

Т.О. Руднєва¹, Т.П. Шевченко², В.О. Цвігун^{1,2}, І.Г. Будзанівська²,
В.П. Поліщук²

¹Інститут агроєкології і природокористування НААН,
вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143, Україна,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирівська, 64, Київ, 01033, Україна,
тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tatuana@bigmir.net

ФІЛОГЕНЕТИЧНА СПОРІДНЕНІСТЬ УКРАЇНСЬКИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ МОЗАЇКИ КАВУНА 2

Мета. Встановлення філогенетичної спорідненості українських ізолятів ВМК 2 з відомими штамами та ізолятами ВМК 2 за нуклеотидною послідовністю гену капсидного білка. **Методи.** Філогенетичну спорідненість українських ізолятів ВМК 2 WMV 2–2g–Ukr і WMV 2–2k–Ukr між собою та з відомими штамами і ізолятами ВМК 2 встановлювали шляхом порівняння ділянки нуклеотидного сиквенсу, що відповідає гену капсидного білка вірусу. Аналіз нуклеотидного сиквенсу проводили за допомогою програми MEGA 5. Для вирівнювання нуклеотидних послідовностей використовували метод CLUSTAL W. Побудову філогенетичних дерев проводили за допомогою програми MEGA 5, використовуючи метод Maximum Likelihood на основі моделі Tamura-Nei. Для перевірки достовірності дерев застосовували бутстреп аналіз (1000 реплікацій). **Результати.** Філогенетичний аналіз на основі вирівнювання в CLUSTAL W показав, що українські ізоляти подібні між собою на 99,1%. Відсоток гомології між українськими ізолятами та штамами і ізолятами з Генбанку становив від 90,7 до 99%. Найбільший відсоток гомології за геном капсидного білка українські ізоляти мали, з європейськими ізолятами з Іспанії, Італії та Франції, а також зі штамами і ізолятами з Близького Сходу, що можливо, пояснюється джерелом їх походження. **Висновки.** Отже, коло найвірогідніших країн, звідки можуть походити або, навпаки, куди були завезені українські ізоляти досить широке і включає Іспанію, Італію, Францію, а також Іран, Туреччину, Ізраїль та Саудівську Аравію. Така ситуація може бути пояснена експортно-імпортними відносинами України з країнами Середземномор'я та Близького Сходу і активним обміном сільськогосподарською продукцією.

Ключові слова: вірус мозаїки кавуна 2, ізоляти, сиквенування, філогенетична спорідненість.

Вірус мозаїки кавуна 2, ВМК 2 (Watermelon mosaic virus 2, WMV-2) належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae*. Вірус простий з ротаційно-трансляційним типом симетрії розміром 730–765x11нм [14]. Віріон містить одну молекулу лінійної одноланцюгової +РНК розміром 10035 нт, до 5' – кінця якої ковалентно приєднаний Vpg білок, а до 3' – послідовність polyA. Геном



представників родини *Potyviridae* містить одну відкриту рамку зчитування (ORF). У результаті зчитування утворюється один великий поліпротеїн, який потім нарізається вірусними протеазами на неструктурні і структурні білки. Ділянка геному, що кодує капсидний білок, знаходиться біля 3' – кінця геномної РНК, безпосередньо перед ділянкою, що не транлюється, приблизно в 250 нт і послідовністю polyA [10].

У експериментальних умовах вірус мозаїки кавуна 2 уражує більш ніж 170 видів рослин з 26 різних родин. Однак, основними рослинами –хазяями для ВМК 2 є рослини родини гарбузових (*Cucurbitaceae*). Вірус уражує представників родини гарбузових як відкритого, так і закритого ґрунту, індукуючи різні симптоми залежно від ізоляту вірусу та сорту рослин. На листках рослин вірус мозаїки кавуна 2 викликає симптоми мозаїки, пухирчасті здуття, появу смуг вздовж жилок та різноманітні деформації аж до нитковидності листової пластинки. На вірусінфікованих плодах рослин спостерігається яскраво виражена деколоризація і слабка деформація.

Окрім представників родини гарбузових, у природних умовах вірус уражує горох, моркву та рослини з родини орхідних. ВМК 2 інфікує також багато видів бур'янів які, однак, у природних умовах не проявляють симптомів вірусної інфекції. Вірус передається неперсистентно щонайменше 35 видами попелиць з 19 родів [8]. Також вірус мозаїки кавуна 2 передається з соком рослин при механічному контакті.

На території України ВМК 2 зустрічається лише на рослинах відкритого ґрунту, головним чином на кабачках, гарбузах, цукіні, динях і огірках. Окрім моноінфекції, вірус мозаїки кавуна 2 часто циркулює у вигляді змішаної інфекції, зазвичай представленої сумішшю вірусів огіркової мозаїки (ВОМ), вірусу жовтої мозаїки цукіні (ВЖМЦ) та вірусу пожовтіння огірка, що передається попелицями (ВПО) [4]. За результатами наших попередніх досліджень вірус мозаїки кавуна 2 циркулює у агроценозах України зі змінною періодичністю [3]. При активації розвитку вірусної інфекції кількість хворих рослин та відсоток їх ураження різко збільшується, що в свою чергу призводить до отримання низькоякісної продукції та значних втрат врожаю. Оскільки вірус мозаїки кавуна 2 – патоген широко розповсюджений у світі, важливо проаналізувати спорідненість українських ізолятів з уже відомими ізолятами і штамми вірусу, а також з'ясувати можливі шляхи походження українських ізолятів.

Метою роботи було встановлення філогенетичної спорідненості українських ізолятів ВМК 2, виділених із рослин кабачків, з відомими штамми та ізолятами ВМК 2, шляхом порівняння нуклеотидної послідовності гену капсидного білка віріона. Оскільки ген, що кодує капсидний білок, найбільш часто використовують для вивчення генетичної різноманітності потівірусів [9] то аналізували ступінь дивергенції за нуклеотидною послідовністю саме цього гену.



Матеріали і методи

Зразки відбирали з рослин відкритого ґрунту шляхом візуального обстеження їх на наявність вірусних симптомів. Для досліджень використовували листки середнього або верхнього ярусу та плоди рослин [2]. Таким чином, з 2005 по 2013 роки, нами було обстежено агроценози наступних регіонів: Автономної республіки Крим (АРК), Вінницької, Дніпропетровської, Донецької, Житомирської, Запорізької, Київської, Кіровоградської, Миколаївської, Одеської, Полтавської, Сумської, Харківської, Херсонської, Черкаської та Чернігівської областей.

Зразки на наявність вірусних антигенів аналізували імуноферментним аналізом (ІФА) у модифікаціях «сендвіч» та «непрямий». Аналіз проводили у полістиролових планшетах «Labsystem». Результати реєстрували на рідері Thermo Labsystems Opsis MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм [1,5].

Рослинні зразки (вегетативні органи і плоди рослин) для ІФА готували шляхом гомогенізації інфікованого рослинного матеріалу у 0,1М фосфатно-солевому буфері 0,001М ЕДТА у співвідношенні 1:2 з наступним центрифугуванням у режимі 4000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С на центрифугі РС-6 [6]. Отриманий гомогенат використовували для імуноферментного аналізу.

При постановці ІФА використовували тест-системи до вірусу мозаїки кавуна 2 виробництва INRA (Франція), Agdia (Англія) та Leowe (Німеччина). Аналіз проводили згідно рекомендацій виробника.

Для виділення тотальної РНК використовували рослини кабачків з агроценозів Автономної Республіки Крим і Полтавської області, які в ІФА позитивно реагували з тест – системою до ВМК 2.

Виділення тотальної РНК зі зразків здійснювали за допомогою RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Великобританія). Аналіз проводили згідно рекомендацій виробника [9]. Виділення тотальної РНК контролювали за допомогою електрофорезу нуклеїнових кислот у 1,5% агарозному гелі.

Для проведення зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) було використано специфічні праймери до ділянки РНК, яка кодує капсидний білок французького штаму ВМК 2 WMV-2-Fr [15]:

- forward праймер – 5'GAATCAGTGTCTCTGCAATCAGG-3';
- reverse праймер – 5'ATTCACGTCCCTTGCAAGTGTG-3'

Дані праймери комплементарні ділянкам нуклеотидів 8926–8948 і 9727–9747 геному і ампліфікують фрагмент розміром 825 п.о., який відповідає гену капсидного білка вірусу [15].

Візуалізацію результатів ПЛР здійснювали за допомогою горизонтального електрофорезу у 1,5% агарозному гелі, використовуючи стандартний набір маркерів Gene Ruller 100 bp RNA Ladder plus (Fermentas, США). [6]. Продукти ампліфікації (кДНК) виділяли з гелю і очищали за допомогою Gel Using Mini Elute Columns (Qiagen, Великобританія).



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

Філогенетичну спорідненість українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2 WMV 2–2g–Ukr і WMV 2–2k–Ukr між собою та з відомими штамми і ізолятами ВМК 2 встановлювали шляхом порівняння ділянки нуклеотидного сиквенсу, що відповідає гену капсидного білка вірусу. Послідовності штамів та ізолятів ВМК 2 було взято з Генбанку. Нами було проаналізовано 32 ізоляти з Генбанку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (табл. 1)

Аналіз нуклеотидного сиквенсу проводили за допомогою програми MEGA 5 [13]. Для вирівнювання нуклеотидних послідовностей використовували метод CLUSTAL W. Побудову філогенетичних дерев ізолятів проводили за допомогою програми MEGA 5, використовуючи метод Maximum Likelihood на основі моделі Tamura-Nei [13]. Для перевірки достовірності дерев застосовували бутстреп аналіз (1000 реплікацій) [7].

Результати та їх обговорення

На території України вірус мозаїки кавуна 2 уражує рослини родини *Cucurbitaceae* виключно у агроценозах відкритого ґрунту [12]. Впродовж дев'ятирічного моніторингу агроценозів України на предмет ВМК 2 було показано, що вірус поширений на культурах гарбузів, кабачків, цукіні, динь та огірків переважно у вигляді змішаної інфекції у поєднанні з вірусом жовтої мозаїки цукіні, вірусом огіркової мозаїки чи вірусом пожовтіння огірка, що передається попелицями [3]. Моноінфекція ВМК 2 на рослинах траплялася значно рідше. Зазвичай, на рослинах уражених ВМК 2, симптоми проявлялися у вигляді темно-зеленої прижилкової мозаїки листкової пластинки або ж темно-зеленої мозаїки з пухирчастим здуттям (рис. 1).



а



б

Рис. 1 а, б. Темно-зелена прижилкова мозаїка листкової пластинки на рослинах кабачків, індукована вірусом мозаїки кавуна 2.

Fig. 1 а, б. Dark green mosaics along the veins of marrow leaves induced by *Watermelon mosaic virus 2*.

За результатами імуноферментного аналізу вірус мозаїки кавуна 2 було детектовано у агроценозах Автономної Республіки Крим, Вінницької, Запорізької, Київської, Кіровоградської, Полтавської та Черкаської областей на рослинах кабачків, гарбузів, огірків та динь.

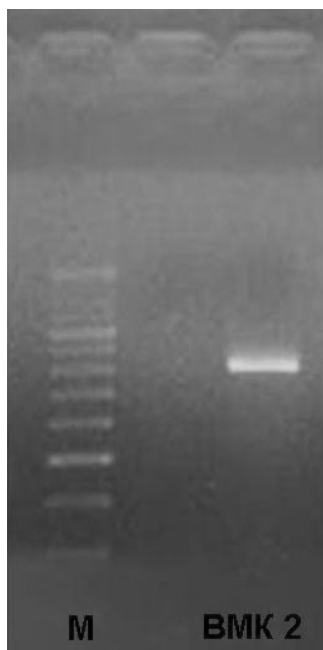


Рис. 2. Електрофореграма отриманих продуктів кДНК українських ізолятів ВМК 2.

М – маркер молекулярних мас Fermentas, 100 п.о.;
ВМК 2 – кДНК капсидного білка вірусу 825 п.о.

Fig. 2. Visualization of electrophoretic separation of amplified cDNAs of Ukrainian WMV-2 isolates.

М – markers Fermentas, 100 bp; ВМК 2 (WMV-2) – cDNA of CP gene of WMV-2 (825 bp)

Для виділення тотальної РНК використовували рослини кабачків з агроценозів АРК і Полтавської області. Після візуалізації тотальної РНК проводили зворотнотранскрипційну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ–ПЛР).

У результаті проведення ЗТ–ПЛР було отримано продукти ампліфікації розміром 825 п.о., що відповідає за розміром ділянці геному, яка кодує капсидний білок вірусу (рис. 2).

Після сиквенування кДНК українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2 проводили порівняння сиквенованих нуклеотидних послідовностей капсидного білка українських ізолятів WMV 2–2g–Ukr і WMV 2–2k–Ukr між собою та з такими ж відомих штамів і ізолятів ВМК 2. Послідовності штамів та ізолятів ВМК 2 було взято з Генбанку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нами було проаналізовано 32 ізоляти з Генбанку (табл. 1).

До першого, найбільш багаточисельного кластеру 1К, увійшло три субкластери. Перший субкластер об'єднує 3 штами і 14 ізолятів ВМК 2. Як видно з філограми, українські ізоляти WMV 2– 2g– Ukr і WMV 2– 2k– Ukr розмістились у першому субкластері. Філогенетичний аналіз на основі вирівнювання в CLUSTAL W показав, що українські ізоляти подібні між собою на 99,1%, що свідчить про низький рівень варіабельності геному українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2.

Найбільший відсоток гомології 98–99,6% українські ізоляти мали з європейськими та близькосхідними ізолятами. Серед згаданих вище – два французьких ізоляти FMFOO – LL2 і CO5–337, італійський ITA00–G, іспанський MAL99.4, турецькі ізоляти TURK91 і W2 та іранські ізоляти Gonbad 68 і KER.KE.1. Сюди ж увійшов і французький штам WMV–Fr.

Необхідно відмітити, що український ізолят з АРК, – WMV 2–2k–Ukr виявився більш близькоспорідненим з європейськими ізолятами ніж з українським ізолятом з Полтавської обл. WMV 2–2g–Ukr. Відсоток гомології кримського

ізоляту відносно європейських складав від 99,3 до 99,6% і був найбільшим з французьким ізолятом FMFOO – LL2, – 99,6%.

Таблиця 1

Штами і ізоляти ВМК 2 з Генбанку, які використовували у філогенетичному аналізі

Table 1

Strains and isolates of WMV-2 used for phylogenetic analysis

Назва штаму/ ізоляту	Регістраційний номер послідовності	Джерело виділення	Країна
штам WMV-Fr	AY437609		Франція
штам Israel	AF322376	<i>Cucumis melo</i>	Ізраїль
штам Dendrobium	HQ384216	<i>Dendrobium anosmum</i> (orchid)	США
штам РК	AB218280	<i>Cucumis melo</i>	Пакистан
штам WMV-CHN	DQ399708	<i>Citrullus lanatus</i>	Китай
штам Tonga	L22907	<i>Cucumis melo</i>	Тонга
штам Watermelon	AB369278	<i>Cucumis melo</i>	Південна Корея
штам Habenaria	AB001994	<i>Habenaria radiata</i>	Японія
ізолят HLJ	AY464948	Snake gourd	Китай
ізолят Liaocheng	EF122550	pumpkin	Китай
ізолят Shiraz	CQ421161	Summer squash	Іран
ізолят KER.KE.1	EU667644	<i>Cucumis melo</i>	Іран
ізолят Kh.S.Nah	JN166711	<i>Cucumis melo</i>	Іран
ізолят Gonbad 68	GQ421157	<i>Cucurbita pepo</i>	Іран
ізолят ESF.GA.2	EU667634	<i>Cucurbita maxima</i>	Іран
ізолят IRO2-54	EU660584		Іран
ізолят MAL99.4	AJ579523	<i>Cucumis melo</i>	Іспанія
ізолят SG99.2	AJ579518	<i>Cucumis melo</i>	Іспанія
ізолят WMV-SA	KC447295	<i>Citrullus lanatus</i>	Саудівська Аравія
ізолят USA	D13913		США
ізолят RS-22	JX028595	<i>Cucurbita pepo</i> , var.texana	США
ізолят HQ11-16	JX028594	<i>Cucurbita pepo</i> , var.ozarkana	США
ізолят FMFOO-LL2	EU660578		Франція
ізолят CO5-337	EU660589		Франція
ізолят CO7-284	JF273468	zucchini	Франція
ізолят WMV-CN	FJ628395	<i>Cucurbita pepo</i>	Польща
ізолят TURK91	EU660579		Туреччина
ізолят W2	KF021298	<i>Cucumis sativus</i>	Туреччина
ізолят VE10-099	KC292915	<i>Cucumis anguria</i>	Венесуела
ізолят Lecce	FJ823122	<i>Citrullus lanatus</i>	Італія
ізолят ITA00-G	EU660590		Італія
ізолят CHI87-620	EO660580		Чилі



Побудова комплексного (консенсусного) філогенетичного дерева дозволила згрупувати досліджувані штами і ізоляти ВМК 2 у два окремі кластери (рис. 3).

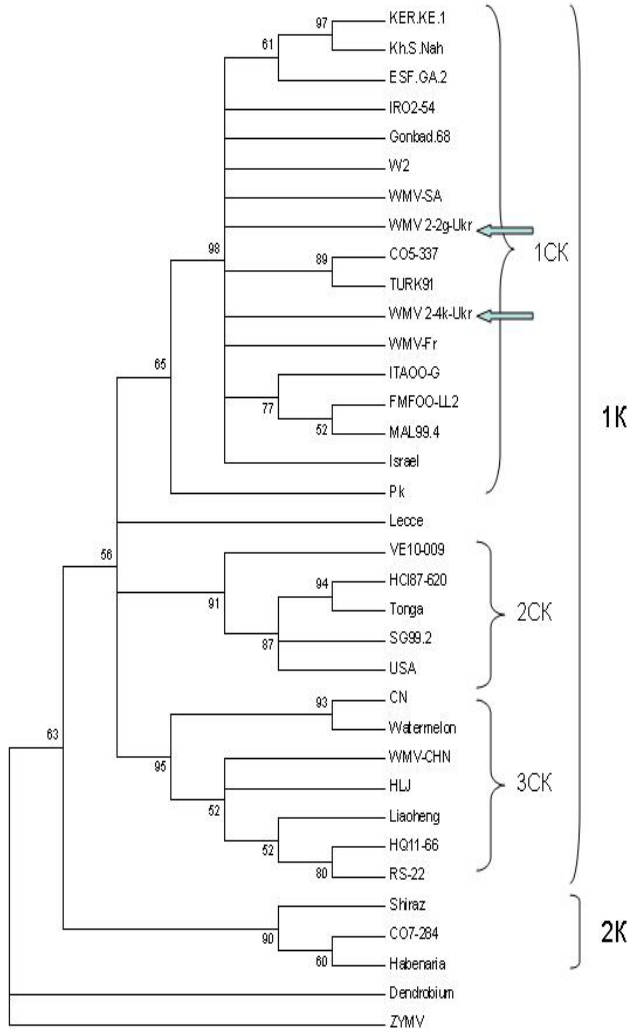


Рис. 3. Комплексне (консенсусне) філогенетичне дерево побудоване за результатами аналізу нуклеотидних послідовностей гену капсидного білка штамів та ізолятів ВМК 2 методом Maximum Likelihood на основі моделі Tamura-Nei, 1000 бутстреп реплікацій.

Числа показують відсоток бутстрепа. Величини бутстрепа більші ніж 50% показано у вузлах дерева, менші 50% – конденсовано. СК– субкластер, К – кластер. В якості кореня філограми використано ізолят Nt-2 (JF7924410) вірусу жовтої мозаїки цукіні (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV).

Fig. 3. Complex (consensus) phylogenetic tree based on the analysis of nucleotide sequences of CP gene of WMV-2 strains and isolates using Maximum Likelihood (ML) method based on Tamura-Nei model (1000 bootstrap replications).

The numbers indicate the percentage of bootstrap. Bootstrap values exceeding 50% are shown on the tree nodes, smaller bootstrap values are condensed. CK – subcluster, K – cluster. The tree root is represented by Nt-2 isolate (JF7924410) of ZYMV.

Дещо менший відсоток гомології з українськими ізолятами, а саме 97%, мали ізоляти з Ірану (**Kh.S.Nah, IRO2-54**), **Саудівської Аравії (WMV-SA)**, а також ізраїльський штам Israel. Найменший відсоток гомології у даному кластері відносно українських ізолятів був з пакистанським штамом PK – 96%.

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

Стосовно третього субкластеру, то в ньому розмістилися штами і ізоляти з США (RS – 22, HQ11–16), Китаю (Liaocheng, HLJ, WMV–CHN), Південної Кореї (Watermelon) та Польщі (CN). Відсоток гомології з українськими ізолятами був у межах 93–94%.

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

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

Найнижчий відсоток гомології 90,7% з українськими ізолятами був у штаму *Dendrobium* з США, ізолюваного з рослини *Dendrobium anosmum* родини орхідних. Як видно з філограми, даний штам утворює окрему філогенетичну гілку.

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

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



Т.А. Руднева¹, Т.П. Шевченко², В.А. Цвигун^{1,2}, И.Г. Будзанивська²,
В.П. Полищук²

¹Институт агроэкологии и природопользования НААН,
ул. Метрологическая, 12, Киев, 03143, Украина,

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64/13, Киев, 01601, Украина,
тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tatuana@bigmir.net

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО УКРАИНСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА МОЗАИКИ АРБУЗА 2

Реферат

Цель. Определение филогенетического родства украинских изолятов ВМА 2 с известными штаммами и изолятами ВМА 2 по нуклеотидной последовательности гена капсидного белка. **Методы.** Филогенетическое родство украинских изолятов ВМА 2 WMV 2–2g–Ukr и WMV 2–2k–Ukr между собой и с уже известными штаммами и изолятами ВМА 2 определяли путем сравнения участка нуклеотидного сиквенса, соответствующего гену капсидного белка вируса. Анализ нуклеотидного сиквенса осуществляли с помощью программы MEGA 5. Нуклеотидные последовательности выравнивали методом CLUSTAL W. Для построения филогенетических деревьев использовали программу MEGA 5, метод Maximum Likelihood модель Tamura-Nei. Достоверность полученных деревьев проверяли бутстрэп анализом (1000 репликаций). **Результаты.** С помощью филогенетического анализа, на основании выравнивания в CLUSTAL W, было показано идентичность украинских изолятов между собой на 99,1%. Процент гомологии украинских изолятов, а также штаммов и изолятов с Генбанка составлял от 90,7 до 99%. Самый высокий процент гомологии по гену капсидного белка украинских изолятов с европейскими: Испании, Италии и Франции, а также штаммами и изолятами с Ближнего Востока, что, вероятно, объясняется путем их происхождения. **Выводы.** Итак, диапазон наиболее возможных стран откуда могут происходить или, наоборот, куда были завезены украинские изоляты является достаточно широким и объединяет Испанию, Италию, Францию, а также Иран, Турцию, Израиль и Саудовскую Аравию. Такая ситуация обусловлена активными сельскохозяйственными экспортно-импортными отношениями Украины со странами Средиземноморья и Ближнего Востока.

Ключевые слова: вирус мозаики арбуза 2, изоляты, сиквенирование, филогенетическое родство.



**T.O. Rudnieva¹, T.P. Shevchenko², V.O. Tsigun^{1,2}, I.G. Budzanivska²,
V.P. Polischuk²**

¹Institute of Agroecology and Nature Management of NAAS of Ukraine,
12, Metrologichna st., Kyiv 03143

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrivska st., Kyiv, 01601
tel.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tatuanaru@bigmir.net

**PHYLOGENETIC HOMOLGY OF UKRAINIAN ISOLATES
OF WATERMELON MOSAIC VIRUS 2**

Summary

Aim. This work is focused on establishing phylogenetic homology of Ukrainian isolates of WMV-2 with known viral strains and isolates by comparing nucleotide sequence of the CP gene. **Methods.** Phylogenetic relationships of Ukrainian isolates of Watermelon mosaic virus 2, WMV 2-2g-Ukr and WMV 2-2k-Ukr (both among themselves and with other known virus strains and isolates) were estimated by comparing sequenced CP gene region. The analysis of the nucleotide sequences of sequenced amplicons (cDNA of CP gene of WMV-2) was done using MEGA 5 software. To align the nucleotide sequences, CLUSTAL W approach was used. Phylogenetic trees reflecting evolutionary relationships of studied isolates with published ones were constructed using MEGA 5 software and **Maximum Likelihood (ML) method based on Tamura-Nei model**. **Bootstrap analysis** (1000 replications) was employed for validation of the trees. **Results.** Phylogenetic analysis based on alignment using CLUSTAL W approach showed that the level of homology between these Ukrainian isolates reached 99,1%, indicating low degree of genome variability of the virus. The percentage of homology between Ukrainian WMV-2 isolates and strains/isolates available in the Genbank was 90,7-99%. Ukrainian WMV-2 isolates showed the highest degree of homology mostly with European isolates of this virus found in Spain, Italy and France, as well as with those strains/isolates reported from the Middle East (that may be explained by their origin). **Conclusions.** Basing on the obtained results we can say that the list of candidate countries from where the Ukrainian WMV-2 isolates may have originated (or where they could be brought in) is rather long and includes Spain, Italy, France as well as Iran, Turkey, Israel and Saudi Arabia. This situation may be explained by export-import trade between Ukraine and Mediterranean/Middle East countries involving the active exchange of agricultural production.

Key words: Watermelon mosaic virus 2, isolates, **sequencing, phylogenetic relationships.**

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гнущова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений / Раиса Васильевна Гнущова. – М.: Наука, 1993. – 301 с.
2. Омелюта В.П. Облік шкідників і хвороб сільськогосподарських культур / В.П. Омелюта, І.В. Григорович, В.С. Чабан. – К.: Урожай, 1986. – 296 с.
3. Руднєва Т.О. Моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської та Полтавської областей / Т.О. Руднєва, Т.П. Шевченко, В.О. Цвігун, В.П. Поліщук // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 55–62.



4. Руднева Т.О. Поширення вірусних захворювань рослин родини *Cucurbitaceae* на території України / Т.О. Руднева, Т.П. Шевченко, А.С. Бисов, В.П. Поліщук // *Агроекологічний журнал*. – 2008. – № 2. – С. 62–66.
5. *Crowther J.R.* (Ed.) *ELISA. Theory and practice*, Humana Press, N.Y. – 1995. – p. 223.
6. *Dijkstra J.* *Practical Plant Virology: Protocols And Exercises* / J. Dijkstra, Cees P. de Jager. – Berlin; – Springer. Verlag and Heidelberg GmbH & Co, 1998. – 459 p.
7. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // *Evolution*. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
8. *Lecoq Herve* **Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin** / Herve Lecoq and Cecile Desbiez . – Academic Press, – 2012. – 592 p.
9. *Molecular* criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae / M.J. Adams, J.F. Antoniw, C.M. Fauquet // *Archives of Virology*. – 2005. – N 150, –P. 459–479.
10. *Nucleotide* sequence, serology and symptomatology suggest that vanilla necrosis potyvirus is a strain of watermelon mosaic virus 2 / Y.Y. Wang, D.L. Beck, R.C Gardner [et al.] // *Archives of Virology*. – 1993. – N 129. – P. 93–103.
11. *QIAGEN*. One step RT-PCR Kit Handbook. – Quiagen, 2002. –39p.
12. *Rudneva T.O.* Virus diseases of Cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine / T.O. Rudneva., T.P. Shevchenko, I.G. Budzanivska, O.V. Shevchenko, V.P. Polischuk // *Plant science*. – 2006. – № 6 ,– P. 508–510.
13. *Tamura K.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution* – 1993 – Vol. 10 – P. 512–526.
14. *Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* [A. King, M. Adams, E. Lefkowitz et al.]. – London: Academic Press, 2012. – 1327 p.
15. *Zohren Moradi* Diagnosis and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from North, East, North-East, and North-West regions of Iran // *Asian Journal of Plant Pathology*. – 2011. – V. 5, – N 3, –P. 115–125.

Стаття надійшла до редакції 20.10.2014 р.

