рослині близько 60 секунд і здатна передавати його на інші рослини протягом декількох хвилин (Jacquemond, 2012). На території лісостепової зони України зареєстровано 134 види попелиць, серед яких представники родів *Myzus* і *Aphis,*

види яких відомі як вектори CMV (Zhuravlov V., 2000). Повідомляється про різну інтенсивність векторної передачі штамів CMV, що не пов'язана зі концентрацією вірусу у вихідному матеріалі або ж ступенем очистки вірусвмісного матеріалу (Gera A. et al., 1990). Подальші дослідження встановили, що нещільне зв'язування CMV зі стилетом опосередковується специфічними амінокислотними залишками вірусного капсиднлго білка та рецепторами у стилеті комах (Brault V. et al., 2010). Інші вірусні генні продукти, крім оболонки вірусу та допоміжних факторів, також можуть опосередковано впливати на інтенсивність векторної передачі вірусів (Tungadi et al., 2017).

Насіннєва передача CMV характерна для понад 19-ти видів рослин. У зірочника середнього (*Caryophyllaceae*) показник інфікування сягає 40% у рослин, вирощених із зараженого насіння. Інші родини рослин, для яких характерна насіннєва передача CMV (включаючи культурні рослини) - *Amaranthaceae* (syn. *Chenopodiaceae*) (шпинат), *Brassicaceae*, *Fabaceae* (syn. *Leguminosae*) (боби, нут, сочевиця, люпин, конюшина, горох, люцерна), *Cucurbitaceae* (*Cucurbita pepo subsp. Pepo*) *Solanaceae* (перець, томат) та глухокропивові (*Lamiaceae*) (Yang et al., 1997; Azizi et al., 2014; Wylie et al., 1993; Choi et al., 2018; Feng et al., 2014; Bruni et al., 2007). Відсоток передачі насінням, зазвичай, доволі низький (до 3%), хоч і коливається в залежності від виду хазяїна (для сочевиці складає 9,5%, для шпинату - 15%, для вігни – 21%), втім, цього достатньо для щорічного виникнення спалахів захворювання на комерційних полях та для потенційного зараження тепличних культур, що ростуть поруч із бур'янами, зростаючими поблизу теплиць (Yang et al., 1997; Ali et al., 2010; O`Keefe et al., 2007).

У перцю при інфікуванні CMV на ранніх стадіях росту розвиваються хлорози на листках, які спостерігаються по мірі росту рослини на більшості листків і супроводжуються також деформаціями та матовістю листкової пластинки (рис. 1.7). У плодів перцю спостерігається кільцеподібні плями та шорсткуватість. Для всіх видів рослин, уражених на ранніх стадіях, характерні затримки у рості (Li et al., 2020).

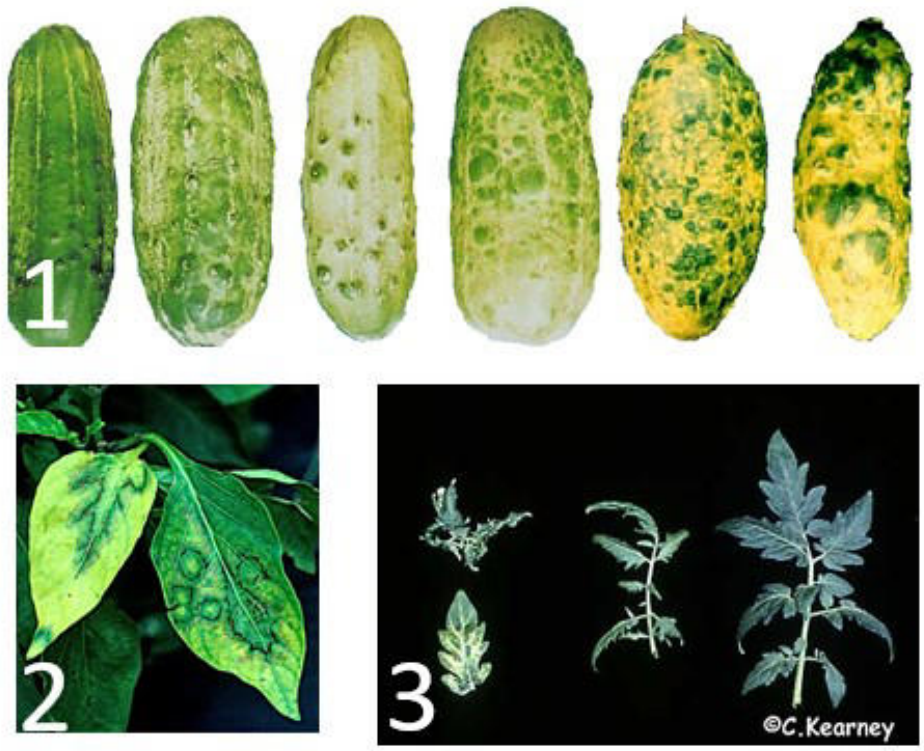

Рис.1.7. Симптоми ураженням вірусом огіркової мозаїки на: 1 – плямистість і деформація плодів огірка (*Mozaika okurková*. (2009, August 3) – Škůdci.com); 2 – плямистість на листках перцю (Zitter & Murphy, 2009); 3 – ниткоподібна деформація листків томату (Zitter & Murphy, 2009).

У шпината симптоми залежать від сорту, віку рослини при ураженні, штама вірусу та температури вирощування рослини. Типовим проявом інфекції є хлороз листків, який здатен прогресувати і викликати загибель рослини. Також на листковій пластинці можуть спостерігатись зморшкуватість з деформацією жилок (Wilson, 1985).

У рослин салату симптоми проявляються у вигляді плямистості листків, некротичних уражень. Рослини деформуються і втрачають товарний вигляд. У селери спостерігається мозаїка, пожовтіння листків, некроз жилок і черешків. Спостерігається залежність прояву симптомів від температури вирощування рослин, так при більш холодніших показниках симптоми проявляються не чітко (Zein et al., 2006).

Рослини томатів уражених на початку розвитку мають затримку у рості, пожовтіння листків, форма рослини більш кущиста. Найхарактернішим симптомом у томатів є ниткоподібні посвітління листкової пластинки (рис. 1.7.).

У квасолі спостерігається кучерявість листків, зменшення кількості листків. Найкраще проявляються симптоми при ураженні рослини до цвітіння, а саме деформація, карликовість і зменшення кількості стручків. Якщо рослини інфіковані після цвітіння, то симптоми більш замасковані й можуть не проявлятись. Оскільки прояв симптомів залежить від часу інфікування та сорту рослини, їх часто можуть спутати зі вірусом мозаїки квасолі (*Bean common mosaic virus*), тому рекомендовано досліджувати зразки імуноферментним аналізом для чіткого діагнозу вірусної інфекції (Dukic et al., 2006).

Прояви вірусної інфекції на гладіолусах характеризуються затримкою у рості, «розривом» кольору пелюсток та деформацією форми квітки, штрихуватою мозаїкою на листках (рис. 1.8.). Пізнє інфікування вірусом огіркової мозаїки проходить у більшості випадків безсимптомно і може проявитись лише у зменшенні кількості квітів у колосі (Raj *et al*, 2002). Загалом, вірус викликає слабкі симптоми на рослині, але при інфікуванні з вірусом жовтої мозаїки квасолі, виникають чітко виражені симптоми і спостерігається однаково висока концентрація обох вірусів.

Рис. 1.8. Симптоми ураженням вірусом огіркової мозаїки на гладіолусах (Aebig et al., 2005).

Пізнє інфікування вірусом огіркової мозаїки, в період ближче до цвітіння гладіолусів, проходить у більшості випадків безсимптомно і може проявитись лише у зменшенні кількості квітів у колосі (Arneodo et al., 2005). На деяких сортах при спільному інфікуванні зі BYMV спостерігається накладання симптомів на пелюстках, яке проявляється у більш яскраво виражених білуватих хаотичних плямах, кількість яких збільшується ближче до центру квітки (Asjes, 1997).

Вірус огіркової мозаїки в насадженнях гладіолусів виявлений в Аргентині (Arneodo et al., 2005), Сполучених Штатах Америки (McWhorter, 1957), Індії (Dubey et al., 2010), Ізраїлі (Stein, 1995), Ірані (Dorrigiv et al., 2013), Нідерландах (Asjes, 1997), Чеській Республіці (Duraisamy and Pokorný, 2009), Японії (Fukumoto et al., 1982). Більшість комерційних сортів є чутливими до CMV (Elmer and Kamo, 2016).

Дослідження реакції рослин-індикаторів на ураження їх гладіолусними штамами при механічній інокуляції вказує, що дані ізоляти викликають як локальні реакції, що проявляються у вигляді некрозів, так і системну інфекцію (Gallitelli, 2000) (табл. 1.3).

Табл.1.3 - Симптоматика вірусної інфекції CMV на рослинах-індикаторах

Рослина-індикатор	Симптоми
Лобода стінна (*Chenopodium murale*)	Світло-коричневі некрози у вигляді концентричних кілець
Лобода (*Chenopodium amaranticolor*)	Локальні некрози
Біб кінський (*Vicia faba L.)*	Локальні некрози
Огірок (*Cucumis sativus*)	Локальна реакція, деформація листків, жовта плямистість Системна мозаїка
Томат *(Lycopersicon esculentum*)	Системна реакція, хлорози
Фізаліс *(Physalis peruviana)*	Хлорози, системна реакція

Щириця білосніжна (*Amaranthus hypochondriacus*)	Системна реакція, мозаїка, локальні некрози
Махорка (*Nicotiana rustica)*	Локальні некрози, системна реакція, мозаїка, дефорація листкової пластинки
Тютюн бенджаміна (*Nicotiana benthamiana*)	Системна реакція, локальні некрози
Тютюн (*Nicotiana tabacum*)	Системна реакція, мозаїка, локальні некрози, листкова деформація

Через широке коло хазяїв, численні бур'яни можуть служити резервуарами для CMV та сприяти поширенню на посіви вірусів на початку сезону. Багаторічні, дворічні та зимові однорічні бур'яни, що містять CMV в коренях, бульбах та підземних органах протягом зими, включають звичайні ваточник (*Asclepias syriaca*), суріпа (*Barbarea vulgaris*), водяний хрін (*Rorippa islandica*) та льонок звичайний (*Linaria vulgaris*). Показано, що рослини *Stellaria media* є важливим перезимуючим джерелом CMV у Британії для салату. Важливо зазначити, що вірус на бур'янах часто не викликає жодних видимх симптомів. Багаторічна культура люцерни може служити резерватором вірусу (Gallitelli, 2000).

1.5 Філогенетична характеристика вірусу жовтої мозаїки квасолі

Багато штамів вірусу жовтої мозаїки квасолі відрізняються патогенністю, серологічними властивостями та генетичним різноманіттям. Перед тим як сиквенс нуклеотидних послідовностей став доступний діапазон господарів, симптоматика, серологія, білкові профілі та методи гібридизації нуклеїнових кислот були використані для з'ясування взаємозв'язків між потівірусами. Перший повний сиквенс послідовності гена *CP* був здійснений в 1986 році.

Генетичне різноманіття вірусу жовтої мозаїки квасолі до появи повного сиквенсу геному досліджувалось шляхом порівняння відсиквенованих послідовностей генів білка оболонки (*CP*) та геном білка VPg. Окрім, функції упакування генетичної інформації у віріони, блок CP також виконує функції руху від клітини до клітини в організмі хазяїна. За допомогою філогенетичного

аналізу послідовностей *CP* Wylie et al. поділяють штами вірусу на сім різних груп – шість політипічних і одну монотипічну (Wylie et al., 2008).

Кластеризація філогенетичних груп на основі гена *CP* тісно пов'язана зі рослиною-хазяїном, тому назви груп відповідають рослині, з якої первинно виділений ізолят. Найбільш генетично різноманітна політипічна група, яка має внутрішньогрупову різноманітність 0,061 нуклеотидних замін на сайт, містить ізоляти з восьми природніх хазяїв, до яких належать однодольні й дводольні рослини й називається групою General. Так, до прикладу, ізоляти виділені зі *L. angustifolius*, які викликають системні некрози та інші вірусспецифічні симптоми, належать до групи General. До неї також належать ізоляти зі рослин родин *Fabaceae, Iridaceae, Orchidaceae* з Азії, Австралії, Європи і північної Америки. Тільки ще одна політипічна група включає однодольні та дводольні хазяї, але має меншу внутрішньовидову різноманітність (від 0,019 до 0,045 нуклеотидних замін на сайт), що вказує на спеціалізацію до певного хазяїна. Інші п'ять груп названі за типом рослини-хазяїна – Monocot, Broad bean, Lupin, Canna, Pea, W. Ізоляти вірусів, виділені зі однодольних рослин-хазяїв з території Євразії, мають 0,019 нуклеотидних замін на сайт і належать до філогенетичної групи Monocot (Wylie et al., 2008). Всі види хазяїв всередині даної групи належать до культурних рослин, включно гладіолуси, які, здебільшого, розмножуються вегетативно. Тим не менше, ізоляти однодольних груп заражають і дводольні рослини, що зростають поблизу (Uga et al., 2004).

Філогенетичний аналіз, проведений на основі ділянки 5' NIb-CP 3' довжиною 768 п.н. чеських ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі, виділених зі гладіолусів, показав належність їх до трьох груп. Так, ізолят M71 BYMV був тісно пов'язаний зі ізолятами D288191, D837491 виділених зі *Nicotiana benthamiana* (Японія). Ізолят J95 BYMV проявляє спорідненість зі AB439729 (гладіолусний ізолят зі Японії) та AY 192568 (гладіолусний ізолят зі США). Ізолят N4 BYMV згрупований зі японськими ізолятами AB079782, AB097089, AB097090, AB079887, AB079886, китайським ізолятом AJ311371, ізолятом AY845012 виділеним зі еустоми (Тайвань) та AY845011, виділеним зі ванілі

(Індія). Філогенетичний поділ даних ізолятів на три групи також підтверджується і різними рівнями патогенності і прояву симптомів (Selvaraj, 2009).

До функцій вірусного білка VPg відносяться трансляція вірусного поліпротеїну шляхом зв'язування зі eIF4E, міжклітинний транспорт і визначення діапазону хазяїв. Однак, VPg рідше використовується для порівняння різних штамів у філогенетичному аналізі. Філогенетичний аналіз послідовностей VPg поділяє ізоляти BYMV на три політипічні й дві монотипічні групи. Даний поділ на групи теж корелює з природніми хазяями, але топології могли не відповідати тим, що утворені за аналізу гена *CP*. Так, до групи I належать чотири ізоляти *G. hybrida* з Японії та Північної Америки, які за класифікацією по білку CP відносяться до загальної або групи однодольних. Для даної групи характерні низькі показники різноманітності нуклеотидних замін - 0,020 (nt) та 0,031 (aa). Група II складалась зі ізолятів виділених зі бобових з території Південно-Західної Австралії з показниками внутрішньогрупового різноманіття 0.121 (нт) та 0.081 (ак). До групи III відносяться ізоляти люпину (*L. angustifolius, LP-2 from L. pilosus*) та ізолят S з *V. faba*. Генетичне різноманіття в цій групі становило 0,084 (нт) та 0,049 (ак). Група IV і V містила лише один ізолят, W і CS відповідно (рис. 1.9.).

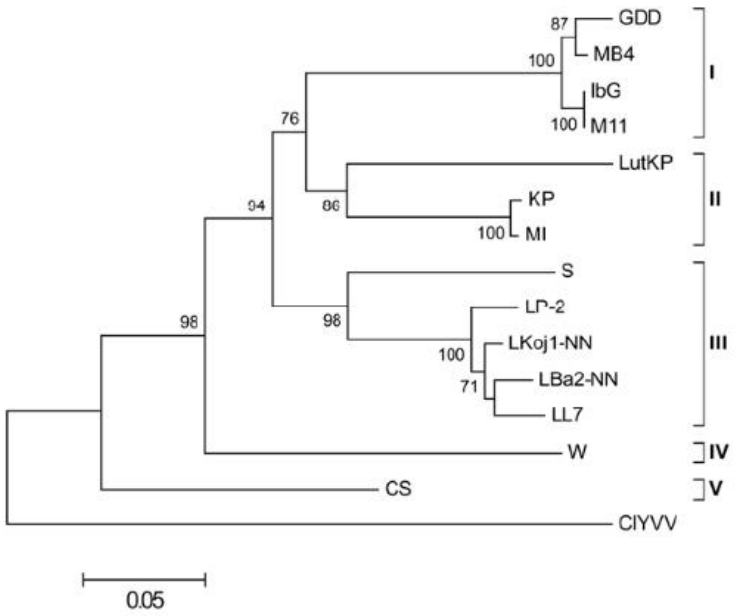

Рис. 1.9. Філогенетичні групи вірусу жовтої мозаїки квасолі створені на основі гена білка VPg (Wylie et al., 2008).

Технології сиквенування наступного покоління (NGS) швидко набули популярності завдяки швидкому отриманню цілих геномів вірусів рослин. З появою повногеномного сиквенсу вірусу жовтої мозаїки квасолі було запропоновано поділяти вірус на I-IX філогенетичні групи. Це пояснюється тим, що можливість дослідження повних геномів довела некоректність класифікацій заснованих на дослідженні лише окремих генів білків та природніх хазяїв.

Дослідження 17 ізолятів *L. angustifolius* з різними проявами симптомів на рослинах та двох ізолятів зі *L. cosentinii,* що проявляють на рослинах мозаїчні симптоми та листкові деформації, а також штами FB, LMBNN та LP вірусу, що зберігались у вигляді ліофілізованого рослинного матеріалу в Західно-Австралійській колекції рослин. Остаточні послідовності додались до European Nucleotide Archive (ENA) за номерами HG970847–HG970870. Філогенетичний аналіз порівнював області кодування 23 повних геномів вірусу жовтої мозаїки квасолі зі майже повним геномом clover yellow vein virus (рис.1.10.).

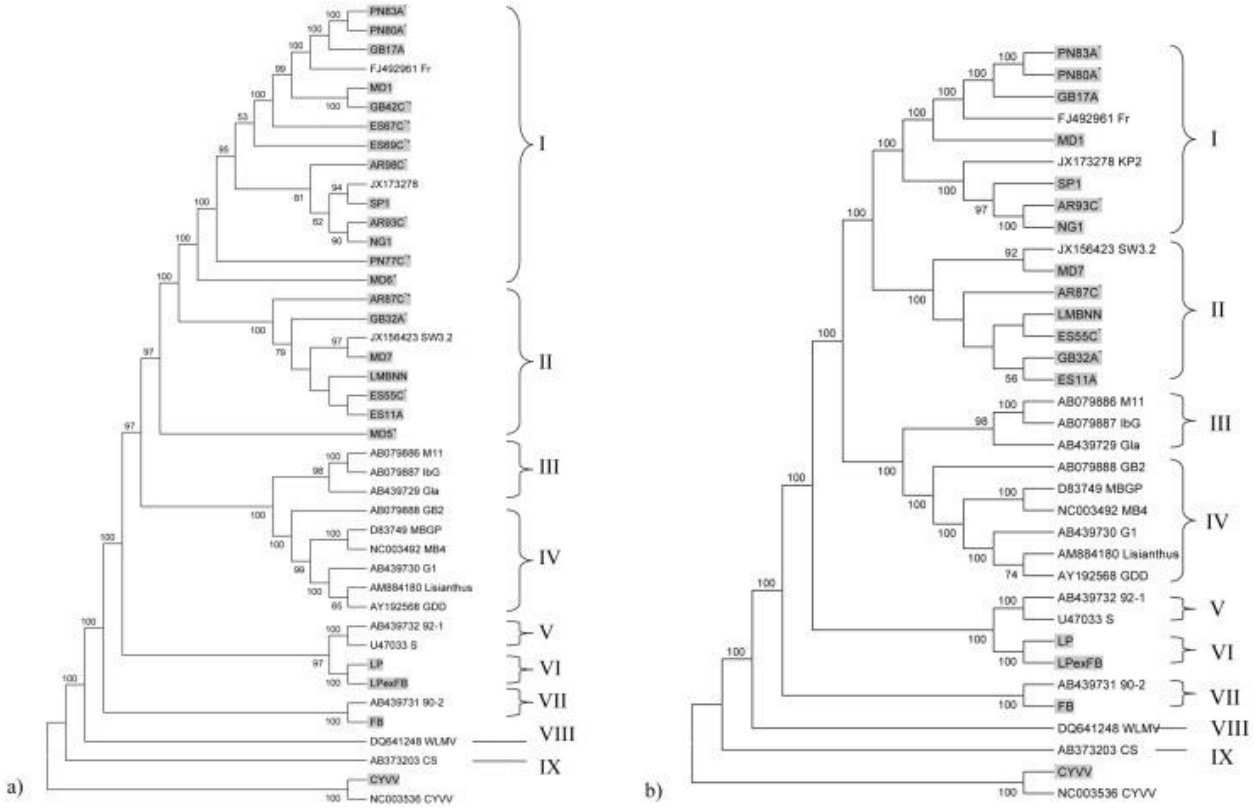

Рис. 1.10. Філограми суміжніх зв'язків отриманих в результаті вирівнювання кодуючих областей геномів вірусу жовтої мозаїки квасолі. Вирівнювання здійснювалось в MEGA 5.2.1 за допомогою ClustalW. Нові ізоляти виділені сірим кольором. a) – повні геноми вірусу зі draft sequences; b – повні геноми вірусу зі вилученими draft sequences (Kehoe et al., 2014).

За результатами даного дослідження діапазон вихідних хазяїв відрізняється в межах кожної групи. Група I складається зі представників однодольних та дводольних. Група II складається зі представників ізолятів зі двох видів однодольних та одного виду дводольних. Група III складається зі лише ізолятів однодольних рослин. Група IV складається зі представника невідомого первинного хазяїна ізоляту, а також двох однодольних ізолятів хазяїв та одного дводольного. Групи V-IX складаються з ізолятів вірусу виділених виключно зі дводольних рослин та належать до родин *Fabaceae* або *Gentianaceae* (рис. 1.11.). Таким чином, гладіолусні ізоляти за даною класифікацією належать до груп I і IV (Kehoe et al., 2014).

Original hosts of isolates within each phylogenetic grouping.

Phylogenetic group (old name)	Accession numbers	Dicot	Monocot
I (general)	FJ492961, JX173278, HG970847, HG970851, HG970851-52, HG970856-57, HG970860-62, HG970864-65, HG970865	*Lupinus angustifolius* [a] (6)[b], *L. cosentinii* (1)	*Diuris magnifica* (1), *Freesia* sp. (1)
II (general)	JX156423, HG970848, HG970850, HG970854-55, HG970858-59, HG970863	*L. angustifolius* (5), *L. cosentinii* (1)	*Diuris* sp. (1)
III (monocot)	AB079886, AB079887, AB439729	-	*Gladiolus hybrid* (3)
IV (general)	AB079888[c], D83749[c], NC003492[c], AB439730, AM884180, AY192568	*Eustoma russellianum* (1),	*Gladiolus* sp. (1), *Gladiolus hybrid* (1)
V(faba bean)	AB439732, U47033	*Trifolium pratense* (1), *Vicia faba* (1)	-
VI (lupin)	HG970866, HG970868	*L. pilosus*(1), *Vicia faba* (1)	-
VII (faba bean)	AB439731, HG970867	*V. faba* (2)	-
VIII (W)	DQ641248	*L. albus* (1)	-
IX (pea)	AB373203	*Pisum sativum* (1)	-

[a]Species from *Lupinus*, *Vicia* and *Trifolium* are from family *Fabaceae*. *Eustoma* is from family *Gentianaceae*, *Gladiolus* and *Freesia* are from family *Iridaceae*, *Diuris* is from family *Orchidaceae*.
[b]Numbers in parentheses represent the numbers of genomes with from this original isolation host.
[c]Denotes an unknown original host for that accession number.

Рис. 1.11. Філогенетичні групи BYMV та їх первинні хазяї (Kehoe et al., 2014).

Порівняння геномів вірусу жовтої мозаїки квасолі зі геномами вірусу пожовтіння жилок конюшини показали їх подібність 66,4–67,9%, що значно перевищує точку демаркації серед потівірусів. Це важливо, оскільки спочатку вірус пожовтіння жилок конюшини вважався штамом вірусу жовтої мозаїки квасолі (Wylie, 2014). Однак, деякі філогенетичні групи BYMV більш тісно пов'язані з вірусом пожовтіння жилок конюшини, ніж інші. Так, VIII та IX мали ідентичності лише 78,4–79,8% та 75,6–76,9% відповідно (Kehoe et al., 2014).

Стосовно філогенетичного аналізу гладіолусних ізолятів вірусу, то вони відносяться за класифікацією до групи IV. Так, найбільшу філогенетичну спорідненість гладіолусні ізоляти вірусу проявляють до ізолятів CK-GL2, G1, GDD, CKGL5, GB2, MB4, Lisianthus, Gla, MBGP, Vfaba2, що виділені в Індії, Японії, США, Тайвані. Більшість рекомбінацій детектується у ділянках 5-UTR, великої рамки зчитування, HC-Pro, P3N-PIPO, генів білків P3, 6K1, CI, VPg, CP, NIa-Pro, NIb, також рекомбінації присутні в ділянці 3'-UTR (Reddy et al., 2019).

Подальші дослідження нових повногеномних сиквенсів ізолятів гладіолусу вірусу жовтої мозаїки квасолі показують можливість поділу групи IV на дві підгрупи IVa та IVb. Досліджуючи ізоляти гладіолусів, виділених на території Індії (CK-GL1, CK-GL2, CK-GL4, CK-GL5), було виділено їх в окремий кластер групи IV. Більше того, використовуючи ізоляти CK-GL3 та CK-GL1,

встановлено чіткі біологічні відмінності, тому ізоляти були віднесені до підгруп IVa та IVb відповідно (рис.1.12.).

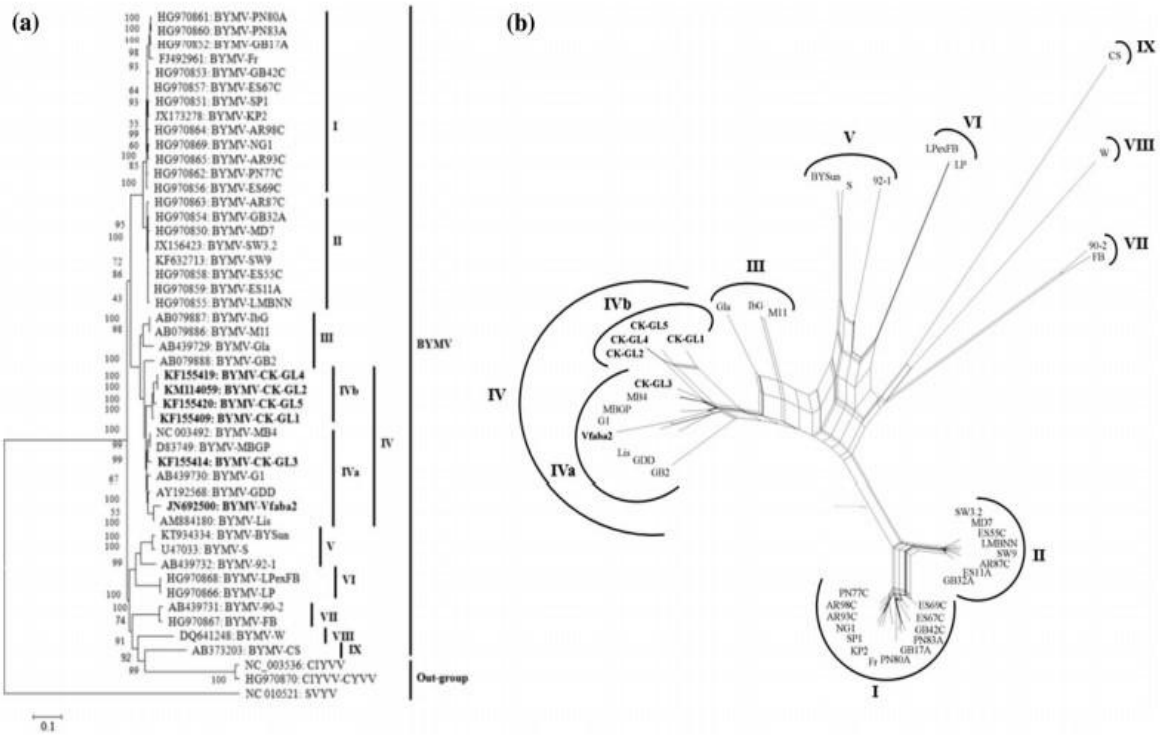

Рис. 1.12. Філограма що показує філогенетичні зв'язки між ізолятами BYMV (досліджувані ізоляти виділені жирним нарисом): A – філогенетичне дерево, створене за допомогою алгоритмів Neighbor-Join та BioNJ, відстані оцінені за Maximum Composite Likelihood (MCL); B - Філогенетичні мережі на основі 48 штамів BYMV (Kaur, 2017).

BYMV-CK-GL2 ізолят асоціюється з розвитком листкової мозаїки та «розривом кольору» квітки гладіолуса, а також з дистрофічними змінами бульбоцибулин. Ізоляти CK-GL1, CK-GL2, CK-GL4 та CK-GL5 викликають тяжкі симптоми на *Gladiolus sp., V. faba, Datura metel* і *Cyamopsis tetragonoloba*; на відмінну від ізолятів CK-GL3 та Vfaba2, які викликають легкі прояви інфекції (Kaur et al., 2015).

1.6. Філогенетична характеристика вірусу огіркової мозаїки

Вірус огіркової мозаїки має найбільший діапазон хазяїв, інфікуючи овочеві, фруктові та декоративні культури рослин. Серологічні дослідження вказують, що вірус огіркової мозаїки є антигенно гетерогенним. Прийнято виділяти дві серологічні групи, які називаються по-різному в залежності від методу аналізу: DTL і ToRS, U та N, I й II, WT та S (Chen et al., 2007). Поділ на серологічні групи був розширений на основі даних гібридизаційних аналізів з використанням компломентарних ДНК.

Різні ізоляти, які різняться діапазоном хазяїв та патогенністю, поділяють на три основні підгрупи: IA, IB та II (Berniak, 2009). Для представників підгруп характерне не рівномірне поширення у світі. Численні філогенетичні дослідження CMV показують, що в основному група IB включає ізоляти CMV з Азії та Близького Сходу, на відміну від групи IA та II, до яких належать ізоляти з різних країн та континентів, більшість з яких є ізолятами з Європи (Roossinck, 2002).

Важливо зазначити, що підгрупа та серологічна група використовуються як тотожні поняття, втім, до серологічної групи відносять за висновками, що базуються на антигенних властивостях вірусів, а підгрупа – це більш узагальнене поняття. Складнощі при класифікації виникають у тих унікальних випадках, коли ізоляти є природніми реасортантами двох кукумовірусів або штамів вірусу (Hsu et al., 2000).

Вірус огіркової мозаїки містить п’ять відкритих рамок зчитування (ORF), аналіз яких використовувався для побудування філогенетичних дерев. За результатами досліджень M. J. Roossinck побудова філогенетичних дерев на основі лише певних ORF не є достовірною, оскільки, через особливість вірусного геному CMV і здатність його до реасортації результати по ізолятах будуть значно різнитись в залежності від досліджуваної частини геному.

Дослідження РНК 3 ORF гена *CP* показало, що штами підгрупи IB мають азійське походження. Аналіз РНК 2 ORF показав чіткий поділ на 3 клади яким відповідають підгрупи IA, IB, та II. Розходження нуклеотидних послідовностей

в аналізі 2b ORF демонструє результати дуже подібні до 2a ORF. Проте, модель дивергенції амінокислот різко відрізняється за довжиною гілок, особливо, у відстані від загально предка. Білок 2b є багатофункціональним білком і бере участь у русі вірусу всередині рослинного організму, індукції сипмтомів, супресії сайленсингу і є детермінантою патогенності. Тому, через високий рівень взаємодії даного білка зі хазяїном він регулює специфічність до рослини-хазяїна. Ця особливість білка 2b дозволяє йому бути значно більш толерантним до нуклеотидних замін й мати найбільший показник варіабельності серед кодуючих регіонів (Nouri et al., 2014).

1a ORF кодує метил-трансферазу і геліказні мотиви. Оцінка філогенії 1a показує серйозні розбіжності між групами I та II. Однак, відмінність між підгрупами IA і IB не така очевидна і вказує на відмінну від інших РНК еволюційну історію. Сигнали вірусної реплікації розміщені в промотарах на 3` кінці (+) та (–) ланцюгів. Промотор на (–) ланцюгу складається з консервативної ділянки 3`NTP (Roossinck, 2002).

Ізоляти всередині однієї групи мають понад 90% рівень ідентичності нуклеїнових послідовностей. Подібність нуклеотидних послідовностей між підгрупами IA та IB складає 92-95%. Рівень ідентичності між I та II групами складає від 67-77% (Kumari, 2013). Ідентичність штамів всередині однієї групи відрізняється на 2-3%.

Розповсюдження підгруп у світі також різниться. Так, найчастіше детектуються та мають найбільше поширення у світі підгрупи IA та II, в той час як розповсюдження IB обмежене Азією (Nouri, 2014). Втім, на даний момент представники підгрупи IB детектуються і в Італії, Греції та Бразилії (Sclavounos, 2016).

Вірус огіркової мозаїки може зазнавати швидких генетичних змін і тому детектуються перерозподіл РНК між підгрупами. Більше того, рекомбінації в 5’ та 3’ NTR між ORF 3a і 3b та наявність сателітних РНК в природніх популяціях CMV є ще одним джерелом мінливості вірусу. Таким чином, вірус огіркової мозаїки – гетерогенний вид зі значною кількістю варіацій серед ізолятів. Така

властивість надає вірусу можливість швидко розповсюджуватись у світі й адаптуватись до нових хазяїв та середовищ (Chen, 2007).

Гладіолусний ізолят вірусу огіркової мозаїки Lucknow (DQ295914) детектований у Індії за допомогою специфічних праймерів гена CMV-CP. Філогенетичне дослідження фрагмента показав 99% гомологію з ізолятом виділеним зі США (Dubey, 2008). Даний ізолят цікавий тим, що він належить до підгрупи IA, хоч для Індійського району найбільш характерними є ізоляти, що відносяться до підгрупи IB. Це може свідчити, що даний ізолят привезений в Індію з США. В подальшому на рослинах *Gladiolus dalenii* на території Індії вдалось ідентифікувати ізоляти Glad-NBRI-10 (KP713797) та Glad-NBRI-4 (KP713798), які кластеризуються з IA підгрупою (Raj et al., 2017). У базі даних NCBI GenBank доступні послідовності також нідерландського гладіолусного ізолята GPP (AJ131623), що належить до підгрупи IA, а також корейсього ізолята ABI (L36525), який кластеризується з підгрупою IB. Таким чином, кількість доступних сиквенсів гладіолусних ізолятів у базі налічує шість, більшість з яких має індійське походження.

1.7. Характеристика змішаної інфекції у рослин

Віруси, що інфікують широке коло рослин, мають значний потенціал для взаємодії з іншими фітопатогенами. Змішана інфекція модулює розвиток симптомів двома способами, спричинюючи синергічну або антагоністичну взаємодії (Syller J., 2012.). Раніше повідомлялось, що спільне інфікування віруса огіркової мозаїки з іншими вірусами (*Crinivirus, Potexvirus, Potyvirus, Tobamovirus*), у випадку інфікування представників гарбузових або пасльонових, порушує синергізм у бік більшого накопичення вірусу огіркової мозаїки і пригнічення інших (Palukaitis & Garcı´a-Arenal, 2003). Втім, одночасне інфікування cucumber mosaic virus (CMV) з blackeye cowpea mosaic virus (BlCMV) рослин *Vigna unguiculata* призвело до значно жорсткіших симптомів в порівнянні з моноінфікуванням одним вірусом (Fajinmi, 2019). Антагоністичні взаємодії, які проявлялись у пригніченні титрів CMV у разі спільного

інфікування зі pepino mosaic virus (PepMV) томатів, змінювали свій характер при додатковому інфікуванні southern tomato virus (STV). Так, у випадку потрійного інфікування CMV, PepMV, STV рослин томатів спостерігалось зростання титру CMV та посилення симптомів на ранніх стадіях зараження, в той час як PepMV лише посилював симтоми на рослинах. Встановлено, що моноінфікування томатів southern tomato virus (STV) не викликає жодного прояву симптомів і супроводжується низькою кількістю vsiRNAs, а високе число vsiRNAs і прояв симтомів спостерігається лише у випадку змішаної інфекції (Gonzales et al, 2021).

Відомо, що створення резистентних сортів є основним методом боротьби з вірусними інфекціями. Втім, повідомляється про втрату резистентності до вірусів у випадку змішаної інфекції. Так, вірусостійкі сорти втрачають свою резистентність до turnip mosaic virus (TuMV) за умов коінфікування зі cucumber mosaic virus (CMV) і cauliflower mosaic virus (CaMV) (Shourabi et al., 2019). При інфікуванні резистентного штаму огірків вірусом огіркової мозаїки в змішаній інфекції зі zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), відбувалось накопичення CMV у рослинах без візуальних проявів симптомів (Wang et al., 2004). Таким чином, синергізм може спостерігатись у рослин, які є толерантними до одного з двох вірусів, або при відновлені дефектних функцій одного з вірусів.

Основну роль у синергізмі відіграє білок 2b через його здатність супресувати сайленсну активність. Так, вплив білка 2b був продемонстрований на трансгенних рослинах тютюну при коінфекції вірусом огіркової мозаїки та вірусом тютюнової мозаїки. Подальші дослідження показали, що стрімкий розвиток симптомів на молодих рослинах тютюну відбувся у результаті спільної дії білка 2b CMV та реплікази вірусу тютюнової мозаїки на сайленсинг генів (Siddiqui et al., 2008). Втім, наприклад, на томатах у випадку коінфекції вірусом огіркової мозаїки та Y-вірусом картоплі спостерігається активне накопичення CMV та пригнічення реплікації Y-вірусу картоплі. При створенні мутантного вірусу огіркової мозаїки, що не містив гена білка 2b, патогенез CMV продовжувався лише при коінфекції зі Y-вірусом картоплі завдяки використанню його механізмів (Ryang et al, 2004). Це свідчить, що вірусні білки,

такі як 2b, відіграють важливу роль у поведінці вірусів при коінфекції рослинних хазяїв.

РОЗДІЛ 2
ОБ‘ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об’єкти

Гладіолусні ізоляти вірусу жовтої мозаїки квасолі, вірусу огіркової мозаїки.

Рослини гладіолусів (*Gladiolus hybridus*) селекційних сортів Авард, Легенди Києва, Пам’ять, Сільва, Мереживо, Міраж, Леда, Сіянець Коричневий, Евер Вальтер, Віла Лієма, Нью Дей, Вій, Веєр, Примадонна, Пітер Пірс, Вікторія Сквирська, Оскар, Лайф Оак, Міс Грін, Прісцилла, Грін Стар, Ліловий Бархат, Йелов Ейдж, Наталка Полтавка, Лебедина Зграя, Рожевий Каскад, Фаворит та неідентифіковані сортові форми.

2.2. Матеріали, реактиви та прилади, які використовувались у роботі

- 96-лункові планшети (“Labsystems”, Фінляндія);
- кювети кварцеві для спектрофотометрії (“Hitach” Японія);
- карборунд (Броварський завод алюмінієвої металургії);
- поліетиленгліколь 6000 (“Serva”, США);
- N-n-нітрофенілфосфат (“Serva”, США);
- набір маркерних ДНК для ЗТ-ПЛР(Cleaver Scientific, Велика Британія);
- EDTA, гліцин, тріс; акриламід, біс-акриламід (“Sigma”, США);
- неорганічні компоненти (“Альфарус”, Україна; “Симбіас”, Україна);
- етанол (“Укрзооветромпостач”, Україна);
- тест-системи для імуноферментного аналізу до CMV, BYMV, TRSV (LOEWE, Німеччина);
- тритон Х-100 - (“Sigma”, США);
- електронний мікроскоп JEM 1230 (JEOL, Японія);
- низькошвидкісна центрифуга К-23;
- Ампліфікатор
- рідер (Termo Labsystems Opsis MR, США).

2.3. Візуальна діагностика

Відбір зразків проводили у літньо-осінній період 2019-2021 рр. на території Київської, Полтавської, Сумської, Херсонської, Львівської, Житомирської областей. Візуальна діагностика включала в себе виявлення симптомів на листках, квітах та бульбоцибулинах, таких як: хлоротична штрихуватість і мозаїка на листках, «розриви» кольору на пелюстках квітки, зміна кількості квітів у квітконосі, відсутність цвітіння, зменшення кількості новоутворених бульбоцибулин на материнській рослині або їх відсутність. Листки, квіти та бульбоцибулини гладіолусів з симптомами, а також візуально здорові рослини, були відібрані для подальшого дослідження.

2.4. Імуноферентний аналіз

Твердофазний імуноферментний аналіз у варіанті DAS (double antibody sandwich – подвійний сандвіч) проводили в полістиролових планшетах “Labsystems” у трьох повторностях. У роботі використовували комерційні сироватки до вірусу жовтої мозаїки квасолі, вірусу огіркової мозаїки та вірусу кільцевої плямистості тютюну (Loewe, Німеччина).

Аналіз включав у себе такі етапи:

1. Наносили АТ1 на карбонатному буфері, pH 9,8 та інкубували 4 год при температурі 37˚С. Відмивали 3 рази по 5 хв буфером відмивки (0,1М PBS+ tween-20, pH 7,4).
2. Вносили АГ (рослинний матеріал розтирали в буфері зразку, центрифугували при 3 тис об/хв. протягом 20 хв., відбирали надосад і використовували його для постановки аналізу), а також вносили позитивний і негативний контролі (в розведенні 1:20). Інкубували протягом ночі при 4˚С. Відмивали 3 рази по 5 хв буфером відмивки (0,1М PBS+ tween-20, pH 7,4).
3. Наносили АТ2 на буфері для розведення АТ. Інкубували протягом 4 годин при температурі 37 ˚С. Відмивали 3 рази по 5 хв буфером відмивки (0,1М PBS+ tween-20) і 1 раз 0,1М PBS.

4. Вносили субстратний буфер для лужної фосфатази з хромогеном (97 мл диетаноламіна доводили до 1 л водою. pH доводили за допомогою HCl до значення 9,8). В якості субстрату використовували N-n-нітрофенілфосфат, С=1мг/мл. Результати реєстрували на рідері Termo Labsystems Opsis MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405 / 630 нм.

За достовірні приймали значення, які перевищували негативний контроль щонайменше у три рази.

2.5. Виділення тотальної РНК

Для виділення тотальної РНК з листків гладіолусів було використано GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, USA), яке включало в себе такі етапи:

1. Наважку 100 мг гомогенізували у рідкому азоті.
2. Переносили гомогенізовану наважку у 1,5 мл епендорф з додаванням до неї 500 мкл Lysis Solution.
3. Ретельно перемішували на вортексі 10-20 с.
4. Ставили епендорфи на водяну баню, розігріту до 56 ºС на 3 хв.
5. Низькошвидкісне центрифугування впродовж 5-ти хв при швидкості 14 тис. об\хв.
6. Відібрали надосад (приблизно 450-550 мкл) та перенесли його у чистий 1,5 мл епендорф.
7. Додали 250 мкл етанолу (96%) та пропепітували суміш.
8. Переносили до колонки з collection tube.
9. Низько-швидкісне центрифугування впродовж 1-ї хв при швидкості 11 тис. об\хв.
10. Зливали розчин та повернули колонку у collection tube.
11. Додавали до колонки з розчином 700 мкл Wash Buffer 1.
12. Низько-швидкісне центрифугування впродовж 1-ї хв при швидкості 11 тис. об/хв.

13. Викинули collection tube.

14. Ставили колонку у чисту 2 мл collection tube.

15. Додали до колонки з розчином 500 мкл Wash Buffer 2.

16. Низько-швидкісне центрифугування впродовж 1-ї хв при швидкості 11 тис. об/хв.

17. Вилили розчин та поставили колонку назад у collection tube.

18. Додали до колонки з розчином 500 мкл Wash Buffer 2.

19. Низько-швидкісне центрифугування впродовж 1-ї хв при швидкості 11 тис. об/хв.

20. Викинули collection tube з розчином та перенесли колонку у чистий 1,5 мл collection tube.

21. Додали до колонки 50 мкл стерильної H_2O.

22. Низько-швидкісне центрифугування впродовж 1-ї хв при швидкості 11 тис. об/хв.

23. Додали до колонки 50 мкл стерильної H_2O.

24. Низько-швидкісне центрифугування впродовж 1-ї хв (однієї хв) при швидкості 11 тис. об/хв.

25. Вийняли колонку, у епендорфі знаходилась РНК.

Отриману РНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією.

2.6. Зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція

Для синтезу кДНК було використано RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, USA). Етапи ампліфікації були здійснені з використанням термоциклера Genetic Research Instrumentation LTD (Велика Британія). При проведенні ПЛР використовували специфічні олігонуклеотидні праймери для ампліфікації ділянки розміром 590 п.н. капсидного білка вірусу жовтої мозаїки квасолі - BYMV-CP-5: 5′-GAACTGTTGGAACGTTTTCAATTCC-3′ та BYMV-CP-3: 5′-TCTGTTCCAACATTGCCATCAAG -3′; для вірусу огіркової мозаїки – CMV-f: 5′-TATGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCA-3′ і CMV-r: 5′-

TTTTAGCCGTAAGCTGGATGGACAACCC-3′ (Wang et al. 2017; Ahmed & Fath-Allah, 2011).

Ампліфікацію ділянки гена капсидного білка BYMV та CMV здійснювали, використовуючи буфер Dream Taq PCR Master Mix (2x) (містить Dream Taq DNA polymerase, 2X Dream Taq buffer, 0,4 mM кожного із dNTP та 4 mM $MgCl_2$), 7,5 мкл стерильної води, 1 мкл кожного праймера (10 μM) та 3 мкл кДНК. Очікуваний розмір ділянки ампліфікації для вірусу жовтої мозаїки квасолі 590 п.н., для вірусу огіркової мозаїки – 500 п.н.

Режим ампліфікації для BYMV наступний: денатурація кДНК (3 хв 95^0C), наступні 30 циклів 30с за 95^0C денатурація, відпал праймерів (30 с за 62^0C), синтез комплементарних ланцюгів ДНК (1 хв за 72^0C), елонгація – 72^0C 5 хв.

Режим ампліфікації для CMV: денатурація кДНК (3хв 95^0C), наступні 30 циклів 30с за 95^0C денатурація, відпал праймерів (30 с за 56^0C), синтез комплементарних ланцюгів ДНК (1 хв за 72^0C), елонгація – 72^0C 5 хв.

В якості негативного контролю брали РНК, виділену зі здорових рослин гладіолусів.

2.7. Електрофорез нуклеїнових кислот

Аналіз виділеної тотальної РНК та продуктів ПЛР-ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу в 1,5%-му розчині агарози з додаванням бромистого етидію в концентрації 0,5 мкг/мл, використовуючи маркер ДНК CSL-MDNA-100bp (Cleaver Scientific, United Kingdom) в режимі 15 В/см протягом 20 хв з подальшою візуалізацією з використанням ультрафіолетового світла.

Агарозний гель готували, використовуючи 1,5% розчин агарози для електрофорезу (Sigma) в електрофорезному буфері (TBE). Для цього брали 20 мл TBE буферу та 300 мг агарози.

Нагрівши суспензію в мікрохвильовій печі, потім охолоджували до 50 °C та додавали бромистій етидій до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл.

Наливали в форму з зафіксованим гребенем розчин агарози. Після того як гель застиг 30-45 хвилин при кімнатній температурі, обережно витягнули гребінку. Форму з агарозою помістили в прилад для електрофорезу та додавали достатню кількість буферу, так щоб гель ним покрився.

До 12 мкл кожного зразку додали по 3 мкл буферу зразка. У випадку маркерів ДНК 6 мкл буферу та 6 мкл маркерів.

Проби вносли по 12 мкл в кожну лунку гелю. Електрофорез проводили протягом 1 години. Результат зафіксували фотографуванням при ультрафіолетовому випромінюванні.

2.8. Трансмісійна електронна мікроскопія

Вивчення морфології вірусних часток та встановлення їх локалізації у рослинах проводили за допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії. Сік із вірусінфікованих рослин гладіолусів наносили на сітки з плівкою-підкладкою, виготовленою з 0,2% розчину формвара на дихлоретані. Негативне контрастування препаратів проводили 2% водним розчином фосфорно-вольфрамової кислоти протягом 2 хв (Салига і Снітинський, 1999). Препарати досліджували за допомогою електронного мікроскопу JEM 1400 (JEOL, Японія). При визначенні модальної довжини вірусних часток за 100% приймали загальну кількість віріонів, які були видимі у полі зору електронного мікроскопу.

2.9. Метод біологічного тестування

Для проведення методу були взяті 11 видів молодих здорових рослин у фазі двох справжніх листків:

- квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сортів Зіронька, Калинка, Червона шапочка, Дніпрянка, Борлото, Несподіванка;
- соя (*Glycine max Moench.*) сорт Гімо;
- гарбуз (*Cucurbita moschata*) сорт Берегиня;
- тетрагонія (*Tetragonia tetragonioides*);

- огірок (*Cucumis sativus*) сортів Джерело, Конкурент;
- вігна (Vigna unguiculata) сорту Макарена;
- кабачок (*Cucurbita pepo var. Giraumontia*) сорт Аспірант;
- томат (*Lycopersicon esculentum*) сорту Новинка Придністров'я;
- горох (*Pisum sativum*) сорту Шеститижневий;
- махорка (*Nicotiána rústica*);
- дурман (*Datura stramonium*);

В якості інфекційного матеріалу використовували сік хворих рослин гладіолусів. Наважку рослинного матеріалу (5-10 г) подрібнювали і розтирали в ступці з додаванням 0,05 М боратного розчину (pH 8,3) у співвідношенні 1:2 для вірусу жовтої мозаїки квасолі. Для гладіолусів, уражених вірусом огіркової мозаїки додавали 0,1 М PBS з pH 7,4 у співвідношенні 1:2.

Механічне ураження проводилось на молодих рослинах у фазі двох справжніх листків. На листкову пластинку, посипану карборундом, наносили інфекційний матеріал, акуратно розтираючи його по площині листка.

За негативний контроль було використано рослини, на які, наносили розчин 1 - 0,05М боратний розчин та розчин 2 - 0,1 М PBS.

Через 30 хв вірусний матеріал та карборунд змивався дистильованою водою, а сама рослина поміщувалась у темне, неосвітлене місце на одну добу. Біологічне тестування проводилось в літньо-осінній період в умовах закритого ґрунту при тривалості світлового дня 16 год. та температурному режимі від 20 до 24 °С. Врахування результатів здійснювали на 7-21 день з моменту механічної інокуляції.

Для підтвердження інфекційної природи симптомів проводили механічне зараження здорових рослин гладіолусу сорту Пам’ять в лабораторних умовах. Подрібнений інфекційний рослинний матеріал гладіолусу зі додаванням 0,1М фосфатного буфера pH 7,4 у співвідношенні 1:2, був використаний для механічної інокуляції квасолі сорту Червона шапочка. Після появи системної реакції на квасолі та підтвердження наявності в ній антигенів BYMV і CMV методом ІФА, інфекційним соком з квасолі механічно уражували рослини

здорових гладіолусів в умовах теплиці. Наявність вірусів у гладіолусах перевіряли методами ІФА та ЗТ-ПЛР.

2.10. Виділення ПЛР-продуктів із агарозного гелю. Сиквенування

ПЛР-продукти були очищені від агарозного гелю з використанням Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo research, США) з дотриманням етапів протоколу:

1. Стерильним скальпелем вирізали продукти ампліфікації і переносили в стерильний 1,5 мл пробірку типу "Eppendorf".
2. Додали Agarose Dissolving Buffer (ADB) в значені об'єму втричі більшому, ніж об'єм вирізаного агарозного гелю з продуктом ампілфікації.
3. Інкубацію проводили за температури +37-55 ^{0}C протягом 5-10 хв.
4. Утворену суміш перенесли до Zymo-Spin™ Column поміщену в епендорф.
5. Центрифугували при 12000 об/хв 60 сек.
6. Додали 200 µl буферу відмивки (DNA Wash Buffer) та центрифугували проягом 30 сек при 12000 об/хв.
7. Додали 6 µl буферу для елюції (DNA Elution Buffer) до матриці Zymo-Spin™ Column та перемістили до чистого 1,5 мл епендорфа з подальшим центрифугуванням протягом 60 сек при 12000 об/хв.

Виділені з гелю ПЛР-продукти були сиквеновані на приладі 3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems HITACHI) з використанням BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems).

2.11. Філогенетичний аналіз

Ідентифікацію та порівняння отриманих послідовностей проводили за допомогою BLAST-аналізу з використанням вірусних послідовностей, доступних у базі NCBI GenBank (http:// www.ncbi.nlm.him.gov). Філогенетичний аналіз послідовностей гена *CP* українських гладіолусних ізолятів BYMV і CMV, здійснювали за допомогою програмного забезпечення MEGA X (Kumar et al., 2018). Вирівнювання послідовностей здійснювали за допомогою програми

Clustul W, вбудованої у MEGA X. Філогенетичні дерева конструювались методом зв'язування найближчих сусідів (Neighbor-Joining tree, NJ) (Saitou & Nei, 1987) та методом максимальної правдоподібності (maximum likelihood, ML) (Huelsenbeck & Rannala, 1997) з використанням моделі Jukes-Cantor як найбільш оптимальної**.** Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп тест з 1000 бутстреп реплікаціями (Felsenstein, 1985). Peanut stunt virus, ізолят ER (Ac No NC_002040) був використаний у якості outgroup для вірусу огіркової мозаїки, clover yellow vein virus (Ac No NC_003536) для вірусу жовтої мозаїки квасолі (Naidu et al., 1995).

Відсоток подібності нуклеотидних послідовностей досліджуваних ізолятів вірусів гладіолусів були представлені як кольорові блоки, використовуючи програмний пакет SDT v.1 software (Sequence Demarcation Tool Version 1.1) (Muhire et al., 2014).

Порівняння аміноксилотних послідовностей здійснювалось за допомогою програмного забезпечення BioEdit 7.2.5 (Alzohairy, 2011).

2.12. Статистична обробка даних

Статистична обробка результатів ЕМ та ІФА проводилася з врахуванням стандартного відхилення:

$$\mathbf{X} = X \pm A\sigma$$

$$X = (X1 + X2 + \ldots + Xi) / i$$

$$A = \left| Xmax - X \right| = \left| Xmin - X \right|,$$

де X – достовірне значення довжини віріону/ значення оптичної густини рідера довжини хвилі 405 нм; X – середнє арифметичне виміряних значень довжини віріону/ значення оптичної густини; X1 … Xi; σ – стандартне відхилення.

Крім цих методів використовували можливості програмного забезпечення Prizm 8 та MEGA X. Для статистичної оцінки філогенетичного аналізу застосовували метод бутстреп-аналізу (Bootstrap) з числом реплікацій 1000, за допомогою якого оцінювали достовірність розміщення кожного таксона на дендрограмі (Felsenstein, 1985).

РОЗДІЛ 3
БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАЇНСЬКИХ ГЛАДІОЛУСНИХ ІЗОЛЯТІВ BYMV І CMV

3.1. Виявлення вірусспецифічних симптомів у насадженнях гладіолусів

Візуальна діагностика насаджень гладіолусів з приватних колекцій здійснювалась в період з 2019-2021 рр. Територія дослідження включала в себе Київську, Полтавську, Сумську, Херсонську, Львівську, Житомирську області. У результаті були виявлені сортові форми гладіолусів з ознаками вірусного ураження. Сортове охоплення включає в себе 26 сортів та сортозразки гладіолусів (табл. 3.1).

Табл. 3.1 - Характеристика сортів гладіолусів та симптомів, що використані в дослідженні.

№	Сорт	Характеристики сорту	Симптоматика	Місце відбору зразків	Рік відбору зразків
1	Аварда	Висота стебла до 150 см. Великоквітковий; квіти сильногофровані, біло-кремового забарвлення	штрихувата мозаїка на листках	м. Київ, Київська обл.	2019
2	Вій	Великоквітковий; квіти сильногофровані, насиченого коричневого забарвлення; 2001 року інтродукції (Ященко-Тимченко)	штрихувата мозаїка на листках, деформація забарвлення квітки	м. Київ, Київська обл.	2019

3	Веєр	Висота стебла до 160 см. Великоквітковий; квіти сильногофровані, чорвоно-малинового забарвлення; 1995 року інтродукції (Лобзанов)	штрихувата мозаїка на листках, деформація забарвлення квітки	м. Київ, Київська обл.	2019
4	Примадонна	Висота стебла до 150 см. Великоквітковий; квіти гофровані, рожево-морквяні, лососеві; 2000 року інтродукції (Мурін)	штрихувата мозаїка на листках	м. Київ, Київська обл.	2019
5	Міраж	Висота стебла до 160 см. Великоквітковий; квіти гофровані, біло-лимонні з рожевим відтінком ближче до центру квітки; 2018 року інтродукції (Крашенніков)	штрихувата мозаїка, деформація забарвлення квітки	м. Київ, Київська обл.	2019
6	Мереживо	Великоквітковий; квіти бахромчасті, лимонного кольору;	штрихувата мозаїка на листках, деформація забарвлення квітки	м. Київ, Київська обл.	2019
7	Нью Дей	Великоквітковий; квіти злегка гофровані, рожеві;	штрихувата мозаїка на листках, деформація забарвлення квітки	м. Київ, Київська обл.	2019

8	Сіянець 2092	Сортова форма на етапі селекції; середньоквітковий; квіти злегка гофоровані, рожево-коралові;	штрихувата мозаїка на листках, деформація забарвлення квітки	м. Київ, Київська обл.	2019
9	Легенди Києва	Висота стебла до 150 см. Великоквітковий; квіти гофровані, лимонно-жовті	штрихувата мозаїка на листках	м. Київ, Київська обл., Полтавська обл.	2019, 2020, 2021
10	Леда	Висота стебла до 150 см. Великоквітковий; квіти злегка гофровані, рожеві.	штрихувата мозаїка на листках	м. Київ, Київська обл., Полтавська обл.	2019, 2020
11	Сільва	Великоквітковий; квіти злегка гофровані, пурпурово-бузкові з білими краями. Інтродукція 2010 року (Лобазнов)	штрихувата мозаїка на листках	м. Київ, Київська обл., Полтавська обл.	2019, 2020
12	Вікторія Сквирська	Великоквітковий; квіти з гладкими пелюстками, лососеві.	штрихувата мозаїка на листках, деформація забарвлення квітки	Білоцерківський р-н., Київська обл., Полтавська обл.	2020, 2021
13	Пам’ять	Середньоквітковий; гібридна форма Primulines; квіти з гладкими пелюстками, рожеві	штрихувата мозаїка на листках, деформація забарвлення квітки	Полтавська обл., м. Київ, Київська обл.,	2019, 2020, 2021
14	Сіянець Коричневий	Сортова форма на етапі селекції; середньоквітковий; квіти з гладкими	штрихувата мозаїка на листках,	м. Київ, Київська обл.,	2019, 2020

		пелюстками, світло-коричневі	деформація забарвлення квітки	Полтавська обл.,	
15	Оскар	Висота стебла до 150 см. Великоквітковий; квіти з гладкими пелюстками, насичено червоного кольору	штрихувата мозаїка на листках, відсутність цвітіння	Яворівський р-н, Львівська обл.	2021
16	Прісцилла	Висота стебла до 150 см. Великоквітковий; квіти гофровані, трьохколірні – білі з рожевими краями пелюстки і жовтим забарвленням до центру	візуально здорові рослини	Яворівський р-н, Львівська обл.	2021
17	Міс Грін	Висота стебла до 120 см. Великоквітковий; квіти з гладкими пелюстками, ніжно-зеленого кольору	візуально здорові рослини	Яворівський р-н, Львівська обл.	2021
18	Лайф Оак	Висота стебла до 110 см. Великоквітковий; квіти з гладкими пелюстками, яскраво-оранджеві	штрихувата мозаїка на листках, відсутність цвітіння	м.Львів, Львівська обл.	2021
19	Грін Стар	Висота стебла до 100 см. Великоквітковий; квіти гофровані, салатні	штрихувата мозаїка на листках, відсутність цвітіння	м.Львів, Львівська обл.	2021
20	Ліловий Бархат	Великоквітковий; квіти з гладкими пелюстками, насичено сині; 1996 року інтродукції (Мірошниченко)	штрихувата мозаїка, деформація забарвлення квітки	Київська обл.	2021

21	Пітер Пірс	Висота стебла до 110 см. Великоквітковий; квіти з гладкими пелюстками, абрикосові	штрихувата мозаїка, деформація забарвлення квітки	Житомирська обл.	2020
22	Йелов Ейдж	Висота стебла до 140 см. Великоквітковий; квіти гофровані, лимонні	візуально здорові рослини	Київська обл.	2020
23	Наталка Полтавка	Висота стебла до 110 см. Великоквітковий; квіти з гладкими пелюстками, червоні	візуально здорові рослини	Полтавська обл.	2020
24	Лебедина Зграя	Висота стебла до 140 см. Великоквітковий; квіти сильногофровані, біло-кремового забарвлення	візуально здорові рослини	Полтавська обл.	2020
25	Рожевий Каскад	Висота стебла до 110 см. Великоквітковий; квіти з гладкими пелюстками, рожеві	візуально здорові рослини	Полтавська обл.	2021
26	Фаворит	Висота стебла до 140 см. Великоквітковий; квіти сильногофровані, персикові	візуально здорові рослини	Київська обл.	2021
27	Сортозразки Київщина	Гладіолуси без чітко визначеного сорту. Різні за забарвленням, формою квітів та іншими характеристиками сортів.	штрихувата мозаїка, деформація забарвлення квітки	Броварський р-н., Васильківський р-н., Обухівський р-н., Фастівський р-н., Київська обл.	2019, 2020, 2021

28	Сортозразки Полтавщина	Гладіолуси без чітко визначеного сорту. Різні за забарвленням, формою квітів та іншими характеристиками сортів.	штрихувата мозаїка, деформація забарвлення квітки	Полтавська обл.	2019, 2020, 2021
29	Сортозразки Сумщина	Гладіолуси без чітко визначеного сорту. Різні за забарвленням, формою квітів та іншими характеристиками сортів.	штрихувата мозаїка, деформація забарвлення квітки	Охтирський р-н., Сумська обл.	2019, 2020
30	Сортозразки Херсонщина	Середньоквітковий; квіти з гладкими пелюстками, червоні	штрихувата мозаїка на листках, відсутність цвітіння	Скадовський р-н., Херсонська обл.	2020
31	Сортозразки Львівщина	Гладіолуси без чітко визначеного сорту. Різні за забарвленням, формою квітів та іншими характеристиками сортів.	штрихувата мозаїка, деформація забарвлення квітки	Золочівський р-н., Пустомицький р-н., Львівська обл.	2019, 2020,

Відбір зразків проводився в літньо-осінній період – час активного росту і квітування гладіолусів. Оскільки, відомо, що візуальні симптоми можуть не проявлятись, нами також було відібрано зразки рослин, що не мали видимих ознак ураженості вірусом (Navalinskiene and Samuitene, 2004).

Для оцінки небезпеки розповсюдженості вірусних патогенів на інші чутливі декоративні рослини були відібрані зразки сортових канн (*Canna sp.*) та ірисів (*Iris sp.*), що зростали поруч з гладіолусами з ознаками вірусної інфекції на території Київської області.

Відібрані зразки гладіолусів зростали у відкритих і закритих ґрунтах в різних кліматичних умовах. Так, для посівних сезонів на Полтавщині характерне жорстке літо з високою середньодобовою температурою, низькими показниками зволоженості ґрунту та переважанням сонячної погоди над хмарною. Початок осінніх сезонів 2019-2021 рр. був під впливом сильної посухи, яка тривала до жовтня. Херсонська область в літній сезон 2020 р. характеризувалась найнижчою вологістю ґрунту - 16% в Україні, та входила до переліку областей з найвищими температурними показниками (до +39°С в липні). Львівська область, навпаки, станом на літньо-осінні сезони 2019-2021 рр. характеризувалась значними опадами у вигляді рясних дощів, шквального вітру, особливо, у середині літнього періоду. Загалом, за показником гідротермічного коефіцієнта зволоження (гтк), на території Львівської області панував надмірно зволожений клімат. Зливові дощі, грози, шквальний вітер та локальне випадіння граду були характерними і для Житомирської області у літній період 2020 року. Втім, спостерігались також значні підвищення температури до +36°С і періоди помірної посухи. Київська і Сумська області в літньо-осінні періоди 2019-2020 рр. характеризувались одними з найвищих показників зростання середньорічних температур, а також максимальних температур влітку. Попри це, показник гідротермічного коефіцієнта зволоження вказує на достатньо зволожений клімат (дані https://www.meteo.farm/).

До характерних і найбільш поширених вірусних симптомів на рослинах гладіолусів належать хлоротична штрихуватість і мозаїка на листках, розриви кольору на пелюстках квітки, зміна кількості квітів у квітконосі, відставання у цвітінні або його відсутність (табл. 3.1). Найбільш поширеним виявленим симптомом вірусної інфекції була шрихувата мозаїка на листкових пластинках гладіолусів, що спостерігались у всіх досліджуваних областях (рис. 3.1).

1 2 3

Рис. 3.1. Шрихувата мозаїка на листкових пластинках гладіолусів: 1 – сортозразок Львівщина (Львівська область, 2020); 2 – сорт Вій (Київська область, 2019); 3 - сорт Пітер Пірс (Житомирська область, 2020).

Симптоми дещо різнились в залежності від сорту, віку рослини, умов зростання та можливого часу інфікування вірусом. «Розрив кольору» квітки, яка спостерігалась у яскраво забарвлених сортових формах (рис. 3.2, 3.3, 3.4, 3.5).

Рис. 3.2. «Розрив кольору» квітки і шрихувата мозаїка на листках на гладіолусі сорту Вікторія Сквирська (Київська область, 2019).

1 2 3

Рис. 3.3. Вірусспецифічні симптоми на гладіолусі сорту Пам’ять: 1 – Здорова рослина (Полтавська обл., 2021); 2 – «розрив кольору» квітки під дією вірусної інфекції (Київська обалсть, 2020); 3 - штрихуватість листкової пластинки (Полтавська область, 2020).

Рис. 3.4. Симптоми «розриву кольору» квітки, шрихувата мозаїка на гладіолусі сорту Нью Дей (Київська область, 2019).

Рис. 3.5. «Розрив кольору» квітки та штрихувата мозаїка на гладіолусі сорту Сіянець коричневий (Полтавська область, 2019).

Втім симптоми «розриву кольору» квітки були не помітні у світлих і білих квіткових формах сортових гладіолусів (рис. 3.6, 3.7).

Рис. 3.6. Симптоми штрихуватої мозаїки на гладіолусі сорту Легенди Києва за відсутності змін у цвітінні (Київська область, жовтень, 2019).

Рис. 3.7. Симптоми штрихуватої мозаїки на гладіолусі сорту Аварда за відсутності змін у цвітінні (Київська область, жовтень, 2019).

Це узгоджується з літературними даними, що деформація кольору квітки частіше постерігається у сортів зі блакитним-, рожевим-, фіолетовим-, червоним-, забарвленням пелюсток і, зазвичай, не помітна у сортів з білими або жовтавими квітами (Asjes, 1997). При більш м'яких умовах зростання у закритому ґрунті відмічався легший прояв симптомів у досліджуваних сортах гладіолусів Пам'ять, Леда, Легенди Києва, Сіянець коричневий в порівняні з відкритим ґрунтом.

Виявлений спектр симптомів на гладіолусах найбільш характерний для вірусу огіркової мозаїки та вірусу жовтої мозаїки квасолі. Так, під впливом BYMV інфекції на гладіолусах проявляється темно-зелена смугастість листків, деформація забарвлення квітів (Asjes, 1997). При інфікуванні гладіолусів CMV спостерігається затримка у рості, «розрив кольору» на пелюстках квітів та деформація форми квітки, штрихувата мозаїка на листках (Raj *et al*, 2002). Загалом, вірус викликає слабкі симптоми на рослині, але при суміжному інфікуванні з вірусом жовтої мозаїки квасолі, виникають чітко виражені

симптоми і спостерігається однаково висока концентрація обох вірусів. Пізнє інфікування вірусом огіркової мозаїки, в період ближче до цвітіння гладіолусів, проходить у більшості випадків безсимптомно і може проявитись лише у зменшенні кількості квітів у колосі (Arneodo et al., 2005). В насадженнях гладіолусів вірус огіркової мозаїки часто детектують у змішаній інфекції зі вірусом жовтої мозаїки квасолі (Arneodo et al., 2005; Navalinskienė and Samuitienė, 2001; Selvaraj et al., 2009).

Таким чином, було виявлено рослини гладіолусів, які проявляли вірусспецифічні симптоми. Для підтвердження вірусної природи було вирішено застосувати методи біологічного тестування, електронної мікроскопії, імуноферментний аналіз, а також молекулярні методи для діагностики фітопатогенів.

3.2 Ідентифікація вірусів методом імуноферментного аналізу та ЗТ-ПЛР

Для визначення наявності вірусних антигенів було використано метод твердофазного імуноферментного аналізу в модифікації «подвійний сендвіч» (DAS-ELISA) з використанням комерційних тест-систем до cucumber mosaic virus (CMV), bean yellow mosaic virus (BYMV), tobacco ringspot virus (TRSV).

У протестованих сортах гладіолусів було ідентифіковано наявність антигенів CMV і BYMV. Вперше на території України було виявлено факт змішаної інфекції вірусом огіркової мозаїки та вірусом жовтої мозаїки квасолі на гладіолусах. Аналіз продемонстрував також і моноінфекцію CMV або BYMV. Антигенів вірусу кільцевої плямистості тютюну (TRSV) у досліджуваних зразках не виявлно (табл.3.2).

Табл. 3.2 - Результати імуноферментного аналізу досліджуваних сортів гладіолусів.

№	Сорт	Рік відбору зразків	Область відбору	Оптична густина, E=405 нм			Вірус
				Зразок	К+	К-	

1	Пам’ять	2019	Полтавська обл.	**0.995**	1.551	0.022	BYMV +
				0.172	0.052	0.049	CMV +
				0.028	0.842	0.020	TRSV
2	Пам’ять	2020	Полтавська обл.	**1.615**	0.938	0.085	BYMV +
				0.579	0.406	0.092	CMV +
3	Пам’ять (закритий ґрунт)	2019	м.Київ, Київська обл.	**1.600**	1.551	0.022	BYMV +
				0.179	0.510	0.049	CMV +
4	Пам’ять «дітки» `19	2019	Полтавська обл.	0.026	1.551	0.022	BYMV
				0.144	0.510	0.049	CMV +
				0.025	0.842	0.020	TRSV
5	Пам’ять «дітки» `20	2020	Полтавська обл.	**1.641**	0.338	0.085	BYMV +
				1.645	0.406	0.092	CMV +
6	Легенди Києва	2019	м.Київ, Київська обл.	**1.058**	1.551	0.022	BYMV +
				0.391	0.510	0.049	CMV +
7	Легенди Києва (закритий ґрунт)	2019	м.Київ, Київська обл.	**0.280**	1.551	0.022	BYMV +
				0.188	0.510	0.049	CMV +
8	Легенди Києва	2019	Полтавська обл.	0.091	1.551	0.022	BYMV
				0.110	0.510	0.049	CMV
				0.021	0.842	0.020	TRSV
9	Сіянець коричневий	2019	м.Київ, Київська обл.	**0.724**	1.551	0.022	BYMV +
				0.250	0.510	0.049	CMV +
				0.023	0.842	0.020	TRSV
10	Сіянець коричневий (закритий ґрунт)	2019	м.Київ, Київська обл.	0.045	1.551	0.022	BYMV
				0.091	0.510	0.049	CMV
11	Сіянець коричневий (закритий ґрунт)	2020	м.Київ, Київська обл.	0.027	1.551	0.022	BYMV
				0.700	0.510	0.049	CMV
12	Сіянець коричневий	2019	Полтавська обл.	**0.448**	1.551	0.022	BYMV +
				0.207	0.510	0.049	CMV +
				0.022	0.842	0.020	TRSV
13	Леда (закритий ґрунт)	2019	м.Київ, Київська обл.	0.070	1.551	0.022	BYMV
				0.071	0.510	0.049	CMV
14	Леда	2019		**0.841**	0.338	0.085	BYMV +

			Полтавська обл.	**0.568**	0.406	0.092	CMV +
				0.024	0.842	0.020	TRSV
15	Леда	2020	Полтавська обл.	0.104	1.551	0.022	BYMV
				0.161	0.510	0.049	CMV +
16	Сільва (закритий ґрунт)	2019	м.Київ, Київська обл.	**0.345**	1.551	0.022	BYMV +
				0.108	0.510	0.049	CMV
17	Мереживо (закритий ґрунт)	2019	м.Київ, Київська обл.	0.065	0.338	0.085	BYMV
				0.107	0.406	0.092	CMV
18	Мереживо	2020	м.Київ, Київська обл.	**1.622**	1.551	0.022	BYMV +
				0.181	0.510	0.049	CMV +
19	Вій	2019	м.Київ, Київська обл.	**1.597**	1.551	0.022	BYMV +
				0.179	0.510	0.049	CMV +
20	Авард	2019	м.Київ, Київська обл.	**1.521**	1.551	0.022	BYMV +
				0.192	0.510	0.049	CMV +
21	Нью Дей	2019	м.Київ, Київська обл.	**1.439**	1.551	0.022	BYMV +
				0.810	0.510	0.049	CMV +
22	Веєр	2019	м.Київ, Київська обл.	**0.508**	1.551	0.022	BYMV +
				0.186	0.510	0.049	CMV +
23	Сіянець 2092	2019	м.Київ, Київська обл.	**1.189**	1.551	0.022	BYMV +
				0.076	0.510	0.049	CMV
				0.027	0.842	0.020	TRSV
24	Примадонна	2019	м.Київ, Київська обл.	**1.077**	1.551	0.022	BYMV +
				-	0.510	0.049	CMV
25	Міраж (закритий ґрунт)	2019	м.Київ, Київська обл.	**1.648**	1.338	0.085	BYMV +
				0.596	0.406	0.092	CMV +
26	Вікторія Сквирська	2019	Сквирський р-н, Київська обл.	**0.444**	1.338	0.085	BYMV +
				0.535	0.406	0.092	CMV +
				0.025	0.842	0.020	TRSV
27	Вікторія Сквирська (закритий ґрунт)	2020	м.Київ, Київська обл.	**0.925**	1.338	0.085	BYMV +
				0.682	0.406	0.092	CMV +
28	Вікторія Сквирська	2020	Полтавська обл.	**0.925**	1.338	0.085	BYMV +
				0.682	0.406	0.092	CMV +
29	Наталка Полтавка	2020	Полтавська обл.	0.132	1.338	0.085	BYMV
				0.067	0.406	0.092	CMV
30	Лебедина Зграя	2020	Полтавська обл.	0.113	1.338	0.085	BYMV
				0.058	0.406	0.092	CMV
31	Йелов Ейдж	2020	Київська обл.	0.127	1.338	0.085	BYMV

				0.065	0.406	0.092	CMV
32	Пітер Пірс	2020	Коростенський р-н, Житомирська обл.	0.041	0.980	0.075	BYMV
				1.091	0.721	0.071	CMV +
				0.026	0.842	0.020	TRSV
33	Ліловий бархат	2021	Київська обл.	**0.895**	1.392	0.072	BYMV +
				0.610	1.213	0.096	CMV +
34	Оскар	2021	Яворівський р-н, Львівська обл.	**0.704**	1.392	0.072	BYMV +
				0.267	1.213	0.096	CMV
35	Прісцилла	2021	Яворівський р-н, Львівська обл.	**1.581**	1.392	0.072	BYMV +
				0.141	1.213	0.096	CMV
36	Міс Грін	2021	Яворівський р-н, Львівська обл.	**1.123**	1.392	0.072	BYMV +
				0.137	1.213	0.096	CMV
37	Лайф Оак	2021	м. Львів, Львівська обл.	**1.272**	1.392	0.072	BYMV +
				0.210	1.213	0.096	CMV
38	Грін Стар	2021	м. Львів, Львівська обл.	**0.732**	1.392	0.072	BYMV +
				0.142	1.213	0.096	CMV
39	Фаворит	2021	Київська обл.	0.091	1.392	0.072	BYMV
				0.102	1.213	0.096	CMV
40	Рожевий Каскад	2021	Полтавська обл.	0.113	1.392	0.072	BYMV
				0.134	1.213	0.096	CMV
Сортозразки							
41	Сортозразок Lv1	2019	Пустомицький р-н, Львівська обл.	0.021	1.551	0.022	BYMV
				0.017	0.510	0.049	CMV
				0.021	0.842	0.020	TRSV
42	Сортозразок Lv2	2020	Золочівський р-н, Львівська обл.	0.042	0.980	0.075	BYMV
				0.878	0.721	0.071	CMV +
43	Сортозразок Kh (Херсонщина)	2020	Скадовський р-н., Херсонська обл.	**1.610**	0.338	0.085	BYMV +
				0.678	0.406	0.092	CMV +
44	Сортозразок №3 Фастів (закритий ґрунт)	2019	м.Київ, Київська обл.	**1.386**	1.551	0.022	BYMV +
				0.143	0.510	0.049	CMV +
				0.027	0.842	0.020	TRSV
45	Сортозразок №3.1 Фастів (закритий ґрунт)	2020	м.Київ, Київська обл.	**1.564**	0.338	0.085	BYMV +
				0.087	0.406	0.092	CMV
46		2020		**1.649**	0.338	0.085	BYMV +

	Сортозразок Глеваха		Фастівський р-н, Київська обл.	**0.210**	0.406	0.092	CMV +
47	Сортозразок Сумщина	2019	Шосткинський р-н, Сумська обл.	**0.868**	1.551	0.022	BYMV +
				0.058	0.510	0.049	CMV
48	Сортозразок №16	2019	Сумська обл.	0.118	1.551	0.022	BYMV
				0.033	0.510	0.049	CMV
49	Сортозразок №2	2019	Сумська обл.	**0.836**	1.551	0.022	BYMV +
				0.065	0.510	0.049	CMV
				0.025	0.842	0.020	TRSV
50	Сортозразок №2 (закритий ґрунт)	2020	Васильківський р-н, Київська обл.	**1.600**	1.338	0.085	BYMV +
				1.648	0.406	0.092	CMV +
51	Сортозразок №9 (закритий ґрунт)	2020	м.Київ, Київська обл.	0.181	1.338	0.085	BYMV
				0.532	0.406	0.092	CMV +
52	Сортозразок Тростянець	2020	Охтирський р-н, Сумська обл.	**0.578**	1.338	0.085	BYMV +
				0.107	0.406	0.092	CMV
53	Сортозразок МІП24	2020	Миронівський р-н. Київська обл.	**1.058**	1.133	0.035	BYMV +
				0.107	0.988	0.067	CMV
				0.022	0.842	0.020	TRSV
54	Сортозразок МІП25	2020	Миронівський р-н. Київська обл.	**0.976**	1.133	0.035	BYMV +
				0.126	0.988	0.067	CMV
				0.025	0.842	0.020	TRSV
55	Сортозразок Плісецьке	2020	Фастівський р-н, Київська обл.	**0.788**	1.133	0.035	BYMV +
				0.030	0.988	0.067	CMV
56	Сортозразок Бровари	2021	Броварський р-н, Київська обл.	**0.892**	1.133	0.035	BYMV +
				0.076	0.988	0.067	CMV

«+» - виявлено антигени вірусу

Інфікування обома вірусами BYMV+CMV виявлене у гладіолусів сортів Авард, Вій, Вікторія Сквирська, Веєр, Легенди Києва, Леда, Пам’ять,Сіянець Коричневий, Сіянець 2092, Нью Дей, Ліловий Бархат, а також і у сортозразках з Київської області (Фастівський р-н, Васильківський р-н), Херсонської області (Скадовський р-н).

Моноінфекція BYMV була присутня у сортів гладіолусів Грін Стар, Міраж, Мереживо, Примадонна, Лайф Оак, Міс Грін, Прісцилла, Оскар, а також невстановлених сортах з Київської області (Фастівський р-н., Миронівський р-н.), Сумської області. Моноінфекція CMV виявлена на гладіолусах сортів Пам'ять, Сільва, Пітер Пірс, Сіянець Коричневий і сортозразку Lv2 зі Львівської області (Золочівський р-н.).

Оскільки є відомості про те, що CMV і BYMV здатні викликати безсимптомну інфекцію, тобто на гладіолусах не проявляються візуальні ознаки зараження, було відібрано та перевірено наявність цих вірусів у десяти візуально здорових зразків. За даними імуноферментного аналізу шість з них виявилися інфікованими вірусами: у трьох зразках було виявлено CMV+BYMV; у двох – CMV та в одному – BYMV. Відсутність візуальних симптомів ураження у гладіолусів при активній репродукції вірусу в клітині відмічається у рослинах, які були інфіковані у рік відбору зразків, а поява штрихуватої мозаїки спостерігається у наступний сезон росту рослин (Navalinskiene, 2004; Raj, 2002). Моноінфікування вірусом також відзначається безсимптомною інфекцією або слабким проявом симптомів (Katoch, 2002).

Гладіолуси сортів Прісцилла і Міс Грін не проявляли візуальних ознак інфікування, втім, за даними імуноферментного аналізу, у зразках виявлені антигени BYMV. Отримані результати можуть свідчити про ймовірну толерантність даних сортів до вірусу жовтої мозаїки квасолі. Сортозразок №16 зі Сумської області, Lv1 з Львівської області, а також один зі досліджуваних зразків гладіолусу сорту Мереживо відібраний у м. Києві не містили антигенів BYMV і CMV. Гладіолуси сортів Йелов Ейдж, Наталка Полтавка, Лебедина Зграя, Рожевий Каскад, Фаворит в ході дослідження проявили нечутливість до BYMV, CMV та можуть бути рекомендовані як матеріал для селекції, створення нових сортів.

Протягом кожного вегетаційного періоду в процесі росту на бульбоцибулинах формуються «дітки» (cormels), які, при відділені від батьківської рослини, використовуються в наступному сезоні для вирощування і

розповсюджування сортів гладіолусів. Аналіз гладіолусів сорту Пам’ять демонструє передачу досліджуваних вірусів з материнської рослини шляхом вегетативного розмноження «дітками». У перший-другий рік посадки на гладіолусах, вирощених з «діток» із інфікованих бульбоцибулин проявились ознаки вірусспецифічної інфекції (рис. 3.8). Варто підкреслити, що за умов жаркого літа і теплої осені 2020 р. крупні «дітки» встигли зацвісти.

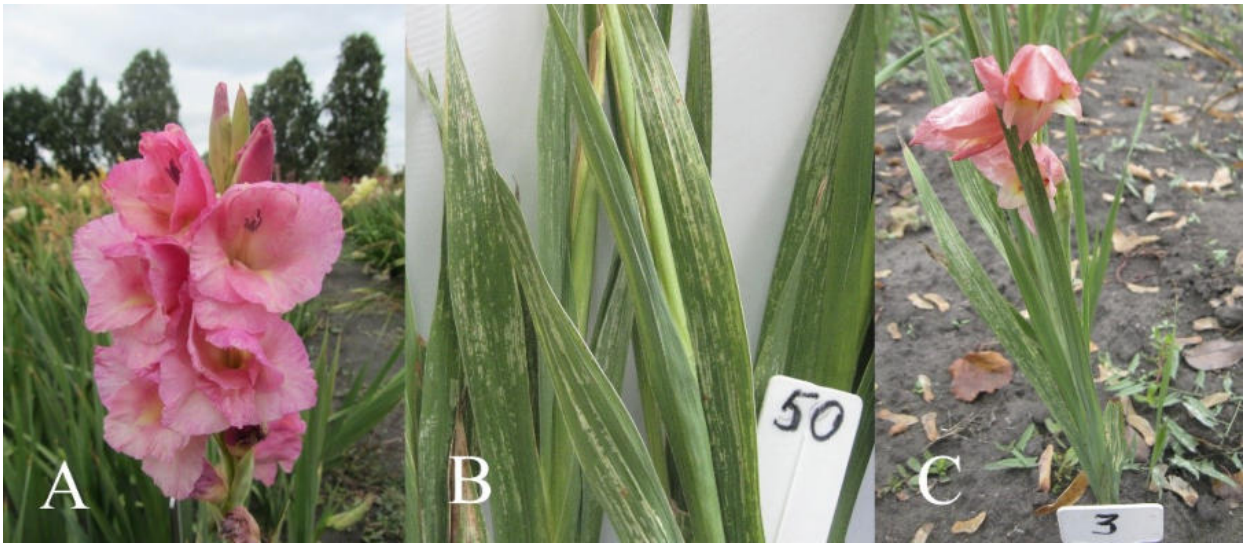

Рис. 3.8. Симптоми вірусної інфекції на гладіолусах: А - зміна забарвлення квітки на гладіолусі с. Нью Дей, жовтень 2019, Київська обл.; В - штрихувата мозаїка на гладіолусі с. Пам’ять, жовтень 2019, Полтавська обл.; С - зміна забарвлення квітки та штрихуватість листкової пластинки на рослинах, вирощених з «діток» інфікованиими CMV і BYMV гладіолусів с. Пам’ять, 11 жовтня 2020 р., Полтавська обл.

В ході роботи було також перевірено на наявність вірусних антигенів декоративні рослини канн (*Canna sp.*) та ірисів (*Iris sp*.), що зростали поблизу досліджуваних гладіолусів і є чутливими до вірусу жовтої мозаїки квасолі (Mitrofanova, 2018; Kulshrestha, 2006). Позитивний результат на наявність вірусу жовтої мозаїки квасолі був отриманий у зразку досліджуваних ірисів (*Iris sp.*). У відібраних поблизу місць зростання гладіолусів сортових канн (*Canna sp.*) антигенів вірусу не було виявлено (рис. 3.9).

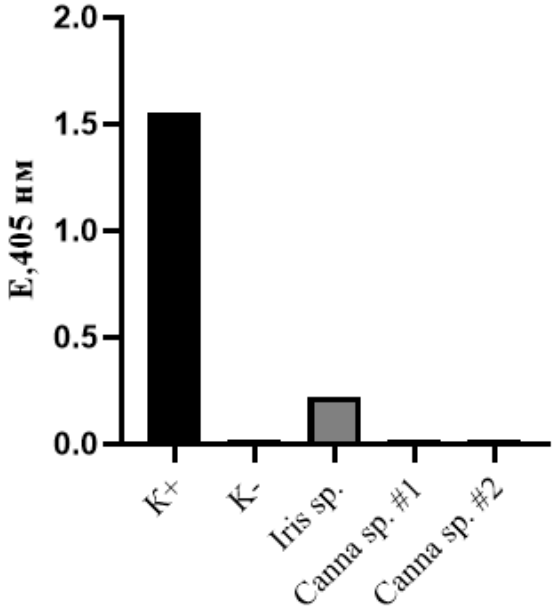

Рис. 3.9. Вміст антигенів BYMV у інших видів декоративних рослин, що зростали у місцях відбору гладіолусів з вірусспецифічними симптомами.

Результати імуноферментного аналізу були підтверджені ЗТ-ПЛР (рис.3.10-3.12).

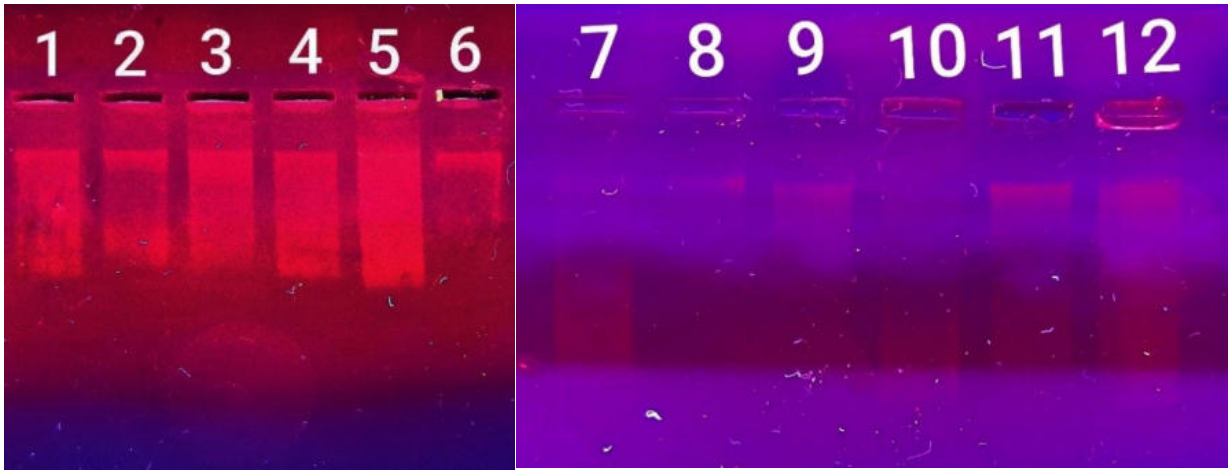

Рис. 3.10. Електрофореграма тотальної РНК продукту зі зразків гладіолусів: 1 – гладіолус №3 Фастів (Київська обл.); 2 - гладіолус Херсонщина (Херсонська обл.); 3 - гладіолус №2 Васильків (Київська обл.); 4 – гладіолус сорт Вікторія Сквирська (Київська обл.); 5 – гладіолус сорт Вікторія Сквирська (Полтавська обл.); 6 - гладіолус Lv2 (Львівська обл.); 7 – гладіолус сорт Сіянець Коричневий (Київська обл.); 8 – гладіолус №8 (Полтавська обл.); 9 – гладіолус МІП№24

(Київська обл.); 10 - гладіолус МІП№24 (Київська обл.); 11 – гладіолус сорт Легенди Києва (Київська обл.); 12 – Гладіолус сорт Пітер Пірс (Житомирська обл.).

Так, було виявлено ПЛР-продукти розміром 590 п.н., що відповідають фрагменту гена *CP* bean yellow mosaic virus (рис. 3.11), а також ПЛР-продукти розміром 500 п.н., що відповідають фрагменту гена *CP* cucumber mosaic virus (рис. 3.12).

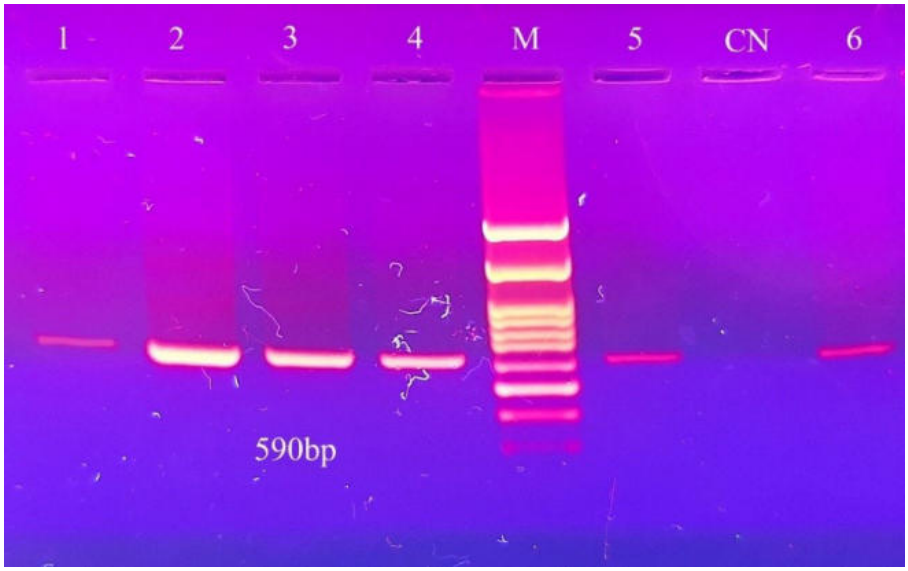

Рис. 3.11. Електрофореграма ПЛР-продуктів 590 п.н. фрагментів гена *CP* BYMV: 1- гладіолус №5 (с. Зелений Бір, Київська обл.); 2 – гладіолус сорт Леда (Полтавська область); 3 – гладіолус сорт Вікторія Сквирська (Київська обл.); 4 – гладіолус (м. Глеваха, Київська обл.) 5 – гладіолус сорт Легенди Києва (Київська область); 6 – гладіолус МІП№25 (Київська область); M – маркер ДНК CSL-MDNA-100bp (Cleaver Scientific, United Kingdom); CN – негативний контроль.

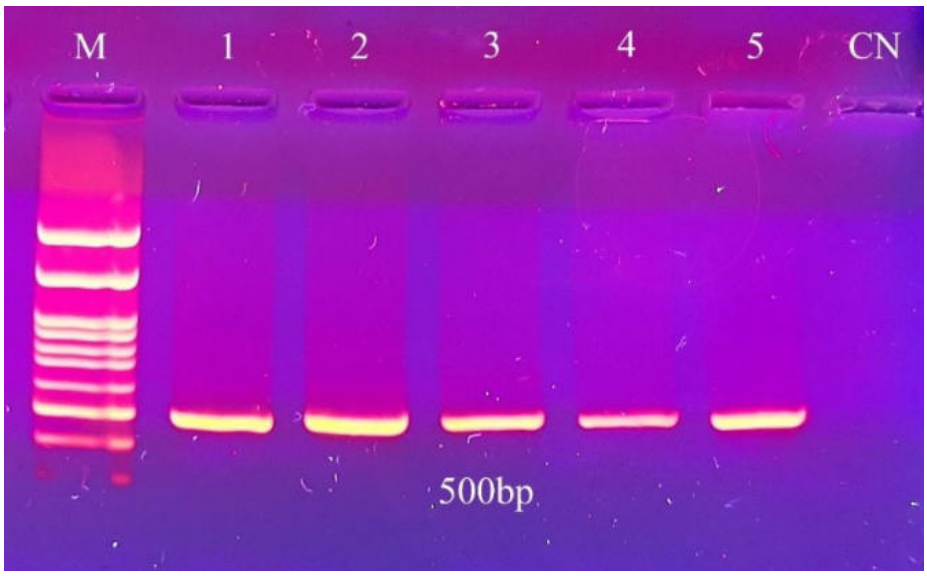

Рис. 3.12. Електрофореграма ПЛР-продуктів 500 п.н. фрагментів гена *CP* CMV: 1 – гладіолус Херсонщина (Херсонська область); 2 – гладіолус №2 Васильків (Київська область); 3 - гладіолус сорт Вікторія Сквирська (Київська обл.); 4 – гладіолус сорт Вікторія Сквирська (Полтавська обл.); 5 - гладіолус Lv2 (Львівська область); M – маркер ДНК CSL-MDNA-100bp (Cleaver Scientific, United Kingdom); CN – негативний контроль.

Таким чином, вперше в Україні встановлено факт змішаної інфекції bean yellow mosaic virus і cucumber mosaic virus в насадженнях сортових гладіолусів. Продемонстровано сортову специфічність гладіолусів до прояву симптомів та чутливості до BYMV і CMV. Знайдено сорти, що не є чутливими до bean yellow mosaic virus і cucumber mosaic virus і мають потенціал для використання у селекції.

3.3. Ураженість рослин гладіолусів CMV і BYMV у досліджуваних областях

На території Київської області частка інфікованих рослин гладіолусів складала 95% серед протестованих зразків за період 2019-2021 рр. Інфікування двома вірусами BYMV+CMV складає 68,5%, моноінфекція BYMV виявлена у 16,3% досліджуваних зразків, CMV – у 10,2% гладіолусів (рис.3.13).

Рис. 3.13. Ураженість рослин гладіолусів на території Київської області.

В Полтавській області відсоток інфікованих гладіолусів вірусами серед перевірених зразків складає 91,9%. Змішана інфекція BYMV+CMV підтверджена у 51,3% уражених рослин. Відсоток рослин, інфікованих BYMV, - 27,1% та інфікованих CMV - 13,5% з усіх відібраних рослин (рис. 3.14).

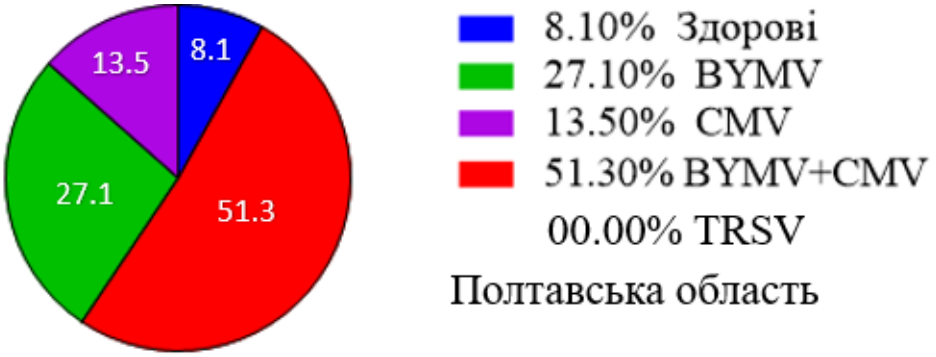

Рис. 3.14. Ураженість рослин гладіолусів на території Полтавської області.

Результати тестування зразків зі Сумської області вказують на 80% ураженості вірусами перевірених гладіолусів. Всі досліджувані випадки є них моноінфекцією BYMV. Інфікування BYMV+CMV, а також CMV моноінфекція не виявлені (рис. 3.15).

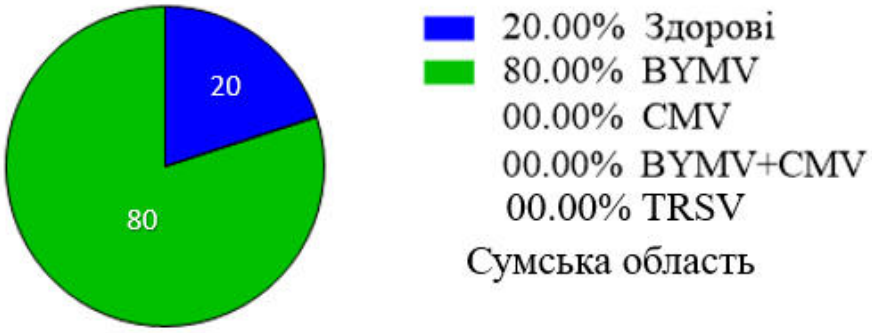

Рис. 3.15. Ураженість рослин гладіолусів на території Сумської області.

На території Львівської області частка інфікованих вірусами протестованих гладіолусів складає 87%. З них моноіфекція BYMV – 72,5%, CMV – 13%. Змішана інфекція BYMV+CMV не виявлена (рис. 3.16).

Рис. 3.16. Ураженість рослин гладіолусів на території Львівської області.

В Херсонській області відсоток ураженості вірусами перевірених гладіолусів складає 70%. Змішана інфекція BYMV+CMV виявлена у всіх уражених зразках гладіолусів. Моноінфекція BYMV, CMV у досліджуваних зразках не виявлені (рис. 3.17).

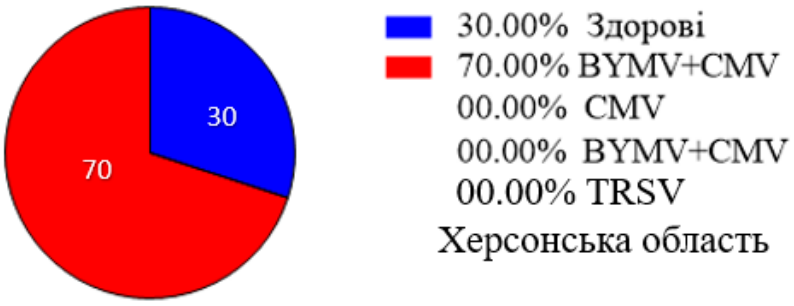

Рис. 3.17. Ураженість рослин гладіолусів на території Херсонської області.

Загальна кількість досліджуваних зразків з території Житомирської області не є достатньою для аналізу ураженості у даній місцевості.

Загалом, було протестовано 138 зразків гладіолусів за період з 2019-2021 рр. у досліджуваних областях. Отримані результати демонструють високі показники ураження вірусом жовтої мозаїки квасолі (bean yellow mosaic virus) та вірусом огіркової мозаїки (cucumber mosaic virus) гладіолусів, що означає потенційну небезпеку для квітникарства та сільського господарства в цих місцевостях, а також демонструє актуальність подальшого дослідження питання вірусних інфекцій гладіолусів. Аналіз зразків гладіолусів не виявив ураження гладіолусів вірусом кільцевої плямистості тютюну (tobacco ringspot virus).

3.4. Встановлення інфекційної природи виявлених симптомів захворювання на гладіолусах

Прояв симптомів інфекційних захворювань рослин можуть бути схожими до симптомів, спричинених абіотичними факторами навколишнього середовища, а саме - зниження температури, нерівномірне зволоження ґрунтів (посуха, надмірні опади), нестача необхідних мікро- і макро- елементів у ґрунтовому складі тощо. Тому було проведено дослідження для спростування невірусної природи виявлених на гладіолусах симптомів.

З цією метою проводили механічне зараження здорових рослин гладіолусу сорту Пам’ять в лабораторних умовах при тривалості світлового дня 16 год та температурному режимі від 20 до 24 °С. Для зараження використовували сік інфікованої квасолі (*Phaseolus vulgaris*) сорту Червона шапочка, попередньо

механічно інокульованої у фазі двох справжніх листків соком гладіолусів зі симптомами мозаїки і хлоротичної штрихуватості й інкубованої до появи характерних симптомів. На рослинах гладіолусів на 15-ий день після зараження соком квасолі була виявлена хлоротична штрихувата мозаїка на листках (рис.3.18).

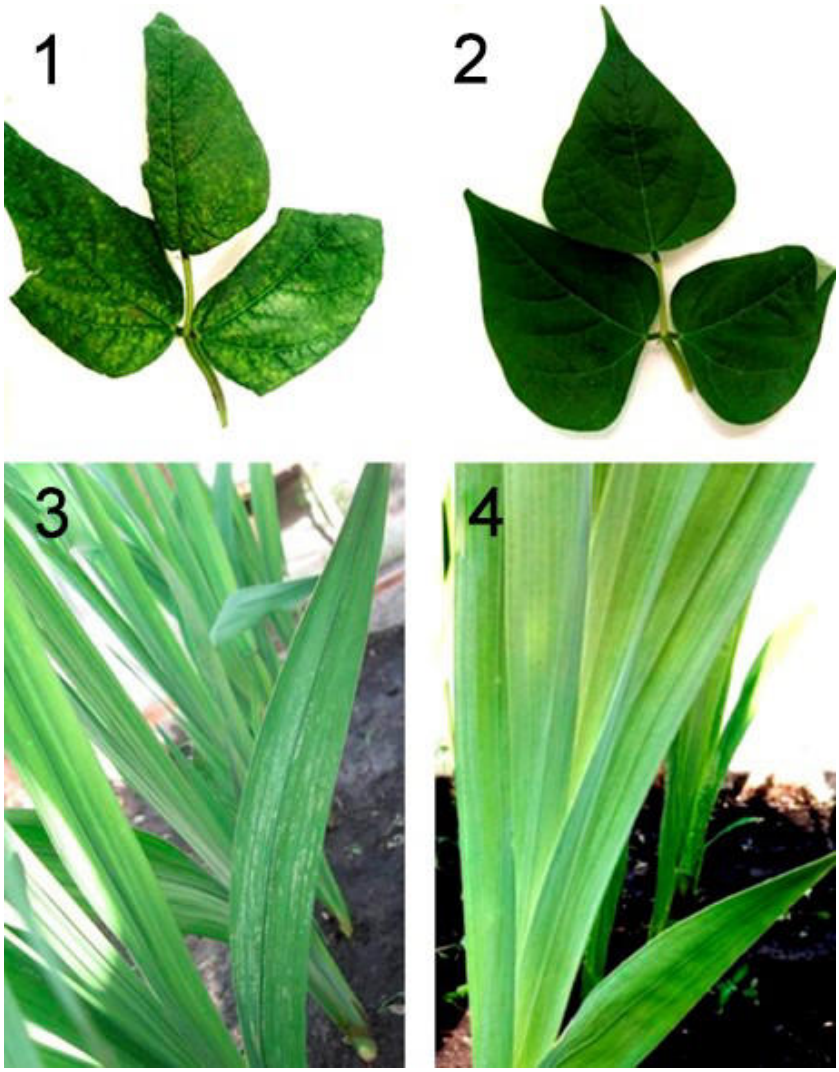

Рис. 3.18. Вірусспецифічні симптоми на механічно інокульованих рослинах: 1 - системна реакція на BYMV-зморшкуватість та світло-зелено-жовта мозаїка листкової пластинки (квасоля сорт Червона шапочка); 2 – негативний контроль (квасоля сорт Червона шапочка); 3 - хлоротична штрихувата мозаїка на листках (гладіолус сорт Пам’ять); 4 - негативний контроль (гладіолус сорт Пам’ять).

Аналізи ІФА та ЗТ-ПЛР підтвердив наявність BYMV в рослинах гладіолуса і квасолі. Таким чином, було доведено інфекційну природу симптомів, виявлених у насадженнях гладіолусів.

3.5. Електронномікроскопічні дослідження гладіолусних ізолятів BYMV і CMV

Для вивчення морфологічних особливостей гладіолусних ізолятів BYMV і CMV було застосовано метод трансмісійної електронної мікроскопії.

У ході дослідження морфології вірусних часток у соці гладіолусів з симптомами штрихуватої мозаїки виявлені скупчення ниткоподібних віріонів довжиною 720-750 нм та шириною близько 11-13 нм (рис. 3.19), що є характерними для вірусу жовтої мозаїки квасолі (Virus Taxonomy, 2012).

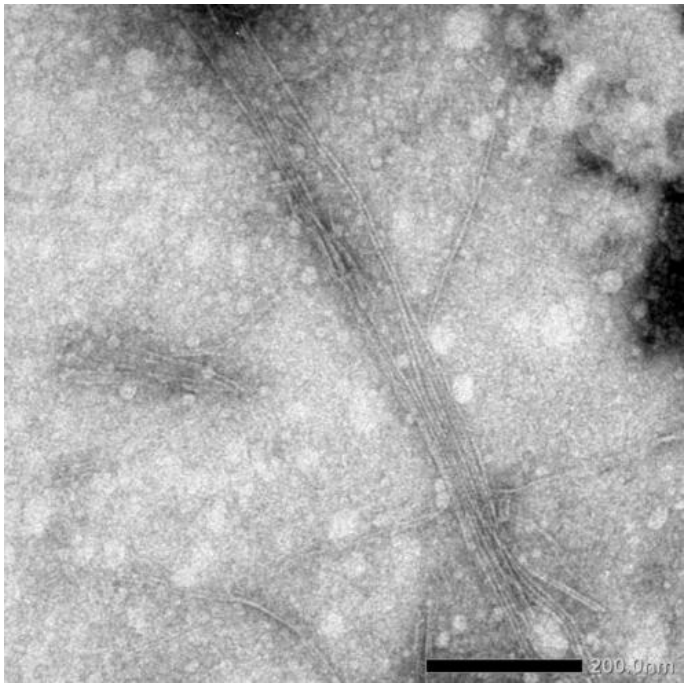

Рис. 3.19. Електронно-мікроскопічне зображення віріонів BYMV у соці з листків хворих гладіолусів, сорт Пам’ять, Київська область, закритий ґрунт (лінійка – 200 нм, збільшення × 30 000).

Інша група вірусних часток була сферична, близько 30 нм у діаметрі з електронно-щільним центром (рис. 3.20), що характерно для CMV (Pallas et al., 2013).

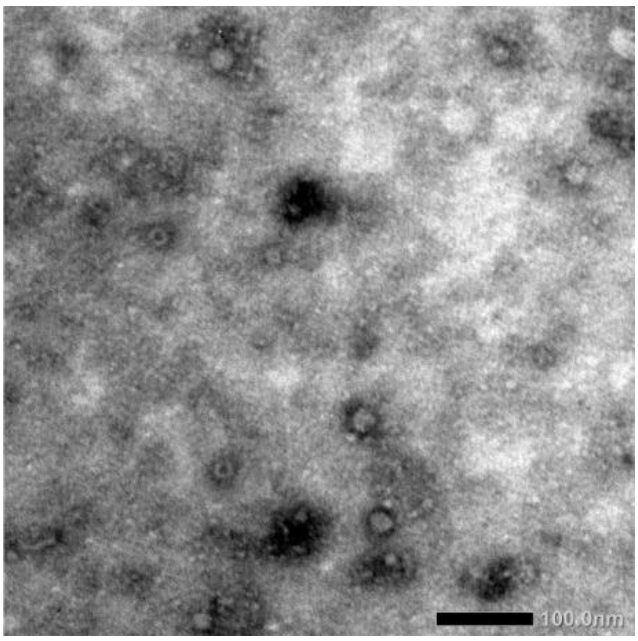

Рис. 3.20. Електронно-мікроскопічне зображення віріонів CMV у соці з листків хворих гладіолусів, сорт Пам’ять, Київська область, закритий ґрунт (лінійка – 100 нм, збільшення × 30 000).

Таким чином, методом електронної мікроскопії вивчена морфологія вірусних часток у соці гладіолусів. Встановлено, що морфологія та розміри віріонів гладіолусних ізолятів BYMV і CMV відповідають типовим для даних вірусів параметрам.

3.6. Встановлення спектру чутливих рослин для гладіолусних ізолятів BYMV і CMV

Коло чутливих до вірусу огіркової мозаїки і вірусу жовтої мозаїки квасолі рослин встановлювалось шляхом біологічного тестування. Для цього проводилась механічна інокуляція рослин соком хворих рослин гладіолусів.

Отримані результати через 18 днів інокуляції аналізувались шляхом візуальної діагностики механічно інокульованих рослин. Порівняння з літературними даними біологічного тестування здійснювалось з врахуванням даних про гладіолусні ізоляти вірусів BYMV і CMV та враховуючи специфічну чутливість BYMV і CMV до спектра рослин (табл. 3.3).

Табл. 3.3 - Реакція досліджуваних рослин на механічне ураження їх гладіолусними ізолятами BYMV та CMV.

Рослина-індикатор	Контроль	Симптоми на інокульованих рослинах	Літературні дані для BYMV	Літературні дані для CMV
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Зіронька	здорові	відсутні вірусні симптоми	Сортоспецифічні прояви: системне ураження або відсутні симптоми (Товкач і Гнутова, 2008; Kaur et al. 2015);	не досліджувалось
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Калинка	здорові	відсутні вірусні симптоми		
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Червона шапочка	здорові	системна реакція, зморшкуватість, мозаїка на листковій пластинці		
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Дніпрянка	здорові	відсутні вірусні симптоми		
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Борлото	здорові	відсутні вірусні симптоми		
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Несподіванка	здорові	відсутні вірусні симптоми		
соя (*Glycine max Moench.*) сорт Гімо	здорові	жовта мозаїка на листковій пластинці	не досліджувалось	не досліджувалось
вігна (*Vigna unguiculata*) сорт Макарена	здорові	відсутні вірусні симптоми	відсутні вірусні симптоми (Товкач і Гнутова, 2008); локальні некрози (Kaur et al. 2015)	не досліджувалось
горох (*Pisum sativum*) сорт	здорові	відсутні вірусні симптоми	мозаїка (Kaur et al., 2015);	не досліджувалось

Шеститижневий			системна реакція, хлорози жилок (Товкач і Гнутова, 2008)	
гарбуз (*Cucurbita māxima*) сорт Берегиня	здорові	хлорози, зморшкуватість та деформації листків	відсутні вірусні симптоми (Товкач і Гнутова, 2008; Kaur et al. 2015)	не досліджувалось
тетрагонія (*Tetragonia tetragonioides*)	здорові	відсутні вірусні симптоми	не досліджувалось	не досліджувалось
огірок (*Cucumis sativus*) сорт Джерело	здорові	відсутні вірусні симптоми	відсутні вірусні симптоми (Товкач і Гнутова, 2008; Kaur et al. 2015)	Системна мозаїка, некрози (Raj et al. 2002)
огірок (*Cucumis sativus*) сорт Конкурент	здорові	відсутні вірусні симптоми		
кабачок (*Cucurbita pepo var. Giraumontia*) сорт Аспірант	здорові	відсутні вірусні симптоми	не досліджувалось	не досліджувалось
томат (*Lycopersicon esculentum*) сорт Новинка Придністров'я	хлорози на листках	хлорози на листках	відсутні вірусні симптоми (Kaur et al., 2015)	хлорози, системна мозаїка (Raj et al. 2002)
дурман (*Datura stramonium*)	здорові	відсутні вірусні симптоми	відсутні вірусні симптоми (Товкач і Гнутова, 2008; Kaur et al., 2015)	не досліджувалось
махорка (*Nicotiána rústica*)	здорові	відсутні вірусні симптоми	мозаїка (Kaur et al., 2015)	системна мозаїка, листкові деформації, світло-зелена плямистість (Raj et al. 2002)

Зі проаналізованих шестри сортів квасолі (*Phaseolus vulgaris*), симптоми інфікування проявив лише сорт Червона Шапочка. Квасоля сорту Червона Шапочка належить до популярних сортів для вирощування в Україні завдяки своїм характеристикам. Так, це середнього терміну дозрівання сорт з низькими кущами до 35 см, який характеризується холодостійкістю і високими показниками врожайності по всій території України (веб ресурс).

Симптоми системної реакції, що проявлялись у зморшкуватості листкової пластини, супроводжувались поступовою появою жовтої мозаїки на листках, починаючи з 15 дня інфікування (рис.3.21).

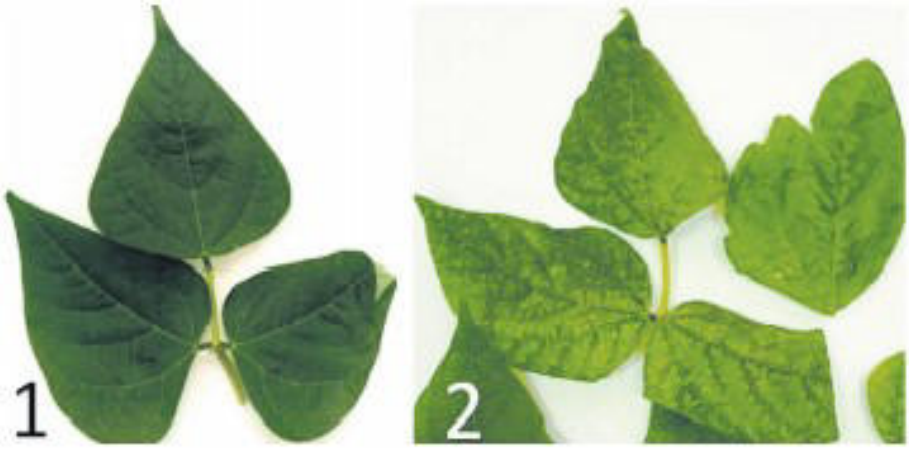

Рис. 3.21. Квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Червона Шапочка, механічно інокульована соком хворих гладіолусів: 1 – негативний контроль; 2 – прояв системної реакції у вигляді зморшкуватості і світло-зеленої мозаїки на листках.

Літературні дані підтверджують сортову специфічність квасолі на гладіолусні ізоляти вірусу жовтої мозаїки квасолі. Так, за даними аналізу, проведеними Товкач В. Ф. і Гнутовою Р. В., зі проаналізованих авторами сортів квасолі, лише сорт Perlicka проявив ознаки системного ураження BYMV (Товкач і Гнутова, 2008).

За результатами біологічного тестування на рослинах сої (*Glycine max*) сорту Грімо на 17-й день після інокуляції виявлено системну реакцію на ураження – жовту мозаїку на листках (рис. 3.22).

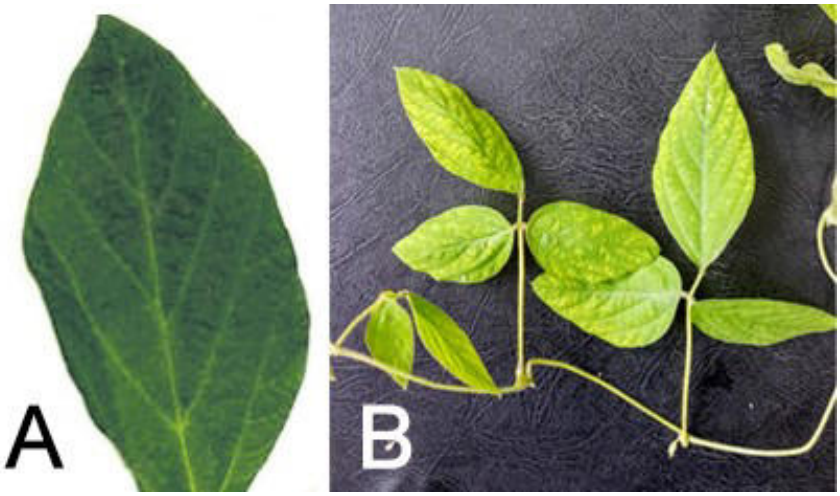

Рис. 3.22. Соя (*Glycine max*) сорту Грімо механічно, інокульована соком хворих гладіолусів: А – негативний контроль; В – жовта мозаїка на листковій пластинці.

Відомо, що штами вірусу жовтої мозаїки квасолі здатні інфікувати сою, викликаючи системну мозаїку (Shamra et al., 2016). Симптоми жовтої мозаїки на листках також спостерігались при механічній інокуляції рослин сої ізолятом BYMV, філогенетично близьким до деяких гладіолусних штамів з групи Monocot (Campos et al., 2013).

Механічно інокульовані рослини гарбуза (*Cucurbita māxima*) сорту Берегиня проявили перші ознаки інфікування на 18-й день після зараження. Симптоми проявлялись у вигляді появи хлорозів, незначної зморшкуватості та деформації листкової пластинки, що поступово розвивались з утворенням мозаїки і жорсткої системної реакції після 40 дня з моменту інфікування (рис. 3.23).

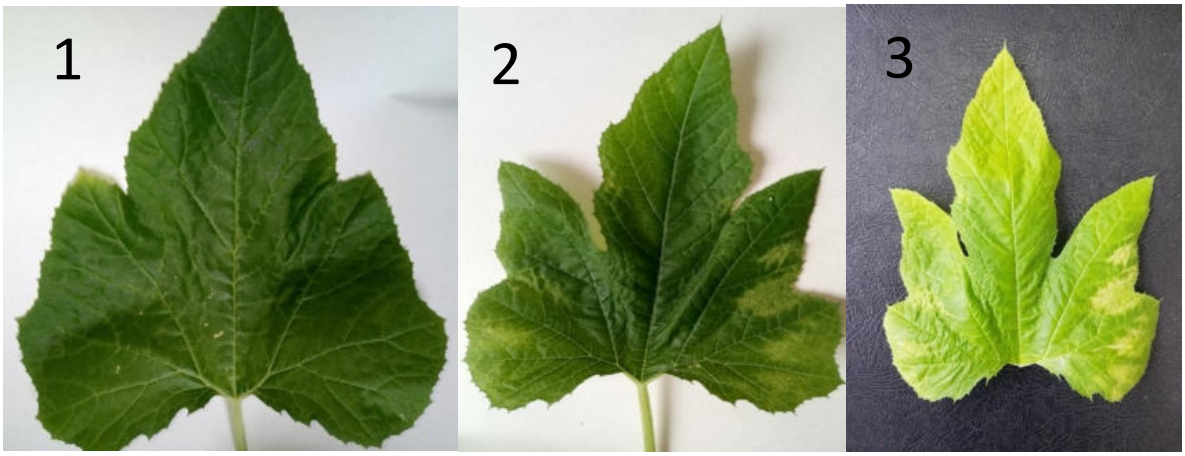

Рис. 3.23. Гарбуз (*Cucurbita māxima*) сорт Берегиня, механічно інокульований соком хворих гладіолусів: 1 – негативний контроль; 2 – 18-й день після інокуляції; 3 – 45-й день після інокуляції.

Рослини томату (*Lycopersicon esculentum*) сорту Новинка Придністров'я проявили ознаки хлорозів на листках ще до інокуляції, включаючи контрольну групу. Подібні симптоми можуть бути викликані насіннєвою інфекцією або ж несприятливими умовами вирощування, до яких входить невідповідний рівень Fe^{+}-іонів (López-Millán et al., 2009).

Наявність у протестованих рослинах антигенів BYMV і CMV підтверджувалась шляхом імуноферментного аналізу в модифікації DAS-ELISA. Імунофементний аналіз проводився у трьох повторностях. У якості позитивного контролю було використано рослини гладіолусів сорту Пам’ять, в яких доведена наявність антигенів вірусів BYMV і CMV. У якості негативного контролю для аналізу на BYMV було використано зразок гладіолусу з Львівської області, та зразок гладіолусу зі Сумської області для CMV.

За результатами імуноферментного аналізу підтверджено факт інфікування квасолі (*Phaseolus vulgaris*) сорт Червона Шапочка та сої (*Glycine max*) сорту Грімо (табл. 3.4).

Табл. 3.4 - Вміст антигенів BYMV у досліджуваних рослинах.

Рослина	Середній показник при E=405 нм	К(BYMV)+	К(BYMV)-
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Зіронька	0.042	1.113	0.019
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Калинка	0.023	1.551	0.020
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Червона шапочка	**1.078 +**	1.615	0.045
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Дніпрянка	0.052	1.551	0.020
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Борлото	0.050	1.551	0.020
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Несподіванка	0.033	1.551	0.020
соя (*Glycine max Moench.*) сорт Грімо	0.044	1.551	0.020
вігна (*Vigna unguiculata*) сорт Макарена	0.047	1.551	0.020
горох (*Pisum sativum*) сорт Шеститижневий	0.058	1.113	0.019
гарбуз (*Cucurbita māxima*) сорт Берегиня	0.037	1.113	0.019
тетрагонія (*Tetragonia tetragonioides*)	0.222	1.615	0.045
огірок (*Cucumis sativus*) сорт Джерело	0.143	1.551	0.020
огірок (*Cucumis sativus*) сорт Конкурент	0.070	1.113	0.019
кабачок (*Cucurbita pepo var. Giraumontia*) сорт Аспірант	0.048	1.551	0.020
томат (*Lycopersicon esculentum*) сорт Новинка Придністров'я	0.034	1.113	0.019
дурман (*Datura stramonium*)	0.132	1.551	0.020
махорка (*Nicotiána rústica*)	0.036	1.113	0.019

За даними імуноферментного аналізу встановлено наявність антигенів CMV у рослинах гарбуза, використаних для визначення спектру рослин-хазяїв (табл. 3.5).

Табл. 3.5 - Вміст антигенів CMV у досліджуваних рослинах.

Рослина	Середній показник при E=405 нм	K(CMV)+	K(CMV)-
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Зіронька	0.073	0.338	0.033
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Калинка	0.055	0.338	0.033
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Червона шапочка	0.047	0.338	0.033
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Дніпрянка	0.053	0.338	0.033
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Борлото	0.216	0.338	0.033
квасоля (*Phaseolus vulgaris*) сорт Несподіванка	0.034	0.338	0.033
соя (*Glycine max Moench.*) сорт Грімо	**0.272** +	0.338	0.033
вігна (*Vigna unguiculata*) сорт Макарена	0.062	0.338	0.033
горох (*Pisum sativum*) сорт Шеститижневий	0.112	0.338	0.033
гарбуз (*Cucurbita māxima*) сорт Берегиня	**0.222** +	0.338	0.033
тетрагонія (*Tetragonia tetragonioides*)	0.078	0.338	0.033
огірок (*Cucumis sativus*) сорт Джерело	0.120	0.338	0.033
огірок (*Cucumis sativus*) сорт Конкурент	0.082	0.338	0.033
кабачок (*Cucurbita pepo var. Giraumontia*) сорт Аспірант	0.074	0.338	0.033
томат (*Lycopersicon esculentum*) сорт Новинка Придністров'я	0.051	0.338	0.033
дурман (*Datura stramonium*)	0.066	0.338	0.033
махорка (*Nicotiána rústica*)	0.038	0.338	0.033

Попри відсутність літературних даних про біологічне тестування гладіолусних ізолятів CMV на рослинах гарбуза, відомо, що гарбуз належить до типових видів рослин, що є чутливі до вірусу огіркової мозаїки, викликаючи

симптоми системної інфекції, що супроводжується мозаїкою, деформаціями (Supyani et al., 2017). Схожі вірусспецифічні симптоми інфікування гарбуза, які стрімко розвивались, починаючи зі 18-ого дня з моменту механічної інокуляції, були отримані і при тестуванні ізолята гладіолуса вірусу огіркової мозаїки.

Дані імуноферментного аналізу узгоджуються зі візуальною діагностикою симптомів і демонструють специфічність гладіолусних ізолятів BYMV і CMV до спектру чутливих рослин.

РОЗДІЛ 4
МОЛЕКУЛЯРНА ХАРАКТЕРИСТИКА УКРАЇНСЬКИХ ГЛАДІОЛУСНИХ ІЗОЛЯТІВ BYMV І CMV

Вивчення молекулярно-біологічної характеристики вірусів, їх філогенії, дає можливість дізнатись більше про філогенетичних зв'язок досліджуваного ізоляту вірусу з іншими, припустити його еволюційну історію і походження, встановити взаємозв'язок амінокислотних заміщень зі особливостями ізоляту. Розвиток новітніх підходів, що базуються на сиквенуванні геномів вірусів дає можливість дослідити ступінь спорідненості з наявними доступними ізолятами з бази NCBI GenBank, таким чином зробити висновки про еволюційну природу досліджуваних вірусів.

У ході роботи було отримано послідовності фрагментів гена капсидного білка дев'яти ізолятів вірусу огіркової мозаїки розмірами 443 нт, а також фрагменти гена *CP* восьми ізолятів вірусів жовтої мозаїки квасолі розмірами 578 нт.

Отримані послідовності BYMV і CMV були депоновані в NCBI GenBank під відповідними номерами доступу (табл. 4.1, 4.2).

Табл. 4.1. - Перелік отриманих BYMV ізолятів виділених з гладіолусів.

№	Сорт гладіолусу	Місце відбору	Рік відбору	BYMV ізолят	
				Назва	Ac.No в NCBI GenBank
1	Пам'ять	Полтавська обл.	2019	GlMP-18	MK416160
2	Легенди Києва	м. Київ	2019	BYMV-Gl-LeK-19	MZ286969
3	Вікторія Сквирська	м. Сквира, Київська обл.	2020	BYMV-Gl-Skv-20	MZ28696
4	Леда	Полтавська обл.	2020	BYMV-Gl-KP-20	MZ286972

5	Сортозразок Київщина	с. Зелений Бір, Васильківський р-н. Київська обл.	2020	BYMV-Gl-SV-20	MZ286966
6	Сортозразок Київщина	м. Глеваха, Фастівський р-н. Київська обл.	2020	BYMV-Gl-FHL-20	MZ286968
7	Сортозразок Київщина МІП 1	с. Центральне, Обухівський р-н. Київська обл.	2020	BYMV-Gl-MIW1-20	MZ286970
8	Сортозразок Київщина МІП 2	с. Центральне, Обухівський р-н. Київська обл.	2020	BYMV-Gl-MIW2-20	MZ286971

Табл. 4.2 - Перелік отриманих CMV ізолятів виділених з гладіолусів.

№	Сорт гладіолусу	Місце відбору	Рік відбору	CMV ізолят	
				Назва	Ac.No в NCBI GenBank
1	Пам’ять	Полтавська обл.	2019	CMV-Gl-MP-19	MW847708
2	Легенди Києва	м. Київ	2019	CMV-Gl-LeK-19	MW847707
3	Вікторія Сквирська	м. Сквира, Київська обл.	2020	CMV-Gl-Skv-20	MW847710
4	Вікторія Сквирська	Полтавська обл.	2020	CMV-Gl-SkvP-20	MW847714
5	Сіянець коричневий	м. Київ	2020	CMV-Gl-SK-20	MW847713
6	Пітер Пірс	Житомирська обл.	2020	CMV-Gl-Zt-20	MW847712
7	Сортозразок Сумщина	Сумська обл.	2020	CMV-Gl-SV-20	MW847709
8	Сортозразок Львівщина	Золочівський р-н. Львівська обл.	2020	CMV-Gl-Lv-20	MW847711
9	Сортозразок Херсонщина	м. Скадовськ, Скадовський р-н., Херсонська обл.	2020	CMV-Gl-Kh-20	MW847715

Вперше сиквеновано та депоновано до NCBI GenBank фрагменти послідовності *CP* українських гладіолусних ізолятів вірусу огіркової мозаїки CMV-Gl-LeK-19 (MW847707), CMV-Gl-MP-19 (MW847708), CMV-Gl-Skv-20 (MW847710) та вірусу жовтої мозаїки квасолі BYMV-Gl-LeK-19 (MZ286969), GlMP-18 (MK416160), BYMV-Gl-Skv-20 (MZ286967), які були виявлені у змішаній інфекції в різних місцях відбору (табл. 4.3).

Табл. 4.3 - Гладіолусні ізоляти BYMV, CMV отримані з рослин, що містили змішану інфекцію.

Сорт гладіолусу	Місце відбору	Рік відбору	CMV ізолят		BYMV ізолят	
			Назва	Ac.No в NCBI GenBank	Назва	Ac.No в NCBI GenBank
Пам'ять	Полтавська обл.	2018	CMV-Gl-MP-19	MW847708	GlMP-18	MK416160
Легенди Києва	м. Київ	2019	CMV-Gl-LeK-19	MW847707	BYMV-Gl-LeK-19	MZ286969
Вікторія Сквирська	м. Сквира, Київська обл.	2020	CMV-Gl-Skv-20	MW847710	BYMV-Gl-Skv-20	MZ286967

Отримані послідовності фрагментів генів капсидного білка BYMV, CMV в подальшому були використані для філогенетичного аналізу з метою встановлення штамової приналежності та можливого походження українських ізолятів, а також дослідження амінокислотних послідовностей ізолятів та можливих амінокислотних заміщень.

4.1. Філогенетичний аналіз гладіолусних ізолятів BYMV

У ході дослідження було отримано і здійснено аналіз сиквенсів ізолятів BYMV, а саме фрагменти гена *CP* розміром 578 нт, що знаходяться у положені 8727-9305 у вірусному геномі.

Послідовності досліджуваних гладіолусних ізолятів було порівняно зі 52-ма ізолятами вірусу BYMV, наявними у базі NCBI GenBank (табл. А.1 додаток А).

Встановлено, що сім досліджуваних ізолятів належать до філогенетичної групи Monocot (групування філогенетичних груп на основі *CP*), маючи з ізолятами цієї групи ідентичність 94,8% - 99,4% за нуклеотидною послідовністю (нт) та 95,3% - 100% за амінокислотною (ак). Один отриманий ізолят (BYMV-Gl-FHL-20) кластеризується зі філогенетичною групою General, маючи ідентичність в середині групи 92,0% - 99,6% за нт і 93,2% - 100% за ак послідовністю (рис. 4.1, 4.2, табл. А.1 додаток А).

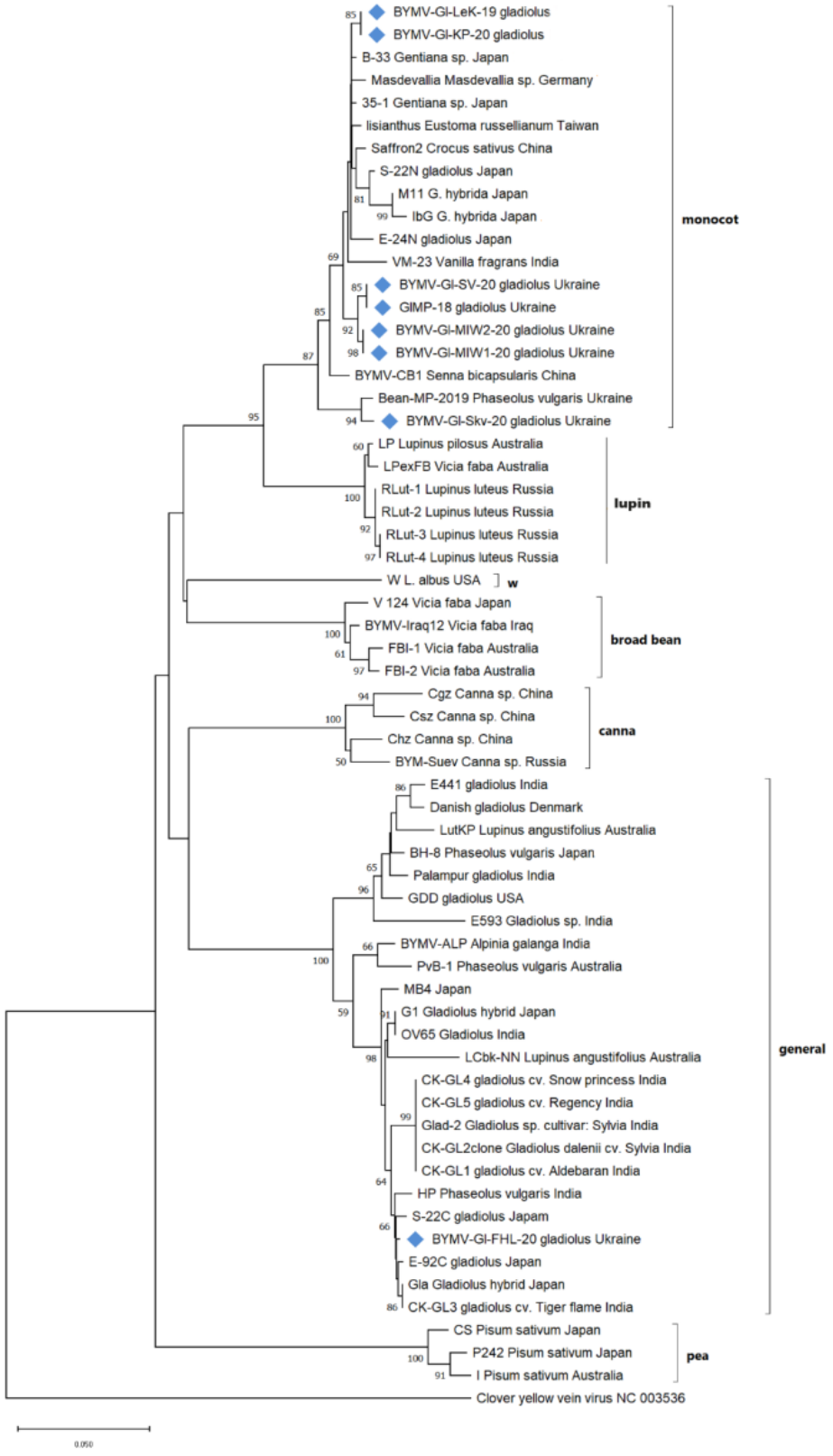

Рис. 4.1. Філогенетичне дерево побудоване на основі нуклеодидних послідовностей ділянки гена капсидного білка розміром 578 нт ізолятів BYMV методом найближчих сусідів (Neighbor-Joining) з 1000 бутстреп реплікацій. Використана модель Jukes-Cantor.

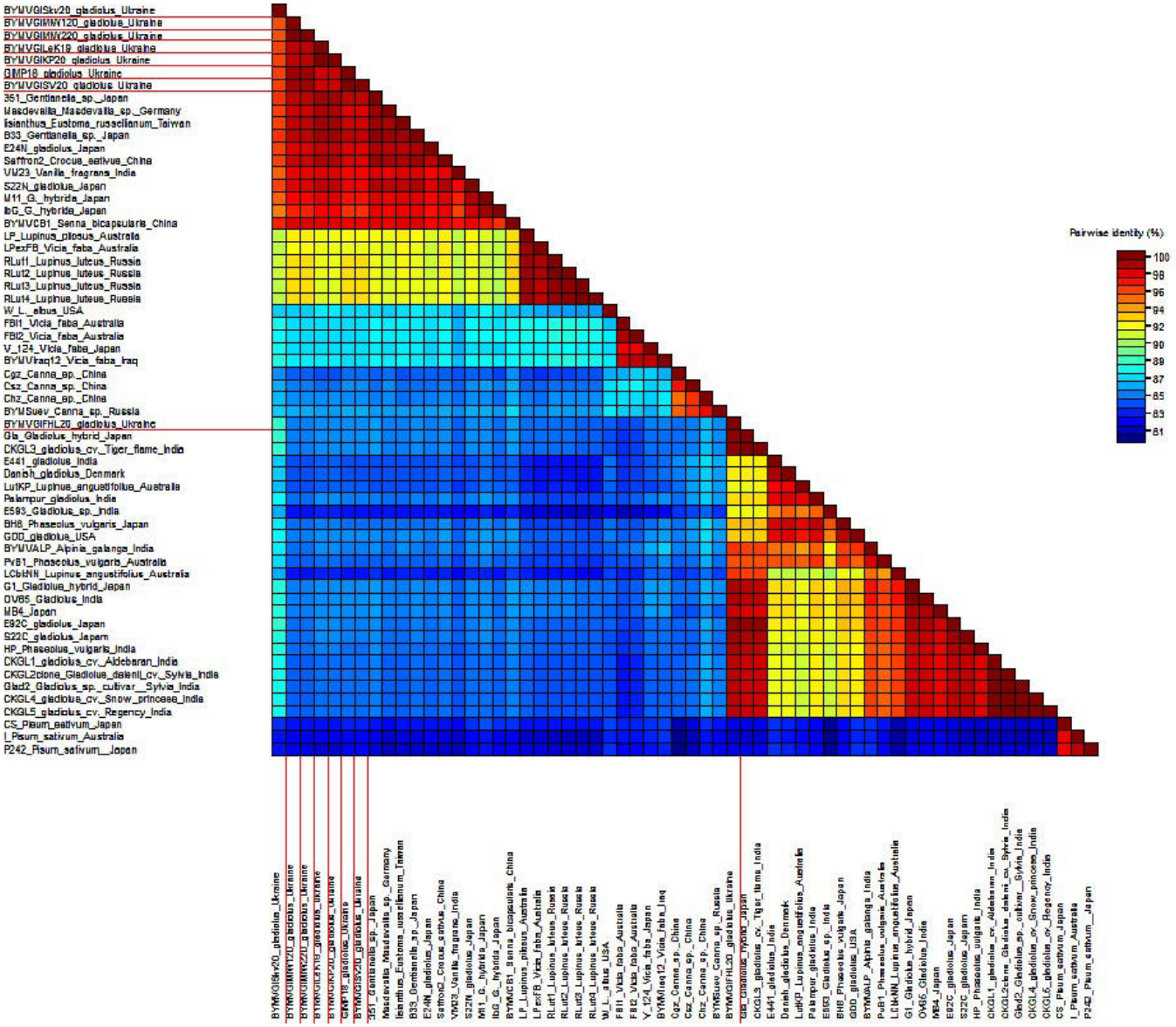

Рис. 4.2. Відсоток ідентичності нуклеотидних послідовностей досліджуваної ділянки гена капсидного білка 52-х ізолятів BYMV. Використане програмне забезпечення SDT v.1.

Між собою досліджувані гладіолусні ізоляти BYMV-Gl-SV-20, BYMV-Gl-Skv-20, BYMV-Gl-LeK-19, BYMV-Gl-MIW1-20, BYMV-Gl-MIW2-20, BYMV-Gl-KP-20, GlMP-18, що були ідентифіковані до групи Monocot, мають ідентичність в межах 95,9% - 100% за нуклеотидною послідовністю та з досліджуваним представником групи General (BYMV-Gl-FHL-20) – 83,4% - 87,6%. (рис. 4.2, табл. 4.4).

Табл. 4.4 - Ідентичність українських гладіолусних ізолятів BYMV за нуклеотидними послідовностями ділянки гена капсидного білка між собою, %.

Назва ізолята	BYMV-Gl-SV-20	BYMV-Gl-Skv-20	BYMV-Gl-LeK-19	BYMV-Gl-MIW1-20	BYMV-Gl-MIW2-20	BYMV-Gl-KP-20	GlMP-18	BYMV-Gl-FHL-20
BYMV-Gl-SV-20	-	96,1	98,4	99,5	99,5	98,4	100	83,6
BYMV-Gl-Skv-20	96,1	-	96,3	95,9	95,9	96,2	96,1	87,6
BYMV-Gl-LeK-19	98,4	96,3	-	98,6	98,6	100	98,4	83,8
BYMV-Gl-MIW1-20	99,5	95,9	98,6	-	100	98,6	99,5	83,4
BYMV-Gl-MIW2-20	99,5	95,9	98,6	100	-	98,6	99,5	83,4
BYMV-Gl-KP-20	98,4	96,2	100	98,6	98,6	-	98,4	83,8
GlMP-18	100	96,1	98,4	99,5	99.5	98,4	-	83,6
BYMV-Gl-FHL-20	83,6	87,6	83,8	83,4	83,4	83,8	83,6	-

При порівнянні за амінокислотними послідовностями, з’ясовано, що отримані гладіолусні ізоляти групи Monocot між собою мають ідентичність в межах 98,4% - 100%, а з представником групи General BYMV-Gl-FHL-20 в межах 95,8% - 96,3% (табл. 4.5).

Табл. 4.5 - Ідентичність українських гладіолусних ізолятів BYMV за амінокислотними послідовностями ділянки гена капсидного білка між собою %.

Назва ізолята	BYMV-Gl-SV-20	BYMV-Gl-Skv-20	BYMV-Gl-LeK-19	BYMV-Gl-MIW1-20	BYMV-Gl-MIW2-20	BYMV-Gl-KP-20	GlMP-18	BYMV-Gl-FHL-20
BYMV-Gl-SV-20	-	98,4	99,5	100	100	99,5	100	95,8
BYMV-Gl-Skv-20	98,4	-	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	96,3
BYMV-Gl-LeK-19	99,5	98,4	-	99,5	99,5	100	99,5	95,8
BYMV-Gl-MIW1-20	100	98,4	99,5	-	100	99,5	100	95,8
BYMV-Gl-MIW2-20	100	98,4	99,5	100	-	99,5	100	95,8
BYMV-Gl-KP-20	99,5	98,4	100	99,5	99,5	-	99,5	95,8
GlMP-18	100	98,4	99,5	100	100	99,5	-	95,8
BYMV-Gl-FHL-20	95,8	96,3	95,8	95,8	95,8	95,8	95,8	-

Таким чином, встановлено, що найвищі показники ідентичності за нт і ак послідовністю мають між собою BYMV-Gl-MIW1-20 і BYMV-Gl-MIW2-20, що дорівнює 100% за нт і ак. Враховуючи, що обидва сорти були зібрані поблизу у складі однієї приватної колекції, такі показники свідчать про циркуляцію певного штаму на даній території в Київській області. Важливо відмітити, що симптоми на кожному зі сортів різнились. Так, гладіолуси, з яких було виділено

BYMV-Gl-MIW1-20, характеризувались штрихуватою мозаїкою і затримкою у цвітінні, в той час як для проявів вірусної інфекції у випадку BYMV-Gl-MIW2-20 були характерні зморшкуватість, деформація листкової пластинки. З'ясовано, що різницю у симптомах не викликала змішана інфекція зі CMV або TRSV, оскільки, за даними імуноферментного аналізу, антигенів CMV або TRSV не було виявлено. Виходячи з отриманих даних можна припустити, що різниця у симптомах при інфікуванні одним штамом BYMV була викликана сортоспецифічними особливостями гладіолусів або ж мутаціями у геномі BYMV у ділянках, що не досліджувались.

Аналіз BYMV-Gl-MIW1-20 і BYMV-Gl-MIW2-20 продемонстрував найбільші показники ідентичності зі японськими ізолятами зі *Gentianella sp.* 35-1 *(*AB097090), B-33 (AB097089), що складає 99,8% за нуклеотидною послідовністю (нт) та 99,5% -100% за амінокислотною (ак), а також зі тайванським ізолятом зі *Eustoma russellianum* Lisanthus (AM884180), китайським ізолятом зі *Crocus sativus* Saffron-2 (MG002647), німецьким ізолятом, виділеним зі *Masdevallia sp.* Masdevallia (AF185961) – 98,4 % - 98,6% за нт і 99,5 % - 100% за ак послідовністю ділянки гена *CP*.

BYMV-Gl-MIW1-20 і BYMV-Gl-MIW2-20 із представниками групи Lupin мають ідентичність в межах 92,2% - 92,9% нт, 98,5% - 99,4% ак; з ізолятами з групи Broad bean – 85,5%-86.0% нт, 97,9% - 99,0% аа; з General – 80,5% - 83,4% нт, 90,1% - 96,5% аа; з групою Canna 82,7% - 84,5% нт, 94,3% - 95,8% ак; з єдиним представником з групи W – 85,1% за нт, 95,3% за аа та з представниками групи Pea – 79,6% - 80,7% за нт і 92,2% - 92,7% за аа послідовністю.

Найвищі показники ідентичності були виявлені також у BYMV-Gl-LeK-19 і BYMV-Gl-KP-20 – 100% за нуклеотидними і амінокислотними послідовностями. Такі ж дані ідентичності (100% за нт і ак) спостерігались між ізолятами GlMP-18 і BYMV-Gl-SV-20. Важливо відмітити, що ці пари ізолятів зі 100% ідентичністю були відібрані в віддалених одна від одної областях України. Так, BYMV-Gl-LeK-19 – ізолят, виділений зі гладіолусу сорту Легенди Києва у 2019 році на території м. Києва має 100% ідентичність за ак і нт послідовністю з

ізолятом BYMV-Gl-KP-20, що був виділений зі гладіолусу сорту Леда на території Полтавської області у 2020 році. У свою чергу, ізолят GlMP-18, що виділений у 2018 році зі гладіолусу сорту Пам'ять на території Полтавської області має 100% ідентичність за нт і ак послідовністю з ізолятом BYMV-Gl-SV-20, що був отриманий зі неідентифікованого сорту гладіолусу на території с. Зелений Бір (Київська область). Такі дані можуть свідчити про спільне походження ізолятів з різних місць відбору, що підтверджує небезпеку поширення гладіолусних ізолятів посадковим матеріалом на нові території.

BYMV-Gl-LeK-19 і BYMV-Gl-KP-20 мають найбільшу ідентичність з японськими ізолятами зі *Gentianella sp.* 35-1 *(*AB097090), B-33 (AB097089), гладіолусними ізолятами E-24N (AB029438) та S-22N (AB029435), тайванським ізолятом Lisanthus зі *Eustoma russellianum* (AM884180), китайським ізолятом зі *Crocus sativus* Saffron-2 (MG002647), німецьким ізолятом, виділеним зі *Masdevallia sp.* Masdevallia (AF185961) – 98,8% - 99,4% за нт, 98,9% - 99,5% за ак послідовністю. Із представниками групи Monocot ізолят BYMV-Gl-LeK-19 і і BYMV-Gl-KP-20 мають ідентичність в межах 97,5% - 99,4% нт і 97,4% - 99,5% за ак послідовністю.

BYMV-Gl-LeK-19 і BYMV-Gl-KP-20 із представниками групи Lupin мають ідентичність в межах 91,6% - 92% нт, 98,4% - 98,9% ак; з ізолятами з групи Broad bean – 85,5% - 86,0% нт, 97,4% - 98,4% аа; з General – 81,0% - 83,8% нт, 90,1% - 96,3% аа; з групою Canna 82,3% - 84% нт, 93,7% - 94,8% ак; з єдиним представником з групи W – 85,7% зат, 94,8% за аа та з представниками групи Pea – 79,2% - 80,8% за нт і 92,2% - 92,7% за аа послідовністю гена капсиднго білка.

Філогенетичний аналіз GlMP-18 і BYMV-Gl-SV-20 показали найвищий відсоток ідентичності із японськими ізолятами зі *Gentianella sp.* 35-1 *(*AB097090), B-33 (AB097089), що складає 98,6% за нуклеотидною послідовністю та 98,5%-100% за амінокислотною, а також зі тайванським ізолятом зі *Eustoma russellianum* Lisanthus (AM884180), китайським ізолятом зі *Crocus sativus* Saffron-2 (MG002647), німецьким ізолятом, виділеним зі *Masdevallia sp.* Masdevallia (AF185961), японським гладіолусним ізолятом E-24N (AB029438) –

98,2% - 98,4% за нт, 98,5% - 100% за ак. Загалом, зі представниками своєї групи GlMP-18 і BYMV-Gl-SV-20 мають ідентичність в межах 96,6% - 98,6% за нт і 96,9% - 100% за аа послідовністю.

Порівняльний аналіз ідентичності з іншими BYMV групами показав, що зі групою Lupin ізоляти GlMP-18 і BYMV-Gl-SV-20 мають ідентичність в межах 92,1% - 92,9% нт, 98,9% - 99,5% ак; з ізолятами з групи Broad bean – 85,5% - 85,8% нт, 97,9% - 98,9% ак; з General – 80,7% - 83,6% нт, 90,1% - 96,3% ак; з групою Canna 83.0% - 84,7% нт, 94,3% - 95,8% ак; з представником з групи W – 85,5% за нт, 95,3% за ак та з представниками групи Pea – 80,1% - 80,2% за нт і 92,2% - 92,7% за ак послідовністю.

Аналіз послідовності гладіолусного ізолята BYMV-Gl-Skv-20 показав, що демонструє ідентичність зі представниками групи Monocot в межах 94,8% - 96,8% за нт і 95,3% - 98,4% за аа, та має найбільшу спорідненість з українським ізолятом Bean-MP-19 виділеним зі квасолі (99,1% за нт, 99,5% за ак), а також із китайським ізолятом зі *Senna bicapsularis* BYMV-CB1 (MK516282), японськими ізолятами 35-1 *(*AB097090), B-33 (AB097089) і Lisanthus (AM884180) – 96,2% - 96,8% за нт і 97,9% - 98,4% за аа. BYMV-Gl-Skv-20 є дещо відмінним від інших українських гладіолусних ізолятів та на філогенетичному дереві розташований відокремлено від решти ізолятів цієї групи.

Порівняльний аналіз BYMV-Gl-Skv-20 зі іншими філогенетичними групами свідчить, що ізолят має ідентичність з групою Lupin в межах 90,6% - 91.0% за нт, 97,4%-97,9% ак; з ізолятами з групи Broad bean – 86,4% - 86,2% нт, 97,4% - 98,4% ак; з General – 80,7% - 87,6% нк, 90,6% - 96,9% ак; з групою Canna 83,6% - 84,9% нт, 93,2% - 94,3% ак; з групою W – 85,3% за нт, 94,8% за аа та з Pea – 80,8% - 81,4% за нк і 92,7% - 93,2% за ак послідовністю ділянки гена капсидного білка.

Філогенетичний аналіз представника групи General - BYMV-Gl-FHL-20 показав, що даний ізолят має ідентичність зі представниками своєї групи 91,9% - 99,6% за нуклеотидною послідовністю та 93,2% - 100% за амінокислотною. BYMV-Gl-FHL-20 має найбільшу ідентичність з японськими гладіолусними

ізолятами Gla (AB439729), G1 (AB439730), S-22C (AB029436), E-92C (AB029439), що варіює в межах 98,9% - 99,6% за нт і 98,9% - 100% за ак та з індійськими гладіолусними ізолятами CK-GL1 (KF155409), CK-GL2-clone (KM114059), Glad 2 (JQ686721), CK-GL3 (KF155414), CK-GL4 (KF155419), CK-GL5 (KF155420), OV65 (MK131270) – 98,8% за нт і 99,5% -100% за ак, а також з індійським ізолятом з *Phaseolus vulgaris* HP (KC011006) – 99,1% за нт і 99,5% за ак послідовністю.

Порівняння BYMV-Gl-FHL-20 вказує, що ізолят має ідентичність з групою Lupin в межах 83,0% - 93,2% за нт, 95,3% - 98,5% ак; з ізолятами з групи Broad bean – 81,2% - 83,4% нт, 95,8% - 96,8% аа; з Monocot – 82,1% - 84,1% нт, 92,7% - 95,8% ак; з групою Canna 83,2% - 85,0% нт, 93,2% - 94,3% ак; з групою W – 82,7% за нт, 93,2% за ак та з Pea – 79,1% - 79,6% за нк і 91,1% - 91,7% за ак послідовністю.

Аналіз амінокислотних послідовностей гладіолусних ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі BYMV-Gl-LeK-19, GlMP-18, BYMV-Gl-Skv-20 здійснювався шляхом порівняння амінокислотних послідовностей з 52 ізолятами/штамами BYMV, доступними у базі GenBank (рис. 4.3.).

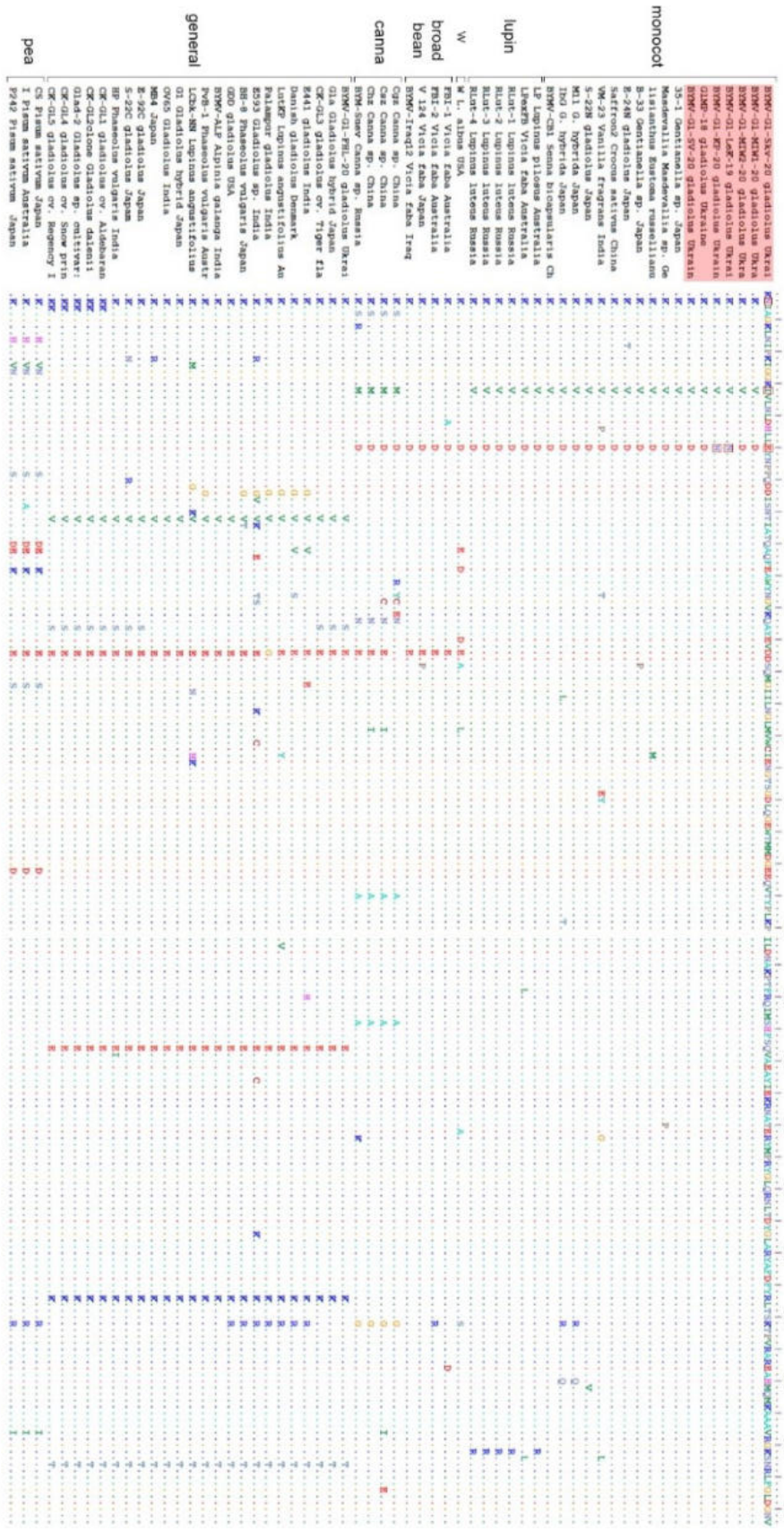

Рис. 4.3. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей досліджуваних українських гладіолусних ізолятів BYMV з групи Monocot. Числа вгорі

представляють позиції амінокислот. Крапками «.» позначені ідентичні амінокислоти, буквами – амінокислоти, що відрізняються.

Ізоляти GlMP-18, BYMV-Gl-SV-20, BYMV-Gl-MIW1-20 і BYMV-Gl-MIW2-20 не містили унікальних амінокислотних замін в порівнянні з іншими представниками групи monocot у досліджуваній ділянці гена *CP*.

Встановлено, що ізоляти BYMV-Gl-LeK-19 і BYMV-Gl-KP-20 мають унікальну ак заміну D→N в позиції 25, яка не характерна для жодного з ізолятів використаних у аналізі у досліджуваній *CP* ділянці. Ізолят BYMV-Gl-Skv-20 має заміщення у позиціях 2 - K→N, 16 - V→I та 25 - D→E. BYMV-Gl-Skv-20 є дещо відмінним від двох інших українських ізолятів та на філогенетичному дереві розташований дещо відокремлено від решти ізолятів цієї групи (рис. 4.3). Серед досліджуваних трьох ізолятів BYMV-Gl-Skv-20 має найбільше ак заміщень - три. Ак заміна K→N в позиції 2 є унікальною і не зустрічається у інших ізолятах, що були використані в аналізі. Важливо відмітити, що присутність амінокислоти I в позиції 16 є характерною для філогенетичних груп Broad bean, General, W and Pea. Амінокислота E в позиції 25 є характерною для групи General і Pea, але не є характерними для ізолятів групи Monocot. Це може бути пов'язане з рекомбінаціями, що зустрічаються у групі Monocot між гладіолусними (*G. hybrida*) ізолятами та квасолевими (*P. vulgaris*) у гені *CP* (Wylie and Jones, 2009).

Оскільки в філогенетичному аналізі був використаний фрагмент гена *CP* продукт якого (capsid protein) бере участь у передачі векторами, руху з клітини-до-клітини, інкапсидації вірусної РНК та в регуляції ампліфікації вірусної РНК, можна припустити, що дані заміни можуть відігравати певну роль у особливостях патогенезу ізолята BYMV-Gl-Skv-20 і спектрі чутливих рослин.

При аналізі амінокислотних послідовностей представника групи General - BYMV-Gl-FHL-20, унікальних амінокислотних замін в порівнянні з іншими представниками групи у досліджуваній ділянці гена *CP* не виявлено (рис. 4.4).

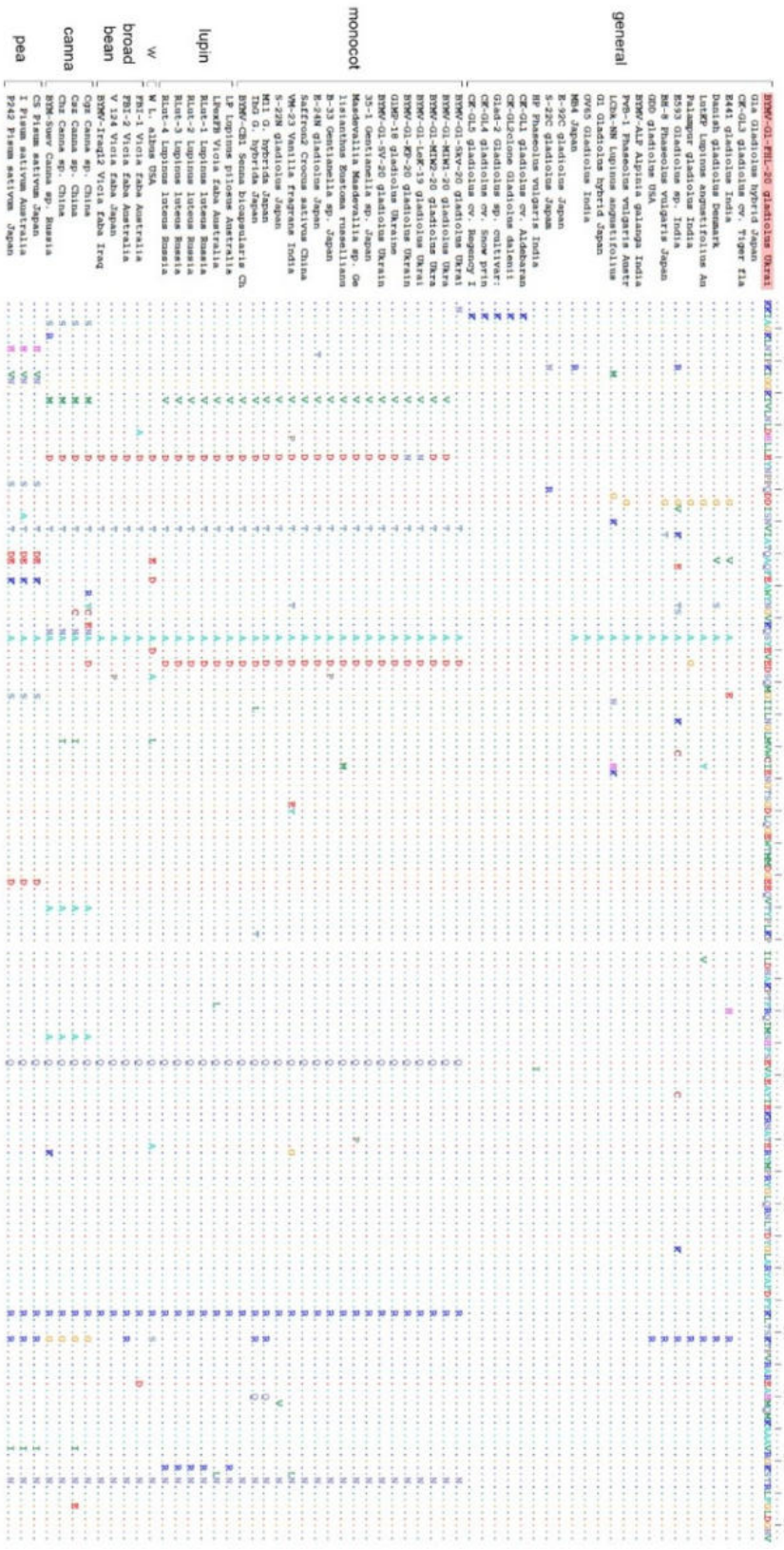

Рис. 4.4. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей досліджуваного ізолята BYMV-Gl-FHL-20 (група General). Числа вгорі представляють позиції амінокислот. Крапками «.» позначені ідентичні амінокислоти, буквами – амінокислоти, що відрізняються.

Для встановлення ймовірного походження досліджуваних ізолятів був проведений філогенетичний аналіз із застосуванням методу максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood) (рис. 4.5).

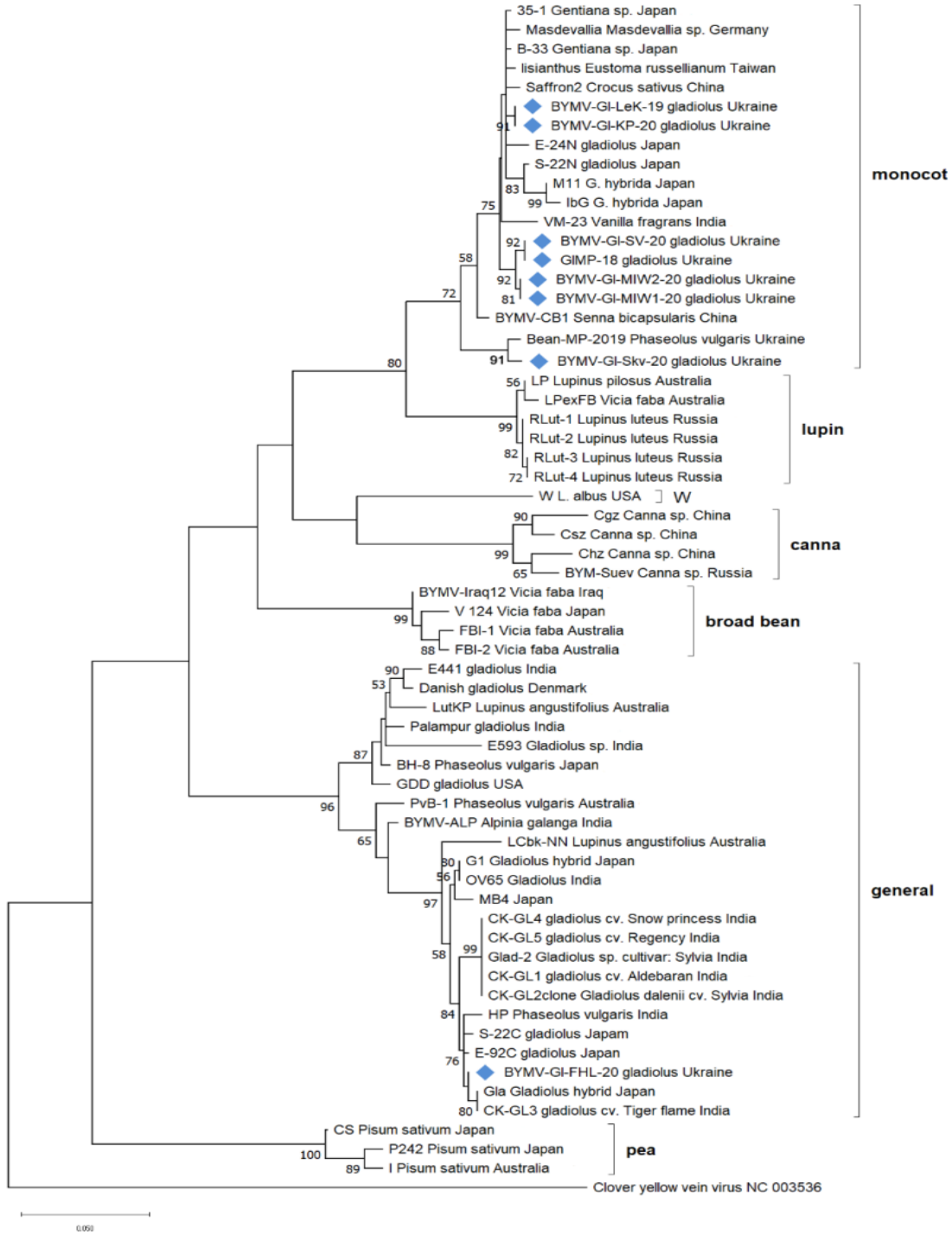

Рис. 4.5. Філогенетичне дерево, побудоване на основі нуклеотидних послідовностей ділянки гена капсидного білка розміром 578 нт ізолятів BYMV методом максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood) з 1000 бутстреп реплікацій. Модель Jukes-Cantor.

Встановлено, що ізоляти BYMV-Gl-LeK-19 і BYMV-Gl-KP-20 мають найвищий відсоток гомології з китайським ізолятом з *Crocus sativus* Saffron-2 (MG002647) – 99,1% за нт і 99,5% за ак послідовністю, що свідчить про спільне їх походження.

Ізоляти GlMP-18 і BYMV-Gl-SV-20, BYMV-Gl-MIW1-20 і BYMV-Gl-MIW2 утворюють окрему філогенетичну гілку, відокремлюючись від іноземних ізолятів групи Monocot вірусу жовтої мозаїки квасолі. Між собою ізоляти мають гомологію – 99,5% за нт і 100% за ак послідовностями гена капсидного білка.

BYMV-Gl-Skv-20 має, порівняно з усіма іншими українськими ізолятами, низьку гомологію з групою Monocot - 94,8% - 96,8% за нт і 95,3% - 98,4% за ак послідовністю. Разом із українським квасолевим ізолятом Bean-MP-2019 (OL555723) вони формують одну еволюційну гілку. Таким чином, BYMV-Gl-Skv-20 еволюційно споріднений з українськими ізолятами вірусу жовтої мозаїки квасолі.

Представник групи General - BYMV-Gl-FHL-20 формує філогенетичну гілку зі японським ізолятом з гладіолусу Gla (AB439729) та індійським ізолятом з гладіолусу CK-GL3 (KF155414), маючи гомологію з ними 99,6% за нт та 100% за ак послідовністю. Таким чином, ізолят BYMV-Gl-FHL-20 має найвищу гомологію саме з азійськими гладіолусними ізолятами з групи General.

Отже, отримані результати свідчать, що на території України у насадженнях гладіолусів циркулюють ізоляти вірусу жовтої мозаїки квасолі, що належать до двох філогенетичних груп – Monocot і General. Максимальна ідентичність ізолятів за послідовністю гена капсидного білка GlMP-18 з BYMV-Gl-SV-20 та BYMV-Gl-LeK-19 з BYMV-Gl-KP-20 з різних місцевостей відбору, цілком можливо, свідчить про спільне походження ізолятів, що, у свою чергу, демонструє поширення гладіолусних ізолятів посадковим матеріалом. Ізоляти, що були зібрані на території однієї приватної колекції сортів - BYMV-Gl-MIW1-20 і BYMV-Gl-MIW2-20, проявляли різний характер симптомів, втім, філогенетичний аналіз показав 100% ідентичність за нт та ак послідовністю досліджуваної ділянки гена *CP*. Таким чином, отримані результати можуть

вказувати на сортоспецифічні особливості перебігу вірусної інфекції у гладіолусах.

4.2. Філогенетичний аналіз гладіолусних ізолятів CMV

Вірус огіркової мозаїки, маючи широке коло хазяїв і векторів передачі, що здатні передавати вірус неперсистентно на інші рослини, належить до найбільш поширених вірусів рослин у світі. Представники підгруп IA, IB та II відрізняються такими особливостями як діапазон хазяїв, поширеність, патогенність. Численні філогенетичні дослідження CMV показують, що в основному група IB включає ізоляти CMV з Азії та Близького Сходу, на відміну від групи IA та II, до яких належать ізоляти з різних країн та континенти, більшість з яких є ізолятами від Європи. Глибокий філогенетичний аналіз ізолятів CMV дозволив встановити, що підгрупа IA походить від підгрупи IB. Єдині очевидні відмінності між деревами CP і 3a полягають у ступені розгалуження, яка дещо вища у 3a, і в довжинах гілок, які довші у дереві побудованому на основі CP, особливо стосовно гілок, що ведуть до підгрупи I та II (Roossinck M. 2002).

У ході дослідження вперше в Україні було отримано і проаналізовано сиквенси гладіолусних ізолятів CMV, а саме фрагменти гена *CP* розміром 443 нт. Нуклеотидні та амінокислотні послідовності ділянки гена капсидного білка гладіолусних ізолятів CMV було порівняно зі послідовностями 70-ти інших ізолятів та штамів CMV, що доступні у базі NCBI GenBank (табл. А.2 додаток А).

З отриманих результатів встановлено, що сім досліджуваних ізолятів кластеризуються зі IA підгрупою маючи з ізолятами цієї групи ідентичність 94,8% - 99,4% за нт та 83,0% - 100% за ак послідовністю. Один ізолят (CMV-G1-SkvP-20) кластеризується зі філогенетичною підгрупою IB маючи ідентичність з ізолятами цієї підгрупи 95,8% - 100% за нт, і 96,0% - 100% за ак послідовністю. Ізолят CMV-Gl-Zt-20 належить до підгрупи II маючи ідентичність з ізолятами цієї підгрупи 97,8% - 99,3% за нт, 95,8% - 99,2% за ак послідовністю (рис. 4.6, 4.7, табл. А.2 додаток А).

Рис. 4.6. Філогенетичне дерево побудоване на основі нуклеодидних послідовностей ділянки гена капсидного білка розміром 443 нт ізолятів CMV методом найближчих сусідів (Neighbor-Joining) з 1000 бутстреп реплікацій. Використана модель Jukes-Cantor.

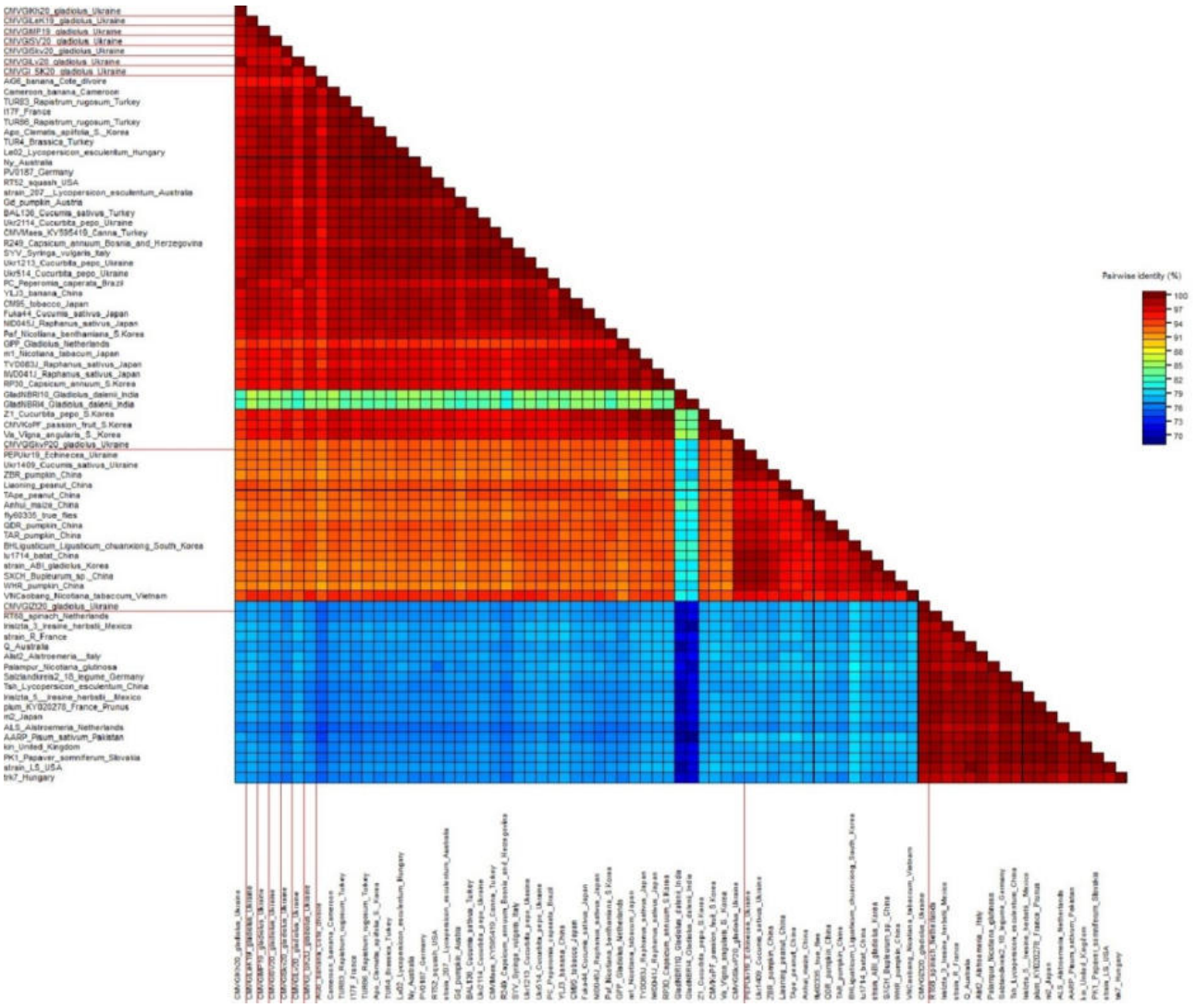

Рис. 4.7. Відсоток ідентичності нуклеотидних послідовностей досліджуваної ділянки гена капсидного білка 52-х ізолятів CMV. Використане програмне забезпечення SDT v.1

Між собою досліджувані ізоляти підгрупи IA (CMV-Gl-LeK-19, CMV-Gl-MP-19, CMV-Gl-SV-20, CMV-Gl-Lv-20, CMV-Gl-SK-20, CMV-Gl-Skv-20, CMV-Gl-Kh-20) мають ідентичність, що варіює в межах 96,0%-99,5% за нуклеотидними послідовностями та 95,5%-100% амінокислотними послідовностями. CMV-Gl-SkvP-20, який належить до підгрупи IB, має ідентичність з досліджуваними ізолятами з підгрупи IA – 91,7% - 92,3% за нт і 97,5% - 98,3% за ак послідовністю. CMV-Gl-Zt-20, що кластеризується зі II підгрупою, має ідентичність з досліджуваними ізолятами з підгрупи IA, яка варіює в межах 72,5% - 73,2% за нт і 80,5% - 82,2% за ак. Зі CMV-Gl-SkvP-20

ізолят CMV-Gl-Zt-20 має ідентичність 72,5% за нт і 82,2% за ак послідовністю (табл. 4.6, 4.7).

Табл. 4.6 - Ідентичність українських гладіолусних ізолятів CMV за нуклеотидними послідовностями ділянки гена капсидного білка між собою, %.

Назва ізолята	CMV-Gl-LeK-19	CMV-Gl-MP-19	CMV-Gl-Lv-20	CMV-Gl-SK-20	CMV-Gl-Skv-20	CMV-Gl-Kh-20	CMV-Gl-SV-20	CMV-Gl-SkvP-20	CMV-Gl-Zt-20
CMV-Gl-LeK-19	-	98,6	97,0	97,8	97,1	97,8	98,1	92,2	73,1
CMV-Gl-MP-19	98,6	-	97,5	98,3	97,6	97,8	99,5	92,2	73,2
CMV-Gl-Lv-20	97,0	97,5	-	96,8	96,0	99,3	97,0	92,0	72,5
CMV-Gl-SK-20	97,8	98,3	96,8	-	99,3	97,0	97,8	92,3	75,2
CMV-Gl-Skv-20	97,1	97,6	96,0	99,3	-	96,2	97,1	92,2	73,2
CMV-Gl-Kh-20	97,8	97,8	99,3	97,0	96,2	-	97,3	91,7	72,5
CMV-Gl-SV-20	98,1	99,5	97,0	97,8	97,1	97,3	-	92,2	73,2
CMV-Gl-SkvP-20	92,2	92,2	92,0	92,3	92,2	91,7	92,2	-	72,5

CMV-Gl-Zt-20	73,1	73,2	72,5	75,2	73,2	72,5	73,2	72,5	-

Табл. 4.7 - Ідентичність українських гладіолусних ізолятів CMV за амінокислотними послідовностями ділянки гена капсидного білка між собою, %.

Назва ізолята	CMV-Gl-LeK-19	CMV-Gl-MP-19	CMV-Gl-Lv-20	CMV-Gl-SK-20	CMV-Gl-Skv-20	CMV-Gl-Kh-20	CMV-Gl-SV-20	CMV-Gl-SkvP-20	CMV-Gl-Zt-20
CMV-Gl-LeK-19	-	100	98,3	99,2	97,5	98,3	99,2	98,3	81,3
CMV-Gl-MP-19	100	-	98,3	99,2	97,5	98,3	99,2	98,3	81,4
CMV-Gl-Lv-20	98,3	98,3	-	97,5	95,5	100	97,5	97,5	82,2
CMV-Gl-SK-20	99,2	99,2	97,5	-	98,3	97,5	98,3	98,3	82,2
CMV-Gl-Skv-20	97,5	97,5	95,5	98,3	-	95,8	96,6	95,8	82,2
CMV-Gl-Kh-20	98,3	98,3	100	97,5	95,8	-	97,5	97,5	82,2
CMV-Gl-SV-20	99,2	99,2	97,5	98,3	96,6	97,5	-	97,5	80,5
CMV-Gl-SkvP-20	98,3	98,3	97,5	98,3	95,8	97,5	97,5	-	82,2

CMV-Gl-Zt-20	81,3	81,4	82,2	82,2	82,2	82,2	80,5	82,2	-

Згідно зі результатами подальшого філогенетичного аналізу встановлено, що гладіолусний ізолят CMV-Gl-Lv-20 зі Львівської області має найбільший показник ідентичності за досліджуваним фрагментом гену *CP* зі бразильським ізолятом PC (AF172842), виділеним з *Peperomia caperata,* (98,0% нт і 98,3% ак), із корейським ізолятом Apo (LC546042) з *Clematis apiifolia* (97,0% нт і 96,7% ак), італійським ізолятом SYV (MH433673) з *Syringa vulgaris* (96,8% нт і 96,7% ак), а також зі російським ізолятами CMV-Maes (KY595419) з *Canna sp.*, турецькими ізолятами TUR83 (LC066509) з *Rapistrum rugosum*, TUR4 (LC066500) з *Brassica* (96,7% нт і 96,7% ак) та австралійськими ізолятами stain 207 (AJ585517), Ny (CMU22821) зі томатів (96,7% - 96,8% нт і 98,3% ак). Із представниками IB підгрупи CMV-Gl-Lv-20 має ідентичність 91,1% - 94,7% за нт, 91,3% - 96,8% за ак, з представниками підгрупи II – 71,0% - 73,5% за нт, 79,6% - 83,1% за ак послідовністю.

Досліджуваний ізолят зі Херсонської області CMV-Gl-Kh-20 демонструє найбільшу ідентичність зі бразильським ізолятом PC (AF172842) з *Peperomia caperata,* (98,3% нт і 99,2% ак), а також зі російським ізолятом CMV-Maes (KY595419) з *Canna sp.* (97,5% нт і 98,3% ак), австралійськими ізолятами stain 207 (AJ585517), Ny (CMU22821) зі томатів (97,5% нт і 98,3% ак) та зі італійським ізолятом SYV (MH433673) з *Syringa vulgaris* (97,5% нт і 98,3% ак). При порівнянні відсотків ідентичності зі іншими філогенетичними підгрупами, встановлено, що CMV-Gl-Kh-20 має ідентичність зі представниками IB підгрупи в межах 90,6% - 93,1% за нт, 95,7% - 96,6% за ак і низьку ідентичність зі представниками підгрупи II, яка становить 71,0% - 73,2% за нт і 79,7%-83,1% за ак послідовністю.

Ізолят CMV-Gl-SV-20, який був виділений на території Сумської області зі гладіолусів, має найвищі показники ідентичності зі українськими ізолятами Ukr-1213 (KT199743), Ukr-2114 (KT199740) зі *Cucurbita pepo* – 98,5% - 98,6% за нт,

99,2% за ак; зі турецькими ізолятами BAL136 (MN985118) з *Cucumis sativus,* TUR4 (LC066500) зі *Brassica* – 98,3% - 98,5% за нт, 98,3% - 99,2% за ак; італійським ізолятом зі *Syringa vulgaris* SYV (MH433673), російським ізолятом зі *Canna sp.* CMV-Maes (KY595419) і південнокорейським ізолятом ізолятом Apo (LC546042) з *Clematis apiifolia* - 98,5% - 98,6% за нт, 99,2% за ак послідовністю. Зі представниками IB підгрупи ідентичність CMV-Gl-SV-20 варіює в межах 94,1% - 97,5% за нт і 91,5% - 93,3% за ак, та зі представниками II підгрупи – 71,8% - 73,5% за нт, 77,9% - 83,1% за ак послідовністю.

Київський ізолят CMV-Gl-SK-20 має найбільшу ідентичність зі автралійськми томатними ізолятами stain 207 (AJ585517), Ny (CMU22821), а також зі турецьким ізолятом зі *Rapistru rugosum* TUR83 (LC066509) – 99,5% за нт, 99,2% за ак; із камерунським ізолятом з банану Cameroon (EU428827), південнокорейським ізолятом ізолятом Apo (LC546042) зі *Clematis apiifolia,* німецьким ізолятом PV0187 (KP165582) та з угорським ізолятом зі *Lycopersicon esculentum* Le02 (AM114273) показники ідентичності – 99,3% за нт, 99,2% за ак; зі турецькими ізолятами TUR4 (LC066500) зі *Brassica,* TUR86 (LC066515) з *Rapistrum rugosum* і з гарбузовим ізолятом RT52 (AJ810258) зі Сполучених Штатів Америки – 99,0% - 99,2% за нт, 97,6% - 99,2% за ак послідовністю. Порівнюючи CMV-Gl-SK-20 зі іншими філогенетичними підгрупами, встановлено, що ідентичність з підгрупою IB варіює в межах 91,4% - 93,0% за нт, 94,1% - 97,5% за ак та з підгрупою II – 71,1% - 73,2% за нт, 79,6% - 83,1% за ак послідовністю.

CMV-Gl-LeK-19 з Києва, який був ідентифікований у змішаній інфекції з ізолятом BYMV-Gl-LeK-19 на гладіолусі сорт Легенди Києва, має найбільшу ідентичність з українським ізолятом виділеним з *Cucurbita pepo* Ukr-1213 (KT199743), австралійськими ізолятами з *Lycopersicon esculentum* Strain 207 (AJ585517) та Ny (CMU22821), італійським ізолятом зі *Syringa vulgaris* SYV (MH433673) і російським ізолятом зі *Canna sp.* CMV-Maes (KY595419) – 98,3 - 98,5% нт, 97,6% ак послідовністю. Ізолят CMV-Gl-LeK-19 має ідентичність зі представниками IB підгрупи в мажех 91,0% - 94,2% за нт, 92,1% - 96,0% за ак і

низьку ідентичність зі представниками підгрупи II, яка становить 71,7% - 73,8% за нт і 77,0% - 81,1% за ак.

Ізолят CMV-Gl-Skv-20 з Київської області, що був ідентифікований у змішаній інфекції зі BYMV-Gl-Skv-20 має найбільшу ідентичність з турецькими ізолятами з *Rapistrum rugosum* TUR86 (LC066515) і з *Brassica* TUR4 (LC066500) – 98,8% - 99,3% нт і 97,6% ак, із банану Cameroon (EU428827) з Камеруна (99% нт і 97,6% ак), а також з австралійськими ізолятами з помідора 207 (AJ585517) та Ny (CMU22821) – 98,9% - 98,8% нт і 97,6% ак. Ізолят CMV-Gl-Skv-20 має ідентичність зі представниками IB підгрупи в мажех 91,1% - 94,2% за нт, 90,6% - 96,0% за ак, низьку ідентичність зі представниками підгрупи II, яка становить 70,8% - 73,2% за нт і 73,8% - 75,9% за ак послідовністю.

Дослідження CMV-Gl-MP-19, що був виявлений на території Полтавської області в змішаній інфекції зі ізолятом GlMP-18 на гладіолусі сорту Пам'ять, демонструє високу ідентичність ізолята з українськими ізолятами, виділеними зі *Cucurbita pepo* Ukr-2114 (KT199740), Ukr-1213 (KT199743), турецьким ізолятом з *Cucumis sativus* BAL136 (MN985118) і з російським *Canna sp.* CMV-Maes (KY595419), італійським ізолятом зі *Syringa vulgaris* SYV (MH433673), південнокорейським ізолятом з *Clematis apiifolia* Apo (LC546042) – 99,0% нт і 97,6% - 98,4% ак, а також зі автралійськими ізолятами з помідора 207 (AJ585517) та Ny (CMU22821), турецьким ізолятом TUR86 з *Rapistrum rugosum* (LC066515) – 98,8% нт і 98,4% ак. Із представниками IB підгрупи CMV-Gl-MP-19 має ідентичність 91,1% - 94,7% за нт, 91,3% - 96,8% за ак, з представниками підгрупи II – 71,8% - 73,9% за нт, 77% - 80,8% за ак послідовністю.

Здорові бульбоцибулини гладіолусів, що не містили антигенів CMV, були висаджені на території Полтавської області, у місцевості циркуляції вірусу огіркової мозаїки. За один вегетаційний період на рослинах, вирощених з цих бульбоцибулин проявились симптоми хлоротичної штрихуватісті листків, що є характерними для ураження CMV. Подальший ІФА та ЗТ-ПЛР підтвердили наявність CMV інфекції у цих рослинах. Філогенетичний аналіз ізоляту CMV-Gl-SkvP-20, виділеного зі гладіолусу сорту Вікторія Сквирська з Полтавщини

показав, що за досліджуваним фрагментом гена капсидного білка (*CP*) ізолят належить до підгрупи ІВ, маючи ідентичність з ізолятами цієї підгрупи 95,8% - 100% за нт, і 96% - 100% за ак послідовністю. CMV-Gl-SkvP-20 має найбільшу ідентичність з українськими ізолятами, виділеними з Полтавської області: томатним ізолятом CMV-ToMP-2019 (OL505434), гарбузовим ізолятом CMV-pumpMP-19 (OL505435), ізолятом P-EP-Ukr-19 (MT978189), який був ідентифікований на ехінацеї (*Echinacea sp.*) та зі Ukr-1409 з *Cucumis sativus* (KT199741) – 99,5% - 100% нт і 99,2% - 100% ак, а також зі китайськими гарбузовими ізолятами ZBR (KP710850), WHR (KP710851), lu-17-14 (MK778781) зі *Ipomoea batatas*, SXCH (JX993913) зі *Bupleurum sp.* (98.3-99.0% нт та 98.4%-99.2% ак), зі південнокорейським гладіолусним ізолятом ABI (L36525) - 98,3% нт і 97,7% ак послідовністю). Із представниками підгрупи ІА ізолят CMV-Gl-SkvP-20 має ідентичність в межах 77,7% - 94,3% за нт, 82,3% - 97,6% за ак та має низьку низьку ідентичність зі представниками підгрупи ІІ, яка становить 73,8% - 75,9% за нт і 76,3% - 80,1% за ак послідовністю.

Враховуючи, що рослини гладіолусів, з яких був виділений ізолят CMV-Gl-SkvP-20, попередньо не містили антигенів вірусу за результатами ІФА, й прояви вірусної інфекції з'явились у місцях циркуляції ізолятів CMV, а саме P-EP-Ukr-19 (MT978189) та CMV-ToMP-2019 (OL505434) з якими у CMV-Gl-SkvP-20 встановлена 100% ідентичність у досліджуваній ділянці гену *CP* за нт і ак, ми припускаємо високу ймовірність векторної передачі вірусу на гладіолуси з інших рослинних культур, зростаючих у цьому агроценозі. Хоча встановлено, що для вірусу огіркової мозаїки характерна насіннєва передача для певних рослин (Montes, 2021), векторна передача сприяє поширенню вірусу на нові чутливі до патогена види рослин і створенню нових рослин-резерваторів. На основі досліджень просторово-часових моделей розповсюдження вірусу в посівах баштанних культур було зроблено висновок, що CMV передається переважно колонізуючими видами попелиць, такими як *Aphis gossypii* (Jeger M., 2020). Таким чином, підтверджений ризик векторної передачі вірусу огіркової мозаїки з інших чутливих рослин-хазяїв на здорові насадження гладіолусів.

При проведені філогенетичного аналізу ізоляту зі Житомирської області CMV-Gl-Zt-20 встановлено, що за досліджуваним фрагментом гена капсидного білка (*CP*) даний ізолят кластеризується зі підгрупою II з відсотками ідентичності 97,8% - 99,3% за нт, 95,8% - 99,2% за ак послідовністю представників підгрупи. CMV-Gl-Zt-20 має найбільшу ідентичність зі нідерландським ізолятом зі шпинату RT68 (AJ810254), словацьким ізолятом зі *Papaver somniferum* PK1 (MN792886) та з японським ізолятом m2 (AB006813) – 99,3% за нт, 98,3% - 99,2% за ак, а також зі німецьким ізолятом з бобових культур Salzlandkreis-2 (MN399746), великобританським ізолятом kin (Z12818), французьким ізолятом зі *Prunus sp.* plum (KY020278) та з мексиканським ізолятом зі *Iresine herbstii* IrisIzta 5 (KJ623609) – 99,1% за нт, 95,7% - 99,2% за ак. Зі представникам підгрупи IA CMV-Gl-Zt-20 має низькі відсотки ідентичності – 60,0% - 73,2% за нт, 77,1% - 83,1% за ак, та з підгрупою IB – 74,5% - 76,1% за нт, 80,5% - 83,1% за ак послідовністю.

Аналіз амінокислотних послідовностей гладіолусних ізолятів вірусу огіркової мозаїки здійснювався шляхом порівняння амінокислотних послідовностей з 68 ізолятами/штамами CMV доступними у базі GenBank. Аналізуючи досліджувані ізоляти CMV з підгрупи IA встановлено ряд унікальних амінокислотних замін (рис. 4.8).

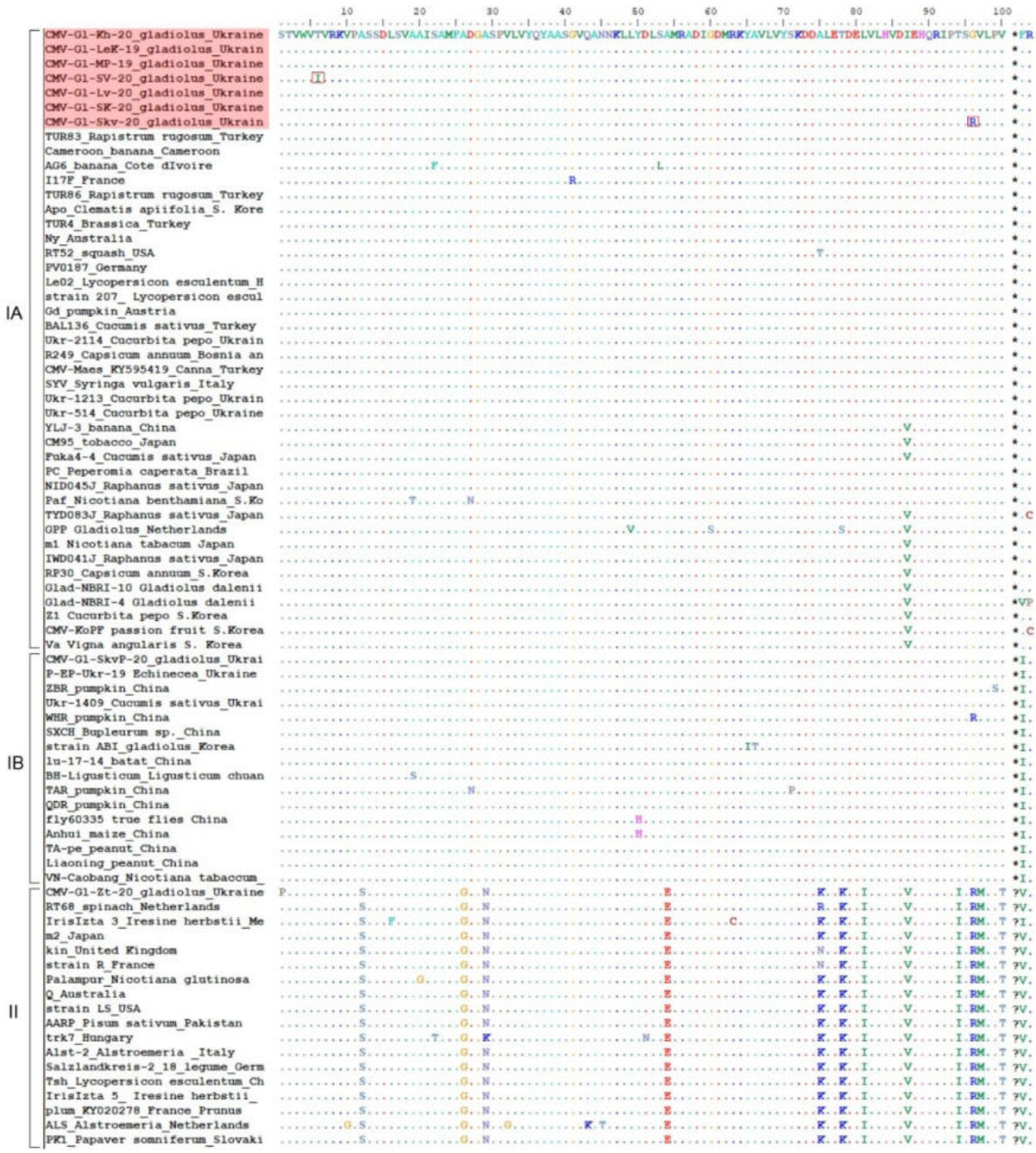

Рис. 4.8. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей досліджуваних українських гладіолусних ізолятів CMV підгрупи IA. Числа вгорі представляють позиції амінокислот. Крапками «.» позначені ідентичні амінокислоти, буквами – амінокислоти, що відрізняються.

Так, ізолят CMV-Gl-SV-20 має заміщення T→I в позиції 4, яке не характерне для жодного з ізолятів, використаних при аналізі досліджуваної *CP* ділянки. У ізолята CMV-Gl-Skv-20 встановлено ак заміщення, що присутнє в досліджуваному фрагменті CP гена, а саме: G→R в позиції 96, що не характерне

для жодного зі досліджуваних ізолятів підгрупи ІА, але є у всіх використаних в аналізі ізолятів ІІ підгрупи та в одного китайського гарбузового ізолята WHR (KP710851) з підгрупи ІВ. При аналізі CMV-Gl-LeK-19, CMV-Gl-MP-19, CMV-Gl-Lv-20, CMV-Gl-SK-20, CMV-Gl-Kh-20 не було помічено унікальних ак замін у досліджуваній CP ділянці, порівняно зі уже наявними в базі NCBI GenBank сиквенсами.

У ході дослідження гладіолусного ізолята CMV-Gl-SkvP-20, який належить до підгрупи ІВ не було помічено унікальних ак замін, дилецій чи вставок у досліджуваній *CP* ділянці порівняно зі уже наявними в базі NCBI GenBank сиквенсами, (рис. 4.9).

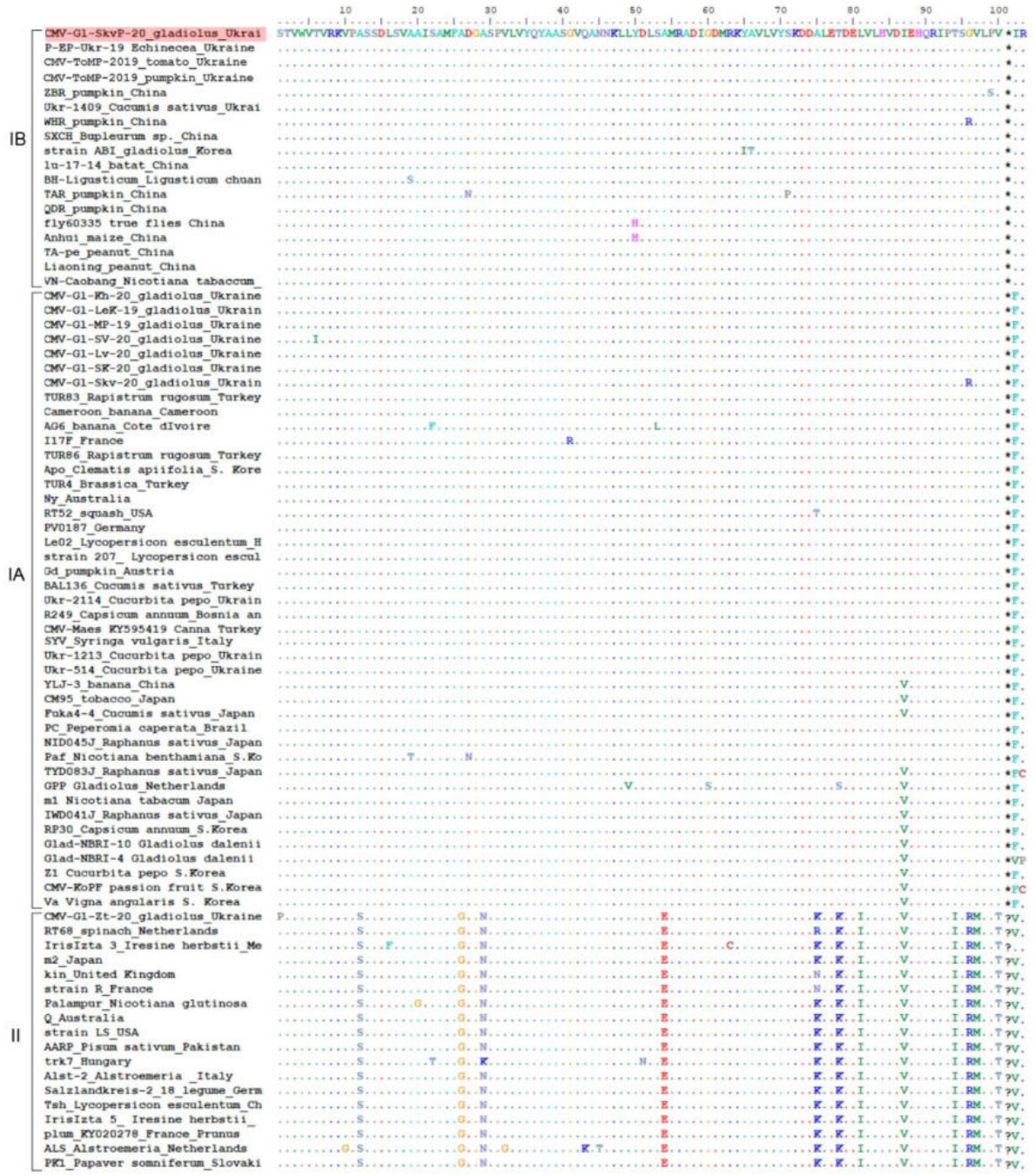

Рис. 4.9. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей досліджуваного ізолята CMV підгрупи IB (CMV-Gl-SkvP-20). Числа вгорі представляють позиції амінокислот. Крапками «.» позначені ідентичні амінокислоти, буквами – амінокислоти, що відрізняються.

Порівняльний аналіз амінокислотної послідовності гладіолусного ізолята CMV-Gl-Zt-20 зі 68 іншими ізолятами з різних країн і хазяїв встановив наявність

унікального заміщення, яке не є характерним для всіх інших ізолятів S→P в позиції 1(рис. 4.10).

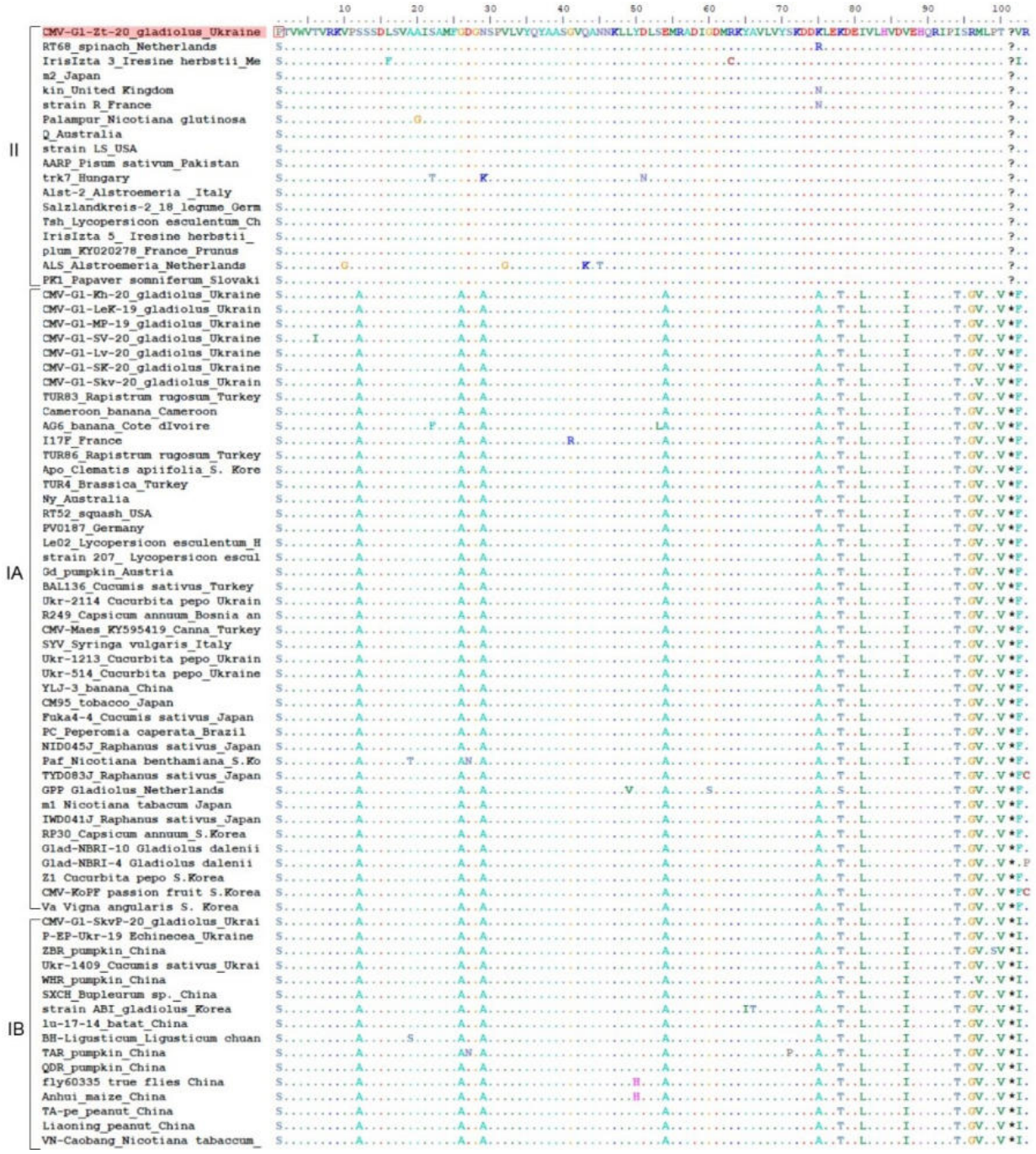

Рис. 4.10. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей досліджуваного ізолята CMV-Gl-Zt-20 підгрупи II. Числа вгорі представляють позиції амінокислот. Крапками «.» позначені ідентичні амінокислоти, буквами – амінокислоти, що відрізняються.

Для встановлення ймовірного походження українських гладіолусних ізолятів був проведений філогенетичний аналіз на основі побудови дерева методом максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood) (рис. 4.11).

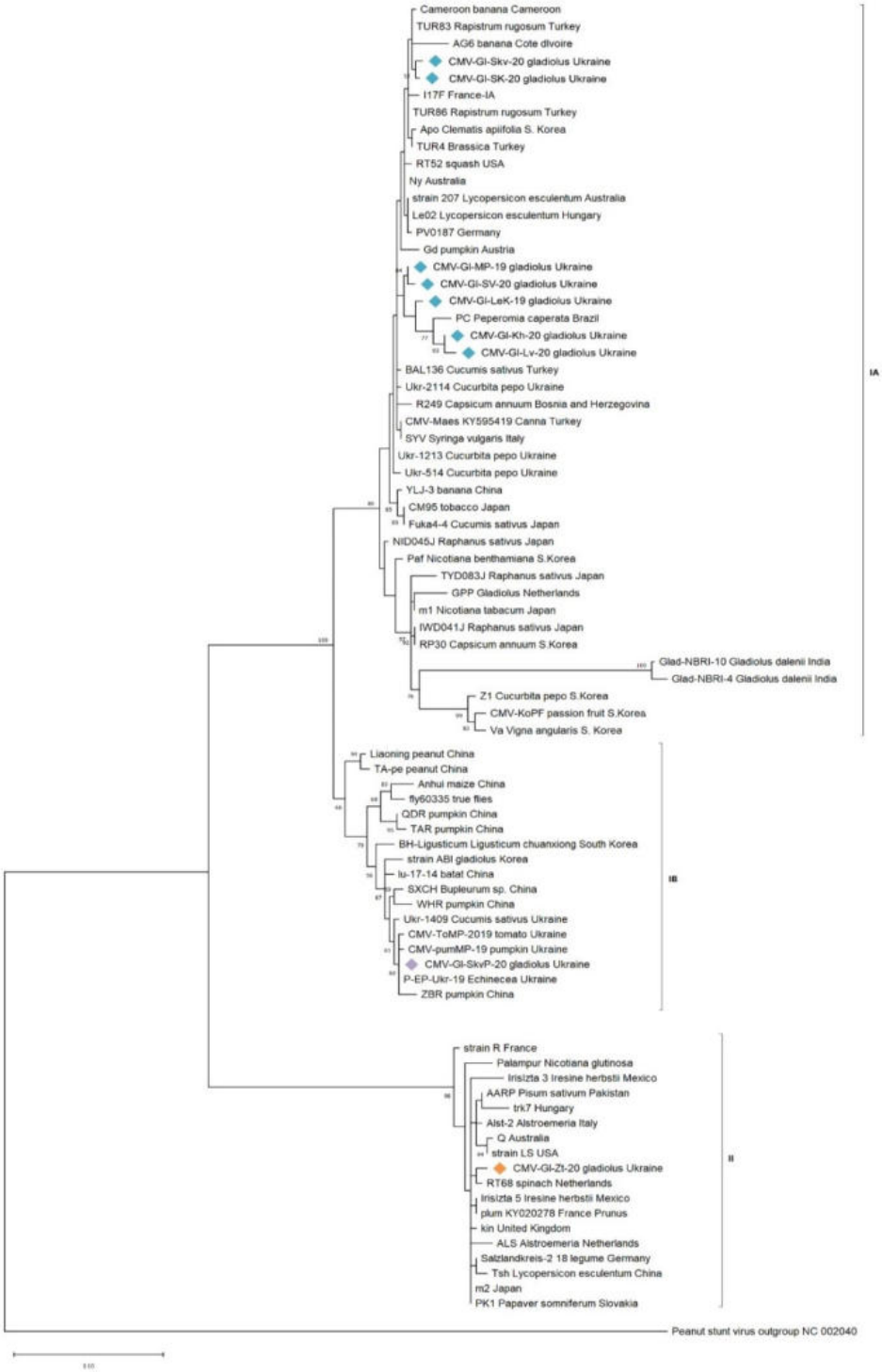

Рис. 4.11. Філогенетичне дерево побудоване на основі нуклеодидних послідовностей ділянки гена капсидного білка (443 нт) ізолятів CMV методом

максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood) з 1000 бутстреп реплікацій. Використана модель Jukes-Cantor

При аналізі ізолятів, що кластеризуються з підгрупою ІА встановлено, що п’ять ізолятів формують окрему еволюційну гілку. Так, полтавський ізолят CMV-Gl-MP-19 і сумський ізолят CMV-Gl-SV-20 утворюють спільне розгалуження у даній гілці, що вказує на спільний еволюційний шлях даних ізолятів. Київський ізолят CMV-Gl-LeK-19 утворює відгалуження та гомологічно пов’язаний зі львівським (CMV-Gl-Lv-20) та херсонським (CMV-Gl-Kh-20) ізолятами, які у свою чергу мають найвищу гомологію зі бразильським PC (AF172842), виділеним з *Peperomia caperata,* - 98,0% - 98,3% нт і 98,3% - 99,2% аа. Отриманий результат об’єднує ізоляти з різних місць відбору зі п’яти областей України, що зростали у різних кліматичними умовах, це може свідчити про поширення CMV з посадковим матеріалом та закріплення цих ізолятів у насадженнях гладіолусів.

Ізоляти з Києва та Київської області CMV-Gl-Skv-20 і CMV-Gl-SK-20 формують окреме відгалуження у гілці разом зі TUR83 (LC066509) з *Rapistrum rugosum,* камерунським ізолятом з банану Cameroon (EU428827) та бананoвим ізолятом AG6 (KC189915) з Кот д'Івуару, маючи з ними гомологію, що варіює в межах 97,1%-99,5% за нт, 93,7%-99,2% за ак. Отримані результати свідчать про спільне походження ізолятів CMV-Gl-Skv-20 і CMV-Gl-SK-20, яке еволюційно пов’язане зі ізолятами TUR83, Cameroon та AG6.

Аналізуючи полтавський ізолят CMV-Gl-SkvP-20, який належить до підгрупи ІВ, з’ясовано, що ізолят має найвищу гомологію з українськими ізолятами з ехінацеї P-EP-Ukr-19 (MT978189), томату CMV-PoMP-2019 (OL505434), гарбузу CMV-pumMP-19 (OL505435) та зі китайськими гарбузовими ізолятами ZBR (KP710850) – 99,0%-100% за нт, 99,2%-100% за ак, які разом формують відгалуження у гілці з українським ізолятом Ukr-1409 з *Cucumis sativus* (KT199741). Результати філогенетичного аналізу свідчать про спільне еволюційне походження українських ізолятів Полтавщини (CMV-Gl-

SkvP-20, P-EP-Ukr-19, CMV-PoMP-2019, CMV-pumMP-19, Ukr-1409) з китайським ізолятом ZBR.

У ході проведеного дослідження, встановлено, що CMV-Gl-Zt-20, який належить до підгрупи II, має найвищу гомологію з нідерландським ізолятом RT68 (AJ810254) – 99,3% за нт, 98,3% за ак послідовністю. Враховуючи, що ізолят CMV-Gl-Zt-20 був виділений зі гладіолусів сорту Пітер Пірс, який є популярним імпортним сортом нідерландської селекції, а результати філогенетичного аналізу свідчать про спільне походження даного ізоляту зі нідерландським ізолятом RT68, можна припустити, що даний ізолят CMV потрапив на територію України через відсутність законодавчо закріпленого моніторингу посадкового матеріалу гладіолусів на вірусні інфекції. Також, слід відмітити, що у базі NCBI GenBank зареєстрований гладіолусний ізолят CMV GPP (підгрупа IA), який був виділений у Нідерландах зі *Gladiolus* x *grandiflorus cv.* 'Peter Pears', а, отже, дана сортова форма гладіолусів є чутливою до двох підгруп вірусу огіркової мозаїки.

Створення трансгенних сортів, які будуть стійкі до вірусної інфекції, є основним варіантом захисту сортових форм гладіолусів від CMV. Так, створені Kamo et al. трансгенні гладіолуси на основі сортів Пітер Пірс (Peter Pears) і Джені Лі (Jenny Lee), які містили ген *CP* ізоляту S з *Cucurbita pepo* (AF063610) II підгрупи CMV, продемонстрували відносну стійкість до інфікування ізолятами II підгрупи, але з роками відмічається втрата стійкості. Гладіолуси, які містили ген *CP* ізоляту GPP (AJ131623) I підгрупи не мали дієвої стійкості у випадку *CP*-опосередкованої резистентності, позитивні результати вдалось досягнути лише у випадку репліказа-опосередкованій резистентності (Kamo et al., 2010).

Отже, отримані результати демонструють, що на території України у насадженнях гладіолусів циркулюють ізоляти вірусу огіркової мозаїки, які належать до всіх відомих філогенетичних підгруп (IA, IB, II) CMV. Висока ідентичність і гомологічна спорідненість п'ятьох ізолятів (CMV-Gl-LeK-19, CMV-Gl-MP-19, CMV-Gl-SV-20, CMV-Gl-Lv-20, CMV-Gl-Kh-20) IA підгрупи з Північної, Центральної, Південної та Західної України вказує на спільне

походження та можливий шлях розповсюдження посадковим матеріалом. Водночас, на території Київської області ідентифіковані ізоляти CMV-Gl-Skv-20 і CMV-Gl-SK-20 еволюційно споріднені зі турецькими та африканськими ізолятами, що вказує на різні шляхи потрапляння CMV у насадження гладіолусів України.

Ізолят CMV-Gl-SkvP-20 (ІВ підгрупа) має максимальну ідентичність за досліджуваною ділянкою гена *CP* з ехінацейним ізолятом P-EP-Ukr-19 (MT978189) та томатним ізолятом CMV-ToMP-19 (OL505434) – 100% нк, 100% ак. З врахуванням того, що первинно на сорті Вікторія Сквирська з Київської області було ідентифіковано ізолят CMV-Gl-Skv-20, який належить до підгрупи ІА, а здорові бульбоцибулини даної сортової форми гладіолусів були висаджені в одній місцевості ідентифікації ізоляту P-EP-Ukr-19 та CMV-ToMP-19, отримані результати свідчать на користь того, що гладіолуси сорту Вікторія Сквирська у Полтавській області були інфіковані не через уражені бульбоцибулини, а за допомогою попелиць, що перенесли вірус з інших культур, зростаючих у цьому агроценозі. Це підтверджує потенційну небезпеку гладіолусів як рослин-резерваторів для вірусів.

Звертаючись до літературних даних та доступних послідовностей гладіолусних ізолятів CMV можна стверджувати, що CMV-Gl-Zt-20 перший у світі ізолят підгрупи ІІ ідентифікований на гладіолусі, та перший в Україні ідентифікований ізолят підгрупи ІІ. Даний ізолят, виділений із гладіолусу сорту Пітер Пірс іноземної селекції і є гомологічно спорідненим із нідерланським ізолятом RT68, що може вказувати на несертифікований посадковий матеріал як джерело вірусної інфекції.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Попри популярність насаджень гладіолусів та цінність рослини як квіткової культури, дослідження вірусних фітопатогенів у гладіолусів на території України не проводилось.

Зважаючи на це та враховуючи необхідність детального вивчення питання вірусних інфекцій гладіолусів в Україні, з приватних колекцій в літньо-осінній період 2019-2021 рр. було відібрано рослини з вірусспецифічними ознаками. Серед них – хлоротична штрихуватість і мозаїка на листках, «розрив кольору» на пелюстках квітки. Візуальна діагностика симптомів та відбір зразків проводились на території шести областей – Київська, Полтавська, Львівська, Сумська, Херсонська, Житомирська.

Всі досліджувані зразки були проаналізовані на наявність антигенів жовтої мозаїки квасолі (BYMV) за допомогою імуноферментного аналізу в модифікації DAS-ELISA. За результатами аналізу вірус жовтої мозаїки квасолі був виявлений у Київській, Полтавській, Львівській, Сумській, Херсонській областях. Вірус огіркової мозаїки виявлений у Київській, Полтавській, Львівській, Житомирській, Херсонській областях. В Київській, Полтавській і Херсонській областях вперше в Україні встановлено факт змішаної інфекції BYMV+CMV гладіолусів.

За результатами нашого дослідження, у насадженнях гладіолусів виявлено інфікування імпортних та вітчизняних сортів гладіолусів вірусом жовтої мозаїки квасолі і вірусом огіркової мозаїки. Аналізуючи насадження гладіолусів у різних місцях зростання на території Полтавської, Київської і Херсонської областей, встановлено факт змішаної інфекції вірусом жовтої мозаїки квасолі і вірусом огіркової мозаїки сортових форм гладіолусів. На рослинах спостерігались жорсткі симптоми у вигляді хлорозів і мозаїки на листковій пластинці, «розрив кольору» на пелюстках квітки. Важливо відмітити, що симптоми більш жорсткіші у своєму прояві на рослинах, що зростали у відкритому ґрунті в порівнянні з рослинами, що зростали у тепличних умовах.

Отримані результати демонструють високі показники ураженості вірусом огіркової мозаїки та вірусом жовтої мозаїки квасолі насаджень гладіолусів в досліджуваних місцевостях, що означає потенційну небезпеку для квітникарства та сільського господарства. Результати аналізу «діток» гладіолусів, вирощених із хворої материнської рослини, свідчать, що вегетативне розмноження гладіолусів слугує способом збереження вірусної інфекції в колекції рослин, що призводить до виродження сортів та є ймовірним фактором поширення вірусних інфекцій на нові території через збут та вирощування неперевіреної та несертифікованої продукції бульбоцибулин гладіолусів.

Біологічне тестування на видах рослин, чутливих до BYMV і CMV, встановило специфічність гладіолусних ізолятів досліджуваних вірусів. Гладіолусний ізолят BYMV інфікував квасолю (*Phaseolus vulgaris*) сорту Червона Шапочка і сою (*Glycine max*) сорту Грімо, а гладіолусний ізолят вірусу CMV уразив гарбуз (*Cucurbita maxima*) сорту Берегиня. Отримані результати узгоджуються зі дослідженнями спектру чутливих рослин до гладіолусних ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі й підтверджують вузьку специфічність цих штамів BYMV (Товкач і Гнутова, 2008; Kaur et al., 2015).

Встановлено сортову специфічність гладіолусів до прояву CMV, BYMV інфекції. Так, гладіолуси сортів Прісцилла і Міс Грін не проявляли візуальних ознак інфікування, хоч, за даними імуноферментного аналізу, у зразках виявлені антигени BYMV. Ці дані можуть свідчити про толерантність даних сортів до вірусу жовтої мозаїки квасолі. Гладіолуси сортів Йелов Ейдж, Наталка Полтавка, Лебедина Зграя, Рожевий Каскад, Фаворит в ході дослідження проявили нечутливість до BYMV, CMV, таким чином, дані сорти можуть розглядатись як потенційні кандидати для селекції та створення стійких до даних вірусів сортів. Дослідження генетичної вірусної стійкості гладіолусів є лише початком для успішного створення резистентних сортів. Враховуючи, що бульбоцибулині рослини, зазвичай, інфікуються більш ніж одним вірусом, перевагою буде створення сортів, які резистентні до декількох вірусів (Kamenetsky and Okubo, 2012).

Дослідження морфології вірусних часток у соці гладіолусів з симптомами штрихуватої мозаїки виявили скупчення характерних для BYMV ниткоподібних віріонів довжиною 720-750 нм та шириною близько 11-13 нм. Інша група віріонів - сферична, ікоседричної симетрії, близько 30 нм у діаметрі з електронно-щільним центром, що характерна для CMV. Морфологія та розміри досліджуваних віріонів гладіолусних ізолятів BYMV і CMV є характерними для даних вірусів (Virus Taxonomy, 2012; Pallas et al., 2013).

Дані імуноферментного аналізу й електронної мікроскопії були підтверджені шляхом виділення РНК продукту з використанням GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, USA) з подальшими етапами ЗТ-ПЛР, в ході яких було синтезовано cDNA. Отримані ПЛР продукти були відсеквеновані на 3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems HITACHI), використовуючи BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). За результатами виділення і сиквенування було отримано сиквенси фрагментів capsid protein (CP) гена дев'яти ізолятів вірусу огіркової мозаїки розмірами 443 нт, а також фрагменти CP гена восьми вірусів жовтої мозаїки квасолі розмірами 578 нт.

Генетичне різноманіття гладіолусних ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі і вірусу огіркової мозаїки досліджувалось за нуклеотидними послідовностями генів капсидних білків обох вірусів. Використовуючи порівняльний аналіз зі доступними у базі NCBI GenBank ізолятами, встановлено їх відсотки ідентичності в порівнянні з досліджуваними гладіолусними ізолятами.

Результати свідчать, що в насадженнях гладіолусів на території України циркулюють ізоляти вірусу жовтої мозаїки квасолі двох філогенетичних груп – Monocot і General, до яких входять всі відомі на сьогодні гладіолусі сиквенси BYMV (Uga et al., 2004). Встановлено, що сім досліджуваних ізолятів BYMV належать до філогенетичної групи Monocot, маючи ідентичність з ізолятами цієї групи в межах 94,8% - 99,4% за нуклеотидною послідовністю (нт) та 95,3% - 100% за амінокислотною (ак). Один досліджуваний ізолят (BYMV-Gl-FHL-20)

кластеризується зі філогенетичною групою General, маючи ідентичність в середині групи 92,0% - 99,6% за нк і 93,2% - 100% за ак. Максимальна ідентичність (100% за нт, 100% за ак) ізолятів GlMP-18 з BYMV-Gl-SV-20 та BYMV-Gl-LeK-19 з BYMV-Gl-KP-20 з різних місцевостей відбору, вірогідно, свідчать про спільне джерело посадкового матерілау, що, у свою чергу, демонструє проблему поширення гладіолусних ізолятів вірусу посадковим матеріалом, який не перебуває під регуляційним контролем держави.

Аналіз амінокислотної послідовності в досліджуваній ділянці гена *CP* виявив ряд амінокислотних замін у деяких гладіолусних ізолятів BYMV. Ізоляти BYMV-Gl-LeK-19 і BYMV-Gl-KP-20 мають унікальну ак заміну D→N в позиції 25. Серед досліджуваних ізолятів BYMV-Gl-Skv-20 має найбільше аа заміщень – три: 2 - K→N, 16 - V→I та 25 - D→E. K→N. Наявність амінокислоти E в позиції 25 є притаманною для групи General і Pea, але не є характерною для ізолятів групи Monocot, що можна пов'язувати зі рекомбінаціями, що зустрічаються між гладіолусними (*G. hybrida*) ізолятами та квасолевими (*P. vulgaris*) у гені *CP* (Wylie and Jones, 2009). Відомо, що CP (capsid protein) бере участь у передачі векторами, інкапсидації вірусної РНК та в регуляції ампліфікації вірусної РНК, руху з клітини-до-клітини, тому виявлені заміщення можуть відігравати певну роль у особливостях патогенезу досліджуваних ізолятів BYMV.

Ізоляти GlMP-18 і BYMV-Gl-SV-20, BYMV-Gl-MIW1-20 і BYMV-Gl-MIW2 утворюють окрему філогенетичну гілку, відокремлюючись від іноземних ізолятів групи Monocot. BYMV-Gl-Skv-20, який має порівняно низьку гомологію з групою Monocot (94,8% - 96,8% за нт і 95,3% - 98,4% за ак), кластеризується з українським ізолятом з квасолі Bean-MP-2019, утворюючи еволюційну гілку українських ізолятів групи Monocot. Єдиний виявлений представник групи General – BYMV-Gl-FHL-20 формує філогенетичну гілку зі японським ізолятом з гладіолусу Gla (AB439729) та індійським ізолятом з гладіолусу CK-GL3 (KF155414), маючи найвищу гомологічну спорідненість зі азійськими гладіолусними ізолятами з групи General.

Результати дослідження гладіолусних ізолятів вірусу огіркової мозаїки демонструють, що на території України циркулюють ізоляти CMV, які належать до всіх відомих філогенетичних підгруп (IA, IB, II) CMV.

Вивчення ізолятів IA підгрупи демонструють, що п’ять ізолятів (CMV-Gl-LeK-19, CMV-Gl-MP-19, CMV-Gl-SV-20, CMV-Gl-Lv-20, CMV-Gl-Kh-20) з різних географічних районів України (Північний, Центральний, Південний та Західний регіони) мають високу ідентичність і гомологічну спорідненість, що вказує на спільне походження та можливий шлях розповсюдження посадковим матеріалом. У свою чергу, ідентифіковані на території Київської області ізоляти CMV-Gl-Skv-20 і CMV-Gl-SK-20 еволюційно споріднені зі турецькими та африканськими ізолятами, що вказує на різні джерела CMV у насадженнях гладіолусів України.

Виділений ізолят CMV-Gl-SkvP-20 за досліджуваним фрагментом гена капсидного білка (*CP*) належить до підгрупи IB. Найвищі відсотки ідентичності CMV-Gl-SkvP-20 має з українськими ізолятами з огірка Ukr-1409 гарбузовим ізолятом CMV-pumpMP-19 та 100% подібність за нк і ак з ізолятами з ехінацеї P-EP-Ukr-19 і зі томатів CMV-ToMP-2019, які були досліджений раніше й походить з тієї ж місцевості, де зростали гладіолуси. Враховуючи, що рослини гладіолусів, з яких був виділений ізолят CMV-Gl-SkvP-20, попередньо не містили антигенів вірусу за результатами ІФА, й прояви вірусної інфекції з’явились у місцях циркулювання ізолятів CMV, дані результати свідчать на користь того, що гладіолуси сорту Вікторія Сквирська у Полтавській області були інфіковані не через уражені бульбоцибулини, а за допомогою попелиць, що перенесли вірус з овочевих або інших культур, зростаючих у цьому агроценозі.

CMV-Gl-Zt-2, виділений зі популярного імпортного сорту гладіолусів Пітер Пірс, належить до II підгрупи і найбільш спорідненний (99,3% за нт, 98,3% за аа) з нідерландським ізолятом RT68 (AJ810254). Даний результат свідчить про спільне походження CMV-Gl-Zt-20 зі нідерландським ізолятом RT68, тому можна припустити, що даний ізолят CMV потрапив на територію України шляхом імпорту бульбоцибулин з європейських країн.

Аналіз амінокислотних послідовностей гладіолусних ізолятів вірусу огіркової мозаїки показав ряд ак замін у досліджуваних гладіолусних ізолятів вірусу. Так, ізолят CMV-Gl-SV-20 T→I має заміщення в позиції 4, ізолят CMV-Gl-Skv-20 - G→R в позиції 96 та ізолят CMV-Gl-Zt-20 - S→P в позиції 1. Важливо відмітити, що ізолят BYMV-Gl-Skv-20, з яким CMV-Gl-Skv-20 виявлений у змішаній інфекції, також містив унікальні заміщення, які не є характерними для ізолятів групи Monocot. Це може вказувати на дещо відмінне походження виявлених ізолятів BYMV-Gl-Skv-20 і CMV-Gl-Skv-20 в порівнянні з іншими українськими ізолятами і потребує детальнішого повногеномного аналізу для встановлення еволюційної природи таких заміщень.

Відомо, що білки вірусу огіркової мозаїки 1a і 2a беруть участь переважно у реплікації вірусу, що відбувається на тонопласті, тоді як білки 2b, 3a і 3b (CP) беруть участь у міжклітинному русі вірусу (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Встановлено, що білок капсиду (CP) був підтверджений як детермінанта симптомів шляхом обміну геном *CP* між штами CMV-M, що індукує хлороз, і штам CMV-Q, що індукує зелену мозаїку, а взаємодія між CP CMV та Fd I є основною детермінантою для індукції хлорозу в тютюні (Qiu Y et al., 2018). Таким чином, присутність ак замін, дилецій чи вставок у досліджуваній *CP* може вказувати на можливі штамові особливості досліджуваних ізолятів, які впливають на міжклітинні взаємодії вірусу та прояв симптомів на рослині в цілому.

Філогенетичний аналіз виділених ізолятів демонструє широку представленість різних філогенетичних груп BYMV і CMV, дозволяє зробити висновки про можливі джерела вірусів та еволюційне походження досліджуваних гладіолусних ізолятів, демонструє ряд унікальних амінокислотних замін, характерних для українських ізолятів BYMV і CMV, що були досліджені в даній дисертаційній роботі.

ВИСНОВКИ

Вперше ідентифіковано та досліджено віруси, що уражують рослини гладіолусів на території України, детально вивчено біологічні і молекулярні властивості гладіолусних ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі (BYMV) і вірусу огіркової мозаїки (CMV). Основні науково-практичні результати роботи викладено у наступних висновках:

1. Вперше встановлено, що на території України рослини гладіолусів уражуються вірусом жовтої мозаїки квасолі (BYMV) і вірусом огіркової мозаїки (CMV). BYMV виявлено у Київській, Полтавській, Львівській, Херсонській, Сумській областях у 16,3-72,5% відібраних зразків. CMV ідентифіковано у 10,2-13,5% рослин із Київської, Полтавської, Львівської, Херсонської, Житомирської областей. Змішана інфекція цими вірусами виявлена у 51-72% відібраних зразків у Київській, Полтавській і Херсонській областях.
2. Досліджено біологічні властивості українських гладіолусних ізолятів. Основним симптомом вірусної інфекції є хлоротична штрихувата мозаїка на листках. Встановлено, що віріони BYMV є ниткоподібними розміром 720-750×11-13 нм. Вірусні частки CMV сферичні діаметром 30±1 нм з електронно-щільним центром. Ці характеристики не відрізняються від ізолятів, виділених з інших рослин. Для досліджуваних гладіолусних ізолятів BYMV і CMV виявлено відмінності у спектрі чутливих видів рослин, порівняно з іншими штамами цих вірусів, а також здатність уражувати деякі економічно важливі види рослин, що вказує на потенційну загрозу вказаних вірусів у агроценозах.
3. Визначено сорти гладіолусів Йелов Ейдж, Наталка Полтавка, Лебедина Зграя, Рожевий Каскад, Фаворит, які не уражуються у природних умовах BYMV і CMV та можуть бути рекомендовані як джерела стійкості до вказаних вірусів для використання їх у селекції при створенні нових сортів.

4. Вперше визначено і депоновано до світового Генбанку нуклеотидні послідовності ділянок генів капсидних білків 17-ти українських гладіолусних BYMV і CMV . Встановлено широке штамове різноманіття ізолятів, які циркулюють на території України. Ізоляти BYMV належать до двох філогенетичних груп – Monocot і General, а ізоляти CMV – до усіх трьох відомих філогенетичних підгруп ІА, ІВ, ІІ. Це перше повідомлення про циркуляцію CMV з підгрупи ІІ на території України, а також про приналежність гладіолусного ізоляту цього вірусу до вказаної філогенетичної підгрупи.
5. Виявлено унікальні амінокислотні заміщення у послідовностях генів капсидних білків трьох досліджуваних ізолятів BYMV, що вказує на генетичну мінливість українських гладіолусних ізолятів, які кластеризуються з філогенетичною групою Monocot. Амінокислотні заміщення, виявлені у досліджуваних послідовностях генів капсидних білків двох ізолятів CMV з підгрупи ІА та у ізолята з підгрупи ІІ, що вказує на штамові особливості досліджуваних ізолятів, які впливають на міжклітинні взаємодії вірусу та прояв симптомів на рослині в цілому.
6. Встановлено ідентичність 100% за нуклеотидною і амінокислотною послідовністю ділянки гена капсидного білка гладіолусного ізоляту CMV-Gl-SkvP-20 з ізолятами з ехінацеї P-EP-Ukr-19, томатів CMV-ToMP-2019 і гарбуза CMV-pumMP19, виділених у одному агроценозі, що свідчить про поширення ізоляту переносниками та небезпечність гладіолусів як резерватора вірусу. Висока ідентичність (100% за нуклеотидною і амінокислотною послідовністю) між послідовностями деяких ізолятів BYMV, виділених із гладіолусів з територіально віддалених областей вказує на їх розповсюдження посадковим матеріалом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гнутова, Р., Товкач, В. (2008). Вирус желтой мозаики фасоли — возбудитель заболевания декоративных культур. *Сельскохозяйственная биология*, *5*, 96-102.
2. Документ Про затвердження Переліку регульованих шкідливих організмів z1300-06, чинний, поточна редакція — Редакція від 03.09.2019,підстава- z0879-19. Available at: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1300-06
3. Кириченко, А. М., Антіпов, І. О., Гринчук, К. В. (2015). Молекулярно-біологічна характеристика ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі. *Агроекологічний журнал, 4, 113-119.*
4. Пиріг, О. В., Дмитрук, О. О., Мамчур, О. Є., & Коломієць, Л. П. (2012). Особливості розвитку рослин люпину жовтого за ураження вірусом жовтої мозаїки квасолі. *Сільськогосподарська Мікробіологія*, *14*, 178–188. https://doi.org/10.35868/1997-3004.14.178-188
5. Салига, Ю., Снітинський, В. (1999). *Електронна мікроскопія біологічних об'єктів.* Київ: Світ.
6. Abdalla, O. A., Bruton, B. D., Fish, W. W., Ali, A. (2012). First Confirmed Report of Tobacco ringspot virus in Cucurbits Crops in Oklahoma. *Plant Disease*, *96*(11), 1705–1705. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0629-PDN
7. Aebig, J. A., Kamo, K., Hei-Ti, H. (2005). Biolistic inoculation of gladiolus with cucumber mosaic cucumovirus. *Journal of virological methods*. 123. 89-94. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.09.010.
8. Ahmed, A. A., Fath-Allah, M. M. (2011). Double infection with Cucumber mosaic virus and Plum pox virus (sharka) in apricot trees. *Int J Virol.* 8(1), 50–60.
9. Albajes, R., Gullino, M. L., Lenteren, J. C. van, & Elad, Y. (2006). *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Springer Science & Business Media.
10. Ali, A., & Kobayashi, M. (2010). Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. *Journal of Virological Methods*, *163*(2), 234–237. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.09.026

11. Al-Shudifat, A. M., Al-Shahwan, I. M., Al-Saleh, M. A., Abdalla, O. A., & Amer, M. A. (2021). Identification of Tomato black ring virus from tomato plants grown in greenhouses in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(4), 2360–2365. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.031
12. Alzohairy, A. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology.
13. Arneodo, J. D., Breuil, S. D., Lenardon, S.L. (2005). Detection of Bean yellow mosaic virus and Cucumber mosaic virus infecting *gladiolus* in Argentina. *Agriscientia*, *22*, 87–89.
14. Asjes, C. J. (1979). Viruses and virus diseases in Dutch bulbous irises (Iris hollandica) in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, *85*(6), 269–279. https://doi.org/10.1007/BF01977599
15. Asjes, C. J. (1997). Incidence and control of viruses in Gladiolus in the Netherlands. *Acta Hortic*, *430*, 699–708.
16. Assob, J. C., Kamga, H. L., Nsagha, D. S., Njunda, A. L., Nde, P. F., Asongalem, E. A., Njouendou, A. J., Sandjon, B., & Penlap, V. B. (2011). Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *11*(1), 70. https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-70
17. Azimi, M. H. (2020). Assessment and ranking of new gladiolus hybrids in Iran. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, *3*(Issue 2-September 2020), 235–244. https://doi.org/10.22077/jhpr.2020.2972.1112
18. Azizi, A., & Shams-bakhsh, M. (2014). Impact of cucumber mosaic virus infection on the varietal traits of common bean cultivars in Iran. *VirusDisease*, *25*(4), 447–454. https://doi.org/10.1007/s13337-014-0233-9
19. Baumann, M. M., Kiambi, R. G., & Lockhart, B. E. (2020). Lady's Slipper Orchid and Hydrangea: New Ornamental Hosts of Tobacco Rattle Virus (TRV) in Minnesota. *Plant Health Progress*, *21*(1), 19–20. https://doi.org/10.1094/PHP-05-19-0034-BR
20. Bellardi, M. G., Pisi, A. (1985). Identification of three isolates of Tomato black ring virus (TBRV) from Gladiolus. *Rivista di ortoflorofrutticoltura italiana*, *69*(5), 299-309.

21. Bellardi, M. G., Vicchi, V., Gelli, C. (1987). Stunting of Gladiolus flower spike associated with Tobacco streak virus (TSV). *Phytopathologia Mediterranea*, *26*(2), 73-80.
22. Berkeley G.H. (1953). Some viruses affecting Gladiolus. *Phytopathology*, *43*, 111–115.
23. Beaver-Kanuya, E., & Harper, S. J. (2021). Seasonal fluctuation and host species affect Tobacco ringspot virus detection. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-369469/v1
24. Berniak, H., Malinowski, T. (2009). 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*, 17(2), 5-20.
25. Bhat, A. I., & Rao, G. P. (2020). Transmission of Viruses Through Fungi. In A. I. Bhat & G. P. Rao (Eds.), *Characterization of Plant Viruses: Methods and Protocols* (pp. 111–115). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0334-5_18
26. Boari, A.J., Maciel-Zambolim, E., Carvalho, M.G., Zerbini F.M. (2000). Caracterizacao biologica e molecular de isolados do Cucumber mosaic virus provenientes de oito especies vegetais. *Fitopatol. Brasil.*, *25*, 49-58.
27. Boccard, F., & Baulcombe, D. (1993). Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology*, *193*(2), 563–578. https://doi.org/10.1006/viro.1993.1165
28. Boye, K., Jensen, P. E., Stummann, B. M., Henningsen, K. W. (1990). Nucleotide sequence of cDNA encoding the BYMV coat protein gene. *Nucleic Acids Research*, *18*, 4926.
29. Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E., Blanc, S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *Compte Rendus Biol.*, *333*, 524–538.
30. Brown, D., & Trudgill, D. (2008). The occurrence and distribution of nepoviruses and their associated vector Longidorus and Xiphinema nematodes in Europe and the Mediterranean basin1. *EPPO Bulletin*, *19*, 479–489. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1989.tb00422.x
31. Bruni, R., Bianchi, A., & Bellardi, M. (2007). Essential oil composition of Agastache anethiodora Britton (Lamiaceae) infected by cucumber mosaic virus (CMV). *Flavour and Fragrance Journal*, *22*, 67–70. https://doi.org/10.1002/ffj.1760

32. Brunt, A.A., Crabtree, K., Dalwitz, M. J. (1996). *Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Cambridge University Press.
33. Bruun-Rasmussen, M., Moller, I.S., Tulinius, G., Hansen, J.K., Lund, O.S., Johansen, I.E. (2007). The same allele of translation initiation factor 4E mediates resistance against two Potyvirus spp. in *Pisum*. *Molacular Plant-Microbe Interactions*, *20* (9), 1075-1082.
34. Bujarski, J., Gallitelli, D., García-Arenal, F., Pallás, V., Palukaitis, P., Reddy, M. K., Wang, A., & ICTV Report Consortium. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Bromoviridae. *Journal of General Virology*, *100*(8), 1206–1207. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001282
35. Campos, R. E., Bejerman, N., Nome, C., Laguna, I. G., & Rodríguez Pardina, P. (2014). Bean Yellow Mosaic Virus in Soybean from Argentina. *Journal of Phytopathology*, *162*(5), 322–325. https://doi.org/10.1111/jph.12185
36. Card, S. D., Pearson, M. N., Clover, G. R. G. (2007). Plant pathogens transmitted by pollen. *Aust, Plant Path*, *36*, 455-461.
37. Carter, D. J. (1984). *Pest Lepidoptera of Europe: With special reference to the British Isles*. W. Junk ; Distributor for the U.S. and Canada, Kluwer Academic Publishers.
38. Carrère, I., Tepfer, M., & Jacquemond, M. (1999). Recombinants of cucumber mosaic virus (CMV): Determinants of host range and symptomatology. *Archives of Virology*, *144*(2), 365–379. https://doi.org/10.1007/s007050050510
39. Chauhan, R. P., Hamon, H. F., Rajakaruna, P., Webb, M. A., Payton, M., & Verchot, J. (2015). Reliable Detection for Bean yellow mosaic virus, Canna yellow streak virus, and Canna yellow mottle virus in Canna Varieties with Red Foliage. *Plant Disease*, *99*(2), 188–194. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0538-RE
40. Chen, Y., Chen, J., Zhang, H., Tang, X., & Du, Z. (2007). Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between cucumber mosaic virus subgroup IA and II strains. *Virus Genes*, *35*(2), 405–413. https://doi.org/10.1007/s11262-007-0094-z
41. Cheng, Y., & Jones, R. A. C. (1999). Distribution and incidence of necrotic and non-necrotic strains of bean yellow mosaic virus in wild and crop lupins. *Austrlian Journal of Agricultural Research*, *50*, 589-599.

42. Cheng, Y., & Jones, R. A. C. (2000). Biological properties of necrotic and non-necrotic strains of bean yellow mosaic virus in cool season grain legumes. *Annals of Applied Biology*, *136*, 215–227.
43. Cho, S. Y., Lim, S., Kim, H. (2016). Complete genome sequence of Ornithogalum mosaic virus infecting Gladiolus spp. in South Korea. *Genome Announcements*, *4*(4), 16–18.
44. Choi, S., Lee, J.-H., Kang, W.-H., Kim, J., Huy, H. N., Park, S.-W., Son, E.-H., Kwon, J.-K., & Kang, B.-C. (2018). Identification of Cucumber mosaic resistance 2 (cmr2) That Confers Resistance to a New Cucumber mosaic virus Isolate P1 (CMV-P1) in Pepper (*Capsicum spp.*). *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1106. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01106
45. Chu, P. W. G., Anderson, B. J., Khan, M. R. I., Shukla, D., & Higgins, T. J. V. (1999). Production of Bean yellow mosaic virus resistant subterranean clover (Trifolium subterraneum) plants by transformation with the virus coat protein gene. *Annals of Applied Biology*, *135*(2), 469–480. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1999.tb00876.x
46. Cook, G., Rybicki, E. P., & Pietersen, G. (2002). Characterization of a new potyvirus isolated from peanut (Arachis hypogaea). *Plant Pathology*, *47*(3), 348–354. https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00243.x
47. Cremer, M. C., Schenk, P. K. (1967). Notched leaf in *Gladiolus spp.*, caused by viruses of the tobacco rattle virus group. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 73, 33–48.
48. *Cucumovirus ~ ViralZone*. (n.d.). Retrieved 12 February 2022, from https://viralzone.expasy.org/135?outline=all_by_species
49. Damayanti, T. A., Sholihah, I., Listihani, Hidayat, S. H., & Wiyono, S. (2020). New natural host of Tobacco mosaic virus on three cucurbits in Java, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *468*(1), 012034. https://doi.org/10.1088/1755-1315/468/1/012034
50. Davies, C., & Symons, R. H. (1988). Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. *Virology*, *165*(1), 216–224. https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90675-7

51. Deyong, Z., Willingmann, P., Heinze, C., Adam, G., Pfunder, M., Frey, B., & Frey, J. E. (2005). Differentiation of Cucumber mosaic virus isolates by hybridization to oligonucleotides in a microarray format. *Journal of Virological Methods*, *123*(1), 101–108. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.09.021
52. Díaz-Cruz, G. A., Smith, C. M., Wiebe, K. F., & Cassone, B. J. (2017). First Complete Genome Sequence of Tobacco necrosis virus D Isolated from Soybean and from North America. *Genome Announcements*, *5*(32), e00781-17. https://doi.org/10.1128/genomeA.00781-17
53. Digiaro, M., Yahyaoui, E., Martelli, G. P., Elbeaino, T. (2015). The sequencing of the complete genome of a Tomato black ring virus (TBRV) and of the RNA2 of three Grapevine chrome mosaic virus (GCMV) isolates from grapevine reveals the possible recombinant origin of GCMV. *Virus Genes*, *50*,165–171.
54. Doolittle, S. P., Jones, F. R. (1925). The mosaic disease in the garden pea and other legumes. *Phytopathology*. *15*(12), 763–772.
55. Dubey, V., Aminuddin, & Singh, V. (2008). First report of a subgroup IACucumber mosaic virus isolate from gladiolus in India. *Australasian Plant Disease Notes*, *3*, 35–37. https://doi.org/10.1007/BF03211230
56. Dubey, V. K., Singh, V. P., (2010). Molecular characterization of Cucumber mosaic virus infecting Gladiolus, revealing its phylogeny distinct from the Indian isolate and alike the Fny strain of CMV. *Virus Genes*, *41*, 126-134.
57. Dukic, N., Krstic, B., Vico, I., Berenji, J., Duduk, B. (2006). First report of Zucchini yellow mosaic virus, Watermelon mosaic virus, and Cucumber mosaic virus in bottlegourd (Lagenaria siceraria) in Serbia. *Plant Dis*, *90*, 380.
58. Elmer, W. H., & Kamo, K. K. (2016). Diseases of Gladiolus. In R. J. McGovern & W. H. Elmer (Eds.), *Handbook of Florists' Crops Diseases* (pp. 1–24). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32374-9_47-1
59. Evans, I. R., & Zettler, F. W. (1970). Aphid and mechanical transmission properties of Bean yellow mosaic virus isolates. *Phytopathology*, *60*(8), 1170–1174.
60. Fajinmi, A.A. (2019). Interactive Effect of Blackeye cowpea mosaic virus and Cucumber mosaic virus on *Vigna unguicu*. *Horticultural Plant Journal*, *5*, 88-92.

61. Felsenstein J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, *39*(4), 783-791.
62. Feng, J., Liu, S., Wang, M., Lang, Q., & Jin, C. (2014). Identification of microRNAs and their targets in tomato infected with Cucumber mosaic virus based on deep sequencing. *Planta*, *240*(6), 1335–1352. https://doi.org/10.1007/s00425-014-2158-3
63. Flowerbulbs, S. (n.d.). *Stoop Flowerbulbs | Gladiolus support*. Retrieved 18 August 2021, from https://www.stoopflowerbulb.nl/en/documents/
64. Fontana, A., Albanese, G., Manglli, A., Tomassoli, L., Tiberini, A. (2020). Phylogenetic analysis based on full genome sequencing of Italian tomato spotted wilt virus isolates identified in "Roggianese" sweet pepper and chilli pepper. *Annals of Applied Biology*, *176*(2), 170–179. https://doi.org/10.1111/aab.12566
65. Fry, P. R. (1953). Two virus diseases of gladiolus. *N.Z. JI Sci. Technol*, *34*, 460-461.
66. Fukumoto, F., Ito, Y., Tochihara, H. Viruses isolated from Gladiolus in Japan. A*nnals of the Phytopathological Society of Japan*, *48*, 68–71.
67. Gaafar, Y., Herz, K., Hartrick, J., Fletcher, J., Blouin, A. G., MacDiarmid, R., & Ziebell, H. (2020). Investigating the Pea Virome in Germany-Old Friends and New Players in the Field(s). *Frontiers in microbiology*, *11*, 583242. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.583242
68. Gallitelli, D. (2000). The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research*, *71*(1), 9–21. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00184-2
69. Gao, F., Du, Z., Shen, J., Yang, H., & Liao, F. (2018). Genetic diversity and molecular evolution of Ornithogalum mosaic virus based on the coat protein gene sequence. *PeerJ*, *6*, e4550. https://doi.org/10.7717/peerj.4550
70. *Genus: Potyvirus—Potyviridae—Positive-sense RNA Viruses—ICTV*. (n.d.). Retrieved 12 February 2022, from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/potyviridae/572/genus-potyvirus
71. Gera, A., Cohen, J. (1990). The natural occurrence of bean yellow mosaic, cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in lisianthus in Israel. *Plant Pathology*, *39*, 561—564.

72. Ghotbi T. (2005). First report on incidence of arabis mosaic virus (ArMV, Nepovirus) on ornamental plants in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *41*(2), 305.
73. Gnutova, R. V., Kakareka, N. N., Tolkach, V. F., Chuyan, A. X., Sibiryakova, I. I., Rubleva N.V., Krylov, A.V. (1989). Some properties of a bean yellow mosaic-virus, identified in the south of the Far East. *Izvestiya Akademii Nauk Sssr Seriya Biologicheskaya*, *3*, 442–449.
74. Goldblatt, P. (1990) Phylogeny and classification of Iridaceae, *Ann. Missouri Bot. Gard*, 77, 607-627.
75. Goldblatt, P., & Manning, J. C. (2008). *The Iris family: Natural history and classification*. Timber Press.
76. González, L. E., Peiró, R., Rubio, L., Galipienso, L. (2021). Persistent Southern Tomato Virus (STV) Interacts with Cucumber Mosaic and/or Pepino Mosaic Virus in Mixed-Infections Modifying Plant Symptoms, Viral Titer and Small RNA Accumulation. *Microorganisms*, *9*(4), 689.
77. Gooding, G.V. (1991). *Diseases caused by viruses. In: Compendium of tobacco diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, USA.
78. Gulati, A., Alapati, K., Murthy, A., Savithri, H., Murthy, M. R. (2016). Structural studies on tobacco streak virus coat protein: Insights into the pleomorphic nature of ilarviruses. *Journal of Structural Biology, 193(2), 95–105.*
79. Guyatt, K. J., Proll, D. F., Menssen, A., & Davidson, A. D. (1996). The complete nucleotide sequence of bean yellow mosaic potyvirus RNA. *Archives of Virology*, *141*(7), 1231–1246. https://doi.org/10.1007/BF01718827
80. Hammond, J., & Hammond, R. W. (2003). The complete nucleotide sequence of isolate BYMV-GDD of Bean yellow mosaic virus, and comparison to other potyviruses. *Archives of Virology*, *148*(12), 2461–2470. https://doi.org/10.1007/s00705-003-0185-7
81. He, Z., Chen, C. F., Luo, Y. J., Chen, X. J. (2018). Molecular detection, identification and genetic diversity of Tobacco rattle virus on peony. *Journal of Plant Protection*
82. Hema, M., Sreenivasulu, P., Patil, B. L., Kumar, P. L., & Reddy, D. V. R. (2014). Chapter Nine - Tropical Food Legumes: Virus Diseases of Economic Importance and Their Control. In G. Loebenstein & N. Katis (Eds.), *Advances in Virus Research* (Vol.

90, pp. 431–505). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801246-8.00009-3

83. Heo, K. J., Kwon, S. J., Kim, M. K., Kwak, H. R., Han, S. J., Kwon, M. J., Rao, A., & Seo, J. K. (2020). Newly emerged resistance-breaking variants of cucumber mosaic virus represent ongoing host-interactive evolution of an RNA virus. *Virus evolution*, *6*(2), veaa070. https://doi.org/10.1093/ve/veaa070

84. Hsu, H. T., Barzuna, L., Hsu, Y. H. (2000) Identification and Subgrouping of Cucumber mosaic virus with Mouse Monoclonal Antibodies. *Phytopathology*, 90(6), 615-620.

85. Huelsenbeck, J. P., & Rannala, B. (1997). Maximum likelihood estimation of phylogeny using stratigraphic data. *Paleobiology*, *23*(2), 174–180. https://doi.org/10.1017/S0094837300016778

86. Jacquemond, M. (2012). Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, *84*, 439–504. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00013-0

87. Jagadeesh, B., Maurya, S. K., Singh, R. P., & Srivastava, J. N. (2022). Diseases and Disorders of Green Pea (Pisum Sativum Var. Hortense) and Their Management. In *Diseases of Horticultural Crops*. Apple Academic Press.

88. Kamenetsky R., Okubo H. (2012). *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production*. CRC Press.

89. Kamińska M. (1978). Some properties of isolates of tomato black ring virus. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, *214*, 109–117.

90. Kamo, K., Gera, A., Cohen, J., Hammond, J., Blowers, A., Smith, F., & Van Eck, J. (2005). Transgenic Gladiolus plants transformed with the bean yellow mosaic virus coat-protein gene in either sense or antisense orientation. *Plant Cell Reports*, *23*(9), 654–663. https://doi.org/10.1007/s00299-004-0888-6

91. Kamran, R., Izadpanah, K. (1981). Isolation and identification of bean yellow mosaic and tobacco ringspot viruses from Gladiolus in Shiraz. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *1*(4), 1-10.

92. Kaper, J. M., Diener, T. O., Scott, H. A. (1965). Some physical and chemical properties of cucumber mosaic virus (strain Y) and of its isolated ribonucleic acid. *Virology*, *27*(1), 54-72.

93. Karanfil, A. & S. Korkmaz., 2021. Güney Marmara Bölgesi kabakgil üretim alanlarında cucumber mosaic virus enfeksiyonunun tespiti ve kılıf protein gen diziliminin filogenetik analizi, *Ege Univ. Ziraat Fak. Derg.*, *58*(2): 239-246. https://doi.org/10.20289/zfdergi.682293

94. Katoch, M. (2003). First report of Tobacco ringspot virus occurring in gladiolus in India. *Plant Pathology*, *52* (6), 789.

95. Katoch, M., Abdin, Z., Zaidi, A. A. (2004). First report of Tobacco rattle virus occurring in gladiolus in India. *Plant Pathology*, 53 (2), 236.

96. Kaur, C., Raj, S. K., Snehi, S. K., Goel, A. K., Roy, R. K. (2011). Natural occurrence of *Ornithogalum mosaic virus* newly reported on gladiolus in India. *New Disease Reports, 24*(2). https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2011.024.002.

97. Kaur, C., Kumar, S., & Raj, S. K. (2015). Characterization of a new isolate of Bean yellow mosaic virus Group-IV Associated with Mosaic disease of Gladiolus in India. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000309

98. Kayode, A. B., Odu, B. O., Ako-Nai, K. A., & Alabi, O. J. (2014). Occurrence of Cucumber mosaic virus Subgroups IA and IB Isolates in Tomatoes in Nigeria. *Plant Disease*, *98*(12), 1750. https://doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0844-PDN

99. Kehoe, M. A., Buirchell, B. J., Coutts, B. A., & Jones, R. a. C. (2014). Black Pod Syndrome of Lupinus angustifolius Is Caused by Late Infection with Bean yellow mosaic virus. *Plant Disease*, *98*(6), 739–745. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1144-RE

100. Kehoe, M. A., Coutts, B. A., Buirchell, B. J., Jones, R. A. C. (2014). Plant Virology and Next Generation Sequencing: Experiences with a *Potyvirus*. *PLOS ONE*, *9*(8), e104580. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104580

101. Khattab, E., & Abdelkader, H. (2015). Production of Polyclonal Antibodies to Bean Yellow Mosaic Virus Isolates Affecting Legumes and Ornamental Plants In Taif Province. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, *8*, 149–159.

102. Kil, E.-J., Chung, Y.-J., Choi, H.-S., Lee, S., & Kim, C.-S. (2020). Life Cycle-Based Host Range Analysis for Tomato Spotted Wilt Virus in Korea. *The Plant Pathology Journal*, *36*(1), 67–75. https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.12.2019.0290

103. Kim, M. K., Seo, J. K., Kwak, H. R., Kim, J. S., Kim, K. H., Cha, B. J., Choi, H. S., (2014) Molecular genetic analysis of cucumber mosaic virus populations infecting pepper suggests unique patterns of evolution in Korea. *Phytopathology*, *104*(9), 993-1000.

104. Kim, M.-K., Jeong, R.-D., Kwak, H.-R., Lee, S.-H., Kim, J.-S., Kim, K.-H., Cha, B., & Choi, H.-S. (2014). First Report of Cucumber mosaic virus Isolated from Wild Vigna angularis var. Nipponensis in Korea. *The Plant Pathology Journal*, *30*(2), 200–207. https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.01.2013.0012

105. King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., Carstens, E. B. (2011) *Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses.* Elsevier Academic Press; Amsterdam.

106. Komorowska, B., Ptaszek, M., Jarecka-Boncela, A., & Hasiów-Jaroszewska, B. (2018). First Report of Arabis Mosaic Virus in Rhubarb in Poland. *Plant Disease*, *102*(9), 1863–1863. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0324-PDN

107. Kouadio, K. T., Agneroh, T. A., De Clerck, C., Lepoivre, P., & Jijakli, M. H. (2013). First Report of Banana mild mosaic virus Infecting Plantain in Ivory Coast. *Plant disease*, *97*(5), 693. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1108-PDN

108. Kulshrestha, S., Hallan, V., Raikhy, G., Ram, R., Zaidi, A.A. and Garg, I.D. (2006). Incidence of *bean yellow mosaic virus* on iris. Acta Hortic., 722, 235-240.

109. Kumari, R., Bhardwaj, P., Singh, L., Zaidi, A. A., & Hallan, V. (2013). Biological and Molecular Characterization of Cucumber mosaic virus Subgroup II Isolate Causing Severe Mosaic in Cucumber. *Indian journal of virology : an official organ of Indian Virological Society*, *24*(1), 27–34. https://doi.org/10.1007/s13337-012-0125-9

110. Kumari, A., Kaur, C., Kumar, S., Raj, S. K., Roy, R., & Nautiyal, C. (2015). First Report of Bean yellow mosaic virus causing a Mosaic Disease of Canna sp. In India. *Plant Disease*. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0001-PDN

111. Kumar, M. S., Devi, R. S. J., Reddy, M. K., . K. V., Krishna, T. M., & . L. P. (2018). Biological characterization and host range of Tobacco Streak Virus (TSV). *Legume Research - An International Journal*, *42*(6), 850-855. https://doi.org/10.18805/LR-3934

112. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

113. Kumar, Y., Hallan, V., & Zaidi, A. A. (2009). Identification and Characterization of Bean yellow mosaic virus Infecting Freesia. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *18*(2), 253–255. https://doi.org/10.1007/BF03263331

114. Kyrychenko, A. M., Antipov, I. O., Hrynchuk, K. V. (2017). Phylogenetic analysis of Ukrainian BYMV isolates from soybeans and beans, *Cytology and Genetic*s, *51*(3), 173–178.

115. Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(15), 608–685.

116. Lee, T. C., Francki, R. I. B., Hatta, T. (1979). A serious disease of gladiolus in Australia caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Disease Reporter*. *63*, 343–348.

117. Lee, H.-J., Kim, N.-Y., & Jeong, R.-D. (2018). First report of cucumber mosaic virus infecting pear in Korea. *Journal of Plant Pathology*, *100*(2), 365–365. https://doi.org/10.1007/s42161-018-0082-2

118. Li, J. L., Cornman, R. S., Evans, J. D., Pettis, J. S., Zhao, Y., Murphy, C., Peng, W. J., Wu, J., Hamilton, M., Boncristiani, H. F., Zhou, L., Hammond, J., & Chen, Y. P. (2014). Systemic spread and propagation of a plant-pathogenic virus in European honeybees, Apis mellifera. *MBio*, *5*(1), e00898-00813. https://doi.org/10.1128/mBio.00898-13

119. Li, N., Yu, C., Yin, Y., Gao, S., Wang, F., Jiao, C., & Yao, M. (2020). Pepper Crop Improvement Against Cucumber Mosaic Virus (CMV): A Review. *Frontiers in Plant Science*, *11*. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.598798

120. Liao F., Lin W., Chen X., Chen Q., Chen H., Huang P., Fang Z., Wu Y., Shen J., Lin S. (2017). Molecular identification and sequence analysis of *Ornithogalum*

mosaic virus in saffron (*Crocus sativus*) corms. *Scientia Agricultura Sinica, 50*, 4046–4054.

121. Loebenstein, G., Lawson, R. H. & Brunt, A. A. (1995). *Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops*. Chichester.

122. Mahasen, M., Taufique, T., Ona, A., Mehraj, H., & Uddin, D. (2015). Suitability of cut corm as planting materials on flowering and corm-cormel production of gladiolus cultivars. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, *4*, 10–19. https://doi.org/10.18801/jbar.040115.38

123. Maneechoat, P., Takeshita, M., Uenoyama, M., Nakatsukasa, M., Kuroda, A., Furuya, N., & Tsuchiya, K. (2015). A single amino acid at N-terminal region of the 2b protein of cucumber mosaic virus strain m1 has a pivotal role in virus attenuation. *Virus Research*, *197*, 67–74. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.020

124. Martin, R. R., MacFarlane, S., Sabanadzovic, S., Quito, D., Poudel, B., & Tzanetakis, I. E. (2013). Viruses and Virus Diseases of Rubus. *Plant Disease*, *97*(2), 168–182. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0362-FE

125. May, C., Miller, P. R., Clellan, W. D. (1963). *Plant Diseases, the Yearbook of Agriculture*. United States. Department of Agriculture. Washington D.C.

126. McBride, S., Appel, D. N., Pontasch, F. M., Gregg, L., & Alabi, O. J. (2017). First Report of Tobacco ringspot virus Infecting an American Hybrid Grape Cultivar in Texas. *Plant Disease*, *101*(6), 1062–1062. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0111-PDN

127. Mishchenko, L.T., Dunich, A.A., Dashchenko, A.V., Bondus, R.O. (2021). Molecular characterization of cucumber mosaic virus infecting *Echinacea purpurea* in Ukraine. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *23*, 1-16.

128. Mitra, A., Jarugula, S., Hoheisel, G.-A., & A. Naidu, R. (2021). First Report of Tobacco Ringspot Virus in Highbush Blueberry in Washington State. *Plant Disease*, *105*(9), 2739. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0183-PDN

129. Mitrofanova, I. V., Zakubanskiy, A. V., Mitrofanova, O. V. (2018) Viruses infecting main ornamental plants: an overview. *Ornamental Hortic*, *24*, 95–102.

130. Moskovets, S. M., Glushak, L. E. (1970). Several properties of cucumber mosaic virus (CMV-1). *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, *32*(1), 64-69.

131. *Mozaika okurková*. (2009, August 3). Škůdci.com - o škůdcích, plísních, plevelech a jak s nimi bojovat. https://www.skudci.com/mozaika-okurkova

132. Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLOS ONE*, *9*(9), e108277. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277

133. Mujib, A. (2015). *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*. Springer.

134. Nakamura, S., Honkura, R., Ugaki, M., Ohshima, M., & Ohashi, Y. (1994). Nucleotide sequence of the 3′-terminal region of bean yellow mosaic virus RNA and resistance to viral infection in transgenic Nicotiana benthamiana expressing its coat protein gene. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, *62*, 472-477 https://doi.org/10.3186/JJPHYTOPATH.60.295

135. Nakazono-Nagaoka, E., Takahashi, T., Shimizu, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., Omura, T., & Sasaya, T. (2009). Cross-Protection Against Bean yellow mosaic virus (BYMV) and Clover yellow vein virus by Attenuated BYMV Isolate M11. *Phytopathology*®, *99*(3), 251–257. https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0251

136. Navalinskiene, M., Samuitiene, M. (2001). Viral diseases of flower plants 15. Identification of viruses affecting gladiolus (*Gladiolus* L.). *Biologija*, *1*, 31–35.

137. Navalinskiene, M., Samuitene, M. (2004). Virological evaluation of Lithuanian dahlia (*Dahlia Cav.*), gladiolus (*Gladiolus L.*), iris (*Iris L.*) and peony (*Paeonia L.*) cultivars and hybrids. *Biologija*, *3*, 57–63.

138. *Nepovirus ~ ViralZone*. (n.d.). Retrieved 22 February 2022, from https://viralzone.expasy.org/300?outline=all_by_species

139. Nouri, S., Arevalo, R., Falk, B. W., & Groves, R. L. (2014). Genetic Structure and Molecular Variability of Cucumber mosaic virus Isolates in the United States. *PLOS ONE*, *9*(5), e96582. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096582

140. O'Keefe, D. C., Berryman, D. I., Coutts, B. A., & Jones, R. A. C. (2007). Lack of Seed Coat Contamination with Cucumber mosaic virus in Lupin Permits Reliable, Large-Scale Detection of Seed Transmission in Seed Samples. *Plant Disease*, *91*(5), 504–508. https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0504

141. Ohshima, K., Matsumoto, K., Yasaka, R., Nishiyama, M., Soejima, K., Korkmaz, S., Ho, S. Y. W., Gibbs, A. J., & Takeshita, M. (2016). Temporal analysis of reassortment and molecular evolution of Cucumber mosaic virus: Extra clues from its segmented genome. *Virology*, *487*. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2015.09.024

142. Palukaitis, P., Garcia-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Adv. Virus Res*, *62*, 242–323.

143. Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassiè, K., Vovlas, C., & Marchoux, G. (2003). An update of the host range of tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology*, *85*(4), 227–264.

144. Park I. S. (1998). The viruses in *Gladiolus hybribus* cultivated in Korea. Broad bean wilt virus, cucumber mosaic virus and tobacco rattle virus. *Korean Journal Plant Pathology*, *14*, 83-91.

145. Park, I.S., Choi, J.D., Goo, D.H., Kim, K.W. (2002). Elimination of viruses from virus-infected gladiolus plants through cormel tip and callus culture. *J Korean Soc Hort Sci*. *43*, 531–535.

146. Pokorny, R., Selvaraj, D. G. (2009). Survey of viral pathogens in gladiolus, iris, and tulip in the Czech Republic. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, *57*(5), 79—86.

147. *Potyvirus ~ ViralZone*. (n.d.). Retrieved 12 February 2022, from https://viralzone.expasy.org/50

148. Qiu, Y., Zhou, Y., Zhang, S., Atta, S., Li, M., Wu, J., Li, R., & Cao, M. (2019). Senna bicapsularis: A New Natural Host of Bean Yellow Mosaic Virus in China. *Plant Disease*, *103*(8), 2144–2144. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0428-PDN

149. Qiu, Y., Zhang, Y., Wang, C. (2018). *Cucumber mosaic virus* coat protein induces the development of chlorotic symptoms through interacting with the chloroplast ferredoxin I protein. *Sci Rep, 8*, 1205. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19525-5

150. Rabedeaux, P. F., Gaska, J. M., Kurtzweil, N. C., & Grau, C. R. (2005). Seasonal Progression and Agronomic Impact of Tobacco streak virus on Soybean in Wisconsin. *Plant Disease*, *89*(4), 391–396. https://doi.org/10.1094/PD-89-0391

151. Raj, S.K., Srivastava, A., Chandra, G., Singh, B. P. (2002). Characterization of cucumber mosaic virus isolate infecting Gladiolus cultivars and comparative evaluation of serological and molecular methods for sensitive diagnosis. *Current Science*, *83*(9), 1132-1137.

152. Raj, S. K., Choudhari S. (2007). Identification of *Tomato aspermy virus* as the cause of yellow mosaic and flower deformation of chrysanthemums in India. *Australas Plant Dis, 2, 1-2.*

153. Raj, S. K., Kumar, S., Verma, D., & Snehi, Dr. S. K. (2011). First report on molecular detection and identification of Tomato aspermy virus naturally occurring on gladiolus in India. *Phytoparasitica*, *39*, 303–307. https://doi.org/10.1007/s12600-011-0145-9

154. Ranjan, P., Ranjan, J., Attri, B. L., Das, B., Krishna, H., & Ahmed, N. (2010). Performance of gladiolus genotypes for cut flower and corm production under high altitude of Uttarakhand. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, *67*, 386–390.

155. Reddy, P., Venkataravanappa, V., Swaranalatha, P., Ashwathappa, K., & Krishna Reddy, M. (2019). Characterization of Recombinant Bean Yellow Mosaic Virus belongs to Group-IV Infecting Gladiolus. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *8*, 1644–1657. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.809.187

156. Roberts, M. J. (2007). *Edible & Medicinal Flowers.* The Spearhead Press.

157. Roossinck, M. J., Zhang, L., & Hellwald, K. H. (1999). Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of virology*, *73*(8), 6752–6758. https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6752-6758.1999

158. Roossinck, M. (2002). Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology*, 76(7), 3382-3387.

159. Ryang, B.-S., Kobori, T., Matsumoto, T., Kosaka, Y., and Ohki, S. T. (2004). Cucumber mosaic virus 2b protein compensates for restricted spread of Potato virus Y in doubly infected tobacco. *J. Gen. Virol.*, 85, 3405–3414.

160. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406–425. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

161. Samuitienė, M., Navalinskienė, M., & Jackevičienė, E. (2008). Arabis mosaic virus on ornamental plants. *Biologija*, *54*(4), 264–268.

162. Schmelzer, K. (1963). Investigations on viruses of ornamental and wild woody plants. 2nd part. Viroses of Forsythia, Lonicera, Ligustrum and Laburnum. *Phytopathologische Zeitschrift*, *46*, 105-138.

163. Sclavounos, A.P., Voloudakis, A.E., Arabatzis, C., Kyriakopoulou, P.E. (2016). A severe hellenic CMV tomato isolate: symptom variability in tobacco, characterization and discrimination of variants. *Eur. J. Plant Pathol*, *115*, 163–172.

164. Selvaraj, G.D., Pokorny, R., Holkova, L. (2009). Variability of Bean yellow mosaic virus isolates in the Czech Republic. *Acta virologica*, *53*, 277-280.

165. Seo, J.-K., Kwon, S.-J., Choi, H.-S., & Kim, K.-H. (2009). Evidence for alternate states of Cucumber mosaic virus replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis. *Virology*, *383*(2), 248–260. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.033

166. Sharma, P. N., Sharma, V., Sharma, A., Rajput, K., & Sharma, S. K. (2015). Identification and molecular characterization of Bean yellow mosaic virus infecting French bean in Himachal Pradesh. *VirusDisease*, *26*(4), 315–318. https://doi.org/10.1007/s13337-015-0270-z

167. Sharma, P., Sharma, S., Gautam, I., & Baranwal, V. K. (2016). Natural infection of *Glycine max* by seven viruses belonging to different genera in india. *Journal of Plant Pathology*, *98*(3), 569–575. https://doi.org/10.4454/JPP.V98I3.009

168. Shevchenko, T. P., Tymchyshyn, O. V., Kosenko, I. A., Budzanivska, I. G., Shevchenko, O. V., & Polishchuk, V. P. (2018). Molecular characterization and phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of Cucumber mosaic virus based on the

partial sequences of three genes. *Biopolymers and Cell, 34*(1), 32-40. https://doi.org/10.7124/bc.00096E

169. Shi, M., Lin, X. D., Tian, J. H., Chen, L. J., Chen, X., Li, C. X., Qin, X. C., Li, J., Cao, J. P., Eden, J. S., Buchmann, J., Wang, W., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, *540*(7634), 539–543. https://doi.org/10.1038/nature20167

170. Shin, H., Koo, B., Kang, S. (2002) Characterization of Tobacco rattle virus (TRV-K) isolated in Korea. *Research in Plant Disease*, *8*, 207-214.

171. Shourabi, N. S. F., Shams-bakhsh, M. (2019). Effect of Cucumber mosaic virus and Cauliflower mosaic virus Infections on the Resistance of Canola to Turnip mosaic virus. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 50, 119-127.

172. Shuo, Y. (2010). Statistical characteristics of complete tobacco necrosis virus genome and clustering. *Agricultural Science & Technology - Hunan*, *11*(3), 160–188.

173. Siddiqui, S. A., Sarmiento, C., Truve, E., Lehto, H., and Lehto, K. (2008). Phenotypes and functional effects caused by various viral RNA silencing suppressors in transgenic Nicotiana benthamiana and N. tabacum. *Mol. Plant Microbe. Interact.*, 21, 178–187.

174. Sofy, A. R., Hmed, A. A., Alnaggar, A. E.-A. M., Dawoud, R. A., Elshaarawy, R. F. M., & Sofy, M. R. (2020). Mitigating effects of Bean yellow mosaic virus infection in faba bean using new carboxymethyl chitosan-titania nanobiocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, *163*, 1261–1275. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.066

175. Sota, I., Misato, T., Masashi, U., Masashi S. (2018). Complete Genome Sequences of Three Tomato Aspermy Virus Isolates in Japan. *Genome Announcements*, *6*(22), e00474-18. https://doi.org/10.1128/genomeA.00474-18

176. Stace-Smith, R., & Hansen, A. J. (1974). Occurrence of tobacco ringspot virus in sweet cherry. *Canadian Journal of Botany*, *52*(7), 1647–1651. https://doi.org/10.1139/b74-216

177. Stein, A., Salomon, R. Cohen, J. (1986). Detection and characterization of bean yellow mosaic virus in corms of *Gladiolus grandiflorus*. *Annals of Applied biology*, 109, 147-154.

178. Stryer, L. (1988). *Biochemistry*. New York : W.H. Freeman. http://archive.org/details/biochemistry3rdedi00stry

179. Sudhakar, N., Nagendra-Prasad, D., Mohan, N., & Murugesan, K. (2006). First Report of Cucumber mosaic virus Subgroup II Infecting Lycopersicon esculentum in India. *Plant disease*, *90*(11), 1457. https://doi.org/10.1094/PD-90-1457B

180. Supyani, Silvana, A., Fathur, R., Septariani, D., & Sri, W. (2017). Occurrence and distribution of cucumber mosaic virus in cucurbits in Karanganyar, Central Java, Indonesia. *African Journal of Agricultural Research*, *12*, 1593–1601. https://doi.org/10.5897/AJAR2017.12247

181. Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol. Plant Pathology*, 13, 204-216.

182. Tabara, M., Nagashima, Y., He, K., Qian, X., Crosby, K. M., Jifon, J., Jayaprakasha, G. K., Patil, B., Koiwa, H., Takahashi, H., & Fukuhara, T. (2021). Frequent asymptomatic infection with tobacco ringspot virus on melon fruit. *Virus Research*, *293*, 198266. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198266

183. Takahashi, Y., Takahashi, T., Uyeda, I. (1997). A cDNA clone to clover yellow vein potyvirus genome is highly infectious. *Virus Genes*, *14* (3), 235-243.

184. Taylor, R. H., & Smith, P. R. (1968). The relationship between bean yellow mosaic virus and pea mosaic virus. *Australian Journal of Biological Science*, *21*, 429-437.

185. *The British Gladiolus Society*. (n.d.). Retrieved 12 October 2021, from http://www.britglad.com/class.html

186. Tomlinson, J., & Carter, A. (2008). Studies on the seed transmission of cucumber mosaic virus in chickweed (Stellaria media) in relation to the ecology of the virus. *Annals of Applied Biology*, *66*, 381–386. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1970.tb04617.x

187. Troiano, E., Bellardi, M. G., & Parrella, G. (2019). Syringa vulgaris is a new host for cucumber mosaic virus. *Phytopathologia Mediterranea*, *58*(2), 385–389. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediter-10625

188. Tungadi, T., Groen, S., Murphy, A., Pate, A., Iqbal, J., Bruce, T., Cunniffe, N., & Carr, J. (2017). Cucumber mosaic virus and its 2b protein alter emission of host volatile organic compounds but not aphid vector settling in tobacco. *Virology Journal*, *14*. https://doi.org/10.1186/s12985-017-0754-0

189. Uga, H., Kobayashi, Y. O., Hagiwara, K., Honda, Y., & Omura, T. (2004). Selection of an attenuated isolate of Bean yellow mosaic virus for protection of dwarf gentian plants from viral infection in the field. *Journal of General Plant Pathology*, *70*(1), 54–60. https://doi.org/10.1007/s10327-003-0091-6

190. Uyemoto, J. K., Cummins, J. R., & Abawi, G. S. (1977). Virus and Virus-Like Diseases Affecting Grapevines in New York Vineyards. *American Journal of Enology and Viticulture*, *28*(3), 131–136.

191. Visser, P. B., Mathis, A., & Linthorst, H. J. M. (1999). TOBRAVIRUSES. In A. Granoff & R. G. Webster (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Second Edition)* (pp. 1784–1789). Elsevier. https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0283

192. Wada, Y., Iwai, H., Ogawa, Y. (2000). Comparison of pathogenicity and nucleotide sequences of 3′-terminal regions of bean yellow mosaic virus isolates from gladiolus. *Journal of General Plant Pathology*, *66*, 345–352.

193. Wang, Y., Lee, K. C., Gaba, V., Wong, S. M., Palukaitis, P., Gal-On, A. (2004). Breakage of resistance to Cucumber mosaic virus by co-infection with Zucchini yellow mosaic virus: Enhancement of CMV accumulation independent of symptom expression. *Arch. Virol.*, *149*, 379–396.

194. Wang, Y. N., Melzer, M. J., Borth, W. B., Green, J. C., Hamim, I., & Hu, J. S. (2017). First Report of Bean yellow mosaic virus in Vanilla in Hawaii. *Plant Disease*, *101*(8), 1557–1557. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0091-PDN

195. Wilson, A.D. (1985). Characterization and Field Studies of a Cucumber Mosaic Virus Isolate from Spinach in the Winter Garden Area of Texas. *Plant Disease*, 69, 751-754.

196. *World Checklist of Selected Plant Families: Royal Botanic Gardens, Kew*. (n.d.). Retrieved 22 February 2022, from https://wcsp.science.kew.org/qsearch.do

197. Wylie, S. J., Coutts, B. A., Jones, M. G. K., Jones, R. A. C. (2008). Phylogenetic Analysis of Bean yellow mosaic virus Isolates from Four Continents: Relationship Between the Seven Groups Found and Their Hosts and Origins. *Plant Disease*, *92*(12), 1596–1603.

198. Wylie, S. J., Li, H., Sivasithamparam, K., Jones, M. G. K. (2014). Complete genome analysis of three isolates of narcissus late season yellows virus and two of narcissus yellow stripe virus: three species or one? *Arch. Virol.*, *159*, 1521–1525.

199. Yang, Y., Kim, K. S., & Anderson, E. J. (1997). Seed Transmission of Cucumber Mosaic Virus in Spinach. *Phytopathology®*, *87*(9), 924–931. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.9.924

200. Yu, C.-M., Geng, G.-W., Cao, X.-R., Yang, C., Qi, Z., Liu, S.-S., Zhu, C.-X., & Yuan, X.-F. (2018). First identification of cucumber mosaic virus infecting six fruit crops in China. *Journal of Plant Pathology*, *101*. https://doi.org/10.1007/s42161-018-0185-9

201. Zakubanskiy, A. V., Mitrofanova, I. V., & Chirkov, S. N. (2017). Molecular characterization of viruses infecting canna in Russia. *European Journal of Plant Pathology*, *149*(4), 923–931. https://doi.org/10.1007/s10658-017-1241-6

202. Zein, H. S., Nakazawa, M., Ueda, M., Ohki, S., Takashima, Y., Miyatake, K. (2006). Detection and Diagnosis of Cucumber Mosaic Virus in Infected Plants Using Monoclonal Antibodies by Enzyme-linked Immunosorbent Assays. *Eco-Engineering*, *18*(1), 15-20.

203. Zitter, T. A., & J. F. Murphy. (2009). Cucumber mosaic. *The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0518-01*

204. Zettler, F. W., Abo El-nil, M. M. (1977). Bean yellow mosaic-virus infections of Gladiolus in Florida. *Plant. Dis. Rep.*, *61*, 243–247.

205. Zheng, H. Y., Wu, X. Y., Han, K. L., Chen, Z. Q., Song, X. J., Peng, J. J., Lu, Y. W., Lin, L., Chen, J. P., Yan, F., Wu, X. Y., & Han, K. L. (2018). First Report of

Beet western yellows virus Infecting *Crocus sativus* in China. *Plant Disease*, *102*(7), 1471–1471. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1579-PDN

206. Zhuravlov, V. (2000). New data on the fauna of aphids (*Homoptera, Aphidinea*) of Ukraine. *News of the Kharkov Entomological Society*, *8* (2), 19-22.

ДОДАТОК А

Табл. А.1. Ідентичність українських ізолятів BYMV за частковими нуклеотидними послідовностями гена капсидного білка, %

No	Ac No в GenBank	Назва ізолята	Рослина-хазяїн	Країна	Філогенетична група	BYMV-Gl-LeK-19 (MZ286969)		GlMP-18 (MK416160)		BYMV-Gl-Skv-20 (MZ286967)		BYMV-Gl-SV-20 (MZ286966)		BYMV-Gl-MIW1-20 (MZ286970)		BYMV-Gl-MIW2-20 (MZ286971)		BYMV-Gl-KP-20 (MZ286972)		BYMV-Gl-FHL-20 (MZ286968)		References
						nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	
1	AB097090	35-1	*Gentianella sp.*	Japan	Monocot	**99.4**	**99.5**	**99.4**	**100**	**99.4**	**98.4**	**99.4**	**100**	**98.8**	**100**	**98.8**	**100**	**99.4**	**99.5**	84.0	95.8	Nakazono-Nagaoka et al. 2004
2	AB097089	B-33	*Gentianella sp.*	Japan	Monocot	**99.4**	**99.0**	**98.6**	**98.5**	**96.4**	**97.9**	**98.6**	**98.5**	**98.8**	**99.5**	**98.8**	**99.5**	**83.6**	**99.0**	83.4	95.3	Nakazono-Nagaoka et al. 2004
3	AM884180	Lisianthus	*Eustoma russellianum*	Taiwan	Monocot	**99.3**	**99.0**	**98.4**	**98.5**	**96.2**	**97.9**	**98.4**	**98.5**	**98.6**	**99.5**	**98.6**	**99.5**	**99.3**	**99.0**	83.4	95.3	Wada et al. 2000
4	MG002647	Saffron2	*Crocus sativus*	China	Monocot	**99.1**	**99.5**	**98.2**	**100**	96.1	98.4	**98.2**	**100**	**98.4**	**100**	**98.4**	**100**	**99.1**	**99.5**	83.6	95.8	Zheng et al. 20
5	AF185961	Masdevallia	*Masdevallia sp.*	Germany	Monocot	**99.1**	**99.0**	**98.2**	**99.5**	96.1	97.9	**98.2**	**99.5**	**98.4**	**99.5**	**98.4**	**99.5**	**99.1**	**99.0**	83.4	95.3	Uga et al. 2004
6	AB029438	E-24N	gladiolus	Japan	Monocot	**98.8**	**98.9**	**98.2**	**99.5**	96.1	97.9	**98.2**	**99.5**	98.1	99.5	98.1	99.5	**98.8**	**98.9**	83.4	95.3	Uga et al. 2004
7	AB029435	S-22N	gladiolus	Japan	Monocot	**98.8**	**98.9**	97.9	99.5	96.1	97.9	97.9	99.5	98.1	99.5	98.1	99.5	**98.8**	**98.9**	83.6	95.3	Unpublished
8	MK516282	BYMV-CB1	*Senna bicapsularis*	China	Monocot	98.1	99.5	97.9	100	**96.8**	**98.4**	97.9	100	98.1	100	98.1	100	98.1	99.5	84.1	95.8	Gibbs et al. 2000
9		Bean-MP-2019	*Phaseolus vulgaris*	Ukraine	Monocot	96.6	98.4	95.9	98.4	**99.1**	**99.5**	95.9	98.4	95.7	98.4	95.7	98.4	96.5	98.4	86.6	96.7	Unpublished
10	AY845012	VM-23	*Vanilla fragrans*	India	Monocot	98.1	96.3	97.5	96.9	95.3	95.3	97.5	96.8	97.7	96.8	97.7	96.8	98.1	96.3	82.1	92.7	Unpublished

11	AB079886	M11	*G. hybrida*	Japan	Monocot	98.0	98.4	97.2	98.6	95.3	97.4	97.2	98.9	97.3	98.9	97.3	98.9	98.0	98.4	83.8	94.8	Unpublished
12	AB079887	IbG	*G. hybrida*	Japan	Monocot	97.5	97.4	96.6	97.9	94.8	96.3	96.6	97.9	96.8	97.9	96.8	97.9	97.5	97.4	83.2	93.7	Qiy Y. et al. 2019
13	HG970866	BYMV-LP	*Lupinus pilosus*	Australia	Lupin	92.0	98.9	92.1	99.5	90.8	97.9	92.1	98.4	92.3	98.5	92.3	98.5	92.0	98.9	83.2	95.8	Wylie et al. 2008
14	EU082124	R-Lut-1	*Lupinus luteus*	Russia	Lupin	91.8	98.9	92.7	99.5	91	97.9	92.7	99.4	92.9	99.4	92.9	99.4	91.8	98.9	83.0	95.3	Wylie et al. 2008
15	EU082125	R-Lut-2	*Lupinus luteus*	Russia	Lupin	91.8	98.9	92.7	99.5	91	97.9	92.7	99.4	92.9	99.4	92.9	99.4	91.8	98.9	83.0	95.3	Wylie et al. 2008
16	HG970868	LPexFB	*Vicia faba*	Australia	Lupin	91.8	98.4	92	98.9	90.6	97.4	92.0	98.5	92.2	98.5	92.2	98.5	91.8	98.4	83.0	98.5	Wylie et al. 2008
17	EU082126	R-Lut-2	*Lupinus luteus*	Russia	Lupin	91.6	98.9	92.9	99.5	90.8	97.9	92.7	99.4	92.9	99.4	92.9	99.4	91.6	98.9	83.0	95.3	Kehoe, M.A. et al. 2014
18	EU082127	R-Lut-2	*Lupinus luteus*	Russia	Lupin	91.6	98.9	92.9	99.5	90.8	97.9	92.7	99.4	92.9	99.4	92.9	99.4	91.6	98.9	83.0	95.3	Kehoe, M.A. et al. 2014
19	JQ026005	BYMV-Iraq12	*Vicia faba*	Iraq	Broad bean	86.0	98.4	85.7	98.9	87.2	98.4	85.7	98.9	86.0	99.0	86.0	99.0	86.0	98.4	83.4	96.8	Wada et al. 2000
20	AB041970	V 124	*Vicia faba*	Japan	Broad bean	85.5	97.9	85.8	98.4	86.8	97.9	85.7	98.4	85.5	98.4	85.5	98.4	85.5	97.9	83.4	96.3	Unpublished
21	EU082116	FBI-1	*Vicia faba*	Australia	Broad bean	85.7	97.4	85.5	97.9	86.8	97.4	85.5	97.9	85.7	97.9	85.7	97.9	85.7	97.4	81.2	95.8	Cheng and Jones 2000
22	EU082114	FBI-2	*Vicia faba*	Australia	Broad bean	85.7	97.9	85.5	98.4	86.4	97.9	85.5	98.4	85.7	98.4	85.7	98.4	85.7	97.9	82.1	96.3	Cheng and Jones 2000
23	AY192568	GDD	*Gladiolus sp.*	USA	General	83.8	95.8	83.6	95.8	86.4	96.3	83.6	95.8	83.4	95.8	83.4	95.8	83.8	95.8	93.1	98.9	Hammond and Hammond 2003
24	AB439729	Gla	*G. hybrida*	Japan	General	83.8	95.8	83.6	95.8	87.6	96.3	83.6	95.8	83.4	95.8	83.4	95.8	83.8	95.8	**99.6**	**100**	Nakazono-Nagaoka et al. 2009

25	AB439730	G1	*G. hybrida*	Japan	General	83.8	96.3	83.6	96.3	87.2	96.9	83.6	96.3	83.4	96.3	83.4	96.3	83.8	96.3	**98.9**	**99.4**	Nakazono-Nagaoka et al. 2009
26	AB029436	S-22C	*Gladiolus sp.*	Japan	General	83.6	94.8	83.4	94.8	87.2	95.3	83.4	94.8	83.2	94.8	83.2	94.8	83.6	94.8	**99.5**	**98.9**	Wada et al. 2000
27	AB029439	E-92C	*Gladiolus sp.*	Japan	General	83.6	95.8	83.4	95.8	87.4	96.3	83.4	95.8	83.2	95.8	83.2	95.8	83.6	95.8	**99.6**	**100**	Wada et al. 2000
28	KF155409	CK-GL1	*Gladiolus*	India	General	83.2	95.3	83	95.3	86.8	95.8	83.0	95.3	82.7	95.3	82.7	95.3	83.2	95.3	**98.8**	**99.5**	Kaur et al. 2018
29	KM114059	CK-GL2-clone	*Gladiolus dalenii*	India	General	83.2	95.3	83	95.3	86.8	95.8	83.0	95.3	82.7	95.3	82.7	95.3	83.2	95.3	**98.8**	**99.5**	Kaur et al. 2018
30	JQ686721	Glad 2	*Gladiolus*	India	General	83.8	95.3	83.6	95.3	87.6	95.8	83.0	95.3	82.7	95.3	82.7	95.3	83.8	95.3	**98.8**	**99.5**	Kaur et al. 2018
31	KF155414	CK-GL3	Gladiolus	India	General	83.2	95.8	83	95.8	86.8	96.3	83.6	95.8	83.4	95.8	83.4	95.8	83.2	95.8	**99.6**	**100**	Kaur et al. 2018
32	KF155419	CK-GL4	Gladiolus	India	General	83.2	95.3	83	95.3	86.8	95.8	83.0	95.3	82.7	95.3	82.7	95.3	83.2	95.3	**98.8**	**99.5**	Kaur et al. 2018
33	KF155420	CK-GL5	Gladiolus	India	General	83.2	95.3	83	95.3	86.8	95.8	83.0	95.3	82.7	95.3	82.7	95.3	83.2	95.3	**98.8**	**99.5**	Kaur et al. 2018
34	AM398198	Palampur	Gladiolus	India	General	83.6	95.3	83.4	95.3	86.4	95.8	83.4	95.3	83.2	95.3	83.2	95.3	83.6	95.3	93.0	97.9	Unpublished
35	AB041972	BH-8	*Phaseolus vulgaris*	Japan	General	83.4	94.8	83.2	94.8	86.2	95.3	83.2	94.8	83.0	94.8	83.0	94.8	83.4	94.8	93.5	97.9	Unpublished
36	EU082123	PvB-1	*Phaseolus vulgaris*	Australia	General	83	95.8	82.7	95.8	85.8	96.3	82.7	95.8	82.5	95.8	82.5	95.8	83	95.8	95.9	98.9	Boye et al. 1990
37	KC011006	HP	*Phaseolus vulgaris*	India	General	83.4	95.3	83.2	95.3	87.2	95.8	83.2	95.3	83.0	95.3	83.0	95.3	83.4	95.3	**99.1**	**99.5**	Sharma et al. 2015
38	AF192781	LutKP-1	*Lupinus luteus*	Australia	General	82.5	94.3	82.5	94.3	84.9	94.8	82.5	94.3	82.3	94.3	82.3	94.3	82.5	94.3	92.0	97.4	Wylie at al. 2008
39	D83749	MB4	-	Japan	General	83.8	95.8	83.6	95.8	87.2	96.3	83.6	95.8	83.4	95.8	83.4	95.8	83.8	95.8	98.4	98.9	Sharma et al. 2015
40	MK131270	OV65	Gladiolus	India	General	83.8	96.3	83.6	96.3	87.2	96.9	83.6	96.3	83.4	96.3	83.4	96.3	83.8	96.3	**98.9**	**99.5**	Cheng and Jones 1999
41	MN509831	BYMV-ALP	*Alpinia galanga*	India	General	83.6	96.3	83.4	96.3	86.2	96.8	83.4	96.5	83.2	96.5	83.2	96.5	83.6	96.3	96.4	99.4	Cheng and Jones 1999

42	AJ844916	E441	Gladiolus	India	General	82.5	93.7	82.3	93.7	85.3	94.3	82.3	93.7	82.1	93.7	82.1	93.7	82.5	93.7	92.5	96.8	Nakamura S. et al. 1996
43	X53684	Danish	*Gladiolus hybrida*	Denmark	General	82.5	94.3	82.3	94.3	85.3	94.8	82.3	94.2	82.1	94.2	82.1	94.2	82.5	94.3	92.5	97.3	Hemachandra Reddy P. et al. 2019
44	AF192783	LCbk-NN	*Lupinus angustifolius*	Australia	General	81.2	93.2	80.8	93.2	84.5	93.8	80.7	93.2	80.5	93.2	80.5	93.2	81.2	93.2	96.6	96.3	Unpublished
45	AM113706	E593	*Gladiolus sp.*	India	General	81.0	90.1	80.7	90.1	84.5	90.6	80.7	90.1	80.5	90.1	80.5	90.1	81.0	90.1	91.9	93.2	Unpublished
46	KY595424	BYM-Suev	*Canna sp.*	Russia	Canna	84.0	94.8	84.7	95.3	85.3	94.3	84.7	95.3	84.5	95.3	84.5	95.3	84.0	94.8	83.8	92.7	Unpublished
47	DQ060521	Chz	*Canna sp.*	China	Canna	83.6	95.3	83.8	95.8	84.9	94.8	83.8	95.8	83.6	95.8	83.6	95.8	83.6	95.3	85.0	93.2	Unpublished
48	EF592169	Csz	*Canna sp.*	China	Canna	83.0	93.7	83.6	94.3	84.7	93.2	83.6	94.3	83.4	94.3	83.4	94.3	83.0	93.7	83.4	91.7	Unpublished
49	EF592168	Cgz	*Canna sp.*	China	Canna	82.3	94.3	83	94.8	83.6	93.7	83.0	94.8	82.7	94.8	82.7	94.8	82.3	94.3	83.2	91.1	Unpublished
50	DQ641248	W	*L. albus*	USA	W	85.7	94.8	85.5	95.3	85.3	94.8	85.5	95.3	85.1	95.3	85.1	95.3	85.7	94.8	82.7	93.2	Bruun-Rasmussen et al. 2007
51	AB373203	CS	*Pisum sativum*	Japan	Pea	80.8	92.7	81.2	92.7	81.4	93.2	81.2	92.7	80.7	92.7	80.7	92.7	80.8	92.7	79.6	91.7	Unpublished
52	S71232	I	*Pisum sativum*	Australia	Pea	79.6	92.2	81.2	92.2	81.4	92.7	80.1	92.2	79.6	92.2	79.6	92.2	79.6	92.2	79.6	91.1	Taylor and Smith 1968
53	AB041971	P242	*Pisum sativum*	Japan	Pea	79.2	92.7	80.1	92.7	80.8	93.2	80.1	92.7	79.6	92.7	79.6	92.7	79.2	92.7	79.1	91.7	Takahashi et al. 1997

Табл. А.2. Ідентичність українських ізолятів CMV за частковими нуклеотидними послідовностями гена капсидного білка, %

No	Ac No in GenBank	Isolate name	Host	Country of origin	Stain group	CMV-Gl-LeK-19 (MW847707)		CMV-Gl-MP-19 (MW847708)		CMV-Gl-Skv-20 (MW847710)		CMV-Gl-Kh-20 (MW847715)		CMV-Gl-SV-20 (MW847709)		CMV-Gl-Lv-20 (MW847711)		CMV-Gl-SK-20 (MW847713)		CMV-Gl-SkvP-20 (MW847714)		CMV-Gl-Zt-20 (MW847712)		References
						nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	
1	KT199743	Ukr-1213	*Cucurbita pepo*	Ukraine	IA	**98.5**	97.6	**99**	98.4	98.1	97.6	97.3	98.3	**98.5**	**99.2**	96.5	98.3	98.8	99.2	93.2	96.1	73.5	81.4	Шевченко та ін., 2018
2	AJ585517	Strain 207	*Lycopersicon esculentum*	Australia	IA	**98.3**	97.6	**98.8**	98.4	**98.8**	97.6	**97.5**	**98.3**	98.3	99.2	**96.7**	**98.3**	**99.5**	**99.2**	93.0	96.0	72.8	81.4	unpublished
3	CMU22821	Ny	-	Australia	IA	**98.3**	97.6	**98.8**	98.4	**98.8**	97.6	**97.5**	**98.3**	98.3	99.2	**96.7**	**98.3**	**99.5**	**99.2**	93.0	96.1	72.5	81.4	unpublished
4	MH433673	SYV	*Syringa vulgaris*	Italy	IA	**98.3**	97.6	**99.0**	98.4	98.1	97.6	**97.5**	**98.3**	**98.6**	**99.2**	**96.8**	**98.3**	98.7	99.2	92.7	96.1	73.1	81.4	Troiano *et al.* 2019
5	KY595419	CMV-Maes	*Canna sp.*	Russia	IA	**98.3**	97.6	**99.0**	98.4	98.1	97.7	**97.5**	**98.3**	**98.5**	**99.2**	**96.7**	**98.3**	98.8	99.2	92.7	96.1	73.0	81.4	Zakubanskiy *et al.* 2017
6	LC546042	Apo	*Clematis apiifolia*	South Korea	IA	98.1	97.6	**99.0**	98.4	98.5	97.6	97.3	98.3	**98.5**	**99.2**	**97.0**	**98.3**	**99.3**	**99.2**	92.7	96.1	72.6	81.1	unpublished
7	AM114273	Le02	*Lycopersicon esculentum*	Hungary	IA	98.1	97.6	98.5	98.4	98.5	97.6	97.2	98.3	98.1	99.2	96.5	98.3	**99.3**	**99.2**	93.0	96.1	72.5	81.4	unpublished
8	LC066515	TUR86	*Rapistrum rugosum*	Turkey	IA	98.0	97.6	98.5	98.4	**99.0**	97.6	97.2	98.3	98.1	99.2	96.5	98.3	**99.2**	**99.2**	92.7	96.1	72.8	81.4	Ohshima *et al.* 2016
9	KP165582	PV0187	-	Germany	IA	98.0	100	98.5	100	98.5	98.3	97.2	98.3	98.1	99.2	96.5	98.3	**99.3**	**99.2**	92.7	95.3	72.4	81.4	unpublished
10	MN985118	BAL136	*Cucumis sativus*	Turkey	IA	98.0	96.8	**99.0**	**97.6**	98.0	96.8	97.3	97.5	**98.5**	**98.3**	96.5	97.5	98.8	98.3	92.7	95.3	73.1	80.5	Karanfil and Korkmaz, 2021
11	KT199740	Ukr-2114	*Cucurbita pepo*	Ukraine	IA	98.0	100	**99.0**	**100**	98.1	97.6	97.3	98.3	**98.6**	**99.2**	96.5	98.3	98.8	99.2	92.7	96.1	73.1	81.4	Шевченко та

																								ін., 2018
12	KT199739	Ukr-514	*Cucurbita pepo*	Ukraine	IA	98.0	100	98.5	98.4	97.6	97.6	96.7	99.2	98.0	98.3	96.5	98.3	98.3	99.2	93.2	96.1	73.8	81.4	unpublished
13	LC066428	NID045J	*Raphanus sativus*	Japan	IA	98.0	100	97.5	100	97.1	98.3	96.5	98.2	97.1	99.2	96.2	98.3	97.8	99.2	93.2	97.5	72.8	81.3	Ohshima *et al.* 2016
14	LC066500	TUR4	*Brassica*	Turkey	IA	97.8	100	**98.8**	100	**98.8**	97.6	97.0	99.2	**98.3**	**99.2**	**96.7**	**98.3**	**99.0**	**99.2**	92.4	96.1	72.8	81.4	Ohshima *et al.* 2016
15	LC066509	TUR83	*Rapistru rugosum*	Turkey	IA	97.8	97.6	98.3	98.4	**99.3**	97.6	97.0	98.3	97.8	99.2	**96.7**	98.3	**99.5**	**99.2**	92.9	96.1	72.4	81.4	Ohshima *et al.* 2016
16	EU428827	Cameroon	banana	Cameroon	IA	97.8	97.6	98.0	98.4	**99.0**	97.6	96.8	98.3	97.6	99.3	96.5	98.3	**99.3**	**99.2**	93.0	96.0	72.2	81.4	Kayode *et al.* 2019
17	AJ810258	RT52	squash	USA	IA	97.8	96.0	98.3	96.8	98.3	96.1	97.0	96.6	97.8	97.5	96.2	96.6	**99.0**	**97.6**	92.4	95.7	72.5	80.5	Deyong *et al.* 2005
18	AB188236	CM95	tobacco	Japan	IA	97.8	96.0	97.8	96.8	97.3	96.1	96.8	97.5	97.3	98.3	96.0	97.5	98.0	98.3	93.0	96.1	73.2	82.2	unpublished
19	AB188233	Fuka4-4	*Cucumis sativus*	Japan	IA	97.8	96.0	97.8	96.8	97.3	96,1	96.7	97.5	97.3	98.3	96.0	97.5	98.1	98.3	93.0	96.0	73.2	82.2	unpublished
20	AF172842	PC	*Peperomiac aperata*	Brazil	IA	97.8	97.6	96.5	97.6	96.3	96.0	**98.3**	**99.2**	96.1	98.3	**98.0**	**99.2**	96.5	98.3	93.0	97.6	72.7	81.4	Boari *et al.* 2000
21	KX710196	R249	*Capsicum annuum*	Bosnia and Herzegovina	IA	97.3	96.8	98.2	97.6	97.3	96.8	96.5	97.5	97.8	98.3	95.7	97.5	98.0	98.3	91.9	95.3	71.9	80.5	unpublished
22	Y18137	I17F	-	France	IA	97.5	96.0	97.8	96.8	98.3	96.1	96.5	96.6	97.2	97.5	95.7	96.6	98.5	97.5	91.9	94.5	72.1	79.7	Carrere *et al.* 1998
23	KT302190	YLJ-3	banana	China	IA	97.5	96.0	98.0	96.8	97.1	96.1	96.2	96.6	97.5	97.5	95.5	96.6	97.8	97.5	91.9	94.5	74.5	83.1	unpublished
24	AB369273	Paf	*Nicotiana benthamiana*	South Korea	IA	97.0	95.3	96.6	96.0	97.1	95.3	95.4	96.6	96.1	97.5	95.2	96.6	97.3	97.5	93.2	95.2	72.7	79.6	Lee *et al.*, 2018
25	HQ916354	Gd	pumpkin	Australia	IA	96.8	97.6	97.8	98.4	97.8	97.6	96.0	98.3	97.3	99.2	95.2	98.3	98.1	99.2	91.9	96.0	72.7	81.4	unpublished
26	AB920779	m1	*Nicotiana tabacum*	Japan	IA	96.3	96.0	95.8	96.8	96.8	96.1	94.7	97.5	95.3	98.3	95.0	97.5	97.1	98.3	93.9	95.3	73.6	82.2	Maneechoat *et al.*, 2015

27	LC066410	IWD041J	*Raphanus sativus*	Japan	IA	96.3	96.8	95.8	96.8	96.8	96.1	94.7	97.5	95.3	98.3	95.0	97.5	97.1	98.3	94.3	96.0	73.9	82.2	Ohshima *et al.* 2016
28	KC527758	RP30	*Capsicum annuum*	South Korea	IA	96.3	96.8	95.8	96.8	96.8	96.0	94.7	97.5	95.3	98.3	94.9	97.5	97.1	98.3	94.2	96.1	73.9	82.2	Kim *et al.*, 2014
29	LC066452	TYD083J	*Raphanus sativus*	Japan	IA	95.8	94.5	95.8	95.7	96.1	95.3	94.2	95.8	95.3	96.6	94.4	95.8	96.8	97.5	93.5	94.5	73.2	81.4	Ohshima *et al.* 2016
30	KC189915	AG6	banana	Cote dIvoire	IA	95.5	95.3	96.0	94.5	97.1	93.7	95.5	95.8	95.5	95.7	95,2	95.8	97.2	95.8	91.4	94.5	70.4	79.7	Kouadio *et al.* 2013
31	AJ131623	GPP	*Gladiolus sp.*	Netherlands	IA	95.0	95.3	94.5	96.0	94.6	92.1	93.4	94.9	94.5	95.7	93.6	94.9	94.8	95.7	92.2	91.4	72.9	80.5	unpublished
32	JX014248	Va	*Vigna angularis*	South Korea	IA	92.4	95.2	92.7	96.0	93.0	93.6	91.2	95.7	92.2	95.7	92.3	95.7	93.2	95.7	89.7	92.1	70.4	80.5	Kim *et al.*, 2014
33	GU327368	Z1	*Cucurbita pepo*	South Korea	IA	92.6	94.4	92.1	95.3	92.7	92.8	92.0	95.7	91.6	95.7	92.3	95.7	93.0	95.7	91.1	93.6	70.6	80.5	unpublished
34	KR535607	CMV-KoPF	Passion fruit	South Korea	IA	91.9	93.6	92.2	94.4	92.4	92,1	91.7	94.9	91.6	94.9	92.0	94.9	92.7	94.9	90.0	92.1	70.4	79.7	unpublished
35	KP713797	Glad-NBRI-10	*Gladiolus dalenii*	India	IA	82.2	85.5	82.5	85.5	82.9	84.7	81.6	86,4	82.2	87.3	82.0	86.4	83.1	88.1	78.4	83.0	60.4	77.1	Raj *et al.*, 2017
36	KP713798	Glad-NBRI-4	*Gladiolus dalenii*	India	IA	81.2	83.9	81.6	83.9	81.9	83.0	80.6	84.7	81.3	85.6	81.0	84.7	82.2	86.4	77.7	82.3	60.0	77.1	Raj *et al.*, 2017
37	MK778781	lu-17-14	batat	China	IB	92.7	98.3	92.7	98.3	92.2	100	92.3	97.5	92.7	97.5	92.5	97.5	93.0	97.5	**98.8**	**98.4**	75.1	82.2	unpublished
38	AM048830	VN-Caobang	*Nicotiana tabaccum*	Vietnam	IB	94.2	94.4	94.7	95.2	94.2	96.0	93.1	95.7	94.2	96.6	93.3	95.7	94.5	96.6	95.7	96.8	74.8	82.2	unpublished
39	LC480455	BH-Ligusticum	*Ligusticum chuanxiong*	South Korea	IB	92.7	96.6	92.7	98.3	92.1	86.6	92.8	97.5	92.7	95.7	93.0	97.5	92.9	95.7	97.8	97.7	76.1	82.2	Heo *et al.*, 2020
40	L36525	Strain ABI	*Gladiolus sp.*	Korea	IB	91.6	93.7	91.7	92.9	91.1	92.1	91.2	95.8	91.6	95.8	91.5	95.8	91.9	95.8	**98.3**	**97.7**	74.7	80.5	unpublished
41	KP710852	QDR	pumpkin	China	IB	92.9	95.3	93	94.5	93	93.7	92.5	97.5	93.0	97.5	92.8	97.5	93.7	97.5	97.8	99.2	74.5	82.2	unpublished
42	KX660758	Anhui	maize	China	IB	92.7	96	92.7	96.8	91.7	92.9	91.2	96.6	92.7	97.5	91.5	96.6	92.5	97.5	96.6	96.0	74.6	80.5	unpublished

43	MH394190	Liaoning	peanut	China	IB	92.7	93.7	92.7	92.9	91.7	92.1	93.1	97.5	92.2	95.8	92.8	97.5	92.5	95.8	96.6	97.7	75.9	83.9	unpublished
44	MK415658	TA-pe	peanut	China	IB	92.4	92.1	92.5	91.3	91.4	90.6	92.8	95.8	92.0	94.1	92.6	95.8	92.2	94.1	96.3	96.1	75.9	83.1	unpublished
45	KP710853	TAR	pumpkin	China	IB	92.4	93.7	92.5	92.9	92.5	92.1	92.0	95.8	92.4	95.8	92.3	95.8	93.2	95.8	97.3	97.7	73.9	80.5	Cheng-Ming *et al.*, 2019
46	JX993913	SXCH	*Bupleurum_sp*	China	IB	92.1	95.3	92.2	94.5	92.2	93.7	91.7	97.5	92.2	97.5	92.0	97.5	92.4	97.5	**98.8**	**99.2**	74.9	82.2	unpublished
47	MT978189	P-EP-Ukr-19	*Echinecea*	Ukraine	IB	92.1	95.2	92.2	94.5	92.2	93.7	91.7	97.5	92.2	97.5	92.0	97.5	93.0	97.5	**100**	**100**	75.2	82.2	Mishchenko *et al.*, 2021
48	KT199741	Ukr-1409	*Cucumis sativus*	Ukraine	IB	92.0	95.3	92.0	94.5	91.9	93.7	91.5	97.5	91.9	97.5	91.7	97.5	92.7	97.5	**99.5**	**99.2**	74.5	82.2	unpublished
49	KX883765	fly60335	True flies	China	IB	91.6	93.7	91.7	92.9	91.7	92.1	91.2	95.8	91.6	95.8	91.5	95.8	92.5	95.8	96.8	97.7	74.8	82.2	Shi *et al.*, 2016
50	KP710850	ZBR	pumpkin	China	IB	91.6	94.5	91.1	93.7	91.1	92.9	90.6	96.6	91.1	96.6	90.9	96.6	91.9	96.6	**99.0**	**99.2**	74.5	81.3	unpublished
51	KP710851	WHR	pumpkin	China	IB	91.0	94.5	91.1	93.7	91.1	94.5	90.6	96.6	91.1	96.6	90.9	96.6	91.4	96.6	**98.3**	**98.4**	74.5	83.1	unpublished
52	LT160072	Alst-2	*Alstroemeria*	Italy	II	73.8	81.1	73.9	80.1	72.9	80.3	73.2	83.1	73.2	81.4	73.2	83.1	73.2	83.1	75.2	79.5	98.8	99.1	unpublished
53	MN399746	Salzlandkreis-218	legume	Germany	II	73.4	80.2	73.5	80.2	72.5	80.3	72.8	83.1	73.5	81.4	72.8	83.1	72.8	83.1	75.5	79.5	**99.1**	**99.2**	Gaafar *et al.*, 2020
54	MF100856	AARP	*Pisum sativum*	Pakistan	II	73.4	80.8	73.5	80.8	72.1	80.1	72.8	83.1	73.5	81.4	72.8	83.1	72.4	82.2	75.5	80.1	98.8	98.3	Sudhakar, *et al.*, 2006
55	Z12818	kin	-	United Kingdom	II	73.1	80.2	73.2	80.2	75.5	80.3	72.5	83.1	73.2	81.4	72.5	81.4	72.5	83.1	72.2	79.5	**99.1**	**98.3**	Boccard and Baulcombe, 1993
56	AB006813	m2	-	Japan	II	73.1	80.2	73.2	80.2	75.2	80.3	72.5	83.1	73.2	81.4	72.5	81.4	72.5	83.1	72.2	79.5	**99.3**	**99.2**	unpublished
57	MCVRNA3A	Q	-	Australia	II	73.1	80.2	73.2	80.2	72.9	80.3	72.1	82.2	73.2	81.4	72.1	82.2	73.2	83.0	75.9	79.5	98.3	98.3	Davies and Symons, 1988

58	AF127976	Strain LS	-	USA	II	73.1	80.2	73.2	80.2	72.9	80.3	72.1	82.2	73.2	81.4	72.1	82.2	73.1	81.4	75.8	79.5	98.6	98.3	Roossinck *et al.*, 1999
59	MN792886	PK1	*Papaver somniferum*	Slovakia	II	73.1	80.2	73.2	80.2	72.2	80.3	72.5	83.1	73.2	81.4	72.5	83.1	72.5	81.4	75.2	79.5	**99.3**	**99.2**	unpublished
60	KY020278	plum	plum	France	II	73.1	80.2	73.2	80.2	71.9	79.5	72.5	83.1	73.2	81.4	72.5	83.1	72.1	81.4	75.2	79.5	**99.1**	**98.3**	unpublished
61	KJ623607	IrisIzta 3	*Iresine herbstii*	Mexico	II	73.8	80.5	73.9	82.2	72.6	77.9	73.2	83.1	72.6	81.4	73.2	83.1	72.8	82.2	74.9	78.7	97.9	98.3	unpublished
62	KJ623609	IrisIzta 5	*Iresine herbstii*	Mexico	II	73.1	80.2	73.2	80.2	71.9	79.5	72.5	81.4	73.2	79.7	72.5	81.4	72.1	80.5	75.2	79.5	**99.1**	**95.7**	unpublished
63	EF202597	Tsh	*Lycopersicon esculentum*	China	II	72.8	80.2	72.8	80.2	71.9	80.3	72.1	83.1	72.8	81.4	72.1	83.1	72.1	83.1	74.9	79.5	98.6	99.2	Chen *et al.*, 2007
64	L15336	trk7	-	Hungary	II	72.7	78.6	72.8	78.6	71.5	77.9	72.1	81.4	72.2	79.7	72.1	81.4	71.8	79.7	74.2	78.0	97.8	95.8	unpublished
65	HG917910	Palampur	*Nicotiana glutinosa*	India	II	72.8	81.3	72.8	82.2	71.5	81.4	72.1	82.2	72.8	82.5	72.1	82.2	71.8	82.5	74.9	78.7	98.3	97.5	Kumari *et al.*, 2013
66	Y18138	Strain R	-	France	II	74.1	82.2	74.2	82.2	73.2	80.3	73.5	83.1	73.5	81.4	73.5	83.1	73.5	83.1	75.5	79.5	98.3	98.3	Carrere *et al.*, 1999
67	AJ304399	IPO ALS	*Alstroemeria*	Netherlands	II	71.7	77.0	71.8	77.0	70.8	77.2	71.0	79.7	71.8	77.9	71.0	79.6	71.1	79.6	73.8	76.3	98.3	95.8	Chen *et al.*, 2002
68	AJ810254	RT68	spinach	Netherlands	II	73.1	82.2	73.2	82.2	72.2	82.2	72.5	81.4	73.2	83.1	72.5	83.1	72.5	83.1	75.2	83.5	**99.3**	**98.3**	Deyong *et al.*, 2004

Документ підписано у сервісі Вчасно (початок)
Sovinskadissertation_mid2.pdf

Документ підписано у сервісі Вчасно (продовження)
Sovinskadissertation_mid2.pdf

Документ відправлено: 13:28 23.06.2022

Власник документу

Електронний підпис
13:28 23.06.2022
Ідентифікаційний код: 3455613728
Совінська Роксолана Стефанівна
Власник ключа: Совінська Роксолана Стефанівна
Час перевірки КЕП/ЕЦП: 13:28 23.06.2022
Статус перевірки сертифікату: Сертифікат діє
Серійний номер: 3ED5083160DBC59B040000007A392200C3F08300