

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № ____ засідання кафедри

від « ____ » _____ 2024 р.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСНИХ ЗБУДНИКІВ КАРЛИКОВОЇ
МОЗАЇКИ КУКУРУДЗИ В УКРАЇНІ**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Власової Тетяни Юріївни
Науковий керівник від кафедри
д.б.н., доцент Шевченко Т.П.

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

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Характеристика карликової мозаїки кукурудзи та її збудників.....	5
1.1. Поширення і шкодочинність хвороби у світі.....	5
1.2. Характеристика вірусів, що викликають хворобу карликової мозаїки.....	8
1.3. Характеристика передачі збудників карликової мозаїки кукурудзи.....	12
1.4. Заходи боротьби з вірусними хворобами кукурудзи.....	16
РОЗДІЛ 2. Методи діагностики вірусів кукурудзи.....	23
2.1. Візуальна діагностика вірусних хвороб кукурудзи.....	23
2.2. Серологічні методи дослідження.....	28
2.3. Молекулярно-біологічна ідентифікація вірусів.....	30
РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи досліджень.....	32
3.1. Об'єкти досліджень.....	32
3.2. Матеріали та методи досліджень.....	32
3.2.1 Візуальна діагностика вірусних хвороб.....	32
3.2.2. Імуноферментний аналіз.....	33
3.2.3. Трансмійна електронна мікроскопія.....	34
3.2.4. Статистична обробка результатів.....	35
РОЗДІЛ 4. Результати досліджень та обговорення.....	36
4.1. Виявлення симптомів хвороби карликової мозаїки кукурудзи в посівах різних регіонів України.....	36
4.2. Ідентифікація вірусів за допомогою імуноферментного аналізу.....	39
4.3. Електронномікроскопічне дослідження.....	42
4.4. Визначення переносників вірусів.....	43
ВИСНОВКИ	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	46

ВСТУП

Виявлення вірусних збудників карликової мозаїки кукурудзи в Україні є актуальною та важливою проблемою в сільському господарстві. Кукурудза є однією з основних культур в Україні, що використовується як корм для тварин і сировина для переробки. Саме Україна є одним з провідних виробників кукурудзи у світі, у 2023 році – кукурудза наймасовіший за обсягом експортний товар в Україні. Карликова мозаїка кукурудзи є серйозним захворюванням, яке може значно знизити врожайність культури, вплинути на якість продукції та призвести до економічних втрат для сільськогосподарських підприємств.

Дослідження вірусних збудників карликової мозаїки кукурудзи має на меті виявлення конкретних вірусів та їхніх особливостей, що дозволить розробити ефективні заходи контролю за цим захворюванням. Наявність точної інформації про вірусні збудники дозволить розробити програми боротьби з карликовою мозаїкою кукурудзи, використовуючи сучасні методи молекулярної біології та генетичної інженерії.

Україна є одним з провідних виробників кукурудзи в світі, тому дослідження вірусів, які спричиняють карликову мозаїку кукурудзи, має велике значення для підтримки стабільності виробництва цієї важливої сільськогосподарської культури. Дана дипломна робота присвячена детальному вивченню вірусних збудників карликової мозаїки кукурудзи в умовах України з метою розробки ефективних стратегій контролю та запобігання поширенню цього захворювання.

Метою роботи було дослідження вірусів, які спричиняють карликову мозаїку кукурудзи в Україні, їх ідентифікація, поширення та способи передачі.

Для досягнення мети курсової роботи, можна виділити наступні завдання:

- 1) Дослідити літературні джерела про карликову мозаїку кукурудзи та вірусні збудники цієї хвороби.

- 2) Дослідити характеристики та особливості вірусних збудників карликової мозаїки кукурудзи, зокрема їхню морфологію, геном, біологічні властивості та механізми поширення.
- 3) Проведення експерименту. Збір зразків кукурудзи в різних регіонах України з вірусоподібними симптомами. Ідентифікація вірусного збудника захворювання кукурудзи.
- 4) Облік результатів та їх обговорення.

Виконання цих завдань дозволить дослідити вірусні збудники карликової мозаїки кукурудзи та їхній вплив на сільське господарство, а також розробити рекомендації для попередження та контролю цієї хвороби в Україні, що можуть бути корисними для аграрних підприємств. Крім того, така робота дозволить розширити знання про вірусні захворювання кукурудзи та їх вплив на сільське господарство загалом.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА КАРЛИКОВОЇ МОЗАЇКИ КУКУРУДЗИ ТА ЇЇ ЗБУДНИКІВ

1.1. Поширення і шкодочинність хвороби у світі

Вірусна хвороба карликової мозаїки є серйозною загрозою для кукурудзи, яка є однією з найважливіших культурних рослин у світі. Інфекція на рослинах кукурудзи впливає на стадії росту, площу листя, плодючість і зрілу масу, кількість насіння, урожайність, якість насіння і чутливість інфікованих рослин до інших патогенів. Ступінь патологічних змін, викликаних MDMV, головним чином залежить від чутливості сорту, фази розвитку рослини під час зараження, умов поживних речовин, води тощо.

Інфікування MDMV на ранніх стадіях затримує подальший розвиток приблизно на два тижні або більше [21]. Висота рослин кукурудзи, інфікованих MDMV, зменшується до 23% [33]. У крайніх випадках, особливо з інбрендними лініями кукурудзи, хворі рослини можуть становити 25-50% висоти здорових рослин [35]. Кількість качанів на рослину, особливо товарних качанів цукрової кукурудзи, суттєво зменшується внаслідок інфікування MDMV. Свіжа вага качанів може бути зменшена на 30% і більше. Качани рослин кукурудзи, інфікованих MDMV, погано заповнюються, а кількість зерен і рядів ядер зменшується. Самі ядра також зменшуються і таким чином вага 1000 зерен може бути зменшена на 26% [20].

Вірус карликової мозаїки кукурудзи суттєво впливає на загальну врожайність кукурудзи. Зменшення врожаю на рослину на родючому полі може становити до 42%. Однак у інбрендних ліній кукурудзи, особливо після пізнього посіву, урожайність може бути знижена на 75% або більше [35].

MDMV вважається одним із найбільш важливих патогенів сорго та кукурудзи в США. У 1967 році, через два роки після виявлення MDMV в Арканзасі, епідемії захворювання спостерігалися у високочутливих генотипів сорго вирощуваних в Техасі, з орієнтовними втратами врожаю понад 15%. Середня державна дохідність того року становила на 8% менше від середнього показника попереднього року. У 1968 році середня втрата доходу від MDMV-А була оцінена у 10%, проте захворюваність вірусом зросла з 25% до 30%. Вже в 1985 р., коли менше сприйнятливі генотипи сорго були використані, втрати врожаю були оцінені в 2%, а захворюваність становила 10% [15].

Економічне значення поширення карликової мозаїки на кукурудзу полягає у втратах врожаю та якості продукту. Зменшення врожаю може становити до 30%, залежно від стадії росту рослини та ступеня поширення хвороби. Крім того, хвороба може призводити до зниження якості зерна, збільшення вмісту шкідливих речовин та зниження тривалості зберігання продукту.

У світі є багато країн, в яких кукурудза є основним продуктом сільського господарства. Такі країни, як США, Китай, Бразилія, Індія та Мексика, вирощують значні обсяги кукурудзи та експортують її в інші країни. Втрати врожаю та якості продукту можуть призвести до значних економічних втрат для таких країн, які можуть вплинути на міжнародний ринок та підвищити ціни на продукти. Крім економічних наслідків для країн-виробників кукурудзи, хвороба карликової мозаїки також може мати соціальні наслідки для місцевих спільнот. Зменшення врожаю може призвести до зниження доходів сільських господарів та підвищення цін на продукт для місцевих споживачів. Крім того, хвороба може мати негативний вплив на здоров'я людей, які працюють у сільському господарстві та приймають участь у зборі врожаю.

Для запобігання поширенню хвороби карликової мозаїки необхідно вживати заходів захисту рослин, таких як обробка насіння, використання резистентних сортів кукурудзи та пестицидів для боротьби з комахами-

переносниками. Крім того, важливо проводити систематичний моніторинг хвороби та вчасно вживати заходів у разі виявлення її поширення.

Узагалі, враховуючи значення кукурудзи як одного з найважливіших продуктів сільського господарства, необхідно вдосконалювати методи боротьби з хворобами та збільшувати ресурси, які вкладаються в дослідження з цієї області. У результаті, зменшення поширення хвороб та збільшення врожаю може мати позитивний вплив на економіку, соціальний розвиток та здоров'я населення в цілому. Для ефективного контролю над хворобою карликової мозаїки на кукурудзі необхідно також розвивати міжнародну співпрацю у галузі захисту рослин та обміну досвідом. Досягнення цього можливе за допомогою взаємної підтримки та координації міжнародних науково-дослідницьких інститутів та організацій.

Значення розуміння та боротьби з хворобами рослин стає все більш важливим у зв'язку зі зростанням світової населення та підвищенням потреб у продовольстві. Наукові дослідження та впровадження ефективних методів боротьби з хворобами рослин, таких як карликова мозаїка на кукурудзі, є необхідні для забезпечення стабільного виробництва продовольства та збереження економічного розвитку в цілому.

Крім того, варто зазначити, що поширення хвороб на кукурудзі може мати значний екологічний вплив на середовище. Використання хімічних засобів боротьби з хворобами може мати негативний вплив на ґрунт та воду, а також на біорізноманіття в районах з високим рівнем виробництва кукурудзи. Тому, на додачу до розвитку ефективних методів боротьби з хворобами, необхідно розвивати такі методи вирощування кукурудзи, які зменшують використання хімічних засобів. Також, варто звернути увагу на зменшення втрат врожаю, які пов'язані з карликовою мозаїкою кукурудзи. Це може включати в себе розвиток ефективних методів контролю за зараженням рослин та вчасного виявлення хвороб. Крім цього варто звернути увагу на ефективне використання ресурсів, таких як вода та добрива, щоб забезпечити максимальний врожай та мінімальні втрати.

У кінцевому результаті, економічне значення поширення карликової мозаїки на кукурудзу може бути великим, залежно від розміру врожаю та впливу на ціни на кукурудзу на ринку. Ефективне управління цією проблемою може забезпечити стійке виробництво кукурудзи, що в свою чергу забезпечує стабільний розвиток сільського господарства та виробництва продовольства. Важливо також враховувати екологічні аспекти боротьби з карликовою мозаїкою. Деякі методи контролю за зараженням рослин можуть бути шкідливі для навколишнього середовища та людського здоров'я, тому необхідно знаходити ефективні методи, які не завдають шкоди екосистемі та не мають негативного впливу на здоров'я людей.

1.2. Характеристика вірусів, що викликають хворобу карликової мозаїки

Було доведено, що більше 50 вірусів можуть інфікувати кукурудзу, включаючи вірус мозаїки сорго (SrMV), вірус мозаїки сорго алепського (JGMV), вірус хлоротичної крапчастості кукурудзи (MCMV), та вірус хлоротичної карликовості кукурудзи (MCDV). Однак з-поміж цих вірусів, вірус карликової мозаїки кукурудзи є найбільш поширеним збудником хвороби цієї однодольної культури в усьому світі. Випадки карликової мозаїки кукурудзи були зафіксовані в Африці, США, Азії, Європі.

Вірус карликової мозаїки кукурудзи (MDMV) як і вірус мозаїки цукрової тростини (SCMV) класифікуються як родину *Potyviridae* і належать до роду *Potyvirus*. Обидва віруси мають позитивну одноланцюгову РНК. У 1964 році в Іллінойсі вперше було ідентифіковано згинальний паличкоподібний MDMV довжиною 750 нм і діаметром 12-15 нм (рис 1.1.). MDMV – це голопаразит, якому для розмноження та виживання потрібен вектор або господар. Зараженим рослинам потрібно до 15 днів, щоб проявити симптоми.



Рис 1.1. Схема віріонів представників роду *Potyvirus* [1]

Геном MDMV ssRNA (+) одноланцюговий лінійний, розміром 10 Кб. 3'-кінець має полі (А) тракт. 5'-кінець має зв'язаний з геномом білок (VPg) (рис. 1.2). РНК обох цих вірусів включає нетрансльовані ділянка (UTR) на обох кінцях і одну відкриту рамку зчитування (ORF) для кодування великого поліпротеїна. Вірусна РНК містить геном-зв'язуючий білок (VPg) на 5'-кінці РНК і полі (А) хвіст на 3'-кінці. Поліпротеїн цих вірусів розщеплюється протеазами P1-pro, HC-Pro та NIa-Pro на 10 функціонально-зрілих білків (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb, CP) з кількома функціями [2].

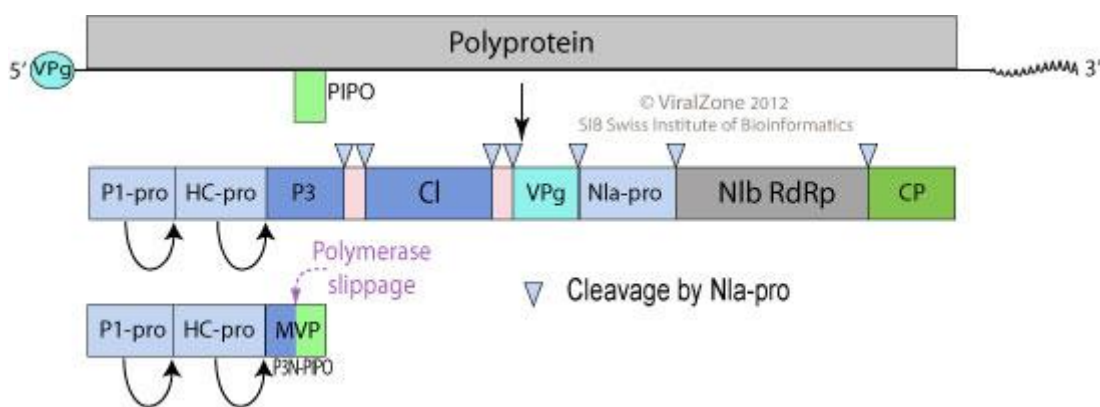


Рис. 1.2. Схема геному вірусів представників роду *Potyvirus* [1]

Білок P1 бере участь у реплікації вірусу і пов'язаний з широкою адаптацією вірусів до різних видів господаря. Послідовність цього білка є найменш консервативною, а величина його варібельності найвища. Білок HC-Pro є потужним інгібітором постраскрипційного мовчання РНК, який був виявлений першим і має декілька мішеней на шляху постраскрипційного мовчання РНК, що дозволяє регулювати накопичення різних малих інтерферуючих РНК. Крім того, коли HC-Pro зливається з P1, експресія P1/HC-Pro і його інгібіторна активність збільшуються. У білка P1 також є інгібіторна

функція постраскрипційного мовчання, яка є більш очевидною, ніж у HC-Pro. Однак, наявність HC-Pro знижує інгібіторну активність P1 щодо постраскрипційного мовчання РНК. Білок P3 бере участь у розмноженні, накопиченні і переміщенні вірусу від клітини до клітини. Білки 6K1 та 6K2 беруть участь у розмноженні та міжклітинному русі вірусу. Білок СІ характерний своєю геліказною активністю, що дозволяє йому боротись і долати захисні реакції рослин. Білок 6K2 пов'язаний з транспортуванням на великі відстані, а також індукує прояв симптомів і утворення везикул. Білок VPg може діяти як праймер в процесі реплікації вірусу. Він теж впливає на рух клітини і транспортуванням на великі відстані. Білок NIa-Pro розщеплює поліпептидні білки, бере участь у розмноженні вірусу, а також може бути пов'язаним зі специфікою господаря. Білок NIb бере участь у реплікації та каталізує утворення шаблонного і прайм-залежного поля (U). Білок CP відіграє роль у переміщенні вірусу від клітини до клітини та на великі відстані, у реплікації та передачі за допомогою вектора.

Гнучкий N-кінець білкової оболонки в основному забезпечує транспорт на великі відстані та системний транспорт, містить висококонцентрований мотив «Asp-Ala-Gly (DAG)», який необхідний для передачі вірусу попелиці, тоді як C-кінцеві ділянки переважно відіграють роль у процесі інкапсуляції та міжклітинного транспорту.

Крім того, обидва віруси містять додатковий консервативний білок PPO, який перекриває ген P3. Він впливає на рух вірусу між клітинами. PPO - це нова відкрита рамка зчитування (ORF), яка нещодавно була описана як експресія в результаті транскрипційного ковзання, специфічного для вірусної РНК-полімерази. Вона добре збережена та має сильну біоінформаційну кодуєчу сигнатуру. Білок P3N-PPO утворюється в результаті трансляції в рамці зчитування +2 відносно полівірусної довгої відкритої рамки зчитування і є злитим білком. Для переміщення від клітини до клітини потівірусний P3N-PPO взаємодіє з білком PCaP1 плазматичної мембрани хазяїна [42].

Раніше існувало значне непорозуміння в таксономії потівірусів, через величезний розмір групи і широку диверсифікацію видів [4]. Штами MDMV були розрізнені за допомогою серологічних характеристик та спектру рослин хазяїв. Проведене серологічне дослідження спорідненості 13 американських і 4 австралійських штамів MDMV і SCMV з використанням вірусоспецифічної поліклональної антисироватки, спрямованої на N-кінцеві ділянки білків їх оболонки, привело до визначення чотирьох груп вірусів: 1) MDMV (MDMV-A, MDMV-D, MDMV-E, MDMV-F); 2) SCMV (MDMV-B); 3) JGMV (MDMV-O); 4) SrMV, які утворюють підгрупу SCMV [4]. Це свідчить про те, що серологічний підхід може бути використаний як таксономічний параметр.

У межах діапазону рослин-хазяїв, що складається з двох основних штамів було виявлено, що MDMV-A інфікує рослину сорго алепське (*Sorghum halepense*), тоді як MDMV-B не здатний на його інфікування. MDMV-A було в подальшому відрізнено від MDMV-B на основі відносної молекулярної маси (Mr) їх РНК. Значення відносної молекулярної маси РНК для MDMV-A, визначене трьома різними методами, складало $3,3 \cdot 10^6$ Да, в той час як для MDMV-B ця величина складала $3,0 \cdot 10^6$ Да [6]. Порівняння нуклеотидного складу РНК показало, що штами MDMV-A і MDMV-B складаються з однакової кількості аденінової та гуанінової кислот. Тим не менш, високий вміст аденінової кислоти в цілому імовірно є характерним для потівірусів. Крім того, MDMV-A містить більшу кількість цитидинової, але меншу уридилової кислота, ніж MDMV-B [7].

Протягом довгого періоду збудниками даної хвороби вважались два потівіруси: вірус карликової мозаїки кукурудзи (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) та вірус мозаїки цукрової тростини (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) через подібну морфологію частинок, діапазон рослин-хазяїв, спосіб передачі та фізичні і фізико-хімічні властивості [17]. Віріони збудників нитчасті гнучкі довжиною 770 нм для MDMV та 750 нм для SCMV і 13 нм в діаметрі. Shukla et al. в 1992 році показали, що група потівірусів злакових складається з чотирьох різних вірусів включаючи MDMV, SCMV, вірус мозаїки сорго

(*Sorghum mosaic virus*, SrMV) та вірус мозаїки сорго алепського (*Johnsongrass mosaic virus*, JGMV) [34].

SCMV зустрічається в більшості частин світу, де вирощується цукрова тростина. Діапазон природних господарів обмежується членами *Poaceae*, за винятком штаму мозаїки абаки, який інфікує *Musa textilis*. Сорго, кукурудза та деякі дикі трави, що ростуть поблизу зараженої цукрової тростини, можуть бути інфіковані природним шляхом.

Віріони SrMV нитчасті гнучкі довжиною 750 нм і містять олРНК. Вірус індукує утворення цитоплазматичних, циліндричних та аморфних включень у клітині хазяїна. Передається механічним шляхом і попелицею неперсистентно. Зустрічається даний вірус в основному в США, а також в Індії, Японії. Віріони вірусу мозаїки сорго алепського аналогічно до вірусу мозаїки цукрової тростини, гнучкі ниткоподібні, довжиною 750 нм. Містять одноланцюгову РНК. JGMV передається механічно і декількома видами попелиць, провокує утворення цитоплазматичних циліндричних включень у клітинах-господарях. Зустрічається переважно на материковій частині Азії та в США, де викликає мозаїчні та некротичні хвороби сорго, мозаїчні хвороби кукурудзи та різних трав [48].

1.3. Характеристика передачі збудників карликової мозаїки кукурудзи

Попелиці є важливими переносниками вірусів рослин і можуть передавати віруси як персистентно, так і неперсистентно. Більше 200 видів вірусів рослин можуть передаватись неперсистентним шляхом за допомогою попелиць, особливо комах роду *Homoptera* з колючо-сисним ротовим апаратом. У родині *Aphididae*, до якої належать м'якотілі попелиці, понад 50% видів переносників можуть передавати понад 60% вірусів. Більше 20 різних видів попелиць можуть неперсистентно передавати MDMV, включаючи

Rhopalosiphum maidis (Fitch), *Myzus persicae* (Sulzer), *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus), *Rhopalosiphum poae* (Gill.), *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus) і *Rhopalosiphum fitchii* (Sand.) (рис.1.3). Передача SCMV так само відбувається переважно кількома видами попелиць, включаючи *Dactynotus ambrosiae*, *Hysteroneura setariae*, *Melanaphis sacchari*, *Rhopalosiphum maidis* і *Toxoptera graminum* неперсистентно (рис. 1.4). Мурахи також мають непрямий ефект передачі, якщо вони активно взаємодіють з попелицями на хворих полях.



Рис 1.3. Види попелиць, що передають MDMV неперсистентно:
А- *Rhopalosiphum maidis*, Б- *Myzus persicae*



Рис 1.4. Види попелиць, що передають SCMV неперсистентно:
А- *Dactynotus ambrosiae*, Б- *Hysteroneura setariae*, В - *Melanaphis sacchari*

MDMV має короткий період доступу (AAP) 10-30 секунд. Передача вірусу тісно пов'язана з утриманням вірусу на стилетах. Berger [21] також виявив, що зберігання MDMV було набагато довшим при збільшенні часу отримання. Раніше були зареєстровані періоди утримання близько 15-20 хвилин. Однак більш тривалі періоди до 240 хвилин також були зареєстровані

для отримання MDMV-A зеленою персиковою попелицею. Придатки попелиці – це місце, де вірусні частинки можуть залишатися перед тим, як інфікувати рослину. Два кодовані вірусом фактори, CP компонент віріону і допоміжний компонент – протеїназа (НС-Pro), сприяють прикріпленню вірусів до придатків попелиць при непрямому зв'язуванні (рис. 1.5).

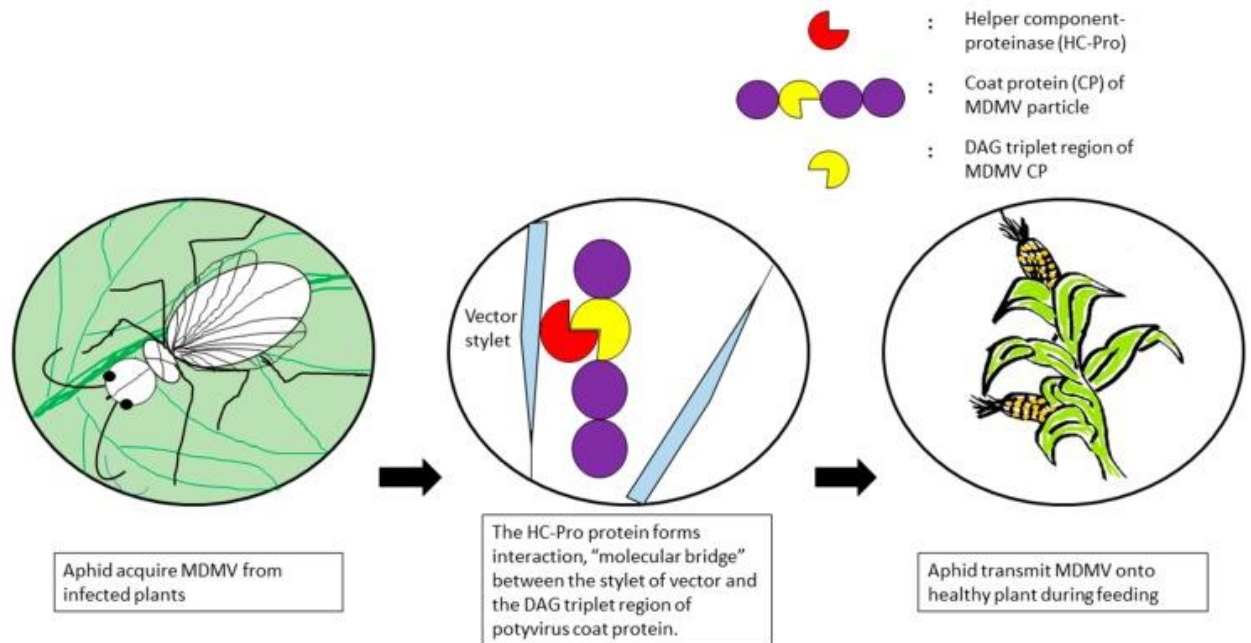


Рис. 1.5. Взаємодія між MDMV і векторним придатком

НС-Pro є неструктурним білком, який міститься в хворих рослинах і утворює взаємодію між стилетом вектора та білком оболонки вірусу, таким чином, виконуючи функцію «молекулярного містка». Передача потівірусів пов'язана з триплетною послідовністю трьох амінокислот DAG (Asp-Ala-Gly), поблизу N-кінцевої області білка оболонки. Є гіпотеза, що N-кінець білка не може взаємодіяти зі стилетом попелиці, якщо він діє як частина вірусної частинки, або як вільний білок. Це можна пояснити тим, що N-кінець знаходиться в недоступному стані, і для активації потрібна присутність НС-Pro, який розгортає білок оболонки. Оскільки триплет DAG в N-кінцевій ділянці білка покриву є вирішальним для передачі попелиці, заміна будь-якого з 3 амінокислотних залишків або залишку після мотиву DAG суттєво мінімізує передачу попелиці, але не механічну передачу вірусу. Незважаючи на те, що вірусні фактори передачі добре вивчені, рецептори попелиць, які утримують

інфекцію та передають її, залишаються невідомими. Однак, дослідження показують, що вони можуть бути знаходяться на дистальному краї пучка стилету.

Передача MDMV залежить від декількох факторів, що впливають на швидкість поширення вірусу. По-перше, голодуючі попелиці передають віруси ефективніше (15%), ніж не голодуючі (5%) [23], оскільки голодування забезпечує очищення шлунково-кишкового тракту від рослинних компонентів, що збільшує утримання віріонів у попелиць. Крім того, передача MDMV залежить від віку листя: концентрація вірусу є нижчою в старих листках, що зменшує передачу попелиці. Групова передача попелиці покращує ефективність передачі MDMV порівняно з одиночною передачею, що може бути пов'язано з коротким періодом зберігання та низькою швидкістю передачі вірусу. Ефективність передачі MDMV залежить від концентрації вірусу *in vivo* в кукурудзі, яка в свою чергу залежить від різних факторів, таких як харчування, вид господаря, температура та вік інфекції. Вид попелиці та штами вірусу також впливають на ефективність передачі. Крім того, температура та вологість грають важливу роль в епідеміології MDMV, оскільки вони впливають на ефективність та кількість переносників попелиць. Наприклад, низька температура та вологість на початку сезону сприяли розповсюдженню вірусів через високу популяцію *S. graminum*.

Крім передачі MDMV через попелицю, цей вірус також може передаватися насінням. Згідно з дослідженням Boothroyd [24] для карликової мозаїчної хвороби кукурудзи, рівень передачі вірусу через насіння становить до 0,5%. Виявлено два способи прояву вірусу - мозаїчні симптоми в деяких рослин і без симптомів у інших. MDMV був виявлений у 0,4% насіння польової та цукрової кукурудзи [25], а також у 0,2% протестованих інбредних ліній кукурудзи. Однак ці показники базуються на прояві симптомів. Подальші дослідження зареєстрували передачу вірусу до 0,007% , 0,006%, 0,005% і нуль. Дослідження наявності MDMV у насінні на різних стадіях зрілості, за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) та

тестів на інфекційність, показало, що MDMV завжди виявляється в перикарпі через 21 день після запилення, але не завжди в ендоспермі або ембріоні. Відсутність вірусної інфекції в ембріоні вказує на обмежену передачу насінням або її відсутність. Через 21 день після запилення, частка MDMV в частинах насіння зменшилася з 100% до рівня, що не виявляється при дозріванні в перикарпі. Після досягнення зрілості, перикарп змінює свою консистенцію з дуже вологої на тверду і суху форму. Тому такий результат не є несподіваним, оскільки вірус може бути інактивований у висушеному стані. Основним механізмом передачі MDMV у цукровій кукурудзі виявилось інфікування жіночих гаметофітів. MDMV не був виявлений в чоловічих гаметофітах [23].

1.4. Заходи боротьби з вірусними хворобами кукурудзи

Застосування інсектицидів та знищення злакових бур'янів

Після виявлення MDMV в рослині дуже важливо вчасно впровадити стратегії контролю з метою зменшення подальших втрат врожаю. Членистоногі грають роль в передачі всіх економічно важливих вірусних захворювань, включаючи хворобу MDMV у кукурудзі. Це означає, що для виникнення захворювання необхідно, щоб у відповідному середовищі були присутні три елементи: вірус, вектор-переносник і вразливий хазяїн.

Один з часто використовуваних методів контролю поширення вірусних захворювань на кукурудзі полягає у зменшенні кількості векторів, які передають хворобу на чутливу кукурудзу. Для цього можуть використовуватись хімічні інсектициди або афіциди. Проте цей метод не може повністю уникнути поширення вірусу на ділянці, і може негативно впливати на родючість ґрунту. Крім того, дослідження показали, що використання інсектицидів не має значного впливу на хворобу MDMV.

Іншим ефективним методом боротьби з карликовою мозаїкою кукурудзи є виключення джерел вірусу шляхом порушення взаємозв'язків між патогеном, вектором та кукурудзою.

Сорго алепське (*Sorghum halepense*), або гумаї, є головним носієм вірусу MDMV. Вірус може зберігатись в рослинах гумаї протягом зими, використовуючи їх як сховище для перезимівлі. В Іспанії також було повідомлено, що інфекція MDMV пов'язана з великою кількістю гумаї. Щоб обмежити поширення вірусу, можна вирішити проблему з сорго алепським шляхом використання сівозміни з незерновими культурами, такими як соя (*Glycine max*), особливо на полях з проблемами сорго або з історією вірусних захворювань кукурудзи. Це може бути доцільним, особливо з введенням нових грамініцидів, які можна використовувати протягом усього сезону на полях з соєю, щоб ефективно знищити сорго без наслідків на наступний рік. Крім того, проблемні поля можна залишити під паром на півсезону і спробувати інтенсивно знищити сорго.

Окрім сорго, зрілий урожай кукурудзи може виступати резерватом вірусу для щойно вирощеної культури, знову слугуючи агентом для передачі вірусів. У цьому випадку перенесення дати посіву кукурудзи, щоб запобігти великій кількості популяції переносників, може дозволити взяти певний контроль над хворобою.

Попередня обробка S-метилметіоніном

Рослини здійснюють автотрофію сірки шляхом поглинання окислених форм сірки з ґрунту, що потім відновлюється і додається до цистеїну та метіоніну. Кінцевий продукт може бути перетворений в S-аденозилметіонін (SAM), який є субстратом для синтезу S-метилметіоніну (SMM) з метіоніну як донора метилових груп. У природі SMM $[(\text{CH}_3)_2\text{-S-(CH}_2)_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}]$ існує як некодована амінокислота, що містить сірку в рослинах. Цикл SMM відповідає за зворотне перетворення SMM на метіонін.

SMM надає стійкість рослинам, а також стимулює анаболізм інших регуляторних і захисних сполук, таких як поліамін і етилен. Коли присутні стресові фактори, виявляється посилення біосинтетичного шляху фенілпропаноїдів, що сприяє виробленню певних фенолоїдів, флавоноїдів та антоціанів, які є сполуками, що характеризуються антиоксидантною якістю та мають більш високу абсорбцію в УФ-спектрі.

SMM продемонстрував свій потенціал не тільки проти абіотичного, але і проти біотичного стресу, оскільки рослини, оброблені SMM, проявляли вищу стійкість до інфекції вірусом карликової мозаїки кукурудзи. Ludmerszki [34] вивчали зміни експресії генів білка GF14-6 та SAMS під час інфекції MDMV.

Продукт GF14-6 допомагає захищати рослини від вірусу шляхом руйнування білка оболонки вірусу та постраскрипційного мовчання РНК. Попередня обробка рослин SMM підвищує їх захисні властивості, демонструючи зниження експресії GF14-6 у попередньо оброблених та інфікованих рослинах.

Дослідження також показали, що обробка SMM сприяє збільшенню кількості фенолоїдів та збереженню хлорофілу під час стресових умов. Дослідження показало поступове збільшення інтенсивності випромінюваної флуоресценції при 440 і 520 нм після обробки рослин SMM, що вказує на збільшення кількості фенолоїдів у цих рослинах. Kocsis [35] продемонстрували, що під час стресових умов SMM запобігає втраті хлорофілу. Значення співвідношення F690/F740 обернено пропорційне зменшенню кількості хлорофілу, локалізованого в листках, що свідчить про збільшення вмісту хлорофілу при обробці рослин SMM. Подібних результатів було досягнуто за допомогою вимірювань індукції флуоресценції хлорофілу-а. Значення Fv/Fm, яке вказує на фізіологічний стан рослини, точніше, максимальну квантову ефективність PSII, що знижується у випадку заражених рослин, було проаналізовано, але значних змін не було виявлено, коли інфіковані рослини також отримували обробку SMM перед зараженням.

Дослідження в області руйнування тилакоїдів MDMV та його впливу на розвиток високоактивних форм кисню (АФК) викликає значний інтерес. Клітини оболонки судинного пучка кукурудзи виявилися дуже чутливими до окислювального стресу, що можна пояснити будь-яким пошкодженням їх тилакоїдних мембран. Щоб захистити клітину від реактивних молекул, в рослинних клітинах наявні антиоксидантні ферменти, такі як аскорбатпероксидази (APX) і пероксидаза гуаякол (GPX). Попередня обробка рослин комбінованою молекулою SMM та саліцилової кислоти (SA), яка відома як S-метилметіонін саліцилат (MMS), дозволила знизити рівень вірусної інфекції та зменшити активність ферменту, що свідчить про підвищення рівня резистентності [18].

Селекція стійких до вірусів ліній та сортів кукурудзи

Найбільш ефективний спосіб захисту посівів кукурудзи від MDMV - це відбір ліній кукурудзи, які є стійкими до цього вірусу. Так як знання про стійкі гени та патогени є обмеженими, селекціонери кукурудзи разом з фітопатологами та ентомологами вважають, що початковим кроком для розробки цього методу є ідентифікація джерел резистентності шляхом скринінгу зібраної зародкової плазми.

Існують різні методи скринінгу стійкості, такі як природне зараження в польових умовах, інокуляція вектора, механічна інокуляція та вирощування в тепличних умовах. Спочатку сприйнятливі інбредні лінії схрещують зі стійкими лініями для отримання покоління F1. Деякі покоління F1 можуть самозапилюватися, щоб отримати покоління F2, інші можуть схрещуватися зі сприйнятливими батьками для отримання покоління BC1. Зазвичай, зворотні схрещування використовуються для передачі стійкості до вірусів від стійких, але небажаних в агрономії ліній до добре адаптованих елітних ліній. Рекурентний батько зазвичай вибирається через його здатність добре поєднуватися, давати високий урожай і адаптуватися до ширших змін. Відбір в поколіннях F2 і BC1 є сприятливим методом для виведення нових інбредних

ліній, які будуть стійкими до вірусів. Вибір за стійкість у тепличних умовах при вищих температурах зазвичай призводить до ліній із вищим рівнем стійкості.

Було встановлено, що є три інбредні лінії (D21, D32, FAP1360A), які повністю стійкі до MDMV, і чотири інбредні лінії (D06, D09, R2306, FAP1396A), які частково стійкі до цього вірусу як в полі, так і в теплиці. Крім того, інбредна лінія Pa405 на сьогодні є найбільш відомим джерелом резистентності до MDMV.

Модифікатори або мінорні гени також впливають на успадкування стійкості кукурудзи до карликової мозаїчної хвороби. Наприклад, коли гібриди F1, F2 потомство і рекомбінантна інбредна лінія (RIL) популяція, отримана від схрещування Oh1V1 до лінії, сприйнятливої до вірусу, Oh28 були досліджені на їх відповіді на шість вірусів, включаючи MDMV, домінантний QTL, що відповідає за 79% загальної дисперсії та кілька незначних QTL, кожен з яких сприяє 1% дисперсії, відображеної в хромосомі 3, і 10 були ідентифіковані. Крім того, дані, що представляють відсоток заражених рослин, що позначають критичні відмінності як в межах поколінь F1 (від 18 до 34%), так і в межах BC1 поколінь (від 26 до 53%) показали, що стійкість до MDMV контролюється основними генами, але незначні гени також беруть участь у модифікації опору. Гібриди та інбредні лінії з генами стійкості до MDMV не проявляють безсимптомних реакцій після інфекцій. Scott [36] зазначили, що симптоматичні відповіді можуть бути наслідком мікроепливів навколишнього середовища, прояву резистентності на пізніх стадіях росту, концентрації інокулята вище певного порогу. Як симптоматична тканина з високою концентрацією вірусу, так і безсимптомна тканина без виявлення вірусу утворювали окремі сектори в стійких гібридах. Подібним чином ELISA підтвердив наявність як інокульованих листків з позитивною відповіддю на вірус, так і молодих листків без збірки віріону в тому самому стійкому інбренді.

MDMV може реплікуватися та передаватися від клітини до клітини в листі інфікованих рослин, але у стійких рослин є бар'єр для його системного розмноження. Таким чином, судинна система листя забезпечує зупинку руху вірусу у стійких рослинах. Якщо стійкість буде передана від стійких гібридів, таких як Pioneer Brand (PB) 3187, до вибраних селекційних ліній, це призведе до подібних механізмів стійкості та успішного контролю карликової мозаїчної хвороби кукурудзи [16].

Створення стійких сортів кукурудзи за допомогою генної-інженерії

Ще один спосіб боротьби з карликовою мозаїчною хворобою кукурудзи в посівах полягає в отриманні стійкості до патогенів шляхом експресії резистентних генів, вірусних білків або РНК в трансгенних рослинах за допомогою генної інженерії. Для цього необхідно досліджувати генетичну концепцію прояву стійкості. Резистентність в кукурудзі може бути досягнута шляхом потрапляння віріонів, рибонуклеопротеїнів або РНК у флоему або вихід із флоєми в листках або коренях. Незважаючи на це, механізм генетичної стійкості ще не повністю зрозумілий. Аналізуючи глобальну транскрипційну відповідь різних інбредних ліній кукурудзи, виявлено, що близько 15% транскриптів були по-різному експресовані між резистентними та чутливими лініями. З цих транскриптів, більше 70% були активовані в резистентній лінії, зокрема Hsp20/alpha кристалоподібний ген і цитохром P450. Проте, необхідне подальше дослідження їхнього внеску у резистентність до патогенів.

Раніше була інкорпорована резистентна зародкова плазма Н9-21 проти MDMV, але її неефективні агрономічні характеристики перешкоджали досягненню потрібного рівня виробництва кукурудзи. Тому продовжувалися спроби генетично підвищити стійкість до MDMV шляхом розробки сконструйованих ліній для створення перехресного захисту. Цей захист можна досягти шляхом введення антисмислової послідовності, гомологічної генам MDMV білка оболонки (CP), реплікази та білків руху, які відіграють роль у реплікації вірусу, поширенні та збірці вірусних часток. Зокрема, гени протеази

MDMV (P1) та білка, асоційованого з реплікацією, були успішно трансформовані в рослини кукурудзи, які виявилися стійкими до MDMV у контрольованих умовах. Це стало можливим завдяки РНК-інтерференції (RNAi), яка використовує самокомплементарну шпилькову РНК (hpRNA), що транскрибується з трансгенної послідовності інвертованих повторів. Дослідження показали, що RNAi є ефективним механізмом захисту, який завдяки постраскрипційному мовчанню генів допомагає забезпечити стійкість до вірусів. Довжина і повторюваність сайтів інтеграції hpRNA має значення для досягнення максимальної стійкості до MDMV, а довша hpRNA є більш успішною в постраскрипційному мовчанню генів вірусу, ніж коротша. Раніше було виявлено, що перенесення послідовності з інвертованим повторенням підвищує резистентність до вірусу кукурудзи, але це може призвести до появи ліній з проміжною стійкістю. Потім резистентність до MDMV була додатково покращена шляхом розробки вектора експресії hpRNA, що складається з 451bp інвертованих повторів послідовностей гена протеази MDMV (P1). Узагалі, генетичне вдосконалення кукурудзи вважається більш ефективним і екологічно стійким методом боротьби з вірусами, ніж інші методи.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСІВ КУКУРУДЗИ

Виявити вірусне захворювання кукурудзи лише за симптомами, досить складно, оскільки симптоми змінюються залежно від генотипу рослини, фази розвитку рослини під час зараження, стану навколишнього середовища та потенційної можливості для різних інфекцій. Найшвидшими та найнадійнішими методами є інфекційність (біологічні аналізи), серологічні аналізи і RT-PCR.

2.1. Візуальна діагностика вірусних хвороб кукурудзи

Хвороба карликової мозаїки кукурудзи може проявлятися у різних формах та залежить від багатьох факторів, таких як вид вірусу, стан рослин, умови середовища та інші. Зазвичай симптоми захворювання проявляються протягом декількох днів після того, як рослини були інфіковані вірусом.

Декілька досліджень описали симптоми вірусу карликової мозаїки кукурудзи. Загалом, рослини, що інфіковані MDMV, мають мозаїчні візерунки, які зазвичай починаються на нижніх листках і виглядають нерівномірними та розмитими. Симптоми хвороби карликової мозаїки кукурудзи залежать від стадії розвитку рослини. На ранніх стадіях хвороба проявляється в зменшенні інтенсивності росту рослини, жовтінні та закручуванні листків, блідих хлоротичних плямах та коротких смугах шириною від 0,5 до 1,5 мм. На новоутворених листках можуть з'являтися цятки або кільця.

На подальших стадіях розвитку рослини спостерігається зниження врожайності, а також з'являються на листках, стеблах та качанах характерні

жовто-зелені плями або смуги, які можуть бути різних форм та розмірів. З часом ці плями можуть збільшуватись та зливатись між собою [25].

Може спостерігатись деформація листків, зелені зони можуть бути зімкнені, що негативно впливає на процеси дихання та живлення рослини. Інфіковані рослини часто відстають у рості, безплідні та схильні до кореневої гнилі та інших вторинних інфекцій. Затримка росту, зменшення ваги рослини, зменшення маси качана, діаметра качана (рис. 2.1.), розміру та кількості голів також є частиною симптомів MDMV. Часом рослини кукурудзи, інфіковані MDMV, можуть демонструвати затримки цвітіння, а також погане зв'язування і наповнення зерна.

При пізніх інфекціях симптоми хвороби виявляються лише на верхніх листках дорослих рослин (рис. 2.2.). У толерантних або стійких гібридів короткі хлоротичні плями або смуги розвиваються лише на одному або двох листках. Симптоми захворювання можуть відрізнитися залежно від гібрида та стадії розвитку рослини на момент зараження.



Рис. 2.1. Качани рослин кукурудзи, інфікованих MDMV, порівняно зі здоровим качаном (праворуч) (Malisa Tosis) [20]



Рис 2.2. Симптоми мозаїки на верхніх листках кукурудзи (Malisa Totic) [20]

MDMV-A зазвичай викликає мозаїку у вигляді смуг, які проходять між жилками листя (рис. 2.3., 2.4.). Мозаїка може розвинути у вигляді жовтуватих смуг, які проходять по всьому краю листка, і може зникнути під час спекотної погоди та бути заміненим звичайним хлорозом в подальшому зростанні. Хлоротичні смуги або форма «А» виникають, коли хлоротичні області поєднуються у безперервні смуги вздовж жилок. Старі рослини мають лише хлоротичні ознаки на верхніх листках і іноді червоні смуги на зрілих листках у пізніх інфекціях. Інші симптоми включають крапчасті плями та неправильні некротичні ураження. Утворення мозаїки, цяток і кілець на листках є результатом збільшення інтенсивності темно-зелених та світло-зелених плям під час розвитку хвороби.

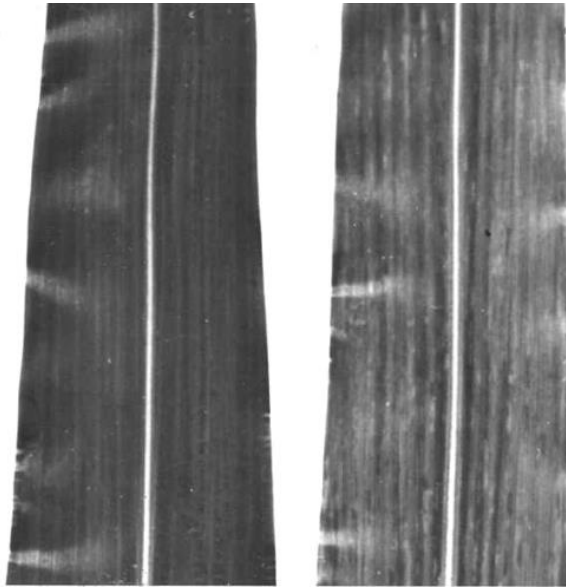


Рис. 2.3. Симптоми мозаїки на листі *Zea mays*, інфікованому штамом А вірусу карликової мохаїки кукурудзи (праворуч), порівняно зі здоровим листком (ліворуч) [52]



Рис. 2.4. Симптоми мозаїки у рослини *Zea mays*, зараженої штамом А вірусу карликової мозаїки кукурудзи [52]

Симптоми вірусу мозаїки цукрового очерету цілком подібні до симптомів вірусу карликової мозаїки кукурудзи. У порівнянні зі здоровим листям, симптоматичні листки мають багато жовтих і зелених краплень смуг або плям, які чергуються з паралельними жилками. Ці ознаки є більш помітними на сонячному світлі. Деякі листки можуть мати кілька вузьких блідо-жовтих смужок на нормально-зеленому тлі, тоді як інші демонструють явний хлороз

у всьому листку. Серйозно інфіковані листки стають жовтими або білими, залишаючи лише кілька зелених островців або невелику кількість червоного точкового некрозу. Крім того, кінчики нових листків можуть бути ненормально закручені. Деякі різновиди демонструють загадкові або нечіткі явища при високій температурі, але симптоми повторюються, коли температура падає.

Рослини, заражені вірусом мозаїки сорго, розвивають короткі жовто-зелені смуги, що перетворюються на червувато-коричневі некротичні смуги з подальшим великим червувато-коричневим некрозом листя.

Кукурудза, заражена JGMV, розвиває мозаїку, кільчасту плямистість та хлороз (рис. 2.5.).

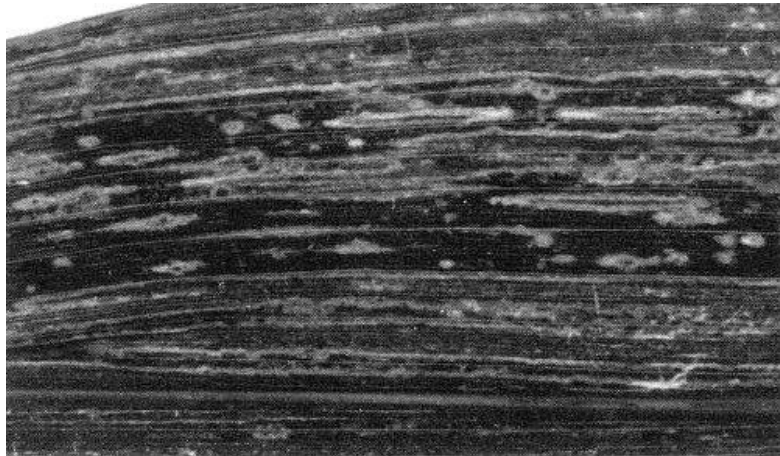


Рис. 2.5. Частина листка *Zea mays*, інфікована JGMV, із мозаїкою та кільцевою плямистістю [51]

Як дослідні рослини слід використовувати проростки кукурудзи, вівса та сорго алепське. За допомогою тестових рослин розсади сорго алепського можна відрізнити вірус карликової мозаїки кукурудзи від вірусу мозаїки сорго. MDMV легко інфікує сорго алепське, тоді як вірус мозаїки цукрової тростини та вірус мозаїки сорго робить це набагато рідше. Овес сприйнятливий лише до вірусу мозаїки сорго алепського. Окрім цих рослин, MDMV також можна ідентифікувати та диференціювати шляхом інокуляції набору сортів сорго Atlas Rio, ВТХ398, NM31, SA8735, R430, OKY8, Tarman, Aunis, Trudex та

TX2786. При зараженні MDMV у розсади цих сортів сорго розвивається мозаїка, а Atlas Rio, NM31, R430 і Aunis також можуть виявляти рідкісні некрози на нових листках. Тестові рослини для біотестів найкраще використовувати на стадії трьох листків. Інокульовані тестові рослини слід інкубувати при 25°C.

2.2. Серологічні методи дослідження

Серологічне виявлення є простим, швидким і недорогим методом для виявлення вірусів рослин, включаючи імунодифузію в агаровому гелі (AGID), електроблоттинг імуноаналіз (EBIA), сендвіч-ферментний імуноферментний аналіз з подвійними антитілами (DAS-ELISA), ELISA з прямим покриттям антигену (DAC-ELISA), непрямий ELISA та точковий імуноферментний аналіз (Dot-ELISA) (також точковий імунозв'язуючий аналіз, DIBA; або точковий імунозв'язуючий аналіз, DBIA). Gaur [30] використовували DAC-ELISA та DIBA для виявлення SCMV в інфікованих зразках тростинного соку, навіть якщо зразки були розведені до 1/150.

Для частини серології принцип простий. Коли антиген вводять парентерально в організм кролика з наступними бустерними ін'єкціями, це викликає вивільнення певних антитіл. Потім у кролика буде взята кров, щоб отримати сироватку крові, що містить імуноглобуліни. Антитіла реагують на антиген, який активував їхнє утворення, певними спостережуваними способами. Рослинні віруси можуть бути використані як антигени, і в будь-якій рослині, підозрюваної на інфекцію, присутність цього конкретного антигену можна визначити за допомогою гомологічної антисироватки. Серологічний метод ELISA є гіперчутливою технікою для діагностики нижчих концентрацій антигену як у сирому, так і в очищеному екстракті вірусів. Його специфічність також корисна для диференціації дуже близькоспоріднених

вірусних ізолятів. Тести ELISA надзвичайно економічні, а також відносно легкі для звичайного використання.

Хоча було розроблено багато варіантів, більшість дослідників віддають перевагу типу ELISA, який називається сендвіч із подвійними антитілами (DAS). Антитіло захоплення використовується для покриття твердої фази та використовується для іммобілізації вірусу в цьому аналізі. Друге антитіло, кон'юговане з ферментом, як правило, лужною фосфатазою, використовується для виявлення іммобілізованого вірусу шляхом реакції з відповідним субстратом для ферменту. Поліклональна антисироватка, яка використовується в цьому аналізі, також часто здатна реагувати на антигени з неінфікованих рослинних екстрактів, оскільки авідність і спорідненість молекули антитіла до вірусу були змінені, що спричинило модифікацію їх штамової специфічності. Це пов'язано з конформаційними змінами в молекулі поліклонального антитіла, спричиненими кон'югацією ферменту з другим антитілом. Цю проблему часто можна обійти, використовуючи захоплення та друге антитіло, отримане в різних видах тварин, і виявлення другого антитіла за допомогою ферментно-кон'югованого антивидоспецифічного антитіла. Однак специфічні антисироватки від різних видів тварин часто недоступні. Унікальні характеристики моноклональних антитіл пропонують потенціал для розробки DAS-ELISA, який дозволяє уникнути модифікації реактивності другого антитіла шляхом молекулярної кон'югації та не потребує використання антисироваток, вирощених у різних видів тварин. Майже всі моноклональні антитіла є специфічними до гомологічного антигену. Використання моноклональних антисироваток для виявлення вірусу рослин у діагностиці та епідеміології є можливою заміною для використання поліклональних антитіл.

Для цього аналізу DAS-ELISA результати будуть інтерпретовані на основі показників поглинання при 405 нм, окрім огляду лунок візуально або за допомогою планшет-рідера на будь-яку зміну кольору. Розвиток жовтого кольору в лунках свідчить про позитивні реакції, тоді як негативні реакції

демонструються відсутністю критичного забарвлення в лунках. Тестові значення вважаються дійсними, якщо і тільки якщо лунки позитивного контролю призводять до позитивної реакції, тоді як здоровий контроль і лунки, що містять буфер, залишаються чистими. Зразки екстракту, які дають показники поглинання, що в два рази перевищують середнє значення здорових контрольних, можна вважати позитивним результатом. Як правило, для отримання позитивних результатів слід зчитувати подібні значення в порівнянні значень A405 нм інфікованого соку листя з очищеним MDMV.

ELISA проводили на сотнях MDMV-інфікованих і неінфікованих соків рослин кукурудзи, зі 100% правильним результатом позитивного і негативного контролю. Чутливість ІФА-тесту в 100 разів вище, ніж звичайних тестів на інфекційність. Тому дуже заохочується застосування ELISA для діагностики вірусів рослин. Це також пояснюється тим, що візуальна оцінка аналізу присутності вірусів у екстрактах рослинної тканини визнана надійною.

2.3. Молекулярно-біологічна ідентифікація вірусів

До класичних методів молекулярної діагностики можна віднести різноманітні гібридизаційні методи, рестрикційний аналіз, аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів, так званий ПДРФ-аналіз (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP analysis) та метод ДНК-зондів. Сучасні молекулярні методи базуються на полімеразній ланцюговій реакції (PCR).

Перевага RT-PCR полягає в тому, що набагато легше отримати послідовності з бази даних, і таким чином можна зібрати інформацію про штам вірусу та основу вірусних ізолятів. Процедура RT-PCR для штамів MDMV починається з подрібнення інфікованого зразка кукурудзи у відповідному

екстракційному буфері, такому як основний фенол або суміш детергентів, з подальшим додаванням ацетату амонію та хлороформ-ізоамілового спирту, а потім центрифугуванням на низькій швидкості для отримання нуклеїнової кислоти, що містить супернатант. Осад супернатанту буде промитий 70% етанолом і ресуспендований, з якого один мікролітр загальної РНК буде переведено на перший синтез кДНК. Це буде передано для виконання RT-PCR з використанням праймерів, спеціально розроблених для ампліфікації доступної послідовності геному MDMV. Продукт RT-PCR секвенують та порівнюють з відомими послідовностями MDMV. Це здійснюється шляхом проведення множинного вирівнювання послідовностей (MSA).

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Об'єкти досліджень

Об'єктом дослідження були віруси що уражують кукурудзу і викликають хворобу карликової мозаїки кукурудзи, зокрема, maize dwarf mosaic virus (MDMV), sugarcane mosaic virus (SCMV), sorghum mosaic virus (SrMV) та Johnsongrass mosaic virus (JGMV).

3.2. Матеріали та методи досліджень

3.2.1. Візуальна діагностика вірусних хвороб

Карликова мозаїка кукурудзи може бути ідентифікована шляхом візуального огляду листя кукурудзи на наявність симптомів таких як зменшення інтенсивності росту рослин, карликовість, закручування листків, мозаїка у вигляді жовтуватих смуг, які проходять між жилками листя. Цей метод простий і економить час. Однак він не може визначити вид вірусів. Крім того, він вимагає високого рівня професійних знань, навичок і вміння неозброєним оком побачити симптоми карликової мозаїки кукурудзи.

3.2.2. Імуноферментний аналіз

ІФА з подвійним сендвічем антитіл (DAS) – один з найпоширеніших методів серологічного виявлення патогенів рослин, який складається з чотирьох основних етапів: На першому етапі на поверхню мікروتитрованого планшета наносять покриття-антитіло (IgG), спрямоване проти специфічного антигену. Коли на другому етапі додається зразок, що містить антиген, він зв'язується з іммобілізованим IgG, утворюючи комплекс IgG-антиген. На третьому етапі додається комплементарний IgG, мічений лужною фосфатазою (AP-кон'югат), який зв'язується з комплексом IgG-антиген і утворює сендвіч з подвійних антитіл. На четвертому етапі наносять субстрат 4-нітрофенілфосфат, і лужна фосфатаза (ЛФ) ферментативно утворює 4-нітрофенол, забарвлений у жовтий колір. Забарвлення можна оцінити візуально або виміряти на спектрофотометрі при довжині хвилі 405 нм.

DAS-ELISA проводили за допомогою Complete Kit Standard DAS – ELISA LOEWE. Спершу було створено схему нанесення зразків, прораховано кількість необхідних реагентів, підготовлено необхідні буфери. Розведено IgG з оригінального флакону 1:200* в карбон-бікарбонатному буфері (КБК), обережно, але ретельно перемішано. Додано по 0,2 мл робочого розчину IgG в кожену необхідну лунку планшета для ІФА. Щільно закрито планшет герметичною стрічкою. Інкубували протягом ночі в холодильнику. Далі IgG було видалено за допомогою промивного буфера за допомогою чотирьох циклів промивання на шейкері.

Наступним етапом була підготовка та нанесення зразків. Спершу було відібрано необхідні зразки, наважено по 500 мг кожного в ступку, ступку обов'язково підписати, ножиці обробляли спиртом після кожного зразка. Гомогенізували зразки у співвідношенні 1:20 об/об у буфері зразка. Перенесли в мікропробірки, урівноважили попарно і центрифугували 15 хв при 3000 об/хв. Розчинили позитивні та негативні контролі LOEWE® приблизно в 2 мл

буфера для зразка. Додавали 0,2 мл екстракту зразка або контрольного розчину в одну лунку планшета для ІФА. Щільно закривали планшет герметичною стрічкою. Інкубували протягом ночі в холодильнику. Видаліть зразок буфером для відмивки за допомогою чотирьох циклів промивання на автоматичному промиванні.

Наступним кроком було застосування кон'югованих антитіл-АР. Було розведено кон'югат 1:200* з оригінального флакону в буфері для нанесення других антитіл, обережно, але ретельно перемішано. Додавали по 0,2 мл* робочого розчину кон'югату в кожен лунку планшета для ІФА. Щільно закривали планшет герметичною стрічкою. Інкубували ніч у холодильнику. Видалення кон'югату за допомогою буфера для відмивки шляхом чотирьох циклів промивання на автоматичному промиванні.

Останнім етапом був ферментативний аналіз. Розчиняли субстрат, еквівалентний 1 мг/мл, в 1x буфері субстрату безпосередньо перед використанням. Додано по 0,2 мл розчину в кожен робочу лунку планшета для ІФА. Інкубували при температурі близько 25°C в темряві. Через 1 годину інкубації субстрату оцінено реакцію візуально, а також зчитано фотометрично при 405 нм.

3.2.3 Трансмійна електронна мікроскопія

Для приготування плівки чисте предметне скельце потрібно занурити у розчин формвару на 20 секунд та зачекати поки воно підсохне. Отриману плівку слід підрізати лезом, щоб вона гарно знялась. Для цього скельце занурювали у воду під кутом 45 градусів. Потім на плівку пінцетом обережно викладаються сітки і знімаються за допомогою фільтрувального паперу. Отримані сітки з плівкою зберігались в чашці Петрі. Пізніше на сітку наносили очищений вірусний матеріал. Надлишкову рідину відбирала через 1 хвилину і

висушували сітки. Останнім етапом підготовки є нанесення краплі 2% уранілацетату, контрастуючої речовини. Надлишок забирався через 1 хвилину, сіточку просушили.

3.2.4. Статистична обробка результатів

Для статистичної обробки даних розраховували середні значення і стандартні похибки за допомогою Microsoft Excel. Всі біологічні дослідження проводилися щонайменше три рази.

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

4.1. Виявлення симптомів хвороби карликової мозаїки кукурудзи в посівах різних регіонів України

Протягом 2022-2023 років обстежували рослини кукурудзи в промислових посівах і присадибних ділянках різних регіонів України, зокрема у Вінницькій, Київській та Харківській областях. В результаті обстеження відбирали зразки з типовими вірусними симптомами хвороби карликової мозаїки кукурудзи, зокрема смугастою і штрихуватою мозаїкою, плямистістю, затримкою росту та карликовістю.

Зокрема, у Вінницькій області ми спостерігали симптоми різної мозаїки на рослинах кукурудзи, крім того в деяких рослин була затримка росту та карликовість (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Симптоми мозаїки на рослинах кукурудзи у Вінницькій області

У посівах Київської області на кукурудзі ми виявляли дрібну штрихувату та смугасту мозаїку (рис. 4.2), а також карликовість (рис. 4.3).



Рис. 4.2. Симптоми штрихуватої та смугастої мозаїки на кукурудзі в Київській області, порівняно зі здоровим листком (праворуч)



Рис 4.3 Симптом карликовості на кукурудзі в Київській області, порівняно зі здоровою рослиною (ліворуч)

В посівах кукурудзи Харківської області ми виявляли рослини з плямистістю та мозаїкою (рис. 4.4).

Слід зазначити, що при повторному обстеженні промислового посіву кукурудзи в Київській області в вересні місяці на раніше здорових рослинах ми спостерігали симптоми хвороби, а саме смугасту мозаїку, та виявили в пазухах листків попелиці (рис. 4.5), які можуть виступати векторами вірусів, збудників хвороби.



Рис. 4.4. Рослини кукурудзи з плямистістю та мозаїкою в Харківській області



Рис. 4.5. Рослини кукурудзи із симптомами мозаїки і попелицями в вересні місяці в Київській області

Отже, в результаті візуального обстеження посівів кукурудзи в різних областях України ми виявили різноманітні симптоми на рослинах, що характерні для карликової мозаїки кукурудзи та потенційних векторів збудників хвороби.

4.2. Ідентифікація вірусів за допомогою імуноферментного аналізу

Серологічне тестування зразків, відібраних під час візуального обстеження посівів кукурудзи в 3-ох областях України, проводили на чотири імовірних збудників хвороби карликової мозаїки кукурудзи, а саме: maize dwarf mosaic virus (MDMV), sugarcane mosaic virus (SCMV), sorghum mosaic virus (SrMV) та Johnsongrass mosaic virus (JGMV). Для ідентифікації збудника

використовували імуноферментний аналіз в модифікації DAS-ELISA за стандартною методикою з використанням комерційних тест-систем Loewe Biochemica (Німеччина).

В результаті проведеної роботи показано, що з чотирьох протестованих вірусів в дослідних зразках ми виявили лише один вірус - sugarcane mosaic virus і лише в Київській області (таблиця 4.1). Відсоток уражених рослин серед зразків відібраних в Київській області складає 35%, та 19,7% від загальної кількості протестованих зразків.

Таблиця 4.1

Виявлення вірусів кукурудзи, що викликають хворобу карликової мозаїки кукурудзи, в посівах трьох регіонів України

область	кількість протестованих зразків	Кількість позитивних зразків за даними ELISA			
		MDMV	SCMV	SrMV	JGMV
Вінницька	23	0	0	0	0
Київська	37	0	13	0	0
Харківська	6	0	0	0	0
загальна	66	0	13	0	0

Підсумовуючи результати серологічної діагностики вірусів у дослідних зразках кукурудзи, можна сказати, що SCMV безсумнівно є основною вірусною загрозою для кукурудзи в Україні, оскільки уразив 19,7% від загальної кількості протестованих зразків.

Слід зазначити, що рослини, уражені SCMV, мали різні симптоми у вигляді штрихуватої або смугастої мозаїки (рис. 4.2) і містили різну концентрацію вірусу, виходячи з оптичної густини зразків (рис. 4.5). На

рисунку 4.5 показано оптичну густину при довжині хвилі 405 нм зразків кукурудзи відібраних в Київській області в 2023 році, що були уражені вірусом мозаїки цукрової тростини (SCMV).

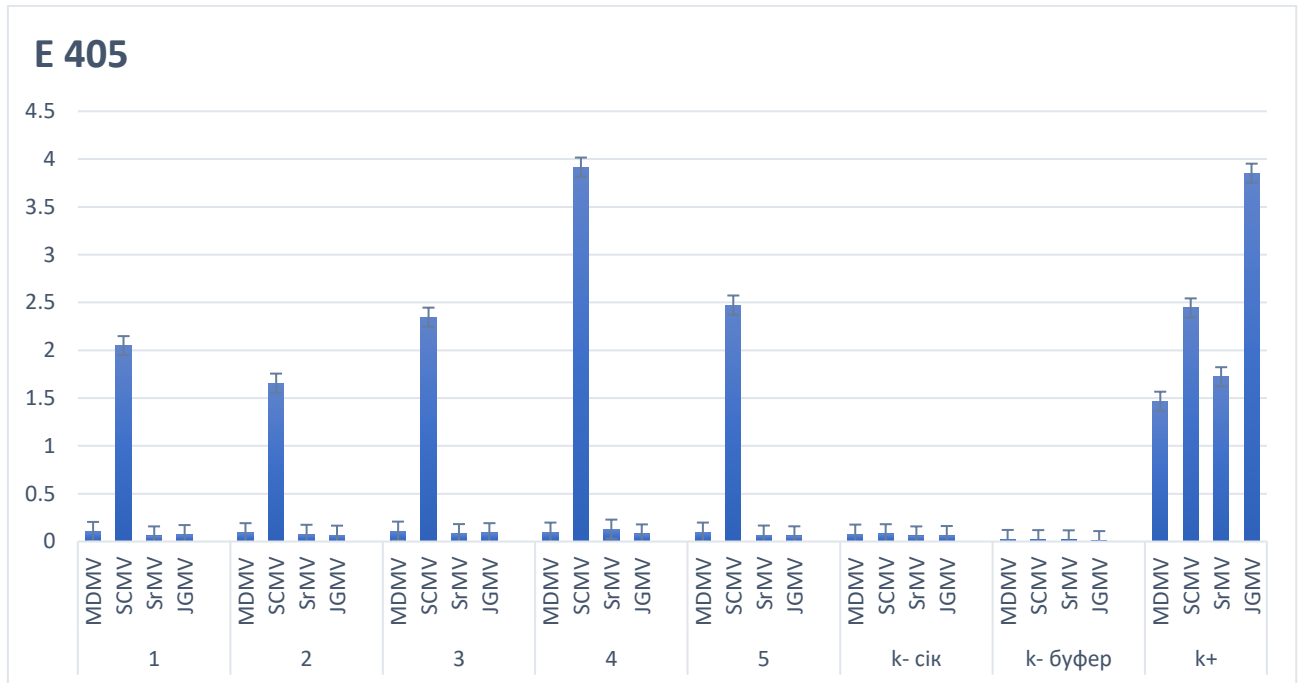


Рис. 4.5. Тестування на наявність вірусів за допомогою імуноферментного аналізу симптоматичних зразків кукурудзи відібраних у 2023 році в Київській області

Таким чином, тестування відібраних зразків кукурудзи за допомогою імуноферментного аналізу показало циркуляцію вірусу мозаїки цукрової тростини лише в Київській області з трьох обстежених. Частка рослин, уражених SCMV, в Київській області становила 35%, у загальній кількості досліджених проб становила 19,7%. Інші віруси, що можуть викликати хворобу карливої мозаїки кукурудзи, зокрема MDMV, SrMV та JGMV, ми не виявили.

4.3. Електронномікроскопічне дослідження

Для виявлення вірусних часток у зразках, що дали позитивний результат в імуноферментному аналізі, досліджували сік даних рослин за допомогою електронного мікроскопу.

В соку вірусінфікованих рослин відібраних в Київській області були виявлені нитковидні вірусні частки (рис. 4.6) типові для Потівірусів, представником яких є вірус мозаїки цукрової тростини (SCMV).

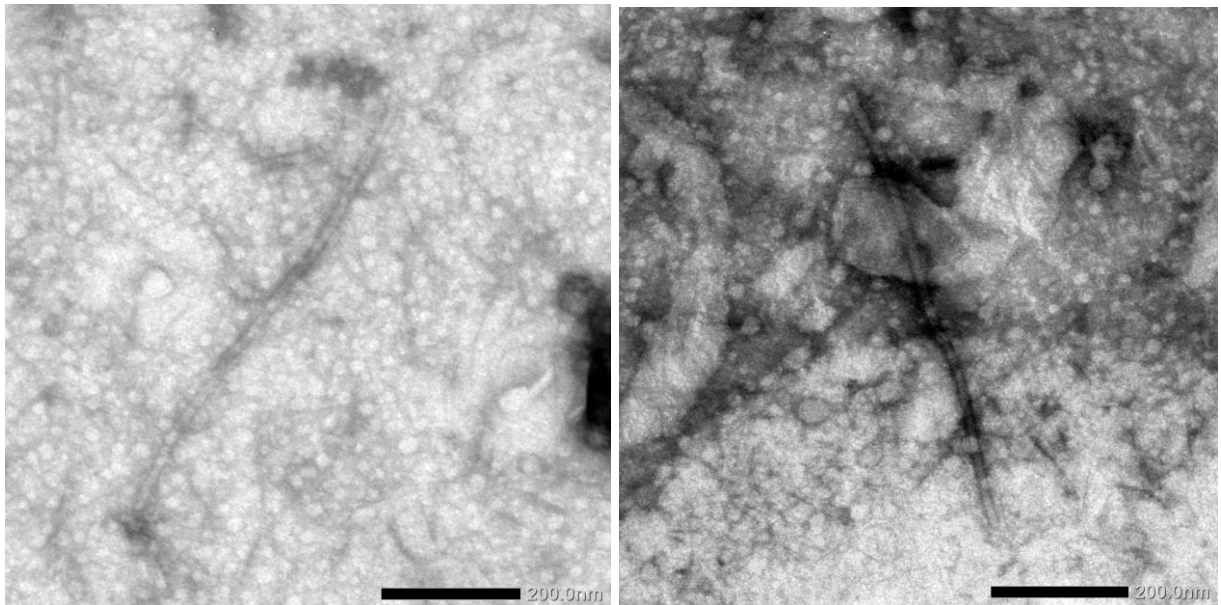


Рис. 4.6. Вірусні частки SCMV в соці хворих рослин кукурудзи, відібраних в Київській області (лінійка 200 нм)

Отже, у результаті електронномікроскопічних досліджень соку симптоматичних рослин, відібраних в 2023 році в Київській області, було виявлено гнучкі ниткоподібні вірусні частки довжиною близько 750 нм і 13 нм в діаметрі, що співпадає з літературними даними. Таким чином результати електронної мікроскопії співпадають з даними імуноферментного аналізу щодо ураження рослин кукурудзи вірусом мозаїки цукрової тростини.

4.4. Визначення переносників

При повторних обстеженнях промислових посівів кукурудзи восени в Київській області ми помітили появу симптомів на раніше здорових рослинах, а в пазухах листків появу попелиць, які за літературними даними можуть виступати векторами вірусів, що викликають хворобу карликової мозаїки кукурудзи. Для визначення виду виявлених попелиць, їх відбирали в спиртовий 70% розчин. Попелиць ідентифікували за допомогою морфологічних ідентифікаційних ключів [46; 47; 48] за допомогою бінокюляра як вид *Rhopalosiphum padi* (рис. 4.7).



Рис. 4.7. Попелиці *Rhopalosiphum padi* на рослинах кукурудзи (інструментальне збільшення $\times 20$)

Слід зазначити, що рослини заселені попелицями, за даними імуноферментного аналізу, були уражені вірусом мозаїки цукрової тростини. З отриманих результатів можна зробити припущення, що *Rhopalosiphum padi* є природним вектором SCMV в агроценозах України.

Таким чином, при виконанні роботи в обстежених регіонах, зокрема в Київській, Харківській та Вінницькій областях, виявлено симптоми характерні

для хвороби карликової мозаїки кукурудзи, а саме штрихувата та смугаста мозаїка, карликовість, плямистість. Використовуючи метод імуноферментного аналізу в модифікації DAS-ELISA було ідентифіковано збудник – вірус мозаїки цукрової тростини в Київській області. Інші потенційні вірусні збудники карликової мозаїки кукурудзи не були виявлені. Було досліджено морфологію збудника методом трансмісійної електронної мікроскопії та визначено розміри вірусних часток. Також в пазухах листків рослин кукурудзи з вірусоподібними симптомами було виявлено попелиць, які можуть виступати векторами вірусів, що викликають хворобу карликової мозаїки кукурудзи. Їх було ідентифіковано за морфологічними ключами. З отриманих результатів, можна зробити припущення, що *Rhopalosiphum padi* є природним вектором для вірусу мозаїки цукрової тростини в агроценозах України.

ВИСНОВКИ

1. У результаті візуального обстеження посівів кукурудзи в різних областях України, зокрема у Вінницькій, Київській та Харківській, було виявлено різноманітні симптоми, що характерні для карликової мозаїки кукурудзи, та потенційні вектори збудників хвороби.
2. Тестування відібраних зразків кукурудзи за допомогою імуноферментного аналізу показало циркуляцію вірусу мозаїки цукрової тростини лише в Київській області з трьох обстежених. Частка рослин, уражених SCMV, в Київській області становила 35%, у загальній кількості досліджених проб становила 19,7%. Інші віруси, що можуть викликати хворобу карликової мозаїки кукурудзи, зокрема MDMV, SrMV та JGMV, не було виявлено.
3. У результаті електронномікроскопічних досліджень соку симптоматичних рослин було виявлено гнучкі ниткоподібні вірусні частки довжиною близько 750 нм і 13 нм в діаметрі, що підтверджує потівірусну інфекцію.
4. *Rhopalosiphum padi* є потенційним природним вектором SCMV в агроценозах України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Berger (1983). *Evidence for 2 modes of retention of Maize dwarf mosaic virus by Schizaphis graminum.*
2. Boothroyd C.W. (1977). Seed transmission of *Maize dwarf mosaic virus* in sweet corn and yield reduction in plants from an infected seed lot. *Am. Phytopathol. Soc.* 4:184. doi: 10.1111/j.1439-0434.1984.tb00746.x.
3. CABI (n.d.). *Myzus persicae (green peach aphid).*
4. Ford and Krass (n.d.). *Ultrastructure of Corn systemically infected with Maize dwarf mosaic virus.*
5. Fuchs, E. and Grüntzig, M. (1995). Influence of sugarcane mosaic virus (SCMV) and maize dwarf mosaic virus (MDMV) on the growth and yield of two maize varieties / Einfluß des Zuckerrohrmosaik-Virus (sugarcane mosaic virus, SCMV) und des Maisverzweigungsmosaik-Virus (maize dwarf mosaic virus, MDMV) auf Wachstum und Ertrag von zwei Maissorten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, [online] 102(1), pp.44–50. Available at: <https://www.jstor.org/stable/43386365>.
6. Gaur R.K., Singh M., Singh A.P., Singh A.K., Rao G.P. (2002). Screening of sugarcane mosaic potyvirus (SCMV) from cane stalk juice. *Sugar Tech.* ;4:169–171. doi: 10.1007/BF02942702.
7. Hill, J. H., Ford, R. E., & Benner, H. I. (1973). Purification and partial characterization of maize dwarf mosaic virus strain B (Sugarcane mosaic virus). *Journal of General Virology*, 20(3), 327–339. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-20-3-327>
8. Hill, J.H. and Benner, H.I. (1976). Properties of potyvirus RNAs: Turnip mosaic, tobacco etch, and maize dwarf mosaic viruses. *Virology*, 75(2), pp.419–432. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(76\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(76)90040-4).
9. Hillung, J., Elena, S.F. and Cuevas, J.M. (2013). Intra-specific variability and biological relevance of P3N-PIPO protein length in

potyviruses. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1).
doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-249>.

10. influentialpoints.com. (n.d.). *Hysteroneura setariae* (Rusty plum aphid) identification, images, ecology, control. [online] Available at: https://influentialpoints.com/Gallery/Hysteroneura_setariae_rusty_plum_aphid.htm

11. influentialpoints.com. (n.d.). *Rhopalosiphum maidis* (Corn leaf aphid) identification, images, ecology, control. [online] Available at: https://influentialpoints.com/Gallery/Rhopalosiphum_maidis_corn_leaf_aphid.htm

12. Knoke J.K., Louie R., Madden L.V., Gordon D.T. (1983). Spread of *Maize dwarf mosaic virus* from johnsongrass to corn. *Plant Dis.* **67**:367–370. doi: 10.1094/PD-67-367.

13. Kocsis, M.G., Nolte, K.D., Rhodes, D., Shen, T.L., Gage, D.A. and Hanson, A.D. (1998). Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in *Spartina alterniflora* L. Evidence that S-methylmethionine and dimethylsulfoniopropylamine are intermediates. *Plant Physiology*, [online] 117(1), pp.273–281. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.117.1.273>.

14. Kong, P. and Steinbiss, H.-H. . (1998). Complete nucleotide sequence and analysis of the putative polyprotein of maize dwarf mosaic virus genomic RNA (Bulgarian isolate). *Archives of Virology*, 143(9), pp.1791–1799. doi:<https://doi.org/10.1007/s007050050417>.

15. Kuntze L., Fuchs E., Grüntzig M., Schulz B., Klein D., Melchinger A.E. (1997). Resistance of early-maturing European maize germplasm to *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) and *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) *Plant Breed.* **116**:499–501. doi: 10.1111/j.1439-0523.1997.tb01038.x.

16. Law, M. D. (1989). Effect of host resistance on pathogenesis of maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology*, 79(7), 757. <https://doi.org/10.1094/phyto-79-757>

17. Louie R, Knoke JK. (1975). Strains of maize dwarf mosaic virus. *Plant Dis Repr.*; 59:518–522.

18. Ludmerszki, E., Chounramany, S., Oláh, C., Kátay, G., Rácz, I., Almási, A., Solti, Á., Bélai, I., & Rudnóy, S. (2017). Protective role of S-methylmethionine-salicylate in maize plants infected with Maize dwarf mosaic virus. *European Journal of Plant Pathology*, 149(1), 145–156. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1174-0>
19. Ludmerszki, E., Rácz, I. and Rudnóy, S. (2014). S-methylmethionine alters gene expression of candidate genes in Maize dwarf mosaic virus infected and drought stressed maize plants. *Acta Biologica Szegediensis*, [online] 58(1), pp.1–5. Available at: <https://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2809> [Accessed 20 Apr. 2023].
20. Maize dwarf mosaic virus (dwarf mosaic of maize). (2022). [Dataset]. In *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.8157>
21. Mayhew, D.E. and Ford, R.E. (1974). Detection of ribonuclease-resistant RNA in chloroplasts of corn leaf tissue infected with maize dwarf mosaic virus. *Virology*, 57(2), pp.503–509. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90189-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90189-5).
22. Messieha (1967). *Studies on aphid transmission of Maize dwarf mosaic virus*.
23. Mikel M.A., D’Arcy C.J., Ford R.E. (1984). Seed Transmission of *Maize dwarf mosaic virus* in Sweet Corn. *J. Phytopathol.* 110:185–191. doi: 10.1111/j.1439-0434.1984.tb00746.x
24. Mikel M.A., D’Arcy C.J., Rhodes A.M., Ford R.E. Mikel, M. A. (1981). Yield Loss in Sweet Corn Correlated with Time of Inoculation with Maize Dwarf Mosaic Virus. *Plant Disease*, 65(11), 902. <https://doi.org/10.1094/pd-65-902>.
25. Mikel M.A., D’Arcy C.J., Rhodes A.M., Ford R.E. Yield response of sweet corn to *Maize dwarf mosaic virus*. *Plant Dis.* 1981;65:900–901. doi: 10.1094/PD-65-900.
26. Murry, L.E., Elliott, L.G., Capitant, S.A., West, J.A., Hanson, K.K., Scarafia, L., Johnston, S., DeLuca-Flaherty, C., Nichols, S. and Cunanan, D. (1993). Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat

protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, [online] 11(13), pp.1559–1564. doi:<https://doi.org/10.1038/nbt1293-1559>.

27. Panayotou P.C. (1981). Investigations on seed transmission of *Maize dwarf mosaic virus* and its effect on the establishment of seedlings. *J. Plant Dis. Prot.* ;88:621–625.

28. Petrik, K., Sebestyén, E., Gell, G. and Balázs, E. (2010). Natural insertions within the N-terminal region of the coat protein of Maize dwarf mosaic potyvirus (MDMV) have an effect on the RNA stability. *Virus Genes*, [online] 40(1), pp.135–139. doi:<https://doi.org/10.1007/s11262-009-0425-3>.

29. *Phytopathology (1989) | Taxonomy of Potyviruses Infecting Maize, Sorghum, and Sugarcane in Australia and the United States as Determined by Reactivities of Polyclonal Antibodies Directed towards Virus-Specific N-Termini of Coat Proteins.* (n.d.). [Www.apsnet.org](http://www.apsnet.org). Retrieved April 20, 2023, from https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1989Abstracts/Phyto79_223.htm

30. Revers, F. and García, J.A. (2015). Molecular Biology of Potyviruses. *Advances in Virus Research*, pp.101–199. doi:<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>.

31. Robert W.Toler..(1985). Maize dwarf mosaic, The most important Virus disease of sorghum.

32. Scott, G. E., & Rosenkranz, E. (1987). Variable Reaction within Corn Inbreds to Maize Dwarf Mosaic Virus not Genetically Controlled1. *Crop Science*, 27(1), 78–79. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183x002700010020x>

33. Shepherd R.J., Holdeman Q.L. (1965). Seed transmission of the Johnsongrass strain of the *Sugarcane mosaic virus* in Corn. *Plant Dis. Report.* **49**:468–469.

34. Shukla DD, Frenkel MJ, McKern NM, Ward CW, Jilka J, Tosic M, Ford RE.(1992). Present status of sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. *Arch Virol (Suppl 5)*. 363–373.

35. Shukla, D.D. and Ward, C.W. (1989). Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virus Research*, [online] 36, pp.273–314. doi:[https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60588-6](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60588-6).
36. Stewart, L., Bouchard, R., Redinbaugh, M., & Meulia, T. (2012). Complete sequence and development of a full-length infectious clone of an Ohio isolate of Maize dwarf mosaic virus (MDMV). *Virus Research*, 165(2), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.02.004>
37. Sum I., Németh M., Pacsa A.S. Detection of *Maize dwarf mosaic virus* with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) *J. Phytopathol.* 1979;**95**:274–279. doi: 10.1111/j.1439-0434.1979.tb01602.x.
38. Toler R.W. (1985). Maize dwarf mosaic, the most important virus disease of sorghum. *Plant Dis.* **69**:1011–1015. doi: 10.1094/PD-69-1011.
39. Tosic M., Ford R.E., Shukla D.D., Jilka J. (1990) Differentiation of *Sugarcane*, *Maize dwarf*, *Johnsongrass*, and *Sorghum mosaic viruses* based on reactions of oat and some sorghum cultivars. *Plant Dis.* doi: 10.1094/PD-74-0549.
40. *Transmission of Maize Dwarf Mosaic Virus to Corn.* [online] Available at:https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1971Abstracts/Phyto61_1516.htm.
41. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.-L. and Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74(1-2), pp.157–175. doi:[https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00220-9).
42. Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., & Miller, W. A. (2012). Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLOS Pathogens*, 8(4), e1002639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002639>
43. viralzone.expasy.org. (n.d.). *Potyvirus ~ ViralZone.* [online] Available at: <https://viralzone.expasy.org/50>.
44. Wang, R.Y., Ammuar, E.D., Thornbury, D.W., Lopez-Moya, J.J. and Pirone, T.P. (1996). Loss of potyvirus transmissibility and helper-

component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *The Journal of General Virology*, [online] 77 (Pt 5), pp.861–867. doi:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-5-861>.

45. Wikipedia. (2023). *Rhopalosiphum maidis*. [online] Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Rhopalosiphum_maidis#/media/File:Corn_leaf_aphid_s_\(Rhopalosiphum_maidis\)_on_maize_\(Zea_mays\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Rhopalosiphum_maidis#/media/File:Corn_leaf_aphid_s_(Rhopalosiphum_maidis)_on_maize_(Zea_mays).jpg) [Accessed 20 Apr. 2023].

46. Williams L.E., Findley W.R., Dollinger E.J., Ritter R.M. (1968). Seed transmission studies of *Maize dwarf mosaic virus* in corn. *Plant Dis. Report.* 52:863–864.

47. www.apsnet.org. (n.d.). *Phytopathology 1971 | Factors Affecting Aphid*

48. www.apsnet.org. (n.d.). *Phytopathology 1974 | Leaf-Dip Serology for the Determination of Strain Relationships of Elongated Plant Viruses*. [online] Available at: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1974Abstracts/Phyto64_128.htm [Accessed 20 Apr. 2023].

49. www.apsnet.org. (n.d.). *Plant Disease 1982 | Insect Transmission of Plant Viruses and Mycoplasma-like and Rickettsia-like Organisms*. [online] Available at: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1982Abstracts/PD_66_99.htm [Accessed 20 Apr. 2023].

50. www.cabdirect.org. (n.d.). *How to access research remotely*. [online] Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19881105459> [Accessed 20 Apr. 2023].

51. www.dpvweb.net. (n.d.). *Details of DPV Johnsongrass mosaic virus and References*. [online] Available at: <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=340> [Accessed 20 Apr. 2023].

52. www.dpvweb.net. (n.d.). *Details of DPV Maize dwarf mosaic virus and References*. [online] Available at: <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=341>.

53. www.dpvweb.net. (n.d.). *Details of DPV Sorghum mosaic virus and References.* [online] Available at: <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=359>.

54. www.dpvweb.net. (n.d.). *Details of DPV Sugarcane mosaic virus and References.* [online] Available at: <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=342>.

55. Zambrano, J.L., Jones, M.W., Brenner, E., Francis, D.M., Tomas, A. and Redinbaugh, M.G. (2014). Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus-resistant maize inbred line. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(4), pp.867–880. doi:<https://doi.org/10.1007/s00122-014-2263-5>.

56. Zhang Z.Y., Wang Y.G., Shen X.J., Li L., Zhou S.F., Li W.C., Fu F.L. (2013). RNA interference-mediated resistance to *Maize dwarf mosaic virus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **113**:571–578. doi: 10.1007/s11240-013-0289-z.