

УДК 635.64; 578.3; 620.187

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ М-ВІРУСУ КАРТОПЛІ, ВИДІЛЕНОГО З ТОМАТІВ

Данілова О.І., Дуніч А.А., Будзанівська І.Г., Міщенко Л.Т.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
E-mail: elena_danilova2012@mail.ru*

Досліджено серологічні, деякі фізико-хімічні і молекулярно-біологічні властивості томатного ізоляту М-вірусу картоплі. Філогенетичний аналіз нуклеотидних та відповідних амінокислотних послідовностей гена капсидного білка виявив високий рівень філогенетичного спорідненості між репрезентативним українським ізолятом МВК і двома штамми євро-азійської групи – іранським та німецьким, що увійшли в один кластер з українським ізолятом і мають одного загального предка.

Ключові слова: *Lycopersicon esculentum* Mill., М-вірус картоплі, філогенетичний аналіз.

ВСТУП

М-вірус картоплі (МВК) є одним з найбільш розповсюджених патогенів картоплі в усіх зонах вирощування культури. На Поліссі України спричинювані ним втрати врожаю становлять в середньому 40,8% [1]. М-вірус картоплі належить до роду *Carlavirus* родини *Betaflexiviridae* порядку *Tymovirales*. За своєю морфологією МВК являє собою ниткоподібні віріони довжиною 650 нм та діаметром 12 нм. Геном вірусу представлений однією молекулою лінійної одноланцюгової смислової РНК з молекулярною масою $2,3 \times 10^6$ Да. Розмір геному складає 7,4-7,7 кб. Віріон містить 6% нуклеїнової кислоти, 94% білка. У своєму складі МВК містить один структурний білок один – білок оболонки молекулярною масою 33 кДа. Ліпідів та вуглеводів у складі віріону не виявлено [2].

Оскільки більшість вірусів рослин є в основному РНК-вмісними (80% відсотків з +ол РНК-геномом), довгий час вважалось, що вони є високомутабельними і відповідно повинні дуже швидко еволюціонувати [3, 4].

На сьогодні існує дві основні гіпотези еволюції РНК-вмісних вірусів. Перша говорить про високу швидкість їх мутабельності за рахунок помилок в роботі РНК-залежної РНК-полімерази. Під впливом позитивного добору змінюються властивості вірусів, внаслідок чого вони швидко пристосовуються до нових умов існування. Друга підкреслює високу гомогенність РНК-вмісних вірусів, що обумовлюється впливом негативного добору на гетерогенні популяції вірусів, а як відомо, негативний добір направлений на підтримання сталості [5, 6]. Дослідження молекулярно-біологічних характеристик, і, зокрема, нуклеотидних послідовностей геному, надає можливість прослідкувати філогенетичні зв'язки даного вірусу з іншими, встановити його еволюційну історію та перспективи.

Крім того, на основі таких даних можна розробити високочутливі методики діагностики на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та прогнозувати можливі зміни і набуття нових властивостей циркулюючими в певному ареалі штамми або ізолятами [7–9]. Таким чином, з розвитком сучасних підходів, що базуються на сиквенуванні геномів, можливо досліджувати нуклеотидні послідовності геномів вірусів рослин і математично достовірно встановлювати їх ступінь спорідненості, роблячи висновки про їх еволюцію [9, 10].

Метою нашої роботи було порівняти молекулярно-біологічні властивості українського ізоляту М-вірусу картоплі з властивостями відомих зарубіжних ізолятів цього вірусу, а також прослідкувати його можливе походження.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Рослинні зразки відбирали шляхом візуального обстеження полів томатів у Лісостеповій зоні України на наявність симптомів вірусної етіології.

Виділення МВК із уражених рослин томатів проводили згідно методики О.В. Ніколаєвої [11].

Інфекційна природа виявлених на томатах симптомів була підтверджена серією експериментальних інфікувань на здорові молоді рослини томатів. Біологічні властивості вірусів досліджували, використовуючи метод рослин-індикаторів [12].

Морфологію вірусних часток вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії (ЕМ). Негативне контрастування очищених вірусних препаратів проводили 2% розчином фосфорновольфрамової кислоти протягом 2 хв [13]. Препарати досліджували за допомогою електронних мікроскопів JEM 1230 (JEOL, Японія) та EM-125 (Суми, Україна).

Для визначення молекулярної маси капсидного білка вірусу проводили електрофорез за Laemmli в 14% поліакриламідному розділяючому та 5% концентруючому (стартовому) гелях з використанням набору маркерних білків LMW ("Pharmacia", Швеція) [14]. Електрофорез проводили у комерційному апараті для вертикального електрофорезу (ООО «Хеликон», VE-10, Москва) при струмі 40 мА протягом 1,5 год.

Ідентифікацію вірусів здійснювали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (сендвіч-варіант) з використання комерційних тест-систем фірми LOEWE (Німеччина). Результати реакції реєстрували на рідері Thermo Labsystems OpSis MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм. За достовірні приймали значення, що перевищували негативний контроль у три рази [15].

Виділення сумарної РНК проводили за стандартною методикою [16]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ-ПЛР) проводили за допомогою ампліфікатора «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems), використовуючи специфічні олігонуклеотидні праймери: PVM1 (5' taactgcagatgccgtcttg 3'), PVM2 (5' tgcgatgtctttgtgcgtat 3').

Аналіз тотальної РНК, отриманої в результаті виділення зі зразків рослин, та аналіз продуктів ПЛР-ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу в 1%-му розчині агарози з додаванням бромистого етидію в концентрації 0,5 мкг/мл [17].

Електрофорез проводили на приладі фірми «Vagos» (Литва) в режимі 15 В/см протягом 30 хв. Гелі фотографували при ультрафіолетовому випромінюванні.

Встановлення нуклеотидної послідовності гена капсидного білка М-вірусу картоплі проводили після ампліфікації даного гену. Продукти ампліфікації (кДНК) очищали за допомогою Gel Using Mini Elute Columns (Qiagen, Dtkbrj, Великобританія).

Сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на аналізаторі Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з використанням Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, США).

Ідентифікацію та порівняння отриманих ділянок проводили за допомогою комп'ютерної програми MEGA 5.

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за параметричними критеріями нормального розподілу варіант, стандартне відхилення середніх значень – за загальноприйнятою методикою з використанням комп'ютерної програми управління базами даних MS EXCEL 2000 [18].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У 2005-2012 рр. проводили обстеження рослин томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) різних сортів, вирощених у відкритому ґрунті, на ураження їх вірусами. Значну увагу привернули симптоми скручування листків по типу «човник вгору», які раніше не були описані та вивчені (рис.1).



Рис.1 Симптоми скручування листків по типу «човник вгору» на ділянці рослин томатів, сорт «Донбас»: ліворуч – контроль, умовно; праворуч – хворі рослини

Симптоми захворювання проявлялися у період з липня по вересень включно.

Інфекційна природа виявлених симптомів на томатах була підтверджена серією експериментальних інфікувань на здорові молоді рослини томатів.

З метою ідентифікації вірусів був проведений ІФА з використанням антитіл до МВК. Крім того, зразки були перевірені на наявність вірусів, які за даними літератури є розповсюдженими на томатах в Україні (Х-вірус картоплі) та

викликають скручування листків подібне до виявленого нами (вірус скручування листків картоплі (ВСКЛ) [19, 2, 20]. Результати ІФА показали наявність антигенів МВК. Антигенів УВК, ХВК та ВСКЛ не виявлено. Повідомлення про виявлення МВК на рослинах томатів, відмічено також і у Європі [20, 22].

Результати ІФА були підтверджені методом полімеразної ланцюгової реакції. Аналіз результатів показав наявність продукту ампліфікації розміром 276 п.н., що відповідає кДНК до РНК М-вірусу картоплі (рис. 2).



Рис. 2. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР по визначенню М-вірусу картоплі у рослинах томатів: трек 1 – томатний ізолят МВК; М – маркер ДНК 100, 200, 300, 400, 500 (кб); К- – негативний контроль; К+ – позитивний контроль (276 п.н.).

Результати ЕМ показали, що віріони мали ниткоподібну форму та розмір $620 \pm 10 \times 11$ нм (рис.3).

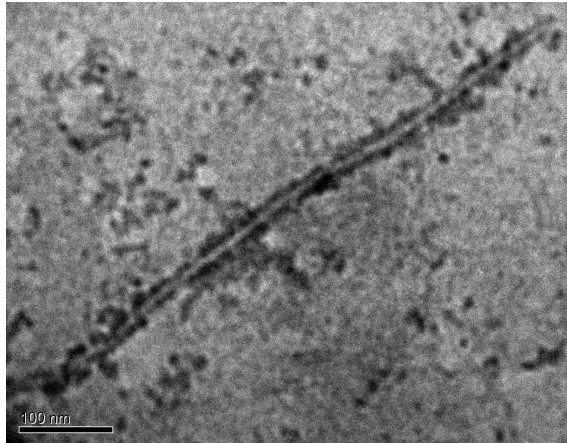


Рис. 3. Електроннограма М-вірусу картоплі, виділеного з рослин томатів, JEM-1230 з приставкою

Тобто, досліджуваний нами ізолят МВК має характерну для карлавірусів ниткоподібну форму та не відрізняється від відомих штамів за своїми розмірами [2] та колом рослин-індикаторів [23].

Нами також встановлено, що структурний білок томатного ізоляту МВК має молекулярну масу 33 кДа (рис. 4).

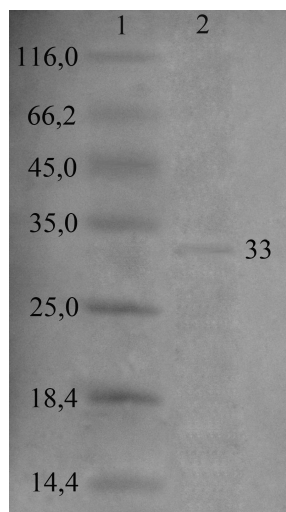


Рис. 4 Електрофореграма білків вірусів, виділених із рослин томатів: 1 – маркерні білки (116.0 кДа, 66.2 кДа, 45.0 кДа, 35.0 кДа, 25.0 кДа, 18.4 кДа); 2 – препарат МВК.

Як було зазначено нами вище, МВК був виявлений на рослинах томатів в Італії та встановлено, що він завжди виявлявся в комплексі з вірусом огіркової мозаїки або Y-вірусом картоплі. Дослідниками зазначено, що моноінфекція МВК-То не викликає симптомів на помідорах, але підсилює симптоми, спричинені YВК. Амінокислотний сиквенс 3'-кінця РНК МВК-То показав наявність двох ORF-ділянок 34 К (структурний білок) і 12 К (нуклеопротеїн) [21]. Молекулярна маса 34 кДа зазначена і для штаму МВК із Росії (Russian wild) [24]

Таким чином, нами досліджено біологічні, серологічні, фізико-хімічні властивості томатного ізоляту МВК та виявлено відмінності з відомим томатним штамом у прояві симптомів захворювання та молекулярній масі структурного білка.

Після сиквенування нуклеотидної послідовності капсидного білка томатного ізоляту МВК проводили її порівняння з відомими ізолятами з генбанку, застосовуючи комп'ютерні програми BLAST та MEGA 5.

Відомо, що за нуклеотидною послідовністю гена білка оболонки і амінокислотній послідовності цього білка всі ізоляти МВК поділяються на дві групи - I та II [25]. Ізоляти МВК з групи I подібні приблизно на 73% - 75% за нуклеотидами і мають 85% - 87% ідентичних амінокислот з ізолятами групи II. Крім того, вони групуються за географічним поширенням: до I групи відносяться ізоляти

з Європи та Азії (Італії, Німеччини, Китаю, Польщі та Росії), до II групи – ізоляти з Америки та Канади.

При порівнянні українського ізоляту MBK з відомими штамми показано, що вони мають відсоток подібності 80-82% по нуклеотидах та 94-95% по амінокислотній послідовності з ізолятами канадо-американської групи та близько 98% за послідовностями нуклеотидів і 100% за послідовностями амінокислот з ізолятами євро-азійської групи, що відносить наш український ізолят до цієї групи (табл. 1).

Таблиця 1
Порівняння нуклеотидних та амінокислотних послідовностей українського ізоляту MBK з ізолятами Генбанку (%)

Номер Генбанку	Штами/ Ізоляти MBK	Країна/ хазяїн	% подібності нуклеотидних послідовностей	% подібності амінокислотних послідовностей
2. D14449.2	Russian wild	Росія картопля	98,5	100
3. EU604672.1	DSMZ	Germany картопля	97,7	100
4.EF397743.1	Kh-92	Iran картопля	98,1	100
5.EF397747.1	Ha-64	Iran картопля	98,1	100
6.EF397746.1	Es-34	Iran картопля	97,7	100
7.EF397745.1	Az-83	Iran картопля	97,7	100
8.EF397744.1	Ar-17	Iran картопля	97,7	100
9. X57440.1	Germany	Germany картопля	97,7	100
10. X85114.1	Italy	Italy томат	96,8	100
11.HM854296.1	VIRUBRA 4/007	Czech Republic картопля	95,8	100
12. GQ496609.1	Latvia	Latvia картопля	95	100
13. AJ437481.1	Hangzhou	China картопля	96,1	100
14. AY311394.1	Uran	Uran картопля	94,6	100
15. HM991708.1	VIRUBRA 4/016	Czech Republic картопля	95	100
16. JN835299.1	Gansu	China томат	95	100
17. AY311395.1	M57	Poland картопля	95	100
18. HQ005276.1	VIRUBRA 4/035	Czech Republic картопля	95	100
19. EF063383.1	CL1	Canada картопля	82,2	94,8
20. AF023877.1	Idaho	USA картопля	82,2	94,8
21. EF063389.1	Ca513	Canada картопля	81,9	94,8
22. EF063388.1	Ca508	Canada картопля	81,9	94,8
23. JN225461.1	VIRUBRA 4/009	Czech Republic картопля	81,1	94,8
24. EF063384.1	CL3	Canada картопля	81,5	94,8
25. GQ923785.1	20810384	Hungary картопля	75	94,8
26. EF063386.1	Ca5	Canada картопля	80,3	94,8
27. EF063385.1	CL4	Canada картопля	80,3	94,8
28. EF063387.1	Ca128	Canada картопля	79,9	93,5

Як видно з рис. 5, український ізолят MBK (на філогенетичному дереві «PVM Ukraine Tomato») має спільне походження з ізолятами із Ірану і Німеччини та

знаходиться поруч з італійським томатним штамом, що свідчить про належність його до євро-азійської групи (рис.5).

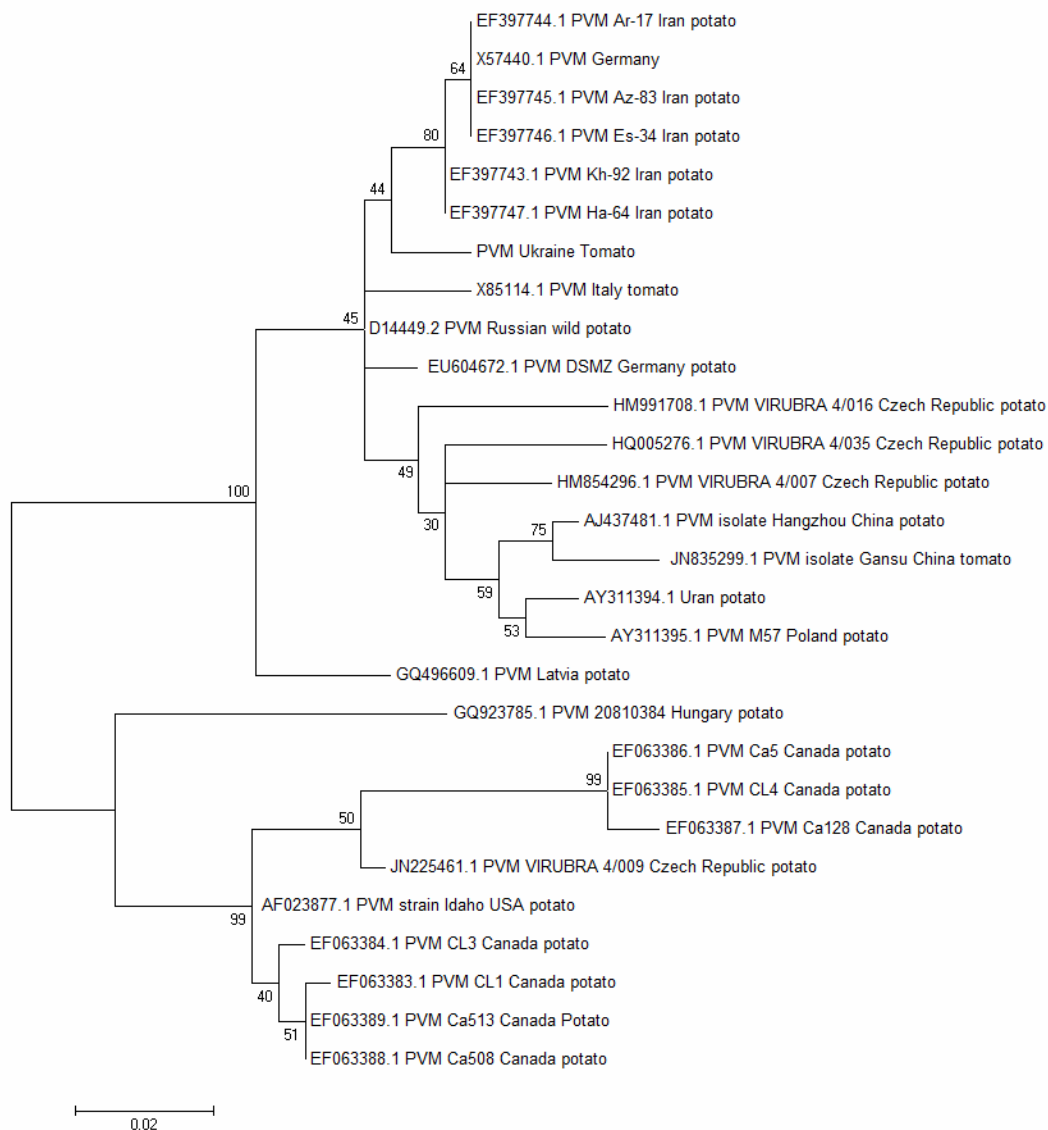


Рис.5 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей капсидного білка МВК (метод максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood), з 1000 будстреп реплікацій

Узагальнюючи отримані результати, можна припустити, що томатний ізолят МВК, виділений в Україні, має напрям еволюції подібний до італійського томатного штаму. Можливо, розділення штамів МВК відбувається не тільки географічно (на євро-азійську та канадо-американську групи), але і за господарями всередині груп.

Можна з впевненістю стверджувати, що МВК, виділений нами з томатів, має спільного предка з європейськими та азіатськими штамми.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено фізико-хімічні, серологічні та молекулярно-біологічні властивості українського томатного ізоляту МВК.
2. При порівнянні українських ізолятів МВК з відомими встановлено високий відсоток гомології їх з ізолятами євро-азійської групи (98% за нуклеотидною послідовністю та 100% - за амінокислотною).
3. Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей ділянки гену капсидного білка ізоляту МВК методом максимальної правдоподібності показав, що український ізолят має спільне походження з групою євро-азійських штамів (з ізолятами із Ірану та Німеччини) та знаходиться поруч з італійським томатним штамом.

Список літератури

1. Міщенко Л.Т. Вірусні інфекції картоплі та їх перебіг за умов модельованої мікрогравітації / Л.Т. Міщенко, В.П. Поліщук, О.П. Таран, О.І. Гордейчик – К.: Фітосоціоцентр, 2011. – 144 с.
2. King A. M. Q. Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz – Elsevier, 2012. – 1327 p.
3. Wang H. Analyses on mutation patterns, detection of population bottlenecks, and suggestion of deleterious-compensatory evolution among members of the genus Potyvirus / H. Wang, L.F. Huang, J.I. Cooper // Arch. Virol. – 2006. – Vol. 151, No 8. – P. 1625-1633.
4. Gilbert G. S. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems / G.S. Gilbert // Annu. Rev. Phytopathol. – 2002. – Vol. 40, No 1. – P. 13-43.
5. Roossinck M. J. Mechanisms of plant virus evolution / M. J. Roossinck // Annu. Rev. Phytopathol. – 1997. – No 35. – P. 191-209.
6. Roossinck M.J. Plant Virus Evolution / M. J. Roossinck. – Springer-Verlag, 2008. – 243 p.
7. Anisimova M. Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites / M. Anisimova, R. Nielsen, Z. Yang // Genetics. – 2003. – Vol. 164. – P. 1229-1236.
8. Morozov S. Y. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement / S. Y. Morozov, A. G. Solovyev // J. Gen. Virol. – 2003. – Vol. 84, No 8. – P. 1351-1353.
9. Garsia-Arenal F. Variability and genetic structure of plant virus populations / F. Garsia-Arenal, A. Fraile, J. M. Malpica // Annu. Rev. Phytopathol. – 2001. – Vol. 39, No 2. – P. 157-186.
10. Gibbs A. J. Plant virus evolution: past, present and future / A. J. Gibbs, P. L. Keese, M. J. Gibbs [et al.] // Origin and evolution of viruses; [Domingo E., Webster R., Holland J. J. (eds)]. – San Diego, Calif.: Academic Press, 1999. – P. 263-285.
11. Николаева О.В., Новиков В.К., Каграманов В.Н. Определение М- и S-вирусов картофеля методом иммуноферментного анализа / О.В. Николаева, В.К. Новиков, В.Н. Каграманов // Сельскохозяйственная биология. – 1985. – вып. 2. – С. 96-101.
12. Бойко А.Л. Практикум із загальної вірусології / А. Л. Бойко. – К.: Видавничий центр “Київський університет”, 2000. – 269 с.
13. Салига Ю. Т. Електронна мікроскопія біологічних об'єктів / Ю. Т. Салига, В. В. Снітинський. – Львів, 1999. – 152 с.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, No 15. – P. 608-685.
15. Clark M. F. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses / M. F. Clark, A. N. Adams // J. Gen. Virology. – 1977. – Vol. 34. – P. 574- 586.

16. Мельничук М. Д. Молекулярна діагностика та ідентифікація X-, Y-, M-, S-, L- вірусів картоплі (*Solanum tuberosum* L.) методом полімеразної ланцюгової реакції. (Методичні рекомендації) / М.Д. Мельничук, І. О. Антіпов, В. Г. Спиридонов. – К.: Видавничий центр НАУ, 2008. – 22 с.
17. Кучеренко М. Є. Сучасні методи біохімічних досліджень: учбовий посібник / М. Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В. М. Войціцький. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.
18. Лакин Г. Ф. Биометрия [3-е изд., перераб. и доп.] / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
19. Ssekyewa C. Incidence, distribution and characteristics of major tomato leaf curl and mosaic virus diseases in Uganda. PhD-thesis / C. Ssekyewa. – Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium. – 2006. – 233 p.
20. Руднева Т.О., Бисов А.С., Шевченко Т.П. Діагностика вірусів у насіннєвому матеріалі рослин родини Solanaceae // Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва: 4 Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених (Сколе, 1-4 червня 2010 р.): Тези доп. – Сколе, 2010. – С. 220-221.
21. Grieco F. Potato virus M in tomato crops in Southern Italy / F. Grieco, D. Gallitelli, A. Franco // J. Plant Pathol. – 1997. – Vol. 79, No 1. – P. 45-49.
22. Loebenstein G. Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes / G. Loebenstein, P. Berger, A. A. Brunt, R. H. Lawson. – Kluwer Academic Press, 2001. – 463 p.
23. Міщенко Л.Т. Властивості томатних ізолятів М- та Y-вірусів картоплі в Україні / Л.Т. Міщенко, А.А. Дуніч, О.І. Данілова, В.П. Поліщук // Мікробіологічний журнал. – 2013. – Т. 75, вип. 2. – С. 89-97.
24. Zavriev S. K. The genome organization of potato virus M RNA / S.K. Zavriev, K.V. Kanyuka, K.E. Levay // J. Gen. Virol. – 1991. – Vol. 72. – P. 9-14.
25. Xu H. M. Genomic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes / H. M. Xu, J. D'Aubin, J. B. Nie // Virol. J. – 2010. – Vol. 7. – P. 25.

Данілова Е.И. Филогенетический анализ украинского изолята М-вируса картофеля, выделенного из томатов / Е.И. Данілова, А.А. Дуніч, І.Г. Будзанівська, Л.Т. Мищенко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 3. – С.54-64.

Изучены серологические, некоторые физико-химические и молекулярно-биологические свойства томатного изолята М-вируса картофеля. Установлено, что украинский изолят М-вируса картофеля происходит от азиато-европейской группы.

Филогенетический анализ нуклеотидных и соответствующих аминокислотных последовательностей гена капсидного белка показал высокий уровень филогенетического родства между репрезентативным украинского изолятом МВК и двумя штаммами евро-азиатской группы - иранским и немецким, которые вошли в один кластер с украинским изолятом и имеют одного общего предка.

Ключевые слова: *Lycopersicon esculentum* Mill., М-вирус картофеля, филогенетический анализ.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF UKRAINIAN TOMATO ISOLATE OF POTATO VIRUS M

Danilova O.I., Dunich A.A., Budzanivska I.G., Mishchenko L.T.

*Taras Shevchenko' Kyiv National University, Kiev, Ukraine
E-mail: elena_danilova2012@mail.ru*

In 2005-2012 monitoring of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is carried out in different regions of Ukraine. New symptoms, which were not described before on tomatoes, are revealed. It was investigated that disease caused with *Potato virus M* (Ukrainian PVM-to). This was the first report about the infection of tomato plants with PVM in Ukraine.

PVM-to was characterized with electron microscopy method, ELISA, bioassay, RT-PCR, sequence analysis of the CP gene. Some biological, serological, molecular, physical and chemical properties of the Ukrainian PVM-to is studying. Differences in symptoms and molecular weight of capsid protein are revealed between Ukrainian PVM-to and Italian PVM-to strain.

Phylogenetic analysis was based on the nucleotide sequence of the CP gene and the amino acid sequence of coat protein. Comparison of nucleotide and amino acid sequences of the coat protein of PVM isolates from different countries showed that Ukrainian PVM-to has 80-82% and 94-95% of homology with isolates from group II (Canadian and USA isolates) and 98% and 100% with isolates from group I (European and Asian isolates) at nucleotide and amino acid level, respectively. Also the nucleotide and amino acid sequence comparison indicated that Ukrainian PVM-to has common origin with Iranian and German isolates and is located near with the Italian tomato strain on the phylogenetic dendrogram and fell into group I.

We assume that direction of Ukrainian PVM-to evolution is similar to Italian tomato PVM strain. Perhaps, the separation of PVM strains occurs not only geographically (Asia-European and Canada-American groups) but also by host plants within each group.

Keywords: *Lycopersicon esculentum* Mill., *Potato virus M (PVM)*, *phylogenetic analysis*.

References

1. Mishchenko L.T., Polischuk V.P., Taran O.P., Gordeichyk O.I. *Potato viral infections and their passing under the conditions of simulated microgravity*, 144 p. (Kyiv: Fitosotsiotsentr, 2011).
2. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E. J. *Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 1327 p. (Elsevier, 2012).
3. Wang H., Huang L.F., Cooper J.I., Analyses on mutation patterns, detection of population bottlenecks, and suggestion of deleterious-compensatory evolution among members of the genus Potyvirus, *Arch. Virol.*, **151**, 1625 (2006).
4. Gilbert G.S. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**, 13 (2002).
5. Rossinck M.J., Mechanisms of plant virus evolution, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **35**, 191 (1997).
6. Roossinck M.J. *Plant Virus Evolution*, 243 p. (Springer-Verlag, 2008).
7. Anisimova M., Nielsen R., Yang Z., Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites, *Genetics*, **164**, 1229 (2003).
8. Morozov S.Y., Solovyev A.G., Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement, *J. Gen. Virol.*, **84**, 1351 (2003).
9. Garsia-Arenal F., Fraile A., Malpica J.M., Variability and genetic structure of plant virus populations, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **39**, 157 (2001).
10. Gibbs A.J., Keese P.L., Gibbs M.J. et al., Plant virus evolution: past, present and future. In: Domingo E., Webster R., Holland J.J. (eds). *Origin and evolution of viruses, 1st edition*, 449 p. (San Diego, Calif.: Academic Press, 1999).
11. Nikolaeva O.V., Novikov V.K., Kagramanov V.N., Detection of potato viruses M and S by ELISA method, *Agricultural Biology*, 2, 96 (1985).
12. Boyko A.L. *Workshop in general virology*, 269 p. (Kyiv: "Kyiv University" Publishing House", 2000).
13. Salyga U.T., Snitynskiy V.V. *Electron microscopy of biological objects*, 152 p. (Lviv, 1999).
14. Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 / U, *Nature*, **227**, 608 (1970).
15. Clark M.F., Adams A.N., Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *J. Gen. Virology*, **34**, 574 (1977).

16. Melnychuk M.D., Antipov I.O., Spiridonov V.G. *Molecular diagnostic and identification of X, Y, M, S, L potato (Solanum tuberosum L.) viruses by polymerase chain reaction (Methodical recommendations)*, 22 p. (Kyiv: NAU Publishing House, 2008).
17. Kucherenko M.E., Babenuk Y.D., Voytsitskiy V.M. *Modern methods of biochemical research: Training Guide*, 424 p. (Kyiv: Fitosotsiotsentr, 2001).
18. Lakin G.F. *Biometrics, 3rd edition, enlarged and revised*, 293 p. (Moscow: High School, 1980).
19. Ssekyewa C. *Incidence, distribution and characteristics of major tomato leaf curl and mosaic virus diseases in Uganda. PhD-thesis*, 233p. (Ghent University, Ghent, Belgium, 2006).
20. Rudneva T.O., Bisov A.C., Shevchenko T.P. Viral diagnostics of seed plant material of the family Solanaceae. In: *Ecological problems of agricultural production: 4th Ukrainian National Scientific Conference of Young Scientists (Skole, 1-4 June 2010): Abstract*, 220p. (Skole, 2010).
21. Grieco F., Gallitelli D., Franco A., Potato virus M in tomato crops in Southern Italy, *J. Plant Pathol.* **79**, 45 (1997).
22. Loebenstein G., Berger P., Brunt A.A., Lawson R.H. *Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes*, 463p. (Kluwer Academic Press, 2001).
23. Mishchenko L.T., Dunich A.A., Danilova O.I., Polischuk V.P., Properties of tomato isolates of potato viruses M and Y in Ukraine, *Microbiological Journal*, **75**, 89 (2013).
24. Zavriev S.K., Kanyuka K.V., Levay K.E., The genome organization of potato virus M RNA, *J. Gen. Virol.*, **72**, 9 (1991).
25. Xu H.M., D'Aubin J., Nie J.B., Genomic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes, *Virol. J.*, **7**, 25 (2010).

Поступила в редакцію 27.08.2013 г.