

УДК 578.81+578.85/.86

Спектр вірусів, виділених із рослин *Pulsatilla pratensis* (Ranunculaceae) природної флори України

О.А. Шидловська¹, О.М. Андрійчук², Т.А. Компанець²

¹Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Робота присвячена скринінгу вірусів на рослинах природної флори України. Досліджено червонокнижну рослину *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill. Із рослин *P. pratensis*, відібраних на території Канівського природного заповідника, виділено інфекційні вірусоподібні частинки діаметром 34, 36, 43, 47, 50 та 57 нм, які мали різне коло рослин-індикаторів. Віріони розміром 34–43 нм викликали некротичну та хлоротичну плямистість на *Chenopodium amaranticolor* Coste and Reun., а 47–57 нм – некрози, хлорози та деформацію листкових пластинок на *Cucumis sativus* L. За допомогою рослин-індикаторів визначали інфекційну природу збудника, коло хазяїв, відокремили вірус із суміші змішаних вірусних інфекцій, визначали концентрацію вірусів у рослинах, а також встановлювали видову приналежність патогену. На рослинах-індикаторах спостерігали симптоми, характерні для вірусної інфекції: побуріння листкової пластинки, крапчастість, хлорози та некрози. Всі симптоми були системними та, ймовірно, викликаними різними вірусами. Нажаль, виділені віруси в рослинах-індикаторах накопичувалися у незначних концентраціях і швидко втрачали інфекційність, через що ми не мали змоги остаточно їх ідентифікувати та детально охарактеризувати. Припускаємо, що ці частки можуть належати бактеріофагам, а симптоми на рослинах *Ch. amaranticolor* викликав інший вірус. Для перевірки цього припущення у подальших дослідженнях зосередилися на одночасному виділенні вірусів рослин і бактеріофагів. Із кореневищ *P. pratensis* і навколореневого ґрунту виділено чотири ізоляти бактеріофагів із довгими хвостовими відростками, різних за розмірами. Охарактеризовано біологічну (літичну) активність стосовно індикаторних бактерій, морфологію негативних колоній та білковий склад бактеріофагів. За результатами дослідження, фаги розділили на три підгрупи, що імовірно відповідають трьом різним видам вірусів. Результати аналізу поліпептидного складу можуть відображати певний еволюційний процес у популяції фагів, що мали спільного предка. Порівняння білків фагів різних хазяїв показує різноманіття молекулярних мас їх поліпептидів, до складу яких входить декілька десятків білків. Отримані результати закладають основу для вивчення розповсюдження окремих вірусів у природі, визначення їх взаємозв'язків у біоценозах.

Ключові слова: віруси рослин; бактеріофаги; електронна мікроскопія

The spectrum of viruses isolated from *Pulsatilla pratensis* (Ranunculaceae) a native plant of Ukraine

O.A. Shydlovska¹, E.N. Andriychuk², T.A. Kompanets²

¹Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

The article is devoted to virus screening of wild plants of Ukraine's flora. The object of the research is the Red Book plant *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill., which grows on the territory of Kanev Nature Reserve. Isolated isometric infectious virus-like particles with diameters of 34, 36, 43, 47, 50 and 57 nm were isolated from selected plants of *P. pratensis*. In our research, determination of the infectious nature of the pathogen, host range, concentration of viruses in plants, species identity and virus isolation from the mixture in mixed viral infections were carried with using indicator plants. The typical viral symptoms were observed on indicator plants: browning of the leaf plate, mottling,

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна
Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Acad. Zabolotny Str., 154, Kyiv, 03680, Ukraine

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska Str., 64/13, Kyiv, 01601, Ukraine
Tel.: +38-067-504-55-49. E-mail: tarkompanets@gmail.com; aom502@ukr.net

chlorosis and necrosis. All symptoms were systemic and could be caused by a variety of virus species. Virions with sizes from 34 to 43 nm produced the necrotic and chlorotic spotting on *Chenopodium amaranticolor* Coste and Reyn. On the other hand, virions with sizes from 47 to 57 nm produced the necrosis, chlorosis and deformation of the leaf plates on *Cucumis sativus* L. That is not typical for viruses previously discovered on *P. pratensis*. The viruses isolated in these plants were cumulated in small concentrations and rapidly lost their infectivity. The number of isolated viruses was insufficient for their identification. Four bacteriophage isolates with long phage tails of different size were isolated from *P. pratensis* roots and radical soil. The biological (lytic) activity towards the tracer bacteria, the morphology of negative colonies, and bacteriophage protein structure were characterized. According to our research, it is possible to divide phages into three subgroups that probably correspond to three different types of viruses. Results of the polypeptide analysis may reflect an evolutionary process in a population of phages that had a common ancestor. Comparison of phage proteins of different hosts shows a variety of molecular weights of polypeptides comprising up to several dozens of proteins. The results of the current work lay the basis for studying the spread of viruses in nature and determination of their relationships in biocenoses.

Keywords: plant viruses; bacteriophages; electron microscopy

Вступ

Одним із підходів до виявлення вірусів рослин природної флори може бути тотальне виділення всіх вірусоподібних частинок із наступною їх перевіркою на фітопатогенність. Адаже за скринінгового виділення вірусів рослин також можна виявити бактеріофаги, які населяють ризосферу рослин. Особливість подібного дослідження – те, що не завжди виділені віруси викликають симптоми захворювання на даних рослинах, так само, як і бактерії не завжди стають причиною розвитку фітопатології. Тому необхідне вивчення взаємозв'язку між рослинами, вірусами рослин та вірусами бактерій.

Останнім часом усе більше уваги приділяється вивченню видів рослин, занесених до Червоної книги України. Більшість із цих видів, на жаль, не можуть підтримувати чисельність своїх популяцій на постійному рівні у природній флорі. Їх чисельність і ареал постійно зменшуються. Цьому сприяє безліч факторів, зокрема, людський вплив (оскільки значна частина видів рослин має декоративне, економічне, лікарське чи ґрунтозахисне значення), зміни клімату, різноманітні забруднення атмосфери, гідросфери та літосфери, вплив інфекційних агентів (вірусів, бактерій та грибів).

До Червоної книги України занесено *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill. (сон лучний) (Diduh, 2009). *P. pratensis* – лікарська, декоративна та отруйна рослина (Mártonfiová, 2004). Здавна рослини роду *Pulsatilla* використовували у східній медицині для лікування ентеритів, а також як протипухлинні та спазмолітичні засоби (Szentpéteri et al., 2007; Danova et al., 2009). Сон лучний володіє антивірусною активністю проти деяких патогенних вірусів людини, зокрема, вірусу грипу типу А, респіраторно-синцитіального вірусу, вірусу герпесу першого типу, людського риновірусу та інших (Glatthaar-Saalmuller and Fallier-Becker, 2001).

Одним із підходів до виявлення вірусів рослин природної флори може бути тотальне виділення всіх вірусоподібних частинок із наступною їх ідентифікацією. Muthukumar et al. (2009) дослідили тотальну РНК із вірусоподібних частинок, виділених із гомогенізату рослин природної флори. У ході аналізу вони встановили послідовності, що належать не лише вірусам рослин, а і вірусам бактерій, безхребетних тварин, і навіть вірусам людини та хребетних тварин. Крім того, виділено послідовності, що належать бактеріям і грибам. Загалом, за результатами такого тотального сиквенсу встановлено, що вірусні послідовності складають лише 9% загальної їх кількості, тоді як бактеріальні – 29%, і тільки на

другому місці рослинні послідовності – 20%. Відсоток послідовностей тваринного походження та ретроелементів – по 5% кожний, найменше виявлено послідовностей грибового походження (2%). Для 29% досліджених послідовностей достовірно встановити належність до будь-якої з перерахованих категорій не вдалося. Також існує 1% послідовностей, що мають еукаріотичне походження, але відмінні від рослинних, тваринних або грибних. Цікавий факт, що далеко не в усіх рослин, із гомогенату яких виділено послідовності вірусів рослин, виявлено симптоми захворювань, подібних до вірусних (Muthukumar et al., 2009).

Значення вірусних частинок полягає не лише у величезній їх кількості, а й у досить значному їх видовому різноманітті (Sandra Chibani-Chennoufi et al., 2004). Поряд із великим різноманіттям фітовірусів у природі, фаги – найчисельніші біологічні об'єкти на Землі, чисельність яких сягає 10^{31} частинок (Wommack and Colwell, 2000). Так їх присутність у навколишньому середовищі обумовлює необхідність зміни ставлення до вивчення процесів в екосистемах (Weinbauer and Ras-soulzadegan, 2004). Дослідження властивостей фагів різних хазяїв, присутніх одночасно у природі, дозволяє порівнювати їх між собою, всередині певних груп і між ними. Дослідження фагів різних родів бактерій та фітовірусів, які одночасно циркулюють у рослинних біоценозах, практично не проводилося. Виявлення властивостей фагів дикого типу та вірусів рослин – необхідний етап вивчення процесів з їх участю у зовнішньому середовищі (Jones et al., 2007).

Мета цієї статті – виявити вірусоподібні частинки з рослин *P. pratensis* природної флори України для їх наступної ідентифікації та характеристики.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкти досліджень – рослини *P. pratensis*, відібрані на території Канівського природного заповідника. Рослини відбирали за наявністю симптомів, подібних до вірусних, двічі в одних і тих самих точках з інтервалом один рік. Відібрано чотири зразки у 2014 році, пронумеровані 14-1, 14-2, 14-3, 14-4, та п'ять зразків у 2015 році, пронумеровані 15-1, 15-2, 15-3, 15-4 та 15-5.

Для біотестування використовували рослини-індикатори: *Chenopodium amaranticolor* Coste and Reyn. (лобода різнокольорова), *Datura stramonium* L. (дурман звичайний), *Cucumis melo* L. (дыня звичайна), *C. sativus* L. (огірок посівний) та *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (капуста пекінська).

У дослідженні використали культури фітопатогенних бактерій, отримані з колекції музею Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (відділ фітопатогенних бактерій).

Концентрацію та очищення вірусних препаратів проводили за стандартними методиками методом диференціального центрифугування. Морфологію віріонів вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії за допомогою електронного мікроскопа JEOL-1400 (Японія) за інструментального збільшення 40 000 та 60 000. Препарати контрастували 2% водним розчином ураніл-ацетату (Budzanivska, 2009).

Для вирощування бактерій та титрування фагів використовували готові комерційні агаризовані живильні середовища на основі рибного гідролізату (виробник – Оболенськ, ГРМ-агар, ГРМ-бульйон). Концентрування та очищення фагів проводили методами високошвидкісного центрифугування у градієнті густини CsCl.

Для виділення бактеріофагів використано зразки рослин *P. pratensis* із симптомами бактеріального ураження (плямистість, некрози, гnilі, зів'янення та пожовтіння листя) та прикореневий ґрунт. Фаги виділяли шляхом прямого висіву. Титри визначали у бляшкотвірних одиницях на мл (БУО/мл) методом двошарового агару за Грація (Adams, 1961).

Чисті лінії бактеріофагів отримували шляхом шестиразового пасивування з наступним виколуванням окремих негативних колоній. Отримані ізоляти фагів використовували надалі для накопичення їх у препаративних концентраціях і об'ємах.

Електрофоретичне дослідження поліпептидного складу білків фагів проводили методом Леммлі з використанням 14% роздільного та 5% концентрувального поліакриламідного гелю з подальшим забарвленням кумасі блакитним (Laemmli, 1970). Облік результатів електрофорезу проводили за допомогою програми TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics) (Peakall and Smouse, 2006).

Розраховували середні значення (m) та стандартне відхилення (SD) кожної характеристики.

Результати та їх обговорення

Інфекційність патогенів підтверджували методом біотестування. Оскільки характер реакції рослини залежить від її генетичної природи та типу інфекції, яка вноситься, у нашому дослідженні як рослини-індикатори використано види, які реагують на описані раніше з *P. pratensis* віруси. Перш, ніж інокулювати рослини-індикатори соком відібраних зразків, провели первинний скринінг останніх методом електронної мікроскопії. У подальшому використовували лише ті зразки, в яких виявили вірусоподібні частинки. У ході дослідження симптоми з'явилися лише на *Ch. amaranticolor*, інокульованих соком зі зразків 2014 року та *C. sativus*, інокульованих соком зі зразків 2015 року. На рослинах, уражених соком зі зразків 14-1 та 14-2, спостерігали подібні симптоми побуріння листової пластинки, хлорози та некрози, що відрізнялися лише ступенем прояву. Рослини, уражені соком зі зразка 14-3, реагували крапчастістю, хлорозами та некрозами, а зі зразка 14-4 – лише слабкою крапчастістю. Патогени, виділені у

2015 році, не викликали жодних симптомів на *Ch. amaranticolor*, незважаючи на те, що точки відбору та ознаки ураження *P. pratensis* збігалися. На інокуляцію соком відібраних у 2015 році зразків, рослини *C. sativus* реагували переважно некротичною реакцією. Зокрема, інфекційні агенти зі зразка 15-1 викликали утворення дрібних некрозів, зі зразка 15-2 – хлоротичну та некротичну реакцію, 15-3 – слабе пожовтіння та некрози, 15-4 – пожовтіння по краю та деформації листової пластинки, 15-5 – мозаїку, некрози та всихання листової пластинки. Всі симптоми на рослинах-індикаторах були системними та не могли бути викликані вірусами *Cherry leaf roll virus*, *Arabidopsis mosaic virus*, *Strawberry latent ringspot virus* або *Scrophularia mottle virus* (King et al., 2011). Проте розміри виділених патогенів значно перевищували розміри перелічених вірусів (рис. 1, 2).

Усі виділені частинки були ізометричними, проте відрізнялися розмірами. У зразках 14-1–14-3 діаметр частинок становив 57 ± 1 , 47 ± 1 та 50 ± 2 нм. Потрібно зазначити, що віріони зі зразка 14-1, імовірно, мали складну будову. У зразку 14-4 виявлено вірусоподібну частинку ікосаедричної симетрії, розміром 107 ± 3 нм, що не характерно для фітовірусів.

Розміри частинок, виділених у 2015 році такі: у зразку 15-1 – 36 ± 1 нм, у 15-2 – 55 ± 2 , у 15-3 – 43 ± 2 та 34 ± 1 , у 15-4 – 43 ± 2 , у 15-5 – 34 ± 1 нм. Незважаючи на подібність розмірів частинок у зразках 15-3, 15-4 та 15-5, імовірно, дані віруси не ідентичні. Адже їх симптоми на *C. sativus* відрізнялися. На жаль, виділені віруси в рослинах-індикаторах накопичувалися у незначних концентраціях і швидко втрачали інфекційність, через що ми не мали змоги остаточно їх ідентифікувати та детально охарактеризувати.

Таким чином, у зразках *P. pratensis* природної флори України виявлено ізометричні вірусоподібні частинки різного діаметра (34–57 нм). У відібраних у 2014 році зразках виявлено не характерні для вірусів рослин частинки, ікосаедричної симетрії діаметром 107 нм (рис. 1). Ми припускаємо, що ці частинки можуть належати бактеріофагові, а симптоми на рослинах *Ch. amaranticolor* викликав інший вірус, концентрація якого була незначною, нижче порога чутливості електронної мікроскопії. Для перевірки цього припущення у подальших дослідженнях зосередилися на одночасному виділенні вірусів рослин і бактеріофагів.

Бактеріофаги поширені в усіх екосистемах, де є бактерії (Vos et al., 2009). Еволюційний підхід дозволяє розглядати їх за впливу природного середовища, де важливі як титр фагів в екосистемі, так і щільність бактеріальної популяції та фізіологічний стан мікроорганізмів. Дослідження взаємодії у системі популяцій бактеріофагів і бактерій в умовах природного середовища дає можливість дослідити динаміку процесу взаємодії та розвитку популяцій, а також їх зв'язок із факторами навколишнього середовища (Clokic et al., 2011).

Для виділення бактеріофагів використовували рослини, змиви з навколореневого ґрунту та кореневищ *P. pratensis*. Спектр літичної активності та титри виділених фагів визначали методом накапування на агар (отримання зон лізису). Всього виявлено п'ять ізолятів фагів (табл.).

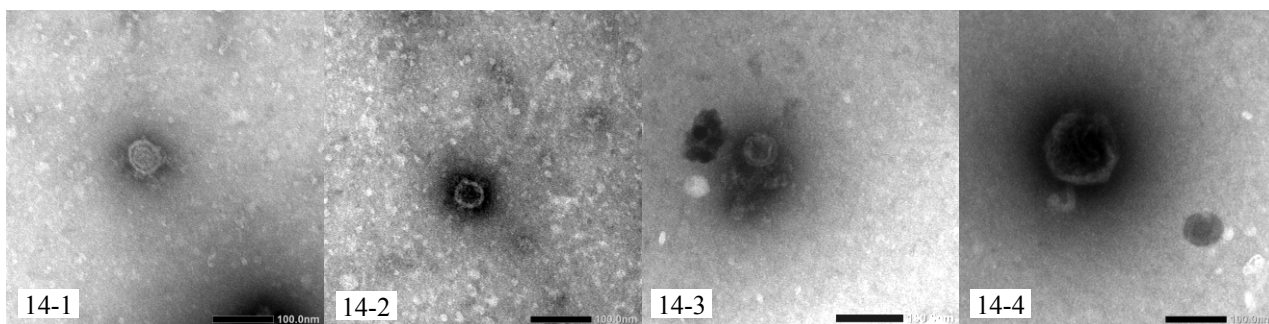


Рис. 1. Електронограма вірусоподібних частинок зі зразків 14-1 – 14-4

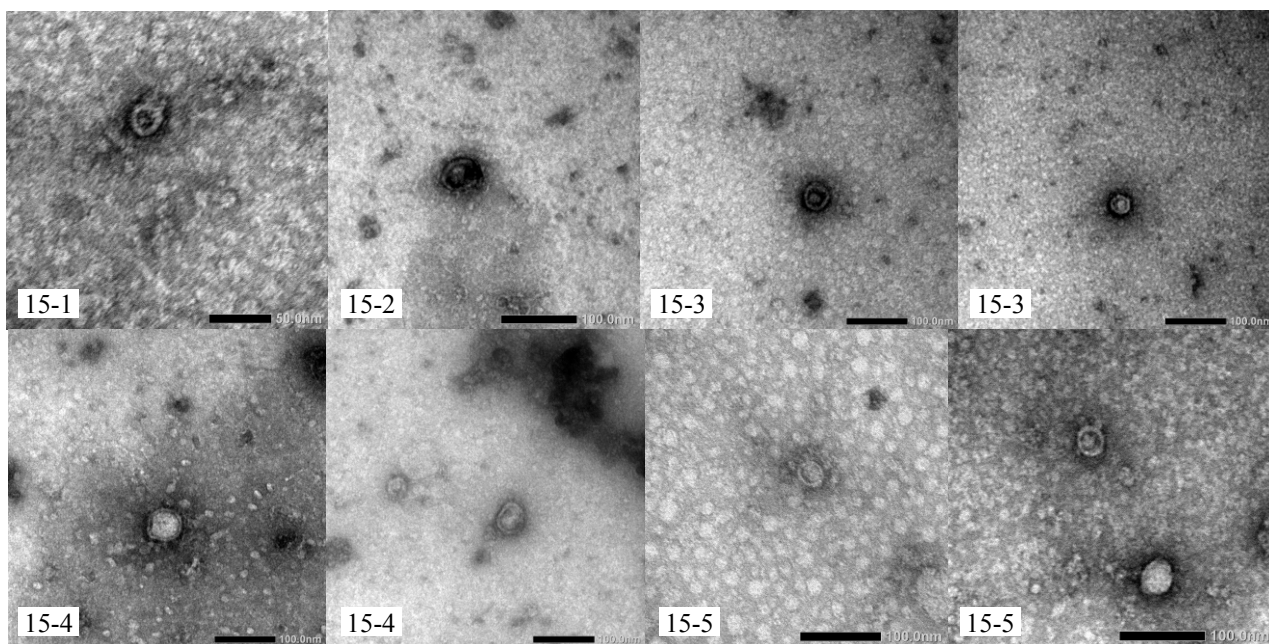


Рис. 2. Електронограма вірусоподібних частинок зі зразків 15-1 – 15-5

У результаті експерименту визначено чутливі бактерії для всіх зразків (*S. marcescens*), а також для зразків 1 та 5 (*P. fluorescens*). Фаги зі зразків на культурах бактерій накопичуються до таких титрів: зразок 1 на культурі *S. marcescens* – 10^6 БУО, на культурі *P. fluorescens* – 10^6 БУО; зразок 2 на культурі *S. marcescens* – 10^7 БУО; зразок 3 на культурі *S. marcescens* – 10^7 БУО; зразок 4 на культурі *S. marcescens* – 10^9 БУО; зразок 5 на культурі *S. marcescens* – 10^{11} БУО, на культурі *P. fluorescens* – 10^{11} БУО. Встановлено морфологію негативних колоній. На культурі *S. marcescens* усі фаги формували дуже дрібні пляшки з чіткими краями, на *P. fluorescens* бактеріофаги зі зразків 1 і 5 – дрібні пляшки з нечіткими краями.

Далі досліджували морфологію віріонів вірусів бактерій за допомогою методу електронної мікроскопії (King et al., 2011). Серед ізолятів переважали фаги з ікосаедричною голівкою та довгим хвостовим відростком. Діаметр голівки та довжина хвостового відростка варіювали (рис. 3). Найбільшими були віріони з голівкою діаметром 97 ± 2 нм і хвостовим відростком довжиною 157 ± 3 нм (зразок 2). Близькими за розмірами виявилися віріони фагів зі зразків 3 та 4, діаметр голівки та довжина хвостового відростка яких становили 84 ± 3 і 87 ± 2 нм та 83 ± 1 і 91 ± 1 нм, відповідно. У зразку 5 виявлено віріони двох типів: (1) із діаметром голівки 94 ± 2 і довжиною хвостового відростка 206 ± 4 нм та (2) із довжиною хвостового відростка 117 ± 1 і діаметром голівки 63 ± 4 нм.

Таблиця

Літична активність фагів до індикаторних бактерій

Індикаторні бактерії	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	Зразок 4	Зразок 5
<i>Pseudomonas syringae</i>	–	–	–	–	–
<i>pv. tabaci</i>	–	–	–	–	–
<i>P. syringae</i> <i>pv. aptata</i>	–	–	–	–	–
<i>P. syringae</i> <i>pv. lachrymans</i>	–	–	–	–	–
<i>P. syringae</i> <i>pv. atrofaciens</i>	–	–	–	–	–
<i>P. syringae</i> <i>pv. syringae</i>	–	–	–	–	–
<i>P. savastanoi</i> <i>pv. phaseolicola</i>	–	–	–	–	–
<i>P. viridiflava</i>	–	–	–	–	–
<i>P. clororophis</i>	–	–	–	–	–
<i>P. alliiicola</i>	–	–	–	–	–
<i>P. fluorescens</i>	+	–	–	–	+
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	–	–	–	–	–
<i>pv. beticola</i>	–	–	–	–	–
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	–	–	–	–	–
<i>Erwinia carotovora</i>	–	–	–	–	–
<i>E. carotovora</i> <i>subsp. atroseptica</i>	–	–	–	–	–
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	–	–	–	–	–
<i>subsp. carotovorum</i>	–	–	–	–	–
<i>Clavibacter michiganensis</i>	–	–	–	–	–
<i>subsp. sepedonicus</i>	–	–	–	–	–
<i>Serratia marcescens</i> L-2	+	+	+	+	+

Примітки: «–» – відсутність, «+» – наявність зон лізису.

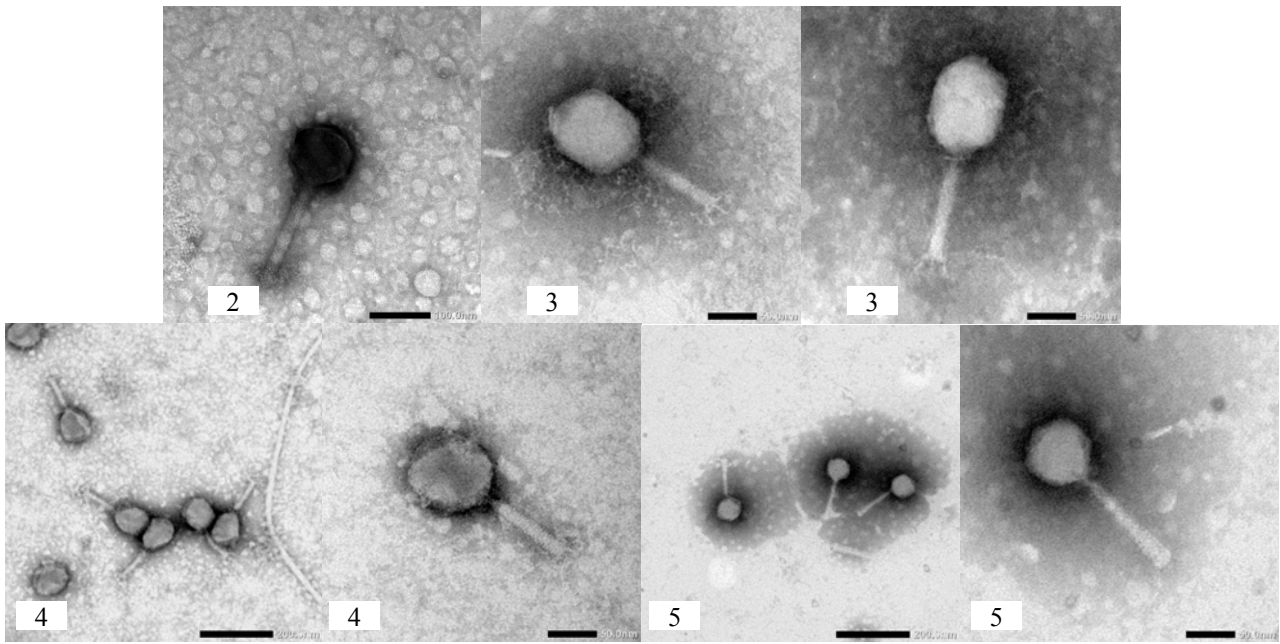


Рис. 3. Електронограма бактеріофагів зі зразків 2–5

Під час дослідження зразків за допомогою ЕМ виділено чотири морфотипи бактеріофагів, які різнилися за розмірами. У подальшому використано лише чотири зразки (1, 3, 4 та 5). Для порівняння білкового складу отриманих і очищених ізолятів фагів проведено електрофорез білків, результати якого наведено на рисунку 4.

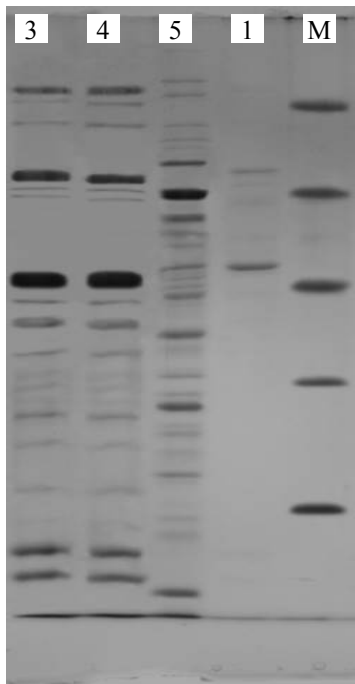


Рис. 4. Електрофореграма білків бактеріофагів із відібраних зразків: цифрами позначено номери зразків; М – маркери 66, 45, 36, 24 та 14,2 кДа

Визначення білкового складу віріонів дало можливість установити їх специфічні особливості. Бактеріофаги зі зразків різнилися своїм білковим складом. Ізоляти зі зразків 3 та 4 мали подібний білковий склад. Інші зразки відрізнялися як від попередніх, так і між собою. У зразках 3 та 4 виявлено 19 білків, у зразку 5 – 25 білків, у зразку 1 – 4 білки. Припускаємо, що вплив на фагів

могли мати перші пасажі на певних бактеріях-хазяях. Як видно з наведеної на рисунку 4 електрофореграми, за білковим складом фаги утворювали три умовні підгрупи, відповідно до штаму, на якому вони виділені (першу групу утворили зразки 3 та 4). Значні відмінності спостерігали у 1- та 5-му зразках (в основному за складом мінорних поліпептидів). Різноманіття структурних білків характерне для вірусів мікроорганізмів, до складу яких може входити до декількох десятків білків. Таке різноманіття характерне, в першу чергу, для таких складноорганізованих фагів, як Т-парні (Kruger and Bickle, 1983). У той же час для вірусів рослин, навпаки, частіше за все характерна наявність єдиного структурного білка. Електрофорез білків досліджуваних фагів показав їх неоднорідність.

Таким чином, різні ізоляти фагів, виділені на одній фітопатогенній бактерії, мають подібний білковий склад за кількістю білків та їх молекулярною масою.

Висновки

Проведено скринінг вірусів на рослинах *P. pratensis* природної флори України. Встановлено наявність змішаної інфекції у рослин, зумовленої вірусними та бактеріальними патогенами. Описано морфологію вірусів рослин і бактеріофагів, виділених зі зразків *P. pratensis* із патологіями вірусної та бактеріальної етіології.

Виділені віруси рослин ідентифікувати та детально охарактеризувати не вдалося, оскільки існуючі тест-системи розроблялися до вірусів культурних рослин. Важко оцінити все різноманіття вірусів певного виду рослин, адже віруси, які циркулюють у природній флорі, залишаються практично недослідженими.

З огляду на це, вважаємо доцільним проводити комплексне вивчення вірусів рослин та вірусів бактерій. Проведене таким чином дослідження може мати вагомий вплив на подальший розвиток вірусологічної науки, стати поштовхом до розширення нашого уявлення про всесвіт вірусів.

Бібліографічні посилання

- Adams, M., 1961. Bakteriofagi [Bacteriophage]. Medgiz, Moscow (in Russian).
- Budzanivska, I.H., 2009. Diahnostyka virusnykh infektsii [Diagnosis of viral infections]. Ukrainskyi Fitosotsiologichnyi Tsent, Kyiv (in Ukrainian).
- Clokie, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S., 2011. Phages in nature. *Bacteriophage* 1, 31–45.
- Danova, K., Bertoli, A., Pistelli, L., Dimitrov, D., Pistelli, L., 2009. *In vitro* culture of Balkan endemic and rare *Pulsatilla* species for conservational purposes and secondary metabolites production. *Botanica Serbica* 33(2), 157–162.
- Diduh, Y.P., 2009. Chervona knyha Ukrainy. Roslynnnyi svit [Red Book of Ukraine. Flora]. Globalkonsalting, Kyiv (in Ukrainian).
- Glatthaar-Saalmuller, B., Fallier-Becker, P., 2001. Antiviral action of *Euphorbium compositum* and its components. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 8(4), 207–212.
- Jones, J.B., Jackson, L.E., Balogh, B., 2007. Bacteriophages for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 245–262.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), 2011. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of International Committee on the Taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
- Kruger, D.H., Bickle, T.A., 1983. Bacteriophage survival: Multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction system of their hosts. *Microbiol. Rev.* 47(3), 345–360.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Mártonfiová, L., 2004. Karyotype studies in *Pulsatilla zimmermannii*. *Biologia Bratislava* 59(1), 61–64.
- Muthukumar, V., Melcher, U., Pierce, M., Wiley, G.B., Roe, B.A., Palmer, M.W., Thapa, V., Ali, A., Ding, T., 2009. Non-cultivated plants of the Tallgrass Prairie Preserve of northeastern Oklahoma frequently contain virus-like sequences in particulate fractions. *Virus Res.* 141, 169–173.
- Peakall, R., Smouse, P., 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6, 288–295.
- Chibani-Chenoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., Brüssow, H., 2004. Phage-host interaction. *Ecological Perspective Journal of Bacteriology* 186(12), 3677–3686.
- Szentpéteri, J.L., Szegő, B., Sente, S., 2007. Biogeographical studies and taxonomic review of *Pulsatilla pratensis* var. *flavescens*. *Acta Bot. Hung.* 49, 163–178.
- Vos, M., Birkett, P.J., Birch, E., Griffiths, R.I., Buckling, A., 2009. Local adaptation of bacteriophages to their bacterial hosts in soil. *Science* 325, 833.
- Weinbauer, M., Rassoulzadegan, F., 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ. Microbiol.* 6(1), 1–11.
- Wommack, K.E., Colwell, R.R., 2000. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 69–114.

Надійшла до редколегії 21.03.2016