

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол No \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2024 р.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ ГРУПИ  
ЖОВТОЇ КАРЛИКОВОСТІ НА РІЗНИХ ПРЕДСТАВНИКАХ РОДИНИ  
*POASEAE* В УКРАЇНІ**

Кваліфікаційна робота магістра  
денної форми навчання  
за спеціальністю Біологія  
Стогнія Сергія Андрійовича  
науковий керівник від кафедри  
д.б.н., доц. Шевченко Т.П.

Робота виконана на базі кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» під керівництвом наукового співробітника, к.б.н. Снігур Галини Олександрівни

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2024 р.

## ЗМІСТ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ВСТУП.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>РОЗДІЛ 1. Характеристика вірусів групи жовтої карликовості.....</b>                            | <b>5</b>  |
| 1.1. Класифікація та молекулярно-біологічна характеристика вірусів групи жовтої карликовості..... | 5         |
| 1.2. Поширення, шкодочинність та заходи боротьби з вірусами групи жовтої карликовості.....        | 8         |
| 1.3. Дослідження вірусів групи жовтої карликовості в Україні.....                                 | 16        |
| <b>РОЗДІЛ 2. Методи досліджень у вірусології.....</b>   | <b>18</b> |
| 2.1. Візуальна діагностика вірусних хвороб.....   | 19        |
| 2.2. Серологічні методи діагностики .....   | 20        |
| 2.3. Молекулярні методи досліджень.....   | 21        |
| <b>РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи дослідження.....</b>   | <b>23</b> |
| 3.1. Об'єкти досліджень.....  | 23        |
| 3.2. Матеріали та методи досліджень, які були використані в роботі.....                           | 23        |
| 3.2.1. Візуальна діагностика вірусних хвороб.....   | 25        |
| 3.2.2. Імуноферментний аналіз.....  | 26        |
| 3.2.3. Виділення РНК.....   | 27        |
| 3.2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією.....                              | 28        |
| 3.2.5. Філогенетичний аналіз.....   | 29        |
| 3.2.6. Статистична обробка результатів.....   | 29        |
| <b>РОЗДІЛ 4. Результати та їх обговорення.....</b>  | <b>30</b> |
| 4.1. Скринінг агроценозів України для виявлення вірусів групи жовтої карликовості.....            | 30        |
| 4.2. Ідентифікація вірусів групи жовтої карликовості за допомогою TAS-ELISA.....                  | 36        |
| 4.3. Виявлення вірусів групи жовтої карликовості в Україні молекулярними методами.....            | 43        |
| <b>ВИСНОВКИ.....</b>  | <b>50</b> |
| <b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>  | <b>51</b> |

## ВСТУП

Віруси рослин, а особливо віруси злаків, несуть високі ризики для країн, що займаються експортом злакової аграрної продукції, зокрема України. Навіть в період війни експорт зазнав росту, що ще більше наголошує на потребі вчасної ідентифікації можливих збудників [1].

Найбільш поширеною та найбільш економічно загрозовою групою вірусів злакових є - віруси жовтої карликовості ячменю або *barly yellow dwarf virus*. Представники даної групи мають високий відсоток ідентичності вірусної одноланцюгової РНК, характерним представником є вірус жовтої карликовості ячменю – PAV (*barly yellow dwarf virus-PAV*, *BYDV-PAV*). Небезпека вірусів цієї групи, як наприклад, *BYDV-PAV*, полягає у можливості знищення до 90% врожаїв. Передача групи вірусів здійснюється за допомогою векторів [2].

У 20-му столітті були зареєстровані випадки епіфітотії, викликані вірусом жовтого карликового ячменю, що призвело до середніх щорічних втрат 4,8% у Сполучених Штатах між 1951 і 1960 роками, причому спалахи в Монтані спричинили втрати врожаю ячменю на 31% і 17-24% у Північна Дакота. У Великій Британії регулярно виникають спалахи, що призводять до втрат до 70% урожаю ячменю. Також у 1959 році в північно-центральных штатах був зареєстрований випадок хвороби вівса, що спричинило 100% втрати врожаю [3-4].

Таксономія вірусів, що викликають захворювання карликовості у зернових культур, постійно змінюється з кінця 20 сторіччя, що пов'язано з покращенням точності молекулярно-генетичних аналізів. Це призводить до утворення нових таксонів, або навпаки видалення тих, що були затвердженні до цього [5].

На даний момент віруси групи жовтої карликовості присутні у всіх країнах де розвинена аграрна промисловість, періодично викликаючи

епідемічні спалахи. Дані віруси викликають характерні симптоми затримки росту і карликовості, що може сягати до 66% та хлорозу листків [2].

В Україні віруси жовтої карликовості ячменю були виявлені починаючи з 60-70 років минулого сторіччя, але дослідження в основному були зосереджені на поширенні та біологічних властивостях.

Єдиним відомим вектором групи вірусів жовтої карликовості є попелиці. Передача вірусу комахами відбувається непропагативно, кожен штам здатний передаватися одним або декількома видами попелиць. У рослині вірус локалізується у флоемі. У вектор вірус потрапляє з флоєми під час живлення комахами. Це призводить до висновку, що окрім виведення стійких до вірусу рослин, для зниження ризику захворювання ефективно перешкоджати поширенню попелиць.

Метою даної роботи було ідентифікувати віруси групи жовтої карликовості на різних представниках родини *Poaceae* в Україні використовуючи методи діагностики та провести філогенетичних аналіз виявлених ізолятів.

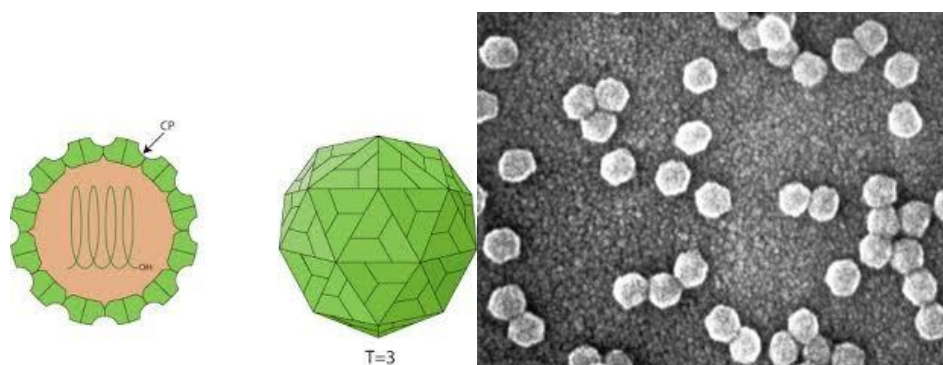
## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТКА ВІРУСІВ ГРУПИ ЖОВТОЇ КАРЛИКОВОСТІ

#### 1.1 Класифікація та молекулярно-біологічна характеристика вірусів групи жовтої карликовості

Віруси, що викликають жовту карликовість у злакових рослин, належать до родин Solemoviridae (віруси жовтої карликовості SGV та GPV) та Tombusviridae (віруси жовтої карликовості PAV, MAV та PAS). Ці родини рослинних вірусів характеризується невеликими одноланцюговими геномами позитивної РНК, які інкапсульовані в ікосаедричні частинки [6].

Віріони вірусів групи жовтої карликовості сферичні, діаметром близько 25-30 нм, ікосаедричний тип симетрії, що складається з 180 СР білків (рис. 1.1), ліпідів та вуглеводів немає. Молекулярна маса віріону становить 65000 Да. Білок оболонки один з молекулярною масою 24400 Да. Плавуча щільність в CsCl - 1,40 г/см<sup>3</sup>. ТТІ - 65-70оС, витримує замороження в соці та відтавання. Оптимальні умови для розвитку: t - 120 С, інтенсивність освітлення 32400 - 43200 люкс. Стійкий до таких речовин як: хлороформ та бутанол [7-9].



**Рис. 1.1.** Вібріони вірусів групи жовтої карликовості [8].

Таксономія BYDV і векторна специфічність виявляють складну матрицю. Ізоляти BYDV спочатку були класифіковані відповідно до специфічності вектора, але з того часу стало зрозуміло, що різні види вірусів групи жовтої карликовості різняться за молекулярно-біологічними характеристиками.

За даними таксономії 1995 року було відомо 6 штамів вірусу жовтої карликовості ячменю, що відносились до двох субгруп роду *Luteovirus* родини *Luteoviridae* (субгрупа I: -MAV; -PAV; -SGV і субгрупа II: -RGV; -RMV; -RPV).

За класифікацією 2005 року дані штами почали вважати окремими видами вірусів, які відносилися до різних родів або без родової приналежності родини *Luteoviridae*. Було відомо 8 видів вірусів родини *Luteoviridae*, які викликали жовту карликовість: рід *Luteovirus*, що включав в себе 3 вірусу: BYDV-MAV, BYDV-PAS та BYDV-PAV, який мав два штама BYDV-PAV і BYDV-RGV. Рід *Polerovirus*, в який входило два види вірусів і назвали їх - Вірус жовтої карликовості злакових (ВЖКЗ, *Cereal yellow dwarf virus*, CYDV): CYDV-RPV та CYDV-RPS. Віруси BYDV-GPV, BYDV-RMV і BYDV-SGV за даними таксономії 2005 року відносились до родини *Luteoviridae*, але не мали роду.

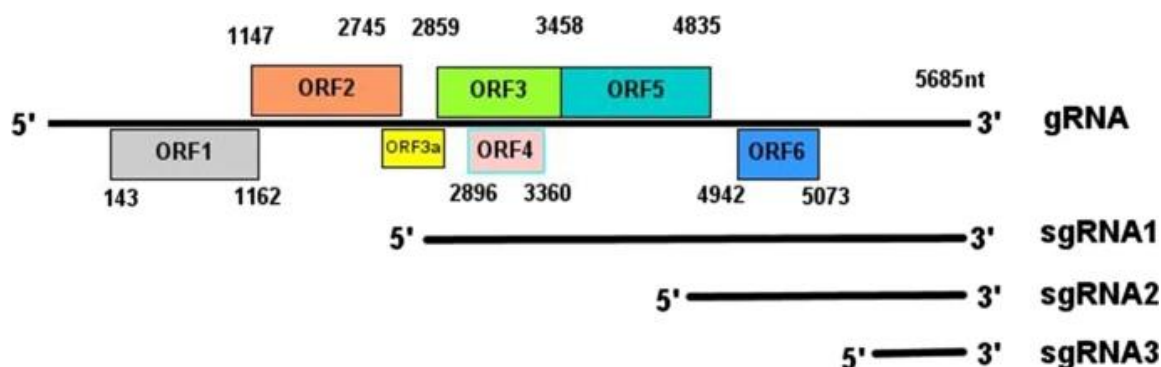
За даними таксономії 2016 року до роду *Luteovirus* входили віруси: *Barley yellow dwarf virus-PAV*, *Barley yellow dwarf virus-MAV*, *Barley yellow dwarf virus-PAS*, *Barley yellow dwarf virus-kerII* і *Barley yellow dwarf virus-kerIII*. До роду *Polerovirus* входять віруси: *Cereal yellow dwarf virus-RPV* і *Cereal yellow dwarf virus-RPS*, а також *Maize yellow dwarf virus-RMV*, який раніше мав назву *Barley yellow dwarf virus-RMV*. *Barley yellow dwarf virus-GPV* і *Barley yellow dwarf virus-SGV* відносяться до родини *Luteoviridae* але не мають роду.

На сьогоднішній день відомо, за даними ICTV 2022, що до родини *Tombusviridae* входить рід *Luteovirus* до якого належить 4 види: *Luteovirus*

mauthordei (MAV), Luteovirus pavhordei (PAV), Luteovirus pashordeita (PAS) та Luteovirus kertrihordei. Під Polerovirus незмінно містить два види Cereal yellow dwarf virus RPV та Cereal yellow dwarf virus RPS [5,8-10].

Геном вірусів групи жовтої карликовості — це позитивна одноланцюгова молекула РНК довжиною приблизно 5-6 кб. Він містить декілька відкритих рамок зчитування, які кодують вірусні білки, включаючи вірусну репліказу, білок оболонки та білок руху.

Геном вірусу містить три відкриті рамки зчитування (ORF) (рис 1.2), які кодують білки вірусної реплікази, білок оболонки та білок руху. Перша ORF кодує вірусну репліказу, яка відповідає за реплікацію вірусної РНК і синтез вірусних білків. Другий ORF кодує білок оболонки, який утворює вірусний капсид і захищає вірусну РНК. Третя ORF кодує білок руху, який сприяє переміщенню вірусу всередині рослини-господаря та між рослинами-господарями [10].



**Рис 1.2.** Зображення генному вірусу жовтої карликовості ячменю [9]

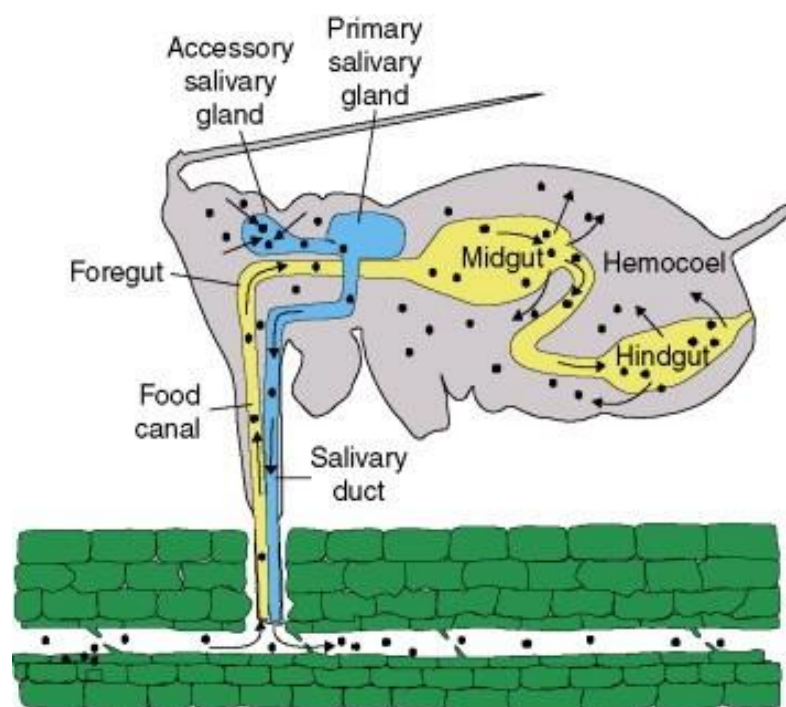
На додаток до цих трьох ORF, геном містить чотири інші ORF, які кодують допоміжні білки, включаючи білок, який бере участь у передачі попелицями, і білок, який пригнічує мовчання РНК у рослині-хазяїні. Вважається, що ці додаткові білки відіграють певну роль у патогенезі та передачі вірусу.

У групі є кілька штамів, включаючи BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-RPV, BYDV-SGV і BYDV-GPV. Хоча ці штами мають схожість в

організації геному, між ними також є деякі відмінності. Розміри геному коливаються приблизно від 5,6 до 5,9 кб. Розташування відкритих рамок зчитування (ORF) у геномі різняться між різними штамми. Наприклад, BYDV-PAV має унікальну ORF, якої немає в інших штамів. Функції деяких вірусних білків, кодованих різними штамми, можуть відрізнятися. Наприклад, було показано, що білок оболонки BYDV-RPV відіграє роль у визначенні специфічності вірусу для певних видів переносників попелиці [9-11].

## **1.2 Поширення, шкодочинність та заходи боротьби з вірусами групи жовтої карликовості**

Основним шляхом передачі вірусів є комахи-переносники, особливо попелиці. Попелиці — це дрібні комахи, що споживають сік рослин, здатні переносити вірус від заражених рослин до здорових. Віруси BYDV нестійкі, тобто не зберігаються тривалий час в організмі комахи. Вірус розмножується в кишечнику попелиці, а потім вводиться в нову рослину, при механічному пошкодженні попелицею. Потрапляючи всередину рослини, вірус може системно переміщатися в інші тканини (рис. 1.3).



**Рис. 1.3.** Передача вірусів групи жовтої карликовості [11]

На рисунку 1.3. показано циркулятивна передача вірусів родини Tombusviridae попелицями-переносниками. Живлячись із ситоподібних трубок зараженої рослини, попелиця (показана в поперечному розрізі) отримує частинки вірусу, які рухаються вгору по стилету, через харчовий канал і в передню кишку. Віріони транспортуються через клітини середньої та/або задньої кишки в гемоцель у процесі, який включає рецептор-опосередкований ендоцитоз. Потім віріони пасивно мігрують через гемолімфу до додаткової слинної залози, де вони знову транспортуються за допомогою процесу, опосередкованого рецепторами, щоб досягти просвіту залози. Потрапляючи в просвіт слинної залози, віріони викидаються зі слиною в судинну тканину рослин-хазяїв. Попелиця може зберігати здатність передавати вірус протягом декількох тижнів. Мембрани задньої кишки зазвичай набагато менш вибіркової, ніж мембрани додаткових слинних залоз, тому віруси, які не передаються певним видом попелиць, часто накопичуються в гемоцелі, але не проходять через мембрани додаткових слинних залоз [12-13].

Віруси жовтої карликовості ячменю (BYDV) та їх переносники (попелиці) наразі є найбільш економічно важливими збудниками зернових у всьому світі. Втрати врожаю коливаються від 5% до 80% в середньому та можуть сягати 100%. Візуальними симптомами BYDV є карликовість пагонів, зміна кольору листя (жовте, фіолетове, червоне або хлороз), зменшення кількості колосків, стерильність колосків і затримка колосіння [11-14].

Вважається, що ефективність передачі залежить від виду вірусу та вектору (рис 1.4), і також очевидно, що фундаментальні знання про асоціацію вектор-вірус потребують оновлення за допомогою новітніх методів

| Genus      | Species | Known vectors |   |
|------------|---------|---------------|---|
| Luteovirus | BYDV    | PAV           | <i>Rhopalosiphum padi</i> , <i>Sitobion avenae</i> , <i>Metopolophium dirhodum</i> , ( <i>Schizaphis graminum</i> *) <i>Sitobion fragariae</i> ** |
|            |         | MAV           | <i>Sitobion avenae</i> , <i>Metopolophium dirhodum</i> , <i>Rhopalosiphum padi</i> , <i>Sitobion fragariae</i> **                                 |
|            |         | PAS           | <i>Rhopalosiphum maidis</i>   |
|            |         | GAV           | <i>Scizaphis graminum</i> , <i>Sitobion avenae</i>  |
|            |         | kerII         | <i>Rhopalosiphum padi</i>   |
|            |         | kerIII        | not known   |
| Polevirus  | CYDV    | RPV           | <i>Rhopalosiphum padi</i> , <i>Schizaphis graminum</i> **   |
|            |         | RPS           | <i>Rhopalosiphum padi</i>   |
| Unassigned | GPV     | GPV           | <i>Rhopalosiphum padi</i> , <i>Schizaphis graminum</i>  |
|            |         | RMV           | <i>Rhopalosiphum maidis</i>   |
|            |         | SGV           | <i>Schizaphis graminum</i> , <i>Sitobion avenae</i>   |

Notes: \*reported for the Chinese isolate \*\*in Australia.

Рис 1.4. Віруси групи жовтої карликовості та пов'язані з ними переносники види попелиць [14]

Існує кілька штамів вірусу жовтої карликовості ячменю, який є групою вірусів рослин, які інфікують пшеницю та інші зернові культури. Вірус жовтого карлика ячменю - RPV: цей штам поширений у Сполучених Штатах і завдає серйозних економічних збитків посівам пшениці та ячменю. RPV передається злаковою попелицею та іншими видами попелиць [9]. Вірус жовтого карлика пшениці - PAV широко поширений у Сполучених Штатах і інфікує різні зернові культури, включаючи пшеницю, ячмінь і овес. PAV передається кількома видами попелиці, включаючи *Rhopalosiphum padi* (рис 1.5) [13-16].



**Рис 1.5.** Попелиць *Rhopalosiphum padi*, вектори вірусів жовтої карликовості ячменю [16]

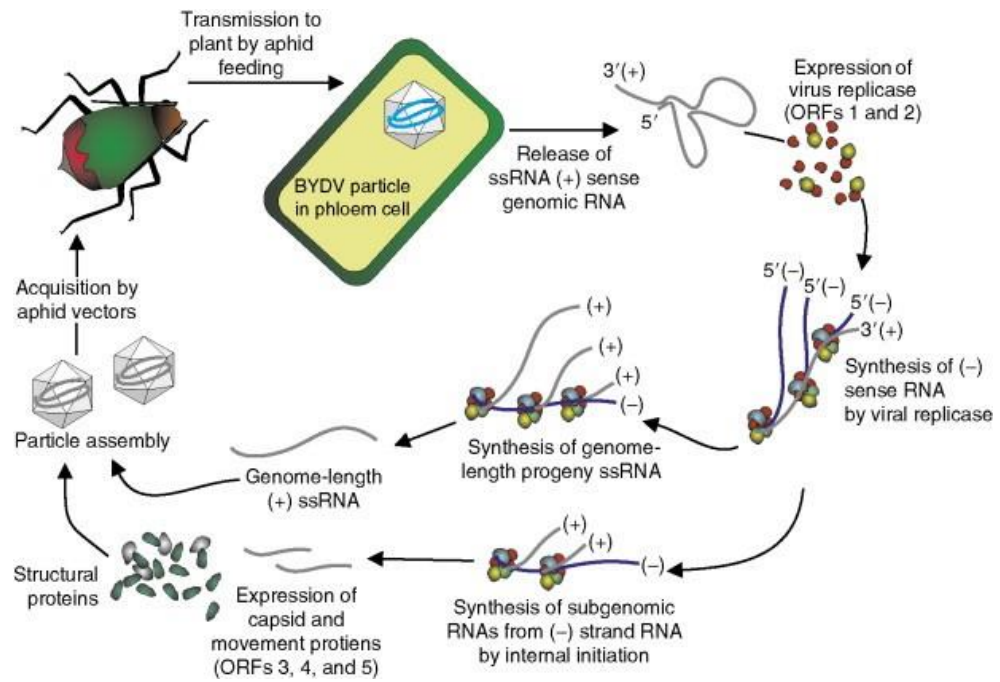
Вірус жовтого карликовості ячменю-MAV вперше був ідентифікований у Китаї та інфікує пшеницю, ячмінь та інші зернові культури. MAV передається кількома видами попелиць, включаючи *Sitobion miscanthi* і *Schizaphis graminum* [9]. Вірус жовтого карлика пшениці SGV вперше був ідентифікований в Австралії та інфікує посіви пшениці та ячменю. SGV передається попелицею *Rhopalosiphum padi* та іншими видами попелиць [16-17].

Передача вірусів відбувається швидко, при цьому вірус вводиться в рослину протягом декількох секунд після початку живлення попелиці. Потім вірус може швидко переміщатися всередині рослини, при цьому симптоми з'являються протягом кількох днів після зараження. Така швидка передача є важливим фактором здатності вірусів швидко поширюватися та завдавати значної шкоди культурам.

Іншою унікальною особливістю передачі вірусу є те, що вірус передається стилетом. Це означає, що вірус передається через стилет попелиці, який є довгим, схожим на голку ротовим апаратом, який комаха

використовує, щоб проникнути на поверхню рослини та отримати доступ до її соку. Вірус не передається через слину попелиці, як у випадку з багатьма іншими вірусами рослин.

На рисунку 1.6. показано життєвий цикл ВЖКЯ- PAV. Вірусні частинки осідають в елементах сита переносниками попелиці. За допомогою ще невідомого процесу одноланцюгова месенджерна геномна РНК вивільняється з вірусних частинок і транслюється механізмом трансляції хазяїна, чому сприяють взаємодії РНК-РНК на великій відстані. Відкриті рамки зчитування (ORF) 1 і 2, які кодують вірусну репліказу, експресуються першими через їх близькість до 5'-кінців геномних РНК. Потім кодована вірусом репліказа синтезує негативно-смыслові РНК, які використовуються як матриці для виробництва нових повно розмірних позитивно-смыслових геномних РНК і субгеномних РНК. Утворення субгеномних РНК призводить до синтезу структурних білків і білків руху між клітинами. Субгеномна РНК2 пригнічує трансляцію з геномних РНК, сприяючи переходу від ранньої до пізньої експресії генів. Повнорозмірні позитивні геномні РНК і структурні білки потім збираються у віріони в клітинах тканин флоєми, де їх можуть проковтнути переносники попелиць, щоб розпочати процес знову[14-18].



**Рис. 1.6.** Життєвий цикл вірусу жовтого карликового ячменю-PAV: Цикл починається з потрапляння вірусу у вектор-попелицю > передається у клітини флоємі через живлення попелиці > вивільнення вірусної одноланцюгової РНК (+) > експресія вірусної реплікації > синтез - сенсової РНК вірусною репліказою > Паралельно відбувається два процеси: 1-ий: синтез вірусної + одноланцюгової РНК; 2-ий: синтез зубгеномній РНК з - сенсової РНК > експресія капсидних білків, білків руху та структурних білків > збірка вірусних часток.[17]

Окрім цих унікальних особливостей, на передачу вірусів також впливають різноманітні екологічні та біологічні фактори. Наприклад, температура та вологість можуть вплинути на швидкість розмноження вірусу в комахі та ймовірність передачі на нову рослину. Рослина-господар також може впливати на передачу вірусу, причому деякі рослини більш сприйнятливі до інфекції та передачі, ніж інші [15-20].

Віруси групи жовтої карликовості ячменю є одними із найбільш поширених і економічно важливих вірусів рослин, що вражають зернові культури, включаючи пшеницю, ячмінь, овес і кукурудзу, у всьому світі. В основному він передається попелицею стійким циркуляційним шляхом і

може завдати значної шкоди зараженим культурам. Урожайність інфікованих рослин демонструє сповільнений ріст і зниження виробництва зерна, що призводить до значних втрат урожаю. Втрати врожаю можуть коливатися від 10% до 100% залежно від тяжкості інфекції. Крім втрати врожаю, BYDV також може спричинити зниження якості зерна, включаючи зниження вмісту протеїну, зниження якості хлібопечення та підвищену сприйнятливість до проростання до збору врожаю. BYDV присутній у багатьох регіонах світу, де вирощують зернові культури, включаючи Північну та Південну Америку, Європу, Азію та Африку. Захворюваність і тяжкість захворювання можуть відрізнятися в різних регіонах і залежать від факторів навколишнього середовища, таких як температура та кількість опадів. Розвиток стійкості до сортів, стійких до BYDV, викликає занепокоєння, оскільки вірус може швидко еволюціонувати, щоб подолати стійкість рослин. BYDV складно контролювати через численні штами та вектори попелиць, які беруть участь у його передачі. Заходи боротьби включають використання стійких сортів, культурні практики та хімічний контроль переносників попелиці, але ці заходи не завжди можуть бути ефективними чи практичними. Використання стійких сортів є поширеним методом боротьби з BYDV. Однак вірус може швидко еволюціонувати, щоб подолати резистентність рослин, що призводить до поломки резистентності та повернення сприйнятливості. BYDV складно контролювати через численні штами та вектори попелиць, які беруть участь у його передачі. Культурні методи, такі як посадка стійких сортів і зменшення кількості бур'янів, можуть допомогти зменшити ризик зараження. Хімічний контроль переносників попелиць також може бути ефективним, але не завжди практичним або економічно доцільним [1,3,5-10,19-24].

Вірусні захворювання є серйозною загрозою для зернових культур у всьому світі, спричиняючи значні економічні втрати та впливаючи на продовольчу безпеку. Боротьба з вірусними хворобами зернових культур

та їх лікування потребують інтегрованого підходу, який включає як культуральні, так і хімічні заходи боротьби. Висаджування стійких сортів є одним із найефективніших способів боротьби з вірусними захворюваннями зернових культур. Селекціонери розробили кілька стійких сортів, які доступні на ринку, і фермери повинні вибирати сорти, стійкі до поширеного вірусу в їх регіоні. Належна санітарна практика має важливе значення для запобігання поширенню вірусних захворювань. Фермери повинні якнайшвидше видалити та знищити хворі рослини, щоб запобігти поширенню вірусу на здорові рослини. Вони також повинні регулярно чистити та дезінфікувати сільськогосподарські інструменти, обладнання та механізми, щоб уникнути перенесення вірусу з одного поля на інше. Комахи-переносники, такі як попелиці для вірусів групи жовтої карликовості, відповідають за передачу вірусних хвороб зернових. Фермери можуть контролювати цих переносників, застосовуючи інсектициди або використовуючи інтегровані методи боротьби зі шкідниками, такі як пастки та засоби біологічної боротьби. Сівозміна є ефективним культурним заходом боротьби, який може знизити захворюваність вірусними хворобами зернових культур. Фермерам слід уникати багаторазового посіву зернових на одному полі, оскільки це може збільшити накопичення вірусних патогенів у ґрунті. Слід уникати посіву зернових культур у районах, де поширені вірусні захворювання. Їм також слід уникати посадки в періоди, коли популяція переносників висока.

Було ідентифіковано гени стійкості до ВЖКЯ-РАV у пшениці - це Bdv1, Bdv2, Bdv3 та Bdv4, у ячменю це Ryd1 Ryd2 Ryd3 та Ryd4. Однак найбільш ефективним геном при розведенні рослин були Bdv2 та Ryd2. Відібрані гени зі збереженим повторюваним мотивом, багатим на лейцин (CC-NBS-LRR) сайту зв'язування нуклеотидів катушка - катушка, також продемонстрували підвищену експресію у сприйнятливих генотипах пшениці та ячменю рано після інфікування, але зменшилася через 30 днів. Дослідження показало що посилення NBS і CC-NBS-LRR у сприйнятливих

генотипах пов'язане зі значним збільшенням кількості копій BYDV-PAV, що могло активувати захисні механізми на ранній стадії інфікування BYDV-PAV, але тривало до 30 днів. Той факт, що експресія підтримується на початковому рівні в резистентних генотипах, може бути наслідком альтернативних механізмів резистентності, які пригнічують реплікацію вірусу (нижчий титр BYDV-PAV), імовірно, спрацьовуючи на ранніх стадіях інфекції BYDV-PAV [25-31].

Підсумовуючи, боротьба з вірусними хворобами зернових культур потребує комплексного підходу, який передбачає поєднання аграрних та хімічних заходів боротьби. Фермери повинні прийняти проактивний підхід до контролю та запобігання вірусним захворюванням зернових, а також вони повинні впроваджувати комбінацію заходів, які відповідають їхнім конкретним умовам вирощування.

### **1.3 Дослідження вірусів групи жовтої карликовості в Україні**

На території України вперше було ідентифіковано вірус жовтої карликовості ячменю у 60-70 роках минулого сторіччя та досліджували через потенційну небезпеку збудника.

У 2018 було опубліковано статтю моніторингу продовж 30 років, в якій зазначалось постійне ідентифікування ВЖКЯ у зразках з коливанням від 1%~45%, з постійними змінами у різних регіонах та різних періодах року. Такі данні могли залежати від коливань популяції попелиць [32].

Інше моніторингове дослідження з 2002-2016 роки досліджувало поширеність вірусних захворювань злакових у різних агроценозах по Україні та проаналізувавши результати показали, що відсоток уражених рослин вірусами групи жовтої карликовості рослин може становити від ~25% ~ 55%. Дослідження також показало, що захворюваність на BYDV

була найвищою в південних і східних регіонах України, які, як відомо, є основними регіонами країни, де вирощують пшеницю. Автори дослідження припустили, що така висока захворюваність BYDV може бути пов'язана з наявністю великих популяцій попелиць, які є основними переносниками вірусу [33].

У 2022 році було опубліковано про перше ідентифікування ВЖКЯ на території України. Для дослідження було взято зразки пшениці, ячменю та інших злакових з декількох регіонів. Та було встановлено, що ізолят ВЖКЯ на 99% співпадав з Польським та Естонським ізолятами, використовуючи ПЛР-зі зворотною транскрипцією [34].

Загалом ці дослідження підкреслюють значний вплив BYDV на посіви пшениці в Україні та потребу в ефективних стратегіях контролю. Розробка стійких сортів пшениці та використання інсектицидів для боротьби з попелицею є двома потенційними підходами до обмеження поширення вірусу. Однак для ефективного управління BYDV і захисту посівів пшениці в Україні та інших країнах необхідно буде продовжити дослідження, щоб визначити нові стратегії та вдосконалити існуючі.

## РОЗДІЛ 2

### МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ У ВІРУСОЛОГІЇ

Для виявлення вірусних хвороб у посівах злакових культур широко застосовують візуальні методи діагностики. Ці методи є швидкими, економічно ефективними та можуть забезпечити попередній діагноз у полі або в лабораторії. Спостереження за видимими симптомами є найпоширенішим і простим методом діагностики вірусних захворювань посівів пшениці. Симптоми можуть включати затримку росту, хлороз, мозаїчні візерунки на листках, почервоніння/пожовтіння листових пластинок та некроз. Різні віруси викликають різні симптоми, і досвідчені фітопатологи можуть ідентифікувати вірус на основі спостережуваної симптоматики.

Імуноферментний аналіз (ІФА) є широко використовуваним серологічним методом тестування для виявлення вірусних інфекцій у рослин. Це передбачає використання антитіл, специфічних для відповідного вірусу, які зв'язуються з вірусом у зразку та викликають зміну кольору. ІФА є швидким і чутливим методом, який може виявити низькі рівні вірусів у зразках рослин.

Молекулярні методи, як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) і ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), є високочутливими та специфічними для виявлення вірусних захворювань у посівах пшениці. Ці методи включають ампліфікацію та виявлення вірусної нуклеїнової кислоти за допомогою специфічних праймерів і зондів. ПЛР і ЗТ-ПЛР можуть виявити низькі рівні вірусної нуклеїнової кислоти, і вони можуть диференціювати тісно споріднені віруси .

Електронна мікроскопія — це метод, який використовує пучок електронів для візуалізації вірусних частинок у тканинах рослин. Цей

метод є високочутливим і може виявити низькі рівні вірусних частинок. Однак це вимагає спеціального обладнання та досвіду .

## 2.1 Візуальна діагностика вірусних хвороб

Спостереження за симптомами є одним із найпоширеніших і простих методів діагностики вірусів рослин. Він передбачає спостереження за видимими симптомами, які вірус викликає в рослині. Різні віруси викликають різні симптоми, і досвідчений фітопатолог може ідентифікувати вірус на основі спостережуваної симптоматики. Затримка росту — заражені вірусом рослини часто сповільнюють ріст порівняно зі здоровими рослинами. Заражені рослини можуть мати коротші стебла та менші листя. Хлороз — це пожовтіння тканин рослин через нестачу хлорофілу. Багато вірусів рослин викликають хлороз, який можна побачити на листках заражених рослин. Некроз — це відмирання тканин рослини, що призводить до темних, заглиблених пошкоджень на листі та стеблах. Багато вірусів рослин викликають некроз, і за типом некрозу можна ідентифікувати вірус. Мозаїка — це неправильні світло- та темно-зелені плями, смуги чи штрихи на листках заражених рослин. Багато вірусів рослин викликають мозаїчні візерунки, і візерунки можна використовувати для ідентифікації вірусу. Кільцеподібні плями — це світло- та темно-зелені ділянки кругової або овальної форми на листках, які викликаються вірусами рослин. В'янення — це втрата тургорного тиску в клітинах рослини, що спричиняє поникнення та в'янення рослини. Багато вірусів рослин можуть викликати в'янення, що може бути ознакою системної інфекції [28, 30-35].

Віруси групи жовтої карликовості на рослинах викликають затримку росту, карликовість та пожовтіння/почервоніння листових пластинок (рис

2.1). Симптоми залежать від виду рослини, штаму та ізоляту вірусу та періоду розвитку інфікованої рослини вірусом.



**Рис 2.1.** Симптоми вірусів групи жовтої карликовості ячменю [36].

## **2.2. Серологічні методи діагностики**

Серологічні методи діагностики вірусів рослин включають використання антитіл, специфічних до даного вірусу. Ці методи засновані на принципі взаємодії специфічних антитіл з антигеном. Серологічні методи діагностики чутливі, специфічні і відносно прості у виконанні. Фермент зв'язуючий імуносорбентний аналіз — цей аналіз є широко використовуваним серологічним методом діагностики вірусів рослин. Він передбачає використання пов'язаного з ферментом антитіла, яке зв'язується з вірусом при постановці аналізу. Фермент змінює колір, що свідчить про наявність вірусу. ІФА є чутливим, специфічним і може виявити низькі рівні вірусу в зразку .

Імунофлуоресцентний аналіз — це метод, який використовує флуоресцентні антитіла для виявлення вірусу в зразку. Флуоресцентні антитіла зв'язуються з вірусом, і вірус можна візуалізувати під флуоресцентним мікроскопом. ІФА є чутливим і специфічним, але вимагає спеціального обладнання та досвіду [37].

### 2.3. Молекулярні методи досліджень

Молекулярні методи діагностики вірусів рослин включають виявлення специфічних послідовностей нуклеїнових кислот вірусу в зразку. Ці методи засновані на тому принципі, що кожен вірус має унікальну послідовність нуклеїнової кислоти, за якою можна його ідентифікувати. Молекулярні методи діагностики чутливі, специфічні і можуть виявити низькі рівні вірусу в зразку. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є широко використовуваним молекулярним методом діагностики вірусів рослин. Він передбачає ампліфікацію певної послідовності нуклеїнової кислоти вірусу в зразку. Ампліфікований продукт можна виявити за допомогою електрофорезу в гелі або ПЛР у реальному часі. ПЛР є чутливим, специфічним і може виявити низькі рівні вірусу в зразку. ПЛР зі зворотною транскрипцією (RT-PCR) є модифікацією ПЛР, яка дозволяє виявляти РНК-віруси [38-40].

Отримавши послідовності досліджуваних зразків їх вносять у базу даних NCBI для подальшого порівняння з існуючими штамми ізолятів певного вірусу. Таким чином буде встановлено припущення спорідненості чи подібності певного ізоляту вірусу з відомими в літературі. Для пошуку послідовностей використовувався BLAST пошук, та програма Mega X для побудування філогенетичних дерев використовуючи найбільш

комплементарні моделі з гама дистрибуцією для методу найближчого-сусідства.

## **РОЗДІЛ 3**

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

#### **3.1.Об'єкти досліджень**

Моніторинг ситуації щодо вірусів злакових на полях потребує детального дослідження. Основним об'єктом в дослідженні були злакові рослини культурної та дикої флори, зібрані в агробіоценозах двох областей України, а саме у Київській та Вінницькій областях. Збір матеріалу відбувався у 2020-2023 роках за симптомами типовими для вірусів групи жовтої карликовості ячменю (затримка росту, пожовтіння-почервоніння листків, надмірна кущистість).

#### **3.2. Матеріали та методи досліджень, які були використані в роботі**

В ході дослідження було використано низку методів та обладнання задля опрацювання досліджених зразків на потенційних збудників вірусного походження. Серед методів були використані:

- Візуальна діагностика;
- Імуноферментний аналіз;
- Полімеразна ланцюгова реакція;
- Філогенетичний аналіз;
- Статистична оцінка результатів.

Для проведення зазначених методів дослідження використовували спеціальне обладнання, завдяки якому була проведена експериментальна робота:

- Самплери;
- Плашки для імуноферментного аналізу;

- Ступки;
- Сухе молоко;
- Буфер для внесення антитіл;
- Натрій-фосфорний буфер;
- Буфер відмивки;
- Буфер для розедення антитіл;
- Дистильована вода;
- Епіндорфи малі та великі за об'ємом;
- Скляний посуд;
- Буфер для нанесення АГ та АТ2 в DAS - ELISA
- Центрифуги;
- Сектрофотометр;
- Водяна баня;
- Хладогени;
- Рідкий азот;
- Фізіологічний розчин;
- Трансілюмінатор.

Склад буферних розчинів, що використовувалися в ході експерименту:

- Натрій-фосфатний буфер:
  - NaCl 8 грам
  - KCl 0,20 грам
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 грам
  - KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,20 грам
  - на 1 літр H<sub>2</sub>O
- Буфер відмивки:
  - 0,1 М PBS, рН 7,4
  - 0,2% tween 20.
- Буфер для внесення антитіл:

- 0,1 М PBS, рН 7,4
- 1% BSA (або сухого молока).
- Буфер для розведення антитіл
- 0,1 М PBS, рН 7,4
- 1% BSA (або сухого молока),
- 0,05% tween 20.
- Буфер для нанесення антигену та антитілу 2 в DAS – ELISA
- 2% PVP (Polyvinylpyrrolidone – 25) – 400 мг,
- 0,2% BSA або сухого молока – 40 мг,
- 0,2% tween 20 – 40 мкл,
- Довести PBS до 20 мл.

### **3.2.1. Візуальна діагностика вірусних хвороб**

Першим етапом у індикації вірусного ураження рослин у агроценозі це візуальна діагностика рослин, які мають симптоми, що вказують на потенційне ураження вірусом. Протягом 2020-2023 років відбирали рослини родини *Poaceae* із симптомами надмірного кущіння, пожовтінням/почервонінням листкових пластинок і затримкою росту в агробіоценозах Київської та Вінницької областей України.

### 3.2.2. Імуноферментний аналіз

Серологічний метод дослідження який базується на взаємодії ферменту із субстратом, яка відбувається під час зв'язування міченого міткою (ферментом) антитіла з антигеном. У дослідженні було використано модифікацію імуноферментного аналізу - потрійний сендвіч метод (Triple Antibody Sandwich-ELISA, TAS-ELISA) із застосуванням комерційних тест-систем фірми Agdia (США).

Схема імуноферментного аналізу потрійної сендвіч модифікації:

1. Підготувати буфер відмивки та буфер для внесення антитіл;
2. У плашку додаються антитіла по 100 мкл на лунку.
3. Інкубувати протягом ночі при 4 0 С, або 2 години при 37 0 С
4. Гомогенізація досліджуваних зразків;
5. Низькошвидкісне центрифугування при 5000 тис обертів/хв на 20 хв. Видбираємо супернатант для дослідження.
6. 4 кратна промивка буфером плашку протягом 5 хв.
7. Внесення вірусмісного матеріалу по 100 мкл на лунку
8. Інкубувати протягом ночі у холодильнику.
9. 4 кратна відмивка (як у пункті 6)
10. У плашку додати антиген специфічні антитіла по 100 мкл в лунку та повторити пункти 3 - 6.
11. Додати мічені антитіла та інкубувати 2 годин при 37 0 С
12. Відмивка (як у пункті 6)
13. Внесення субстрату розчиненого в субстратному буфері (1мг/мл) по 100 мкл в лунку. Реакція – до 1 год.

14. Зупинка реакції 2М NaOH.
15. Фіксація результатів за допомогою спектрофотометра,  $\lambda=405$  нм.

### 3.2.3. Виділення РНК

1. Стерилізація робочого місця та лабораторного посуду
2. Гомогенізація рослинного матеріалу у фосфатному буфері чи рідкому азоті.
3. Центрифугування при 5000 обертів на хвилину, протягом 7 хвилин.
4. Відібрати 100 мкл досліджуваного над осаду
5. Додати 100 мкл лізуючого розчину.
6. Центрифугувати та поставити у водяну баню при 40 0 С на 15 хв.
7. Додати до кожного епіндорфу 25 мкл ресуспендованого сорбенту.
8. Додати перший розчин для відмивання 500 мкл.
9. Центрифугувати на міксері та поставити у водяну баню при 40 0 С на 15 хв. Вилити надосад.
10. Додати другий розчин для відмивання 500 мкл.
11. Центрифугувати та поставити у водяну баню при 40 0 С на 15 хв. Вилити над осад.
12. Додати 50 мкл РНК-елюенту.

13. Інкубувати 15 хвилин у водяній бані при 40 0 С на 15 хвилин. Центрифугувати при 5000 обертів на хвилину, протягом 7 хвилин.

14. Отриманий результат повинен бути видимий на дні епіндорфа у вигляді осаду.

### **3.2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією**

1) Обережно на вортексі взбовтати DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)

2) Подальшу роботу проводити над льодом або хладогеном.

3) Змішати наступні реактиви:

a) DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) 25 мкл

b) Forward primer 1 мкл

c) Reverse primer 1 мкл

d) Template DNA 10 мкл

e) Nuclease free water до 50 мкл

4) Перемішати епіндорфи з сумішами у вортексі

5) Додати 25 мкл мінеральної олії

6) Запустити цикл:

Кроки Температура в 0 С Час Кількість циклів:

Початкова денатурація 95 1-3 хвилини 1. Денатурація 95 30 секунд 25-40 Автоматичне флуоресцентне доповнення 72 1 хвилина/kb 25-40 Останє доповнення 72 5-15 хвилин 1

7) Перенести 5-15 мкл міксу ПЛР у гель.

### **3.2.5. Філогенетичний аналіз**

Отримавши послідовності досліджуваних зразків їх було внесено у базу даних NCBI для подальшого порівняння з існуючими штамми ізолятів досліджуваних вірусів. Для пошуку послідовностей використовувався BLAST пошук, та програма Mega X для побудування філогенетичних дерев за методом Neighbour-Joining.

### **3.2.6. Статистична обробка результатів**

У ході дослідження для опрацювання результатів та виділення закономірностей, використовувалися статистичні методи обробки результатів. Для цього використовували показники частоти детекції вірусів в агроценозах та показники спектрофотометру[33].

## РОЗДІЛ 4.

### Результати та їх обговорення

#### 4.1. Скринінг агроценозів України для виявлення вірусів групи жовтої карликовості

Протягом вегетаційних періодів 2020-2023 рр. з метою виявлення вірусів групи жовтої карликовості було проведено польові обстеження у 2 зернових регіонах України, зокрема, у Вінницькій та Київській областях. Під час обстеження посівів відбирали рослини з симптомами затримки росту, надмірної кущистості, пожовтіння та/або почервоніння листків як культурних зернових: пшениця (*Triticum aestivum* L.), ячмінь (*Hordeum vulgare* L.), жито (*Secale cereale* L.), овес (*Avena sativa* L.), трітікале( × *Triticosecale* sp.), стоколос безостий (*Bromus inermis* L.), який вирощується як кормова культура; так і дикорослих злакових: пирій повзучий (пирій звичайний, *Elymus repens* (L.) Gould), мишій сизий (*Setaria pumila* (Poir.) Roem. & Schult.), мишій зелений (*Setaria viridis* (L.) P.Beauv.), грястиця звичайна (грястиця збірна, житниця, *Dactylis glomerata* L.), пальчатка кров'яна (пальчатка кривава, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.), ячмінь мишачий (*Hordeum murinum* L.), плоскуха звичайна (півняче або куряче просо, *Echinochloa crus-galli* (L.) P.Beauv.) і пажитниця багаторічна (англійський райграс, *Lolium perenne* L.). В результаті проведеної роботи ми виявляли типові вірусні симптоми на падалиці і культурних злакових як восени, так і весною-на початку літа (рис. 4.1, рис.4. 2, рис. 4.3).



**Рис. 4.1.** Симптоми почервоніння листкових пластинок на озимій пшениці в Київській області.



**Рис. 4.2.** Симптоми пожовтіння листкових пластинок і затримки росту на трітікале в Київській області.



**Рис. 4.3.** Симптоми почервоніння листкових пластинок і затримки росту на стоколосі безостому (*Bromus inermis* L.) в Київській області.

На дикорослих злаках ми виявляли симптоми почервоніння та затримки росту з травня по жовтень місяць в Київській області (рис. 4.4, рис. 4.5).



**Рис. 4.4** Симптоми почервоніння листкових пластинок на *Echinochloa crus-galli* в Київській області.



**Рис. 4.5.** Симптоми почервоніння листкових пластинок на *Digitaria sanguinalis* в Вінницькій області.

У Вінницькій області на дикорослих злаках ми також виявляли симптоми почервоніння (рис. 4.6).



a)

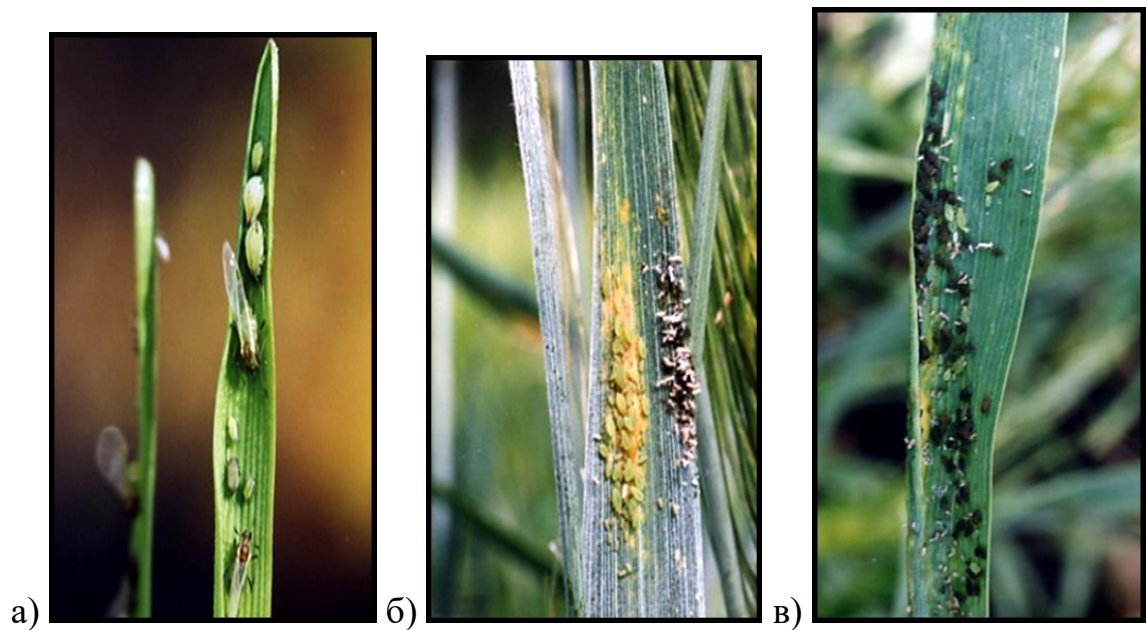


б)

**Рис. 4.6.** Симптоми почервоніння листкових пластинок на (а) і *Setaria pumila* (б) в Вінницькій області.

Відібрані зразки злакових були протестовані на наявність вірусів групи жовтої карликовості.

Важливо зауважити, що при обстеженні посівів та відборі зразків ми часто спостерігали наявність попелиць, які є переносниками вірусів жовтої карликовості. На пшениці, зазвичай в червні місяці, протягом 2020-2023 років ми виявляли попелиць *Sitobion avena* (велика злакова), що можуть бути ефективними векторами BYDV-PAV і BYDV-MAV; *Schizaphis graminum* (звичайна злакова), яка є ефективним переносником BYDV-SGV; а також *Rhopalosiphum padi* (звичайна черемхова), яка є ефективним переносником кількох вірусів групи жовтої карликовості BYDV-PAV, CYDV-RPV, CYDV-RPS (рис. 4.7). Попелиць ідентифікували за морфологічними ідентифікаційними ключами [41-43].



**Рис. 4.7.** Переносники вірусів групи жовтої карликовості виявлені в посівах Київської та Вінницької областей: а) *Sitobion avena*; б) *Schizaphis graminum*; в) *Rhopalosiphum padi*.

Рослини із симптомами типовими для вірусного ураженнями вірусами групи жовтої карликовості та заселеними попелицями відбирали для подальших досліджень.

#### **4.2. Ідентифікація вірусів групи жовтої карликовості за допомогою TAS-ELISA**

Ідентифікацію вірусів групи жовтої карликовості у відібраних зразках здійснювали методом твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА) в Triple Antibody Sandwich-ELISA (TAS-ELISA) модифікації із застосуванням комерційних тест-систем фірми Agdia (США) за стандартною методикою дотримуючись рекомендацій виробника [44-45] .

Дані тест-системи засновані на використанні моноклональних антитіл, тому перехресно не реагують з іншими видами вірусів з групи жовтої карликовості. В симптоматичних зразках злакових рослин ми виявляли вірус жовтої карликовості ячменю-PAV (barley yellow dwarf virus-PAV, BYDV-PAV), вірусу жовтої карликовості ячменю-MAV (barley yellow dwarf virus-MAV, BYDV-MAV) і вірусу жовтої карликовості злакових-RPV (cereal yellow dwarf virus-RPV, CYDV-RPV). При проведенні тестування використовували комерційні контролі (позитивний і негативні). Значення поглинання, що перевищували негативні контролі більше ніж у три рази і були  $\geq 0.2$ , вважалися позитивними.

У результаті проведеної роботи встановлено, що рослини пшениці, відібрані у Вінницькій і Київській областях інфіковані BYDV-PAV; з 19 протестованих зразків ураженими BYDV-PAV було 11, що складає 57,9%. Отримані дані співпадають з літературними даними щодо ураження пшениці в Україні BYDV-PAV [46]. Слід зазначити, що ми вперше в Україні виявили BYDV-PAV в рослинах *Echinochloa crus-galli* відібраних в Київській області в 2021 році та *Echinochloa crus-galli* відібраних у Вінницькій області в 2020 році. Також, вперше ідентифіковано BYDV-MAV у посівах вівса в Київській області та представниках дикої флори, *Elymus repens* і *Echinochloa crus-galli*, відібраних у Вінницькій області в 2020 році (Таблиця 1).

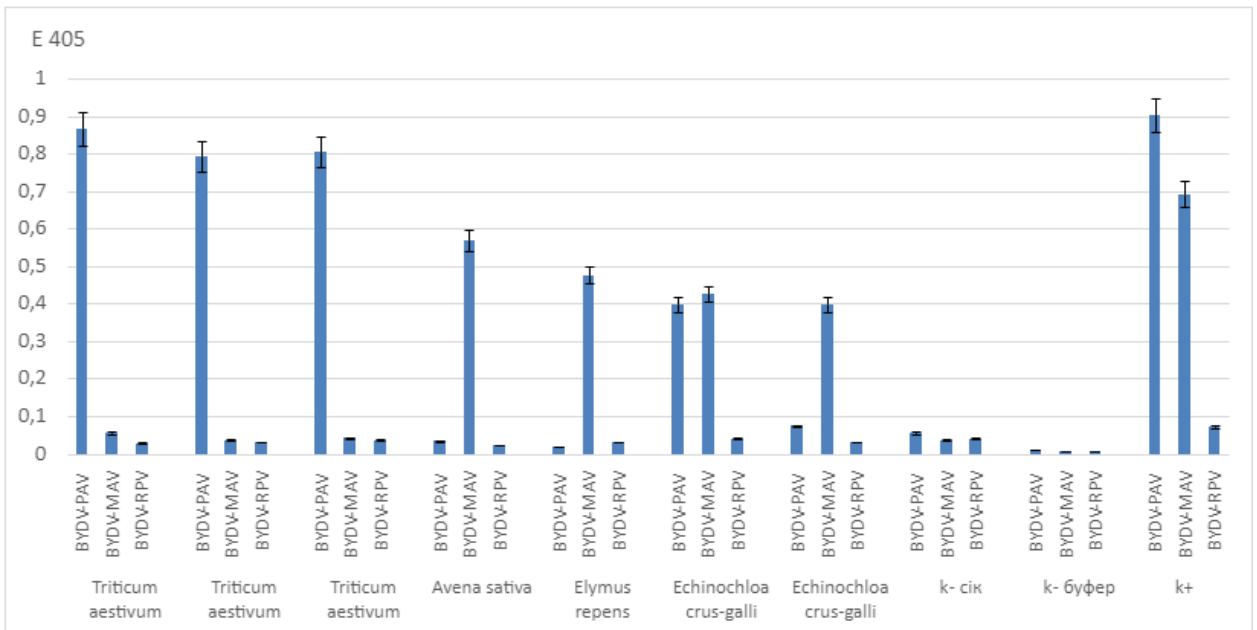
Таблиця 4.1

**Виявлення вірусів групи жовтої карликовості в агробіоценозах  
України у 2020-2023 роках за допомогою TAS-ELISA**

| рік  | рослина                       | кіль-<br>кість,<br>шт | Результати TAS-ELISA |              |              |
|------|-------------------------------|-----------------------|----------------------|--------------|--------------|
|      |                               |                       | BYDV-<br>PAV         | BYDV-<br>MAV | CYDV-<br>RPV |
| 2020 | <i>Triticum aestivum</i>      | 5                     | 3                    | 0            | 0            |
|      | <i>Hordeum vulgare</i>        | 3                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Secale cereale</i>         | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Avena sativa</i>           | 2                     | 0                    | 1            | 0            |
|      | × <i>Triticosecale sp.</i>    | 2                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Elymus repens</i>          | 2                     | 0                    | 1            | 0            |
|      | <i>Lolium perenne</i>         | 3                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Dactylis glomerata</i>     | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Setaria viridis</i>        | 3                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Setaria pumila</i>         | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Digitaria sanguinalis</i>  | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Echinochloa crus-galli</i> | 3                     | 2                    | 1            | 0            |
| 2021 | <i>Triticum aestivum</i>      | 6                     | 4                    | 0            | 0            |
|      | <i>Hordeum vulgare</i>        | 2                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Avena sativa</i>           | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Hordeum murinum</i>        | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Echinochloa crus-galli</i> | 1                     | 1                    | 0            | 0            |
| 2022 | <i>Triticum aestivum</i>      | 3                     | 2                    | 0            | 0            |
|      | <i>Hordeum vulgare</i>        | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Bromus inermis</i>         | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Echinochloa crus-galli</i> | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
| 2022 | <i>Triticum aestivum</i>      | 5                     | 2                    | 0            | 0            |
|      | <i>Hordeum vulgare</i>        | 1                     | 0                    | 0            | 0            |
|      | <i>Echinochloa crus-galli</i> | 2                     | 0                    | 0            | 0            |

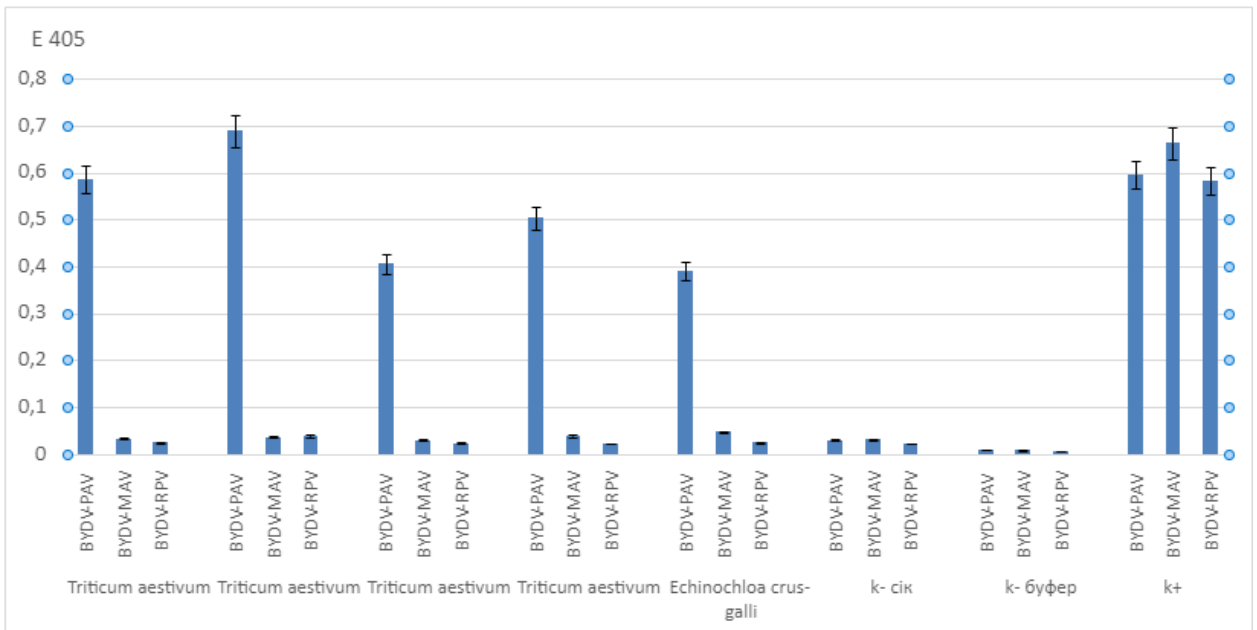
|   |        |    |    |   |  |
|---|--------|----|----|---|--|
| 3 |        |    |    |   |  |
|   | всього | 52 | 14 | 3 |  |

Аналіз даних отриманих в 2020 році показав, що поглинання у вірус-позитивних зразках різне, що свідчить про різну кількість вірусу в протестованих зразках, адже при тестуванні ми брали однакову масу матеріалу і додавали однаковий об'єм буферного розчину. В озимій пшениці концентрація вірусу була вища, ніж у вівсі та диких злаках. Слід зазначити, що в одному зразку *Echinochloa crus-galli* була сумісна інфекція barley yellow dwarf virus-PAV і barley yellow dwarf virus-MAV (рис. 4.8). Відсоток вірус-позитивних зразків в 2020 році для barley yellow dwarf virus-PAV складав 18,5 %, а для barley yellow dwarf virus-MAV - 11 % від загальної кількості протестованих симптоматичних зразків злакових рослин культурної та дикої флори. Вірус жовтої карликовості злакових-RPV (cereal yellow dwarf virus-RPV) не було виявлено в 2020 році.



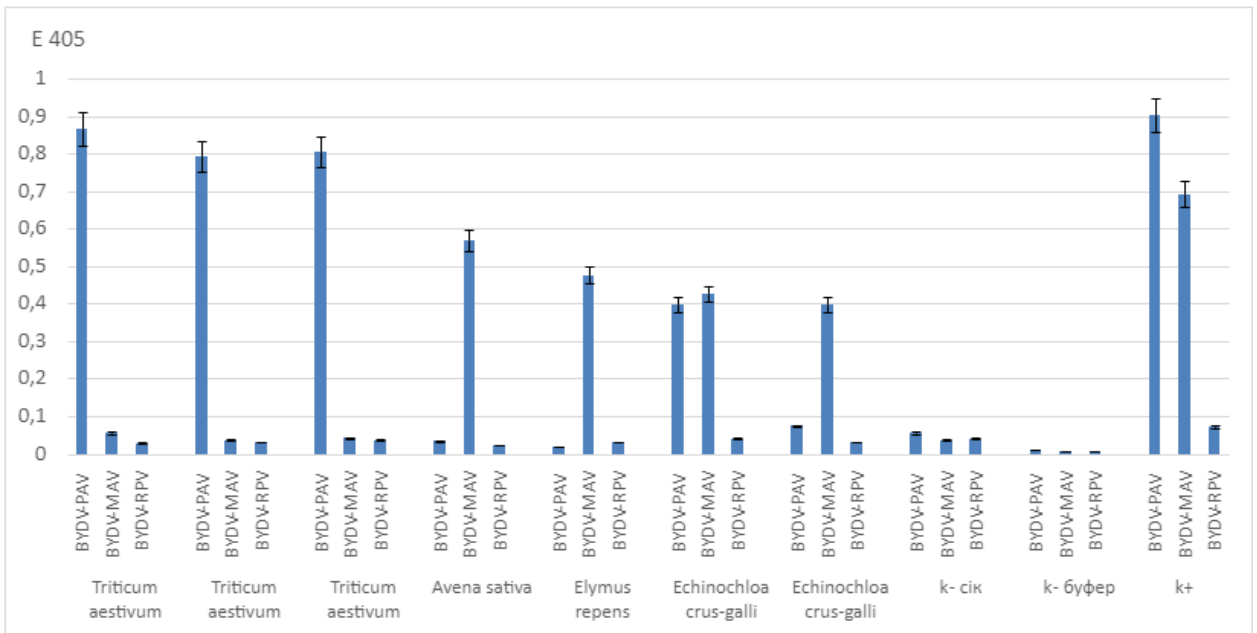
**Рисунок 4.8.** Тестування на наявність вірусів за допомогою імуноферментного аналізу симптоматичних зразків злакових відібраних у 2020 році

В 2021 році за допомогою імуноферментного аналізу було ідентифіковано лише один вірус з групи вірусів жовтої карликовості, а саме barley yellow dwarf virus-PAV, зокрема на трьох зразках озимої пшениці та одному зразку Echinochloa crus-galli (рис. 4.9). Відсоток вірус-позитивних зразків в 2021 році складав 45,5 % від загальної кількості протестованих симптоматичних зразків злакових рослин культурної та дикої флори. Barley yellow dwarf virus-MAV та cereal yellow dwarf virus-RPV не було ідентифіковано в 2021 році.



**Рисунок 4.9.** Тестування на наявність вірусів за допомогою імуноферментного аналізу симптоматичних зразків злакових відібраних у 2021 році

При дослідженні симптоматичних зразків злакових культурної та дикої флори в 2022 році серологічним методом було встановлено ураження лише озимої пшениці одним вірусом, що належить до групи жовтої карликовості - barley yellow dwarf virus-PAV; відсоток уражених рослин складав 33,3 %. В 2023 році нам також вдалося виявити лише barley yellow dwarf virus-PAV на озимій пшениці з частотою 25 % від загальної кількості протестованих зразків (рис. 4.10). Не було ідентифіковано barley yellow dwarf virus-MAV та cereal yellow dwarf virus-RPV в 2022 та 2023 роках.

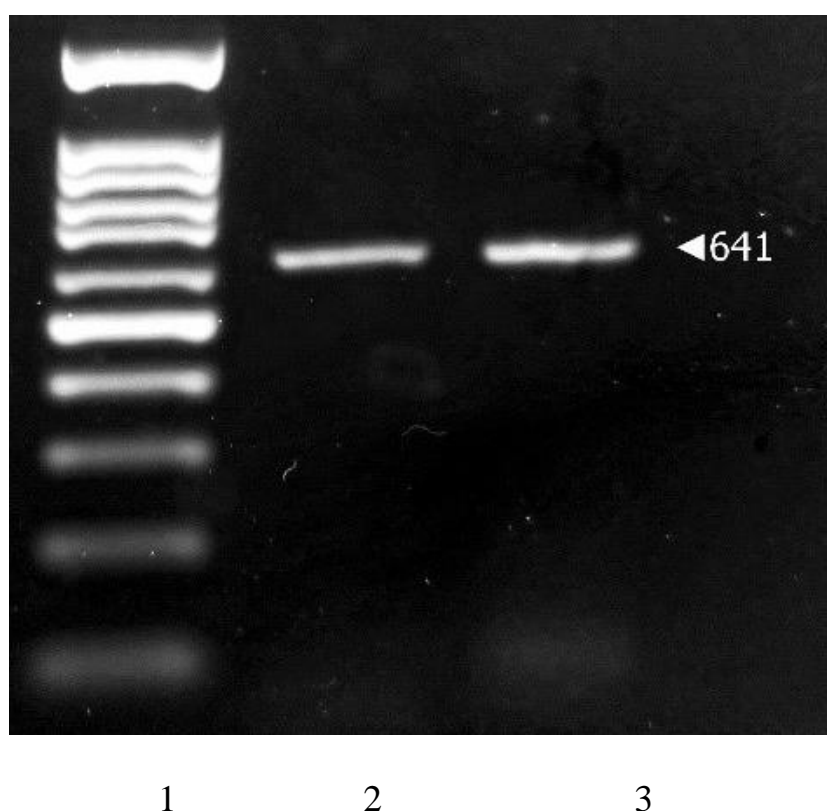


**Рисунок 4.10.** Тестування на наявність вірусів за допомогою імуноферментного аналізу симптоматичних зразків злакових відібраних у 2022 та 2023 роках

Таким чином в агробіоценозах Київської та Вінницької областей в 2020-2023 роках ми виявили лише barley yellow dwarf virus-PAV і barley yellow dwarf virus-MAV на різних представниках родини Poaceae; cereal yellow dwarf virus-RPV ми не ідентифікували. Barley yellow dwarf virus-PAV за чотири роки досліджень виявлявся значно частіше, майже 27 % (14 з 52) протестованих зразків злакових з типовими вірусними симптомами були уражені даним вірусом, а barley yellow dwarf virus-MAV уражував лише 5,7% (3 з 52) від загальної кількості протестованих зразків.

### 4.3. Виявлення вірусів групи жовтої карликовості в Україні молекулярними методами

Для дослідження українських ізолятів вірусів жовтої карликовості ячменю молекулярними методами ми проводили ідентифікацію BYDV-PAV і BYDV-MAV за допомогою методу зворотньої транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) з використанням праймерів BYspF (5'-CCACTAGAGAGGTGGTGAATG-3') і BYspR (5'-CCGGTGTGAGGAGTCTACC-3') [47]. В результаті проведеної роботи було отримано продукти довжиною 641 п.н., які включають ділянку гену білка оболонки та міжгенну область у позиціях геному 2839-3479 вірусів BYDVs (рис. 4.8).



**Рисунок 4.8.** Візуалізація ПЛР-продуктів в агарозному гелі вірусів злакових: 1 – ДНК маркери (CSL-MDNA-100BP, Cleaver Scientific); BYDV-PAV (2) та BYDV-MAV (3).

Ампліфіковані продукти ЗТ-ПЛР розміром 641 п.н. були сиквеновані та задепоновані в базу даних NCBI (GenBank), а також проведено філогенетичний аналіз ділянки гена білка оболонки довжиною 482 пн, що фланкує ділянку білка оболонки в позиції 2918-3400.

При філогенетичному дослідженні вірусів групи жовтої карликовості, обраних з GenBank (Таблиця 4.2), було показано, що ідентифікований в Україні на озимій пшениці ізолят BYDV-PAV, названий BYDV-PAV\_Ukr і депонований в базу даних NCBI, GenBank Accession No OK338686, має найвищу гомологію 96 % з естонським ізолятом BYDV-PAS з озимої пшениці (GenBank: MK012650). Філогенетичний аналіз також вказав на тісний зв'язок BYDV-PAV\_Ukr з PAV і PAS, які відрізняються від інших ізолятів MAV і GAV. Український BYDV-PAV і відомі ізоляти BYDV-PAV і BYDV-PAS утворили добре підтримувану групу, але BYDV-PAV\_Ukr має віддалену спорідненість з BYDV-MAV, отриманим нами в Україні з вівса (рис. 4.9). Хоча український ізолят BYDV-PAV\_Ukr має найвищу ідентичність до ізолятів BYDV-PAS (96 % до естонського ізоляту з озимої пшениці, GenBank: MK012650), ми класифікували його як BYDV-PAV головним чином тому, що ізолят BYDV-PAV\_Ukr був розпізнаний в TAS-ELISA з використанням комерційних тест-систем з моноклональними антитілами як BYDV-PAV. На жаль, дані дослідження не дозволили нам позначити вірус як BYDV-PAV або BYDV-PAS через коротку послідовність CP та відсутність більш розбіжних амінокислотних ділянок CP (розташованих у двох гіперваріабельних ділянках, які охоплюють амінокислоти 45–60 та/або 155 і 168), які використовуються для позначення PAV або PAS.

Філогенетичний аналіз послідовності BYDV-MAV, виділений з вівса та названий як BYDV-MAV\_Ukr, має найвищу гомологію ізолятами KU893151 BYDV-GAV на ячмені з Польщі, FJ645758 BYDV-MAV на пшениці з Чехії. Найбільшу схожість наш відібраний ізолят з польським приблизно 90%, що свідчить про те, що можна припустити спираючись на результати імуноферментного аналізу та секвенуванню, а також філогенетичного аналізу що відібрані ізоляти і справді відносяться до вірусу жовтох карликовості -MAV.

Таблиця обраних ізолятив з GenBank

| Код ГенБанку        | Рослина господар            | Країна         |
|---------------------|-----------------------------|----------------|
| DO631165 BYDV-PAV   | <i>Elymus multisetus</i>    | США            |
| EF408155 BYDV-PAS   | Пшениця                     | Нова Зеландія  |
| EF408153 BYDV-PAS   | <i>Microlaena stipoides</i> | Нова Зеландія  |
| LC746084 BYDV-PAV   | Пшениця                     | Південна Корея |
| MZ773946.1_BYDV-MAV | Ячмінь                      | Україна        |
| KU893149.1_BYDV-MAV | Ячмінь                      | Польща         |
| KP341632.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341625.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341616.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341612.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341611.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341610.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341585.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341580.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341577.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341576.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341572.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| KP341560.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| EU386793.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| EU386785.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| EU386783.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| EU386778.1_BYDV-GAV | Пшениця                     | Китай          |
| OK338686.1_BYDV_PA  | Пшениця                     | Україна        |

|                                       |                        |        |
|---------------------------------------|------------------------|--------|
| V                                     |                        |        |
| MN807304.1_BYDV                       | Пшениця                | Чехія  |
| FJ645753.1_BYDV                       | Пшениця                | Чехія  |
| FJ645756.1_BYDV                       | Ячмінь                 | Чехія  |
| EU863652.1_BYDV-PAS                   | Весняна пшениця        | Чехія  |
| FJ645759.1_BYDV_barley_Czech_Republic | Ячмінь                 | Чехія  |
| EU863653.1_BYDV_PAS                   | Озимий ячмінь          | Чехія  |
| FJ645752.1_BYDV_                      | Ячмінь                 | Чехія  |
| MN780852.1_BYDV                       | Пшениця                | Чехія  |
| MN780853.1_BYDV                       | Пшениця                | Чехія  |
| MN780850.1_BYDV                       | Пшениця                | Чехія  |
| FJ645757.1_BYDV_                      | Пшениця                | Чехія  |
| DQ907157.1_BYDV_PAS                   | Злаки                  | США    |
| DQ907150.1_BYDV_PAS                   | Злаки                  | США    |
| KJ816646.1_BYDV_PAV                   | Злаки                  | Турція |
| KJ816649.1BYDV_PAV                    | Стоколос<br>волотистий | Турція |
| KJ816645.1_BYDV_PAV                   | Вівсе                  | Турція |
| KJ816648.1_BYDV_PAV                   | Стоколос<br>волотистий | Турція |
| KF271792.1_BYDV_                      | Ячмінь                 | Туніс  |
| JX402453.1_BYDV_                      | Ячмінь                 | Туніс  |
| KX883261 Tombus_like                  | Яблучний равлик        | Китай  |



**Рис. 4.9.** Філогенетичне дерево побудоване за методом найближчих сусідів (Neighbor-Joining, NJ), що демонструє філогенетичні зв'язки між ізолятами BYDVs. Для побудови дерева використовували частину гену білка оболонки. Українські ізоляти, досліджені в цій роботі, показані кругами.

Узагальнюючи результати серологічного скринінгу та молекулярного дослідження можна сказати про циркуляцію в агроценозах України двох вірусів групи жовтої карликовості: BYDV-PAV і BYDV-MAV в 2020-2023 роках. Підсумовуючи, можна сказати, що це дослідження дало додаткове розуміння біології, епідеміології та філогенії вірусів групи жовтої карликовості, для підтвердження наших висновків необхідне широке дослідження цих збудників та їх переносників у різних (переважно південних та західних) регіонах України. Однак це дослідження описує еволюційні зв'язки між українськими і світовими ізолятами даних патогенів. Крім того, вперше проведено філогенетичний аналіз barley yellow dwarf virus-PAV і barley yellow dwarf virus-MAV в Україні, описано еволюційні зв'язки українських ізолятів з відомими світовими ізолятами.

Також нами вперше в Україні було виявлено BYDV-PAV в рослинах плоскухи звичайної (*Echinochloa crus-galli*) та BYDV-MAV в рослинах пирія повзучого (*Elymus repens*) і плоскухи звичайної (*Echinochloa crus-galli*) за допомогою серологічного тестування. Можна зробити висновок, що дані бур'яни є резерваторами вірусів жовтої карликовості в агроценозах України.

## ВИСНОВКИ

1. Візуальні обстеження посівів, серологічне тестування та молекулярно-біологічне дослідження зразків злаків у 2020-2023 роках показали наявність в агробіоценозах України двох вірусів групи жовтої карликовості, зокрема, *barley yellow dwarf virus-PAV* на рослинах пшениці *barley yellow dwarf virus-MAV* на рослинах вівса.

2. Результати серологічного тестування симптоматичних рослин показали, що плоскуха звичайна (*Echinochloa crus-galli*) і пирій повзучий (*Elymus repens*) є резерваторами *BYDV-PAV* і *BYDV-MAV* в агробіоценозах нашої країни.

3. На рослинах уражених *BYDV-PAV* і *BYDV-MAV* при відборі зразків були виявлені переносники даних вірусів, попелиці *Sitobion avenae* *Rhopalosiphum padi*.

4. Серед вірусів групи жовтої карликовості в обстежених агроценозах домінує *barley yellow dwarf virus-PAV*, він уражував майже 27 % зразків від загальної кількості, а *barley yellow dwarf virus-MAV* уражував лише 5,7% протестованих зразків.

5. Вперше в Україні проведено філогенетичний аналіз *barley yellow dwarf virus-PAV* і *barley yellow dwarf virus-MAV*, описано еволюційні зв'язки українських ізолятів з відомими світовими ізолятами

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Україна збільшила експорт агропродукції на 7% цього року, виручивши \$22,9 млрд – мінагрополітики (2023) Україна експортувала агропродукції на \$22,9 млрд, на 7% більше, ніж у 2022 році - Forbes.ua. Available at: <https://forbes.ua/news/ukraina-zbilshila-eksport-agroproduksii-na-7-tsogo-roku-viruchivshi-229-mlrd-minagropolitiki-27122023-18169>.
2. Enespa, Chandra, P. and Awasthi, L.P. (2020) “Plant virus taxonomy,” *Applied Plant Virology*, pp. 421–434. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818654-1.00029-3>.
3. Rao, G.P. and Reddy, M.G. (2020) “Overview of yield losses due to plant viruses,” *Applied Plant Virology*, pp. 531–562. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818654-1.00038-4>.
4. Kidanemariam, D. and Abraham, A. (2023) ‘Luteoviruses’, *Plant RNA Viruses*, pp. 57–77. doi:10.1016/b978-0-323-95339-9.00015-6.
5. *Taxon details ICTV*. Available at: [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202203764](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202203764)
6. Ghafari, M. *et al.* (2024) ‘Revisiting the origins of the sobemovirus genus: A case for ancient origins of plant viruses’, *PLOS Pathogens*, 20(1). doi:10.1371/journal.ppat.1011911
7. Trzmiel, K. and Hasiów-Jaroszewska, B. (2023) ‘Molecular characteristics of Barley yellow dwarf virus—pas—the main causal agent of barley yellow dwarf disease in Poland’, *Plants*, 12(19), p. 3488. doi:10.3390/plants12193488.
8. ViralZone is operated by the Swiss-Prot group of the SIB Swiss Institute of Bioinformatics License & Disclaimer Privacy Policy *Luteovirus (taxid:12036)*, *ViralZone is operated by the Swiss-Prot group of the SIB Swiss*

*Institute of Bioinformatics License & Disclaimer Privacy Policy*. Available at: [https://viralzone.expasy.org/609.html?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/609.html?outline=all_by_species).

9. Shen, C. *et al.* (2020) ‘Barley yellow dwarf virus-gav-derived vsirnas are involved in the production of wheat leaf yellowing symptoms by targeting chlorophyll synthase’, *Virology Journal*, 17(1). doi:10.1186/s12985-020-01434-7.

10. Choudhury, S. *et al.* (2019) ‘Identification of new QTL contributing to barley yellow dwarf virus-pav (BYDV-PAV) resistance in wheat’, *Plant Disease*, 103(11), pp. 2798–2803. doi:10.1094/pdis-02-19-0271-re.

11. Sõmera, M. *et al.* (2021) ‘ICTV Virus Taxonomy Profile: Solemoviridae 2021’, *Journal of General Virology*, 102(12). doi:10.1099/jgv.0.001707.

12. Wei, S. *et al.* (2023) ‘Global molecular evolution and phylogeographic analysis of Barley yellow dwarf virus based on the CP and MP genes’, *Virology Journal*, 20(1). doi:10.1186/s12985-023-02084-1.

13. Van den Eynde, R., Van Leeuwen, T. and Haesaert, G. (2020) ‘Identifying drivers of spatio-temporal dynamics in Barley yellow dwarf virus epidemiology as a critical factor in disease control’, *Pest Management Science*, 76(8), pp. 2548–2556. doi:10.1002/ps.5851.

14. Kern, M. *et al.* (2021) ‘Infection of susceptible/tolerant barley genotypes with barley yellow dwarf virus alters the host plant preference of *Rhopalosiphum padi* clones depending upon their ability to transmit BYDV’, *Journal of Pest Science*, 95(1), pp. 215–229. doi:10.1007/s10340-021-01367-2.

15. Domier, L.L. and D’Arcy, C.J. (2008) ‘Luteoviruses’, *Encyclopedia of Virology*, pp. 231–238. doi:10.1016/b978-012374410-4.00438-6.

16. Deutsch, C.A. *et al.* (2019) “Increase in crop losses to insect pests in a warming climate,” *Science*, 361(6405), pp. 916–919. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aat3466>.

17. Yazdkhasti, E., Hopkins, R.J. and Kvarnheden, A. (2021) ‘Reservoirs of plant virus disease: Occurrence of wheat dwarf virus and barley/cereal yellow dwarf viruses in Sweden’, *Plant Pathology*, 70(7), pp. 1552–1561. doi:10.1111/ppa.13414.
18. Nancarrow, N. *et al.* (2019) “Prevalence and incidence of yellow dwarf viruses across a climatic gradient: A four-year field study in southeastern Australia,” *Plant Disease*, 102(12), pp. 2465–2472. Available at: <https://doi.org/10.1094/pdis-01-18-0116-re>.
19. *Rhopalosiphum Padi* (no date) *AphID*. Available at: [https://aphid.aphidnet.org/Rhopalosiphum\\_padi.php](https://aphid.aphidnet.org/Rhopalosiphum_padi.php)
20. Domier, L.L. (2008) ‘Barley yellow dwarf viruses’, *Encyclopedia of Virology*, pp. 279–286. doi:10.1016/b978-012374410-4.00637-3.
21. Guo, M. *et al.* (2022) “Complete genome sequence of a novel wheat-infecting polerovirus associated with yellowing dwarf disease in China,” *Archives of Virology*, 167(3), pp. 983–987. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05360-7>.
22. Ilbağı, H., Masonbrink, R.E. and Miller, W.A. (2022) “The complete nucleotide sequence of Barley yellow dwarf virus-pav from wheat in Turkey,” *Microbiology Resource Announcements*, 11(10). Available at: <https://doi.org/10.1128/mra.00745-22>.
23. Adhikari, A. *et al.* (2020) “Barley yellow dwarf virus-pav is the dominant species causing barley yellow dwarf disease in South Dakota and Minnesota,” *Crop Protection*, 134, p. 105171. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105171>.
24. Hao, X. *et al.* (2021) “Rescue of an infectious cDNA clone of Barley yellow dwarf virus-gav,” *Phytopathology*®, 111(12), pp. 2383–2391. Available at: <https://doi.org/10.1094/phyto-11-20-0522-r>.

25. Minato, N. *et al.* (2022) “Manipulation of insect vectors’ host selection behavior by Barley yellow dwarf virus is dependent on the host plant species and viral co-infection,” *Life*, 12(5), p. 644. Available at: <https://doi.org/10.3390/life12050644>.

26. Walls, J., Rajotte, E. and Rosa, C. (2019) ‘The past, present, and future of Barley yellow dwarf management’, *Agriculture*, 9(1), p. 23. doi:10.3390/agriculture9010023.

27. Пасічник Л.А., Буценко Л.М., Гуляєва Г.Б., Токовенко І.П., Курченко І.М., Сирчін С.О., Юр’єва О.М., Снігур Г.О., Шевченко О.В., Будзанівська І.Г., Кириленко Л.В., Сушанович Д., Калініченко А.В., Демченко О.А., Патика В.П. За редакцією Л.А. Пасічник. – Вінниця: ХВОРОБИ ПШЕНИЦІ «Віндрук», (2019). 139с. Available at: [https://www.researchgate.net/profile/Oleksiy-Shevchenko/publication/337257248\\_Wheat\\_Diseases/links/5dcd614fa6fdcc7e137f5be5/Wheat-Diseases.pdf?origin=publication\\_detail](https://www.researchgate.net/profile/Oleksiy-Shevchenko/publication/337257248_Wheat_Diseases/links/5dcd614fa6fdcc7e137f5be5/Wheat-Diseases.pdf?origin=publication_detail)

28. Rashidi, M. *et al.* (2021) ‘Grassy weeds and corn as potential sources of barley yellow dwarf virus spread into winter wheat’, *Plant Disease*, 105(2), pp. 444–449. doi:10.1094/pdis-05-20-1004-re.

29. Nancarrow, N. *et al.* (2021) ‘Yield losses caused by Barley yellow dwarf virus-pav infection in wheat and barley: A three-year field study in south-eastern Australia’, *Microorganisms*, 9(3), p. 645. doi:10.3390/microorganisms9030645.

30. Mc Namara, L. *et al.* (2020) ‘Management of yellow dwarf disease in Europe in a post-neonicotinoid agriculture’, *Pest Management Science*, 76(7), pp. 2276–2285. doi:10.1002/ps.5835.

31. Snihur, H. *et al.* (2018) *Widespread viral diseases endangering cereal crops in Ukraine*, *Mikrobiolohichniy Zhurnal*. Available at: <https://scholar.archive.org/work/lep3k2cudfeqno266u4bm4sode>.

32. Lidiya T. Mishchenko 1, Alina A. Dunich 1, Ivan A. Mishchenko, Vira P. Petrenkova and Tetyana I. Mukha Snihur, H. *et al.* (2018) ‘Widespread viral diseases endangering cereal crops in Ukraine’, *Mikrobiolohichni Zhurnal*, 80(3), pp. 103–116. [doi:10.15407/microbiolj80.03.103](https://doi.org/10.15407/microbiolj80.03.103).
33. Kyrychenko, A. *et al.* (2022) First report of Barley yellow dwarf virus-mav infecting *Avena sativa* L. in Ukraine - *Journal of Plant Pathology*, SpringerLink. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42161-022-01209-9>.
34. Rashidi, M. *et al.* (2021) “Grassy weeds and corn as potential sources of barley yellow dwarf virus spread into winter wheat,” *Plant Disease*, 105(2), pp. 444–449. Available at: <https://doi.org/10.1094/pdis-05-20-1004-re>.
35. Rong, W. *et al.* (2018) “Molecular and ultrastructural mechanisms underlying yellow dwarf symptom formation in wheat after infection of Barley yellow dwarf virus,” *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), p. 1187. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms19041187>.
36. Mishchenko, L. *et al.* (2021) “Wheat dwarf virus and its impact on the 2020 harvest in some regions of Ukraine,” *Karantin i zahist roslin*, (1), pp. 3–9. Available at: <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2021.1.3-9>.
37. Mishchenko, L.T. and Dunich, A.A. (2021) ‘Viral and fungal diseases of wheat in Ukraine: A threat to food security’, *ACHIEVEMENTS OF UKRAINE AND THE EU IN ECOLOGY, BIOLOGY, CHEMISTRY, GEOGRAPHY AND AGRICULTURAL SCIENCES*, pp. 391–409. [doi:10.30525/978-9934-26-086-5-31](https://doi.org/10.30525/978-9934-26-086-5-31)
38. *Assaying levels of plant virus by Elisa* (no date) Springer Nature Experiments. Available at: <https://experiments.springernature.com/articles/10.1385/0-89603-385-6:455>
39. Rydzak, P. *et al.* (2020) ‘Combining multiplex PCR and high-resolution melting for the detection and discrimination of arthropod transmitted viruses of cereals’, *Journal of Virological Methods*, 278, p. 113823. doi:[10.1016/j.jviromet.2020.113823](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113823).

40. R.L.Blackman and V.F.Eastop John Wiley & Sons Ltd, Chicheste (2006). Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs Volume 2. The Aphids., in conjunction with The Natural History Museum, London, Hardcover, 1439 pp
41. Heie, O.E. (1986) The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. III. Family Aphididae: subfamily Pterocommatinae and tribe Aphidini of subfamily Aphidinae. *Fauna Entomol Scand.*, 17: 1-314 pp.
42. Мамонтова В. О. (1959.) *Злакові попелиці України.*— К.: Вид-во АН УРСР, — 94 с.
43. M.F. Clark, A.N. Adams // *J. Gen. Virol* (1977). *Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses* – V. 34 (3). – P. 475-483.
44. Ward E. S.J. Foster, B.A. Fraaije, H.A. McCartney (2004) Plant pathogen diagnostics: Immunological and nucleic acid-based approaches *Ann. Appl. Biol.* . – V. 145. – P. 1-16.
45. A, K. *et al.* (2022) 'Weeds as reservoirs of viruses in agrobiocenosis of cereal crops in Ukraine.', *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 84(6).
46. J., K.K. First Report of Barley yellow dwarf virus-PAS in Wheat and Barley Grown in the Czech Republic, *APS Journals*. Available at: <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-11-1587B>