

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри д.б.н., проф., Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № _____ засідання кафедри

від «__» _____ 20__ р.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ
ВІРУСУ КАРЛИКОВОСТІ ПШЕНИЦІ**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю біологія

Неделя Ірини Вікторівни

Науковий керівник від кафедри
к.б.н., ас. Дуніч А.А

Робота виконана на базі ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка під
керівництвом д.б.н., проф. Міщенко Л.Т.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Характеристика вірусу карликовості пшениці	5
1.1. Властивості вірусу карликовості пшениці	5
1.2. Філогенетичні дослідження ізолятів вірусу карликовості пшениці.....	11
1.3. Заходи профілактики та боротьби з вірусом карликовості пшениці	15
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	20
2.1. Матеріали досліджень.....	20
2.2. Відбір зразків.....	20
2.3. Твердофазний імуноферментний аналіз	20
2.4. Виділення тотальної ДНК.....	21
2.5. Полімеразна ланцюгова реакція	23
2.6. Філогенетичний аналіз.....	23
2.7. Статистична обробка результатів.....	25
РОЗДІЛ 3. Результати дослідження та обговорення	26
3.1. Дослідження симптомів вірусної інфекції на рослинах пшениці.....	26
3.2. Ідентифікація вірусів методом імуноферментного аналізу	30
3.3. Діагностика вірусу карликовості пшениці методом ПЛР.....	34
3.4. Філогенетичний аналіз послідовностей гена капсидного білка ізолятів вірусу карликовості пшениці.....	36
3.4.1. Визначення штамової приналежності ізолятів	36
3.4.2. Дослідження походження ізолятів	45
3.4.3. Аналіз амінокислотних мутацій	47
ВИСНОВКИ	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	53

ВСТУП

Втрати врожаю від патогенів можуть бути зменшені шляхом ефективного захисту від захворювань у системах землеробства. Однак, ефективність цих заходів залежить від ранньої діагностики.

Вирішальне значення у забезпеченні продовольчої програми України мають зернові культури, з яких основною є пшениця озима, що займає посівну площу понад 6 млн. га. в Україні. Значення цієї культури для народного господарства нашої країни важко переоцінити, однак її врожайність протягом останніх семи років становить лише 4 т/га, що набагато нижче за генетично-потенційну продуктивність вітчизняних сортів. Навіть за сприятливих для рослинництва умов втрати врожаю пшениці від вірусних хвороб можуть сягати понад 60% (Abt, 2019).

Найменш дослідженим серед вірусних хвороб пшениці в нашій країні є вірус карликовості пшениці, ВКП (wheat dwarf virus, WDV). Вірус карликовості пшениці - шкодочинний вірус, адже викликає такі симптоми, як карликовість, неволошування, пожовтіння і смугастість листків, а також зниження стійкості до холоду та передчасна загибель рослин у ранній стадії розвитку (Vaske, 1972). Вірус карликовості пшениці може призводити до суттєвих втрат врожаю – від 20 до 40%, у окремих випадках – до 100% (Lindbland, Waern, 2002; Lemmetty, Huusela-Veistola 2005; Sirlova et al., 2005).

Дослідження вірусу карликовості пшениці має важливе економічне значення, які нададуть змогу підвищити стійкість сортів пшениці та розвиток наукових підходів до вивчення та контролю вірусних захворювань. Результати таких досліджень можуть сприяти зростанню врожайності пшениці, покращенню якості продукції та збільшенню її стійкості. Знання про наявність та поширення вірусу карликовості пшениці може бути корисним для селекції та розробки стійких сортів пшениці. Це допоможе зменшити ураженість культури до цього вірусу та забезпечити більш стабільний врожай.

Останні повідомлення про виявлення ВКП на рослинах пшениці озимої в Україні було у 2009 році (Київська та Одеська області) (Тóbiás et al., 2011) та у 2011 році на рослинах пшениці озимої і ячменю озимого в Одеській області та на диких злаках у Херсонській та Одеській областях (Гуляєва та ін., 2011) Проте, останні близько десяти років інформації про виявлення ВКП на території України не з'являлося.

Тому, метою нашої роботи було дослідити молекулярно-генетичні властивості ізолятів вірусу карликовості пшениці.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ КАРЛИКОВОСТІ ПШЕНИЦІ

1.1. Властивості вірусу карликовості пшениці

Хвороба карликовості пшениці (WDD) була вперше описана на пшениці в 1960-х роках у колишній Чехословацькій СР (Vacke, 1961). На сьогодні відомо, що ареал поширення WDD включає численні країни Європи, Близького Сходу, Африки та Азії.

Хворі рослини характеризується наступними симптомами: карликовістю, пожовтінням, плямистістю, смугами на листках, пригніченим колосінням і суворою затримкою росту інфікованих рослин. Це в результаті може спричинити до 90% втрат урожаю (Abt, 2019). Таким чином, WDD розглядається як серйозна проблема для виробництва зерна в більшості зернових районів світу.

На сьогодні відомо, що дану хворобу викликає вірус карликовості пшениці, який відноситься до родини *Geminiviridae*, роду *Mastrevirus* та індукує розвиток WDD на дрібнозернових злаках.

Загалом усі віруси родини *Geminiviridae* – це віруси, що інфікують рослини. Вони характеризуються здвоєними неповними ікосаедричними частинками 22×38 нм у діаметрі і мають моно- або біпартитні кільцеві одноланцюгові геноми ДНК розміром 2,5–5,2 кб. На основі вектора, діапазону хазяїв і організації геному, а також згідно з останнім таксономічним переглядом, члени родини класифікуються на дев'ять родів: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Turncurtovirus*, *Capulavirus* і *Grablovirus* (Zerbini, 2017).

Віруси роду *Mastrevirus* мають несегментований геном, що містить чотири відкриті рамки зчитування (ORF), дві кодують білок руху (MP) та

капсидний білок (CP), відповідно, і дві у комплементарному сенсі, які кодують білки Rep і RepA, що асоційовані з реплікацією.

Більшість вірусів роду *Mastrevirus* уражує однодольні рослини, що належать до родини *Poaceae*. Деякі мастревіруси, такі як вірус хлоротичної карликовості нуту, вірусу хлоротичності нуту, вірус почервоніння листя нуту, жовтого нуту та вірусу жовтої карликовості тютюну, інфікують лише дводольні рослини, такі як тютюн, квасоля та нут. Мастревіруси передаються певними видами цикадок (Pouramini, 2019).

Геном WDV складається з кільцевої одноланцюгової ДНК (ssDNA), яка має розмір приблизно 2,75 кб. Ця молекула кодує чотири білки, як і у інших представників роду *Mastrevirus*: відкриті рамки зчитування віріону V1 і V2 (ORF) кодують білок руху (MP) і білок оболонки (CP), тоді як дві інші ORF, C1 і C2, розташовані на комплементарному ланцюзі, кодують білки Rep і RepA, відповідно, які пов'язані з реплікацією вірусу (Abt, 2019).

Геном WDV також має дві некодуючі послідовності: довгу та коротку (LIR та SIR, відповідно), які містять послідовності, важливі для реплікації вірусу та для регуляції експресії генів. Дані ділянки також важливі для таксономії і філогенетичного аналізу вірусів, де часто використовуються.

Шляхи передачі вірусу

WDV здатний інфікувати широкий спектр хазяїв, що належать до родини *Poaceae*, включаючи економічно важливі зернові культури, наприклад, пшеницю, ячмінь, овес і жито, а також багато диких трав (наприклад, *Apera spicaventi*, *Avena fatua*, *Lolium multiflorum* і *Poa pratensis*) (Vacke, 1999).

WDV передається за допомогою цикадок *Psammotettix alienus* (Hemiptera, Cicadellidae) персистентно непропагативно, які зазвичай зустрічаються на зернових полях і луках. У ході даного процесу передачі, вірус змішується зі слиною німфи або дорослої цикадки та проникає у флоемну рідину, коли комаха проникає в тканини рослини своїм стилетом для живлення. У нестійких рослинах віруси рухаються з потоком флоєми спочатку до молодих листків і кінчиків коренів, а потім до старих частин, доки рослина не буде

системно заражена. Реакція рослини залежить не тільки від її генотипу, але й від віку рослини, коли вона заражена. Коли рослини пшениці ростуть, вони поступово набувають стійкості до WDV, і коли рослина розвинула свій перший вузол на стеблі, вона набула зрілої стійкості (Nygren, 2015).

Проблема точної ідентифікації виду *Psammotettix*, як переносників різних штамів WDV, заключається в тому, що вимагає морфологічного опису статевих органів самця (тобто едеагуса), що не дозволяє віднести самок до певного виду *Psammotettix*. Через складну таксономію *Psammotettix spp.*, критерії, які використовуються для ідентифікації видів цикадок, погано описані в дослідженнях WDV. Це може призвести до деяких суперечливих результатів, у тому числі щодо експериментів із передачі WDV, опосередкованої цими переносниками (Abt, 2019).

Проте загалом є певні дані, які вказують на різні види комах, відповідальні за розповсюдження вірусу в різних частинах світу. Повідомлялося, що саме вид *Psammotettix alienus* передає найбільшу кількість WDV у світі. Наприклад, є повідомлення про передачу у Фінляндії, Китаї та Ірані саме цим видом (Wang, 2014; Abt, 2018). Однак, наприклад, вид *P. provincialis* може також передавати WDV, що було зареєстровано у Сирії (Ekzayez, 2011). При цьому показано також, що особини *P. alienus*, що походять з Ірану, здатні з високою ефективністю передавати не тільки WDV пшениці, але і WDV ячміню (Ghodoum Parizipour, 2016).

Життєвий цикл *Psammotettix alienus* добре вивчений. *P. alienus* зимує в стадії яйця; яйця вилуплюються протягом квітня, а перші дорослі особини з'являються в травні або червні залежно від температури. Відомо, що *P. alienus* може мати два-три покоління протягом року в помірній зоні (Manurung, 2005). Весною популяція першого покоління цикадок починає збільшуватися, коли температура досягає 15 °C, створюючи серйозну загрозу для рослин ячменю (Lindblad, 2004).

Найбільш критичним періодом, при якому відбувається максимальна кількість заражень, є пізня осінь, коли чисельність цикадок висока і рослини

знаходяться на ранніх стадіях розвитку, що робить їх чутливими до вірусної інфекції. Це підтверджено тим, що загалом рівень зараження WDV позитивно корелює з чисельністю цикадок (Kis, 2016).

Повідомлялося, що дорослі особини та різні стадії личинок можуть отримувати та передавати як пшеничні, так і ячмінні штами WDV (Abt, 2019). Щодо можливості передачі штамів на дикі рослини, інформації немає.

Тобто, підсумовуючи, первинне зараження викликається дорослими цикадками восени, а вторинне зараження навесні — німфами (Lindblad, 2004). Більш тривалі теплі періоди наприкінці літа та восени сприяють посиленню інфекції, тому ранні стадії розвитку озимої пшениці та озимого ячменю піддаються особливому ризику (Mehner, 2003; Manurung, 2004).

При дослідженні шляхів передачі вірусу важливо пам'ятати, що діапазон його хазяїв охоплює не лише пшеницю, але й кілька диких трав та інших злаків, таких як ячмінь, овес і жито. Для зараження пшениці дикорослі трави є менш важливими як первинні джерела порівняно з культивованою пшеницею. Проте трави, що ростуть поблизу культивованих зернових полів, можуть виступати резерваторами WDV (Nygren, 2015).

Як вже було зазначено, симптоми інфекції WDV у пшениці включають смугастість листків, хлороз, зменшення кількості колосків, зниження холодостійкості та загибель рослин на ранній стадії розвитку (Vacke, 1972). Проте ступінь ураження сильно залежить від стадії розвитку на момент інфікування. Інфекція на стадії двох-трьох листків призводить до більш виражених симптомів з негативним впливом на холодостійкість і врожайність, тоді як інфікування вірусом на стадії виходу в трубку призводить лише до незначного вкорочення пагонів (Lindblad, 2002).

Цікаво, що захворюваність озимих зернових різна з року в рік. Симптоматичні рослини з'являються на полі осередками із середніми втратами врожаю до 35%. У деяких випадках виникають локальні епідемії з втратою врожаю до 90% (Fohrer, 1992; Lindsten, 1999; Lindblad, 2002; Širlová, 2005). Є імовірність, що причиною є щорічні коливання температури (Pfrieme,

2022), оскільки існує інформація та певні роботи, які показують, що температура суттєво впливає на передачу вектором ряду рослинних вірусів (Damsteegt 1984; Smyrnioudis, 2001; Anhalt, 2008).

Наприклад, у польовому дослідженні Lindblad (Lindblad, 2002) було продемонстровано, що холодна погода на початку літа може негативно вплинути на життєвий цикл і розмір популяції *P. alienus*. Крім того, було помічено, що тепла погода восени може призвести до кращої зимівлі популяції цикадок. Наприклад, коли середні температури були менше 10°C, було спіймано лише кілька особин *P. alienus*, а з підвищенням температури було спіймано більшу їх кількість. Інше дослідження динаміки популяції *P. alienus* було проведено в Німеччині, яке визначило температуру як важливий фактор, що безпосередньо впливає на чисельність популяції цикадки (Manurung, 2005). Було виявлено, що тепліша погода 2000 року була пов'язана з більшою чисельністю популяції векторів на зернових полях порівняно з 1999 роком.

Загалом уже багато разів було показано, що температура також може впливати на розвиток симптомів у різноманітних взаємодіях між рослинами та різними вірусами (Li, 2009; Sugiyama, 2009; Velázquez, 2010; Ghodoum Parizipour, 2014; Ghoshal, 2014; Chung, 2015). У більшості досліджень повідомлялося, що високі температури пов'язані зі знизеним проявом симптомів у заражених вірусом рослин (Velázquez, 2010; Ghodoum Parizipour, 2014; Ghoshal, 2014; Chung, 2015). Але дані дослідження проводились не для WDV.

Тим не менш, відносно недавно групою дослідників (Ghodoum Parizipour, 2018) було проведено експеримент, що показав, як температура може вплинути на передачу WDV у пшениці та ячменю. У ході роботи було досліджено вплив різної температури на передачу ізолятів WDV-W та WDV-V рослинам пшениці та ячменю дорослими стадіями та стадіями німфи *P. alienus*, відповідно. Вони дослідили в першу чергу, як температура може впливати на рівень смертності переносника цикадки під час передачі вірусу, а

також вплив температури на розвиток симптомів та кількість вірусних частинок у WDV-інфікованих рослинах за різних температурних режимів.

Ці результати показали, що постійна температура 25°C пов'язана з найвищим рівнем інфекції, спричиненої ізолятами WDV-W та WDV-B у пшениці та ячменю шляхом передачі вектором. Схоже, що такий високий рівень зараження через передачу вектором є результатом впливу температури на комаху-переносника, а не на рослину-хазяїна, оскільки біологія цикад залежить від температури, і вважалося, що переміщення комах в просторі бути результатом зміни факторів навколишнього середовища (наприклад, температури), що призводить до зростання або зниження загальної кількості комах-переносників (Maramorosch, 2006).

Наприклад, при високих температурах, більше 30°C, цикадки мають тенденцію спускатися на землю, що зменшує кількість комах, що харчуються ними, що призводить до зниження швидкості передачі WDV рослинам пшениці та ячменю. Крім того, висока температура (35°C) була пов'язана з підвищеним рівнем смертності цикадок порівняно з іншими температурними режимами.

Цікаво, що цикадки, які переносять WDV, на стадії німфи можуть викликати найвищий рівень зараження рослин пшениці та ячменю. Це може бути пов'язано з тим, що стадія німфи *P. alienus* набагато довша за стадію імаго (Manurung et al. 2005). І, крім того, німфи *P. alienus* як переносники WDV, хоча і безкрилі, є більш активними, ніж дорослі особини.

Окрім рівня зараження, температура також може впливати на розвиток симптомів у заражених рослин. Часто висока температура (35°C) пов'язана із ремісією симптомів на інфікованих вірусом рослинах, як повідомлялося в інших патосистемах вірус-рослина (Ghodoum Parizipour, 2018; Ghoshal, 2014; Chung, 2015).

Як показано на WDV-інфікованих рослинах, ті з них, що були інкубовані при 35°C, демонстрували нижчий вміст вірусу, ніж ті, які утримувалися при постійних температурних режимах 20, 25 і 30°C. Ці результати були подібні

до отриманих раніше в попередніх дослідженнях (Ghodoum Parizipour, 2018) виходячи з того, що уражені джемівірусом рослини, інкубовані при високій температурі (30°C), мали знижений титр вірусу порівняно з рослинами, інкубованими при низьких температурах (<30°C). Ці результати свідчать про те, що більш висока температура негативно впливає на вміст вірусу в уражених рослинах.

1.2. Філогенетичні дослідження ізолятів вірусу карликовості пшениці

Філогенетичні дослідження, проведені з повногеномними послідовностями WDV, отриманими з ізолятів, відібраних на різних видах хазяїв, засвідчили наявність двох основних груп, включаючи, відповідно, спочатку описані штами пшениці та ячменю (Commandeur, 1999).

Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей ізолятів WDV різних видів хазяїв показав, що вірус утворює окрему кладу, в склад якої входять декілька штамів і яка чітко відрізняється від інших представників родини. На основі філогенетичного аналізу послідовностей WDV із ізолятів різних видів хазяїв було показано, що WDV утворює кладу, яка чітко відрізняється від інших мастревірусів і складається з кількох штамів (Vaske, 2000).

У Німеччині у рослинах *Avena fatua* за допомогою секвенування послідовностей ізолятів, що були зібрані з зернових рослин, був ідентифікований інший вид *Mastrevirus*, а саме вірус карликовості вівса (ODV). Даний вірус має подібні до WDV симптоми, не зважаючи на їх часткову подібність на основі аналізу послідовностей, відсоток схожості геномів вірусу ODV в порівнянні з штамми ячмінних та пшеничних штамів WDV складає лише 70% (Schubert, 2007).

У 2013 році на основі філогенетичного аналізу було запропоновано класифікацію для поділу вірусу на п'ять філогенетичних груп, а саме від А до

Е. За цією класифікацією було зроблено поділ на штами, що можуть інфікувати пшеницю - (WDV-W) та штами, що заражають ячмінь - (WDV-B) (Muhire, 2013). Пізніше у ході проведеного дослідження послідовностей для 230 ізолятів виділено вже шість штамів враховуючи їх подібність, а саме від А до F. До WDV-B були віднесені штами від А до F, а штами WDV-W включав в себе в більшості штами В–Е (Wu, 2008).

Філогенетичні дослідження, проведені з повногеномними послідовностями WDV, отриманими з ізолятів, відібраних на різних видах хазяїв, засвідчили наявність двох основних груп, включаючи, відповідно, спочатку описані штами пшениці та ячменю (Commandeur, 1999). Генетичне різноманіття WDV було додатково розділено на клади (від А до F) на основі подібності послідовностей та філогенетичних зв'язків: група WDV-W включає клади С, D і Е, F тоді як WDV-B включає клади А (підрозділені на А1 і А2) і В (Muhire, 2013).

Штами WDV-B і WDV-W демонструють 83–84% ідентичності за нуклеотидною послідовністю, де LIR і SIR є найбільш варіабельними геномними ділянками (Köklü, 2007). Ідентичність нуклеотидних послідовностей становить понад 94% між ізолятами WDV-B і понад 98% між ізолятами WDV-W.

Діапазон хазяїв двох клад WDV містить численні суперечливі дані, але припускає, що обидві групи можуть інфікувати, принаймні час від часу, бажаного хазяїна іншого штаму. Деякі польові дослідження показали, що ізоляти WDV-B не інфікують рослини пшениці (Tóbiás, 2011), тоді як інші польові дослідження повідомляли про ізоляти WDV-B у пшениці та ізоляти WDV-W в ячмені (Köklü, 2007; Kundu, 2009).

Експерименти з передачі вірусу показали, що ізоляти WDV-B не могли інфікувати рослини пшениці, тоді як рослини ячменю могли бути інфіковані ізолятами WDV-W (Abt, 2019). Однак, інше дослідження показало, що агроінфекційний клон WDV-B успішно інфікував рослини пшениці, але не інфікував ячмінь, жито та овес (Ramsell, 2009). Але тим не менш,

послідовності обох клад WDV були отримані з WDV-інфікованих рослин ячменю та пшениці (Wang, 2008), підкреслюючи, що WDV-W та WDV-B можуть інфікувати ці два специфічних хазяїна.

Незважаючи на це, зараження пшениці штамом WDV-B відбувається рідко, але коли це все-таки відбувається, відзначали надзвичайну карликовість та великі втрати врожаю (Wang, 2008; Ramsell, 2009).

Результати дослідження Tóbiás та співавторів (Tóbiás, 2011) показали, що угорські та українські ізоляти WDV були розділені на дві різні групи пшениці та штами ячменю. WDV-Uk-Odessa — перший ізолят штаму ячменю, що походить із зараженої пшениці в природних умовах. У злаках, що були вирощені в польових умовах України та Угорщини, вдалося ідентифікувати штам ячменю WDV в одній рослині пшениці лише один раз за час проведення інтенсивної дворічної ПЛР на основі скринінгу ізолятів WDV.

Факт передачі ячмінного штаму WDV на рослини пшениці *P. alienus* був визнаний незвичайним і рідкісним явищем. Хоча це може відбуватися в природних умовах, це відбувається у рідкісних випадках і, можливо, лише тоді, коли концентрація вірусу в рослинах-хазяях досить висока, щоб дозволити передачу вірусу шляхом подолання звичайних обмежень на взаємодію між вірусами та рослинами. Питання передачі WDV за допомогою його вектора потребує подальшого дослідження, особливо використання молекулярних підходів для ідентифікації генів вірусу або їх векторних аналогів, що відповідають за передачу вірусу та його ефективність.

Для порівняння темпів еволюції між ячмінними та пшеничними ізолятами WDV був проведений експеримент (Wei, 2024), в якому було використано 5 наборів даних, які були розділені на штами, у результаті отримали загалом 10 наборів. Ці дані були відкалібровані згідно з швидкістю еволюції. Виявлено, що швидкість еволюції WDV-пшениці перевищує швидкість еволюції WDV-ячменю для генів *CP*, *Rep*, *RepA* та загальною

областю кодування геному. На противагу, швидкість еволюції МР у ячмінного WDV була значно вищою, ніж у пшеничного. Проте, аналіз результатів показав, що штам з ячменю WDV має більш раннє відокремлення від спільного предка, ніж штам пшениці.

Усередині організму хазяїна можуть існувати різні популяції WDV, і відсутність антагонізму між ізолятами може впливати на рекомбінаційний потенціал вірусних послідовностей. Підтвердженням цьому є випадок, що вже був зафіксований для турецького ізоляту Bar [TR]. Цей ізолят є варіантом ячмінного штаму WDV, що був виявлений в інфікованому ячмені (Köklü, 2007). Аналіз повногеномної послідовності показав, що новому виду *Mastrevirus* в певній мірі відповідає ізолят ячменю WDV (Ramsell, 2009). Крім ізоляту WDV Bar [TR], аналіз вирівнювання послідовностей польових ізолятів виявив ділянки вірусного геному з короткими моделями рекомбінації за кількістю нуклеотидів між штамми пшениці та ячменю. Це свідчить про те, що послідовності штамів ячменю були замінені функціонально гомологічними послідовностями штамів пшениці. Крім того, внутрішньоспецифічні рекомбінантні геноми були виявлені у двох штамів пшениці WDV в Китаї (Wu 2002). Варто відзначити, що дефектні форми штамів пшениці та ячменю, які містять принаймні частину послідовностей SIR та LIR, також були виявлені в WDV-інфікованих рослинах (Schubert, 2014). Прогнозовані рекомбінантні геноми, були виявлені для таких представників роду *Mastrevirus*, як вірус смугастості кукурудзи (Owor, 2007).

Таким чином, вже було проведено кілька досліджень взаємодії між хазяїном і WDV, але здатність кожного штаму WDV інфікувати пшеницю та ячмінь досі не до кінця зрозуміла і суперечлива.

1.3. Заходи профілактики та боротьби з вірусом карликовості пшениці

Відомо, що одомашнені культури часто дуже сприйнятливі до багатьох патогенів, тоді як дикі родичі культур можуть бути стійкими до тих самих патогенів. Сприйнятливість сільськогосподарських культур може бути наслідком відсутності селекції на стійкість до хвороб під час одомашнення. Інші ознаки, такі як збільшений розмір насіння, посилене верхівкове домінування, придушення природного розповсюдження насіння, втрата стану спокою насіння та синхронізований ріст, були більш важливими при штучній селекції і саме їм віддавали перевагу стародавні фермери у насінницьких культурах і відбирали їх із існуючих генетичних варіацій предків диких культур (Nygren, 2015).

Найефективнішим і найстійкішим рішенням для боротьби з WDV на даний момент є використання стійких до вірусів сортів, але їх отримання потребує надто багато роботи та часу. Окрім цього, при створенні стійких сортів виникають проблеми пошуку вже існуючих стійких сортів, часто диких, для схрещування і пошуку стійких генів, чого може не бути в популяції.

На сьогодні через відсутність стійких сортів для боротьби з поширенням WDV у полі використовуються лише профілактичні агротехнічні заходи. Наприклад, такі як пізній посів озимих зернових та зменшення резерваторів вірусу шляхом видалення рослинних решток оранкою безпосередньо після збирання врожаю (Lindblad, 2002; Manurung, 2005). Сьогодні єдиним заходом для боротьби з вірусом і зменшення втрат урожаю є боротьба з переносниками за допомогою інсектицидів, але через велику кількість та мобільність цикадок успіх цього підходу обмежений. Окрім цього, наразі в Європейському Союзі немає схваленого інсектициду для боротьби з *P. alienus*, і очікується, що застосування пестицидів буде додатково обмежено в майбутньому (Pfrieme, 2022).

Тому створення толерантних або стійких сортів було б найбільш екологічно безпечним і ефективним методом боротьби з вірусом. Роботи в

цьому напрямку проводяться, але проблемою є те, що наразі виявлено лише кілька толерантних сортів пшениці, що перешкоджає успіху традиційних методів селекції.

Вирішенням цього є генна інженерія. І в цьому напрямку уже зроблено кілька важливих проривів. У першу чергу для виявлення нових найбільш стійких сортів пшениці були проведені тести на стійкість. Нажаль, як і очікувалось, більшість досліджених сортів озимої пшениці були сприйнятливими до вірусу (Vaske, 2000).

У 2005 році 25 зареєстрованих сортів озимої пшениці було перевірено на стійкість на невеликих ділянках. Тут найменш сприйнятливі сорти показали серйозні симптоми та значну втрату врожаю (87–93%) (Širlová, 2005). Однак слабкий прояв симптомів із лише легким хлорозом спостерігалася в угорських сортів Mv Dalma та Mv Vekni (Benkovics, 2010). Обидва генотипи показали стійкі властивості до агроінокуляції ДНК WDV, і не спостерігалось жодних відмінностей у виживанні або поведінці порівняно з чутливими генотипами, що важливо для подальшої селекції чи генної інженерії (Benkovics, 2010).

У роботі Pfrieme проводилось дослідження, в якому дослідники пройшли далі і знайшли не лише стійкі сорти рослин, але і відповідні локуси, які можуть відповідати за стійкість рослин (Pfrieme, 2022).

Під час скринінгу на стійкість до WDV з використанням штучної інокуляції вивчали популярні сорти пшениці, зразки з генного банку та диких родичів пшениці. Підмножину зі зразків пшениці було генотиповано за допомогою 15k iSelect SNP Chip. За допомогою загальногеномного дослідження асоціацій (GWAS) було ідентифіковано локуси кількісних ознак (QTL) для часткової стійкості до WDV.

Скринінг стійкості до WDV у пшениці та диких її родичів показав, що два сорти (зразок з генного банку PI 245511 і сорт озимої пшениці «Fisht») мають низький середній рівень зараження (близько 5%) і відносно врожайність порівняно зі здоровими. Завдяки асоціаційним генетичним дослідженням гексаплоїдних видів ідентифікувати 35 QTL для стійкості до WDV.

Окрім цього, важливим напрямком також є використання новітніх методів генної інженерії. Наприклад, щоб подолати неспроможність традиційної селекції забезпечити будь-яку резистентність, можна застосувати біотехнологічні методи, використовуючи ефективну противірусну активність РНК-інтерференції (RNAi) (Cillo, 2014).

RNAi є регуляторним механізмом, який служить системою противірусного захисту і контролює ендogenous експресію генів. Вірусна інфекція запускає виробництво вірусоспецифічних малих інтерферуючих РНК (siRNA; 21 нуклеотид у довжину), які потім розпізнаються комплексом RISC (РНК-індукований комплекс глушіння), що призводить до специфічної деградації комплементарних вірусних РНК (Seo, 2013).

Експресія кодованих трансгеном довгих фрагментів РНК вірусних послідовностей може бути використана для створення ефективної стійкості проти вірусів у рослинах, що було показано у кількох роботах (Simon-Mateo, 2011; Wang, 2012).

Проте, незважаючи на всі можливі перспективи, як і у всього, у цієї технології також є потенційні недоліки. По-перше, дана технологія може призвести до прояву нецільових ефектів, націлених на власні ендogenous РНК (Xu et al., 2006). Ще одним занепокоєнням, пов'язаним з біотехнологічним використанням шляху RNAi, опосередкованого siRNA, є потенційне пригнічення її активності при низькій температурі, як описано у кількох видів (Kasai, 2009; Hu, 2011). Ця температурна чутливість може бути спричинена залежною від температури активністю рослинних РНК-залежних РНК-полімераз, залучених до RNAi, яку можна подолати за допомогою трансгенної експресії довгих продуктів dsRNA (Hu, 2011).

Альтернативним підходом до впровадження стійкості до вірусів у рослин є застосування штучної miRNA (amiRNA), націленої на вірусоспецифічні послідовності (Tiwari, 2014). AmiRNA розроблені шляхом модифікації дуплексів miRNA / miRNA ендogenous попередника amiRNA для отримання amiRNA, націленої на експериментально визначені цільові послідовності.

Піонерська робота продемонструвала, що технологію amiRNA можна використовувати як ефективну противірусну технологію, що робить рослини *Arabidopsis thaliana* стійкими до вірусу жовтої мозаїки ріпи та вірусу мозаїки ріпи (Niu, 2006). Щоб зменшити ризик еволюції вірусу, що призводить до ухилення від резистентності, вигідно використовувати кілька amiRNA, націлених на різні консервативні ділянки геному вірусу (Zhang, 2011; Fahim, 2012).

Стійкість/толерантність до вірусу на основі amiRNA була успішно розроблена на модельних і сільськогосподарських рослинах для контролю інфекції plum pox virus (Simon-Mateo, 2006), cucumber mosaic virus (Zhang, 2011), potato virus Y і potato virus X (Ai, 2011), wheat streak mosaic virus (Fahim, 2012), watermelon silver mottle virus (Kung, 2012) та tomato leaf curl New Delhi virus (Vu, 2013).

Стосовно використання даної технології для створення стійких до WDV рослин, існує робота, яка показує перспективи на рослинах ячменю (Kis, 2016). Рослини ячменю були трансформовані поліцистронною конструкцією amiRNA, що експресує amiRNA з найкращою ефективністю. Були проведені дослідження зараження з використанням WDV, що несуть вектори *Psammotettix alienus*, і інфіковані рослини зберігалися при 12–15 °C, щоб перевірити довговічність стійкості при низькій температурі. Отже, дані експерименти показали, що технологія amiRNA може контролювати реплікацію ДНК-вірусу в ячмені навіть при низькій температурі, подібній до умов польової інфекції. Окрім цього, в боротьбі з WDV було використано і систему CRISPR/Cas9 (Kis, 2019).

З метою ідентифікувати кілька цільових сайтів, дослідники відобразили геном WDV для потенційних цільових послідовностей CRISPR/Cas9, що охоплюють мотив PAM. Щоб створити захист від кількох штамів вірусу, геномна послідовність двох штамів WDV ячменю та двох пшениць була використана для ідентифікації потенційних цільових сайтів sgRNA, розташованих у консервативних областях геномів вірусів.

Результати демонструють, що за відсутності природних ресурсів стійкості систему CRISPR/Cas9 можна використати для створення надзвичайно ефективною стійкості однодольних рослин для боротьби з економічно важливим руйнівним ДНК-вірусом, що передається вектором. Однак, відбір потужних sgRNA і забезпечення їх належної експресії є передумовами оптимального результату.

Спільне застосування різних альтернативних біотехнологічних методів може забезпечити ефективне рішення для розробки міцної, довготривалої, високоефективної резистентності широкого спектру дії.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали дослідження

У роботі були використані сорти та селекційні лінії рослин пшениці озимої та пшениці м'якої.

2.2. Відбір зразків

Проведено візуальні обстеження рослин пшениці у п'яти областях України – у Вінницькій, Хмельницькій, Київській, Чернігівській та Черкаській. При обстеженнях використовували методику, описану В. Ф. Пересипкіним (Пересипкін, 2000). Відібрані зразки хворих та візуально здорових рослин пшениці були відібрані для подальших досліджень.

2.3. Твердофазний імуноферментний аналіз

Для ідентифікації вірусів використовувався метод твердофазного імуноферментного аналізу (DAS-ELISA) за допомогою комерційних тест-систем для наступних вірусів: вірус смугастої мозаїки пшениці (WSMV), вірус карликовості пшениці (WDV), вірус жовтої карликовості ячменю (BYDV), вірус мозаїки бромусу (BMV), вірус веретеновидної смугастої мозаїки пшениці (WSSMV) (виробництва Loewe, Німеччина). Для негативного контролю також використовувалися зразки листків здорових рослин. Позитивний контроль був представлений комерційними зразками (Loewe, Німеччина).

I. Перші антитіла наносили на карбонатний буфер з рН 9,8 і інкубували при 37°C протягом 4 годин. Потім вони відмивалися 3 рази протягом 5 хвилин буфером відмивки рН 7,4, що містив 0,1М PBS та tween-20.

II. Антигени (рослинний матеріал розтирали у буфері зразку, центрифугували при 3 тис об/хв протягом 20 хвилин, відбирали над осад і використовували його для аналізу) наносили, а також вносили комерційні позитивний і негативний контролю (в розведенні 1:20). Інкубація відбувалася протягом ночі при 4°C. Потім відмивалися 3 рази протягом 5 хвилин буфером відмивки.

III. Другі мічені лужною фосфатазою антитіла наносили на буфер для розведення АТ і інкубували протягом 4 годин при температурі 37 °С. Потім вони відмивалися тричі протягом 5 хвилин буфером відмивки і один раз 0,1М фосфатним буфером.

IV. Вносили субстратний розчин, який складався з субстратного буфера для лужної фосфатази (рН=9,8) з хромогеном (N-п-нітрофенілфосфат). Концентрація хромогена становила 1мг/мл. Результати реєстрували на рідері Thermo Labsystems Opsis MR (США) з програмним забезпеченням Dypex Revelation Quicklink при довжині хвилі 405 нм. Результати вважали достовірними, якщо вони перевищували негативний контроль у три рази (Crowther, 1995).

2.4 Виділення тотальної ДНК

Виділення тотальної ДНК із рослинного матеріалу проводили з використанням Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific, США) проводили згідно рекомендацій виробника:

1. Гомогенізували 100 мг рослинної тканини у ступці з додаванням рідкого азоту.

2. Додавали 400 мкл лізуючого буфера та гомогенізували у ступках протягом 5 хв.
3. Відбирали 1,5мл гомогенату зі ступки та переносили у стерильну мікропробірку.
4. Мікропробірку розміщували на водяну баню – 65 °С 10 хв.
5. Вносили до мікропробірки 600 мкл хлороформу, м'яко перемішували 3-5 разів.
6. Центрифугування 10 000 об/хв протягом 2 хв.
7. Готували у новому чистому епендорфі precipitation solution: 720 мкл стерильної дист. води + 80 мкл концентрованого (10 x) precipitation solution.
8. Переносили верхню водну фазу, яка містить РНК, з епендорфу після нщц (пункт 6) до епендорфу з приготованим precipitation solution (пункт 7), перемішували при кімнатній температурі 1-2 хв.
9. Центрифугування 10 000 об/хв. протягом 2 хв.
10. Виливали супернатант, після до цієї ж мікропробірки додавали 100 мкл розчину NaCl, ресуспендували осад ДНК зі стінок чи дна мікропробірки.
11. Додавали 300 мкл охолодженого 96% етанолу.
12. Екстракція ДНК ніч при – 20 °С
12. Низькошвидкісне центрифугування 10 000 об/хв протягом 3-4 хв.
13. Відбирали етанол та розводили отриману ДНК у 20 мкл стерильної дистильованої води.

Аналіз тотальної ДНК, отриманої в результаті виділення зі зразків, проводили за допомогою електрофорезу 1,5%-му агарозному гелі, у якості барвника застосовували розчин бромистого етидію в концентрації 0,5 мкг/мл, протягом 20 хв з подальшою візуалізацією під ультрафіолетовим світлом.

2.4. Полімеразна ланцюгова реакція

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували комерційний набір DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США).

Ампліфікацію проводили у загальному об'ємі 25 мкл для одного зразка: 12,5 мкл Dream 2x буферу Taq Green PCR Master Mix, 7,5 мкл води стерильної, 1 мкл кожного з праймерів (у концентрації 10 μ M) та 3 мкл тотальної ДНК. Застосовували олігонуклеотидні праймери, що кодують ген капсидного білка вірусу, довжиною 783 п.н: WDV-F 5'-ATGGTGACCAACAAGGACTCC-3' та WDV-R 5'-TTACTGAATGCCGATGGCTTTG -3' (Zhang P., 2014). Режим ампліфікації включав: денатурація 3 хв при 95°C, далі 30 циклів: 95°C 30 с, 60°C 30 с, та 72°C 1 хв, та 72° 5 хв.

Продукти ПЛР були розділені на 1,5% агарозному гелі, у якості барвника застосовували розчин бромистого етидію в концентрації 0,5 мкг/мл, з ДНК-маркерами CSL-MDNA-100bp (Cleaver Scientific, Велика Британія) та візуалізовані під УФ світлом.

2.6. Філогенетичний аналіз

Сиквенування за Сенгером очищених ампліфікованих фрагментів гена капсидного білка ізолятів ВКП проводили на аналізаторі 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems HІTACHI, США) з використанням набору BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США).

Філогенетичний аналіз здійснювали за допомогою програмного пакету MEGA 11. Вирівнювання послідовностей здійснювали за допомогою програми Clustal W. Філогенетичні дерева для послідовностей ділянки гена капсидного білка ізолятів ВКП побудовані методом зв'язування найближчих сусідів, Neighbor-Joining, NJ (Saitou, 1987) та методом максимальної

правдоподібності (maximum likelihood, ML) (Huelsenbeck, 1997) з використанням найбільш оптимальної моделі Jukes–Cantor у програмі MEGA. Ізолят SxA25 вірусу карликовості вівса (AM296025) був взятий для побудови кореня дерева (Schubert, 2007).

Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп-тест з 1000 бутстреп реплікаціями. Дерево намальовано в масштабі з довжиною гілок у тих же одиницях, що й еволюційні відстані, які використовуються для визначення філогенетичного дерева. Еволюційні відстані були обчислені за допомогою методу Jukes–Cantor і виражені в одиницях кількості нуклеотидних заміщень на сайт (Jukes, 1969).

Амінокислотні послідовності гена капсидного білка були порівняні та представлені за допомогою програми BioEdit.

Відсоток ідентичності нуклеотидних і амінокислотних послідовностей були вираховані у програмі Mega та представлені у вигляді рисунків з кольоровою шкалою-репрезентацією відсотка ідентичності із застосуванням програмного забезпечення SDT v.1 (Sequence Demarcation Tool Version 1.3) (Muhire, 2014).

Визначення співвідношення синонімічних/несинонімічних мутацій dN/dS для гена CP

Для розрахунку співвідношення dN/dS, показника еволюційного напрямку еволюції, нуклеотидні послідовності капсидного білка усіх ізолятів ВКП, взятих до дослідження, були вирівняні за кодонами. Співвідношення частоти несинонімічних (dN) до частоти синонімічних (dS) мутацій було розраховано за допомогою методу Nei-Gojoboori у програмі SNAP (Korber, 2002).

2.7. Статистична обробка результатів

Для кожного вимірювання ІФА було проведено п'ять біологічних повторів. Кожен біологічний повтор містив листки з п'яти окремих рослин, об'єднаних разом до подрібнення. Для кожного біологічного повтору були проведені три технічні повтори. Дані технічних повторів були усереднені для отримання середнього значення для кожного біологічного повтору.

Статистична обробка результатів ІФА проводилася з врахуванням стандартного відхилення:

$$X = \bar{X} \pm A\sigma$$

$$\bar{X} = (X_1 + X_2 + \dots + X_i) / i$$

$$A = |X_{\max} - \bar{X}| = |X_{\min} - \bar{X}|,$$

де \bar{X} – достовірне значення оптичної густини рідера при довжини хвилі 405 нм; \bar{X} – середнє арифметичне значення оптичної густини; $X_1 \dots X_i$; σ – стандартне відхилення.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Дослідження симптомів вірусної інфекції на рослинах пшениці

Обстеження полів пшениці показали, що у п'яти областях України (Вінницькій, Хмельницькій, Київській, Чернігівській та Черкаській) виявлено рослини пшениці з симптомами карликовості та невиколошування різного ступеню. Окрім карликовості рослини характеризувалися пожовтінням та смугастістю на листках. Всього було відібрано 52 зразки: 35 зразків пшениці 14-ти сортів та селекційних ліній із вірусоподібними симптомами карликовості, пожовтіння та невиколошування та 17 зразків візуально здорових рослин (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Сорти та селекційні лінії пшениці, відібрані для дослідження

Сорт/ селекційна лінія пшениці	Область	Симптоми
Актер	Вінницька	сильна карликовість невиколошування, смугастість на листках
Матрикс	Вінницька	сильна карликовість невиколошування, смугастість на листках
Колонія	Хмельницька	сильна карликовість невиколошування
Дагмар	Хмельницька	сильна карликовість невиколошування

Патрас	Черкаська	сильна карликовість невиколошування
Продуцент	Чернігівська	зменшене колосоутворення, карликовість
Д-13*	Київська	пожовтіння листків, карликовість, зменшене колосоутворення
Д-12*	Київська	пожовтіння листків, карликовість, зменшене колосоутворення
Д-12-1*	Київська	Пожовтіння, почервоніння та смугастість листків, карликовість, зменшене колосоутворення
Д-12-2*	Київська	пожовтіння та смугастість листків, карликовість, зменшене колосоутворення
Д-35*	Київська	пожовтіння листків, сильна карликовість, зменшене колосоутворення
Д-43*	Київська	пожовтіння листків, карликовість, зменшене колосоутворення
Д-32*	Київська	пожовтіння листків, карликовість, зменшене колосоутворення
Д-50*	Київська	пожовтіння листків, карликовість, зменшене колосоутворення

*- селекційні лінії

Серед усіх відібраних рослин, найпоширенішим симптомом була затримка росу рослин (карликовість) та відсутність колосоутворення. Виявлено рослини пшениці з суворими симптомами карликовості та невиколошування. Окрім карликовості, рослини характеризувалися також штрихуватістю різного ступеню на листках (рис. 3.1).



А

Б



В



Г



Д

Рис. 3.1. Симптоми карликовості рослин, штрихуватості на листках пшениці сорту Актер (Вінницька обл.): А, Д – здорові; Б,В,Г – уражені

На рослинах пшениці сорту Дагмар із Хмельницької області виявлено симптоми карликовості та невиколошування, а також пожовтіння листків (рис.3.2, 3.3).



А Б

Рис. 3.2. Симптоми карликовості, невиколошування та пожовтіння листків пшениці сорту Дагмар, Хмельницька область : А – здорові рослини; Б – уражені



А

Б

Рис. 3.3. Симптоми пожовтіння листків рослинах пшениці Д-12, Київська область: А – здорові рослини; Б – хворі рослини

Зразки листків рослин пшениці із вказаними симптомами були відібрані та в подальшому протестовані для ідентифікації вірусів.

3.2. Ідентифікація вірусів методом імуноферментного аналізу

Методом ІФА нами встановлено, що рослини пшениці із вказаними симптомами були уражені вірусом карликовості пшениці. Комерційний препарат (Loewe, Німеччина, каталожний номер 07082РС) використовували як позитивний контроль, а візуально здорові рослини використовували як негативний контроль (рис. 3.4).

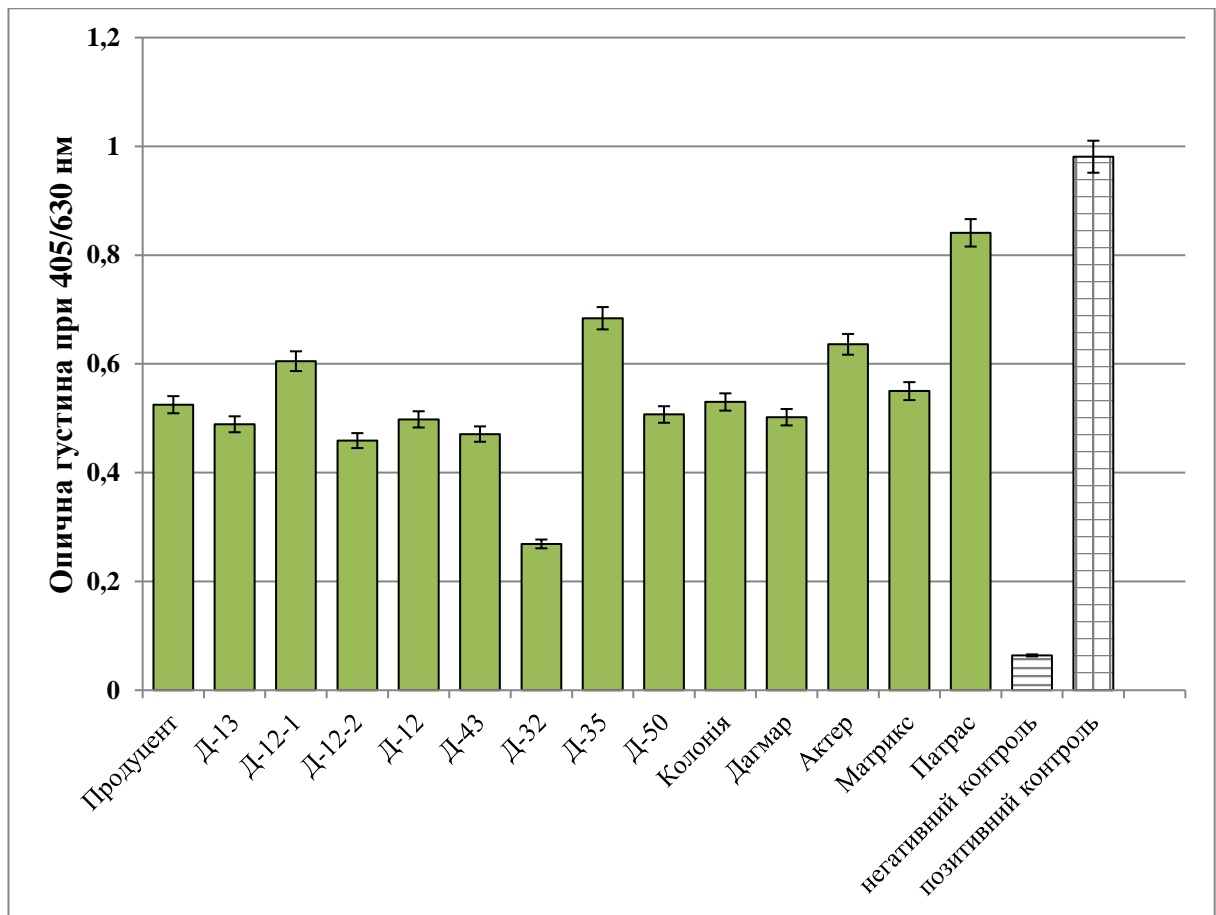


Рис. 3.4. Вміст антигенів ВКП у рослинах пшениці. На рисунку наведені середні значення оптичної густини всіх зразків (рослин) для кожного сорту

Зразки пшениці із зазначеними симптомами були також перевірені на наявність інших вірусів, які циркулюють на території України та які можуть викликати подібні симптоми захворювання, а саме: ВСМП (wheat streak mosaic virus, WSMV) (рис.3.5), вірусу жовтої карликовості ячменю, ВЖКЯ (barley yellow dwarf virus, BYDV) (рис.3.6), вірусу мозаїки бромусу, ВМБ (brome mosaic virus, BMV) (рис.3.7), вірусу веретеновидної смугастої мозаїки пшениці, ВВСМП (wheat spindle streak mosaic virus, WSSMV) (рис.3.8).

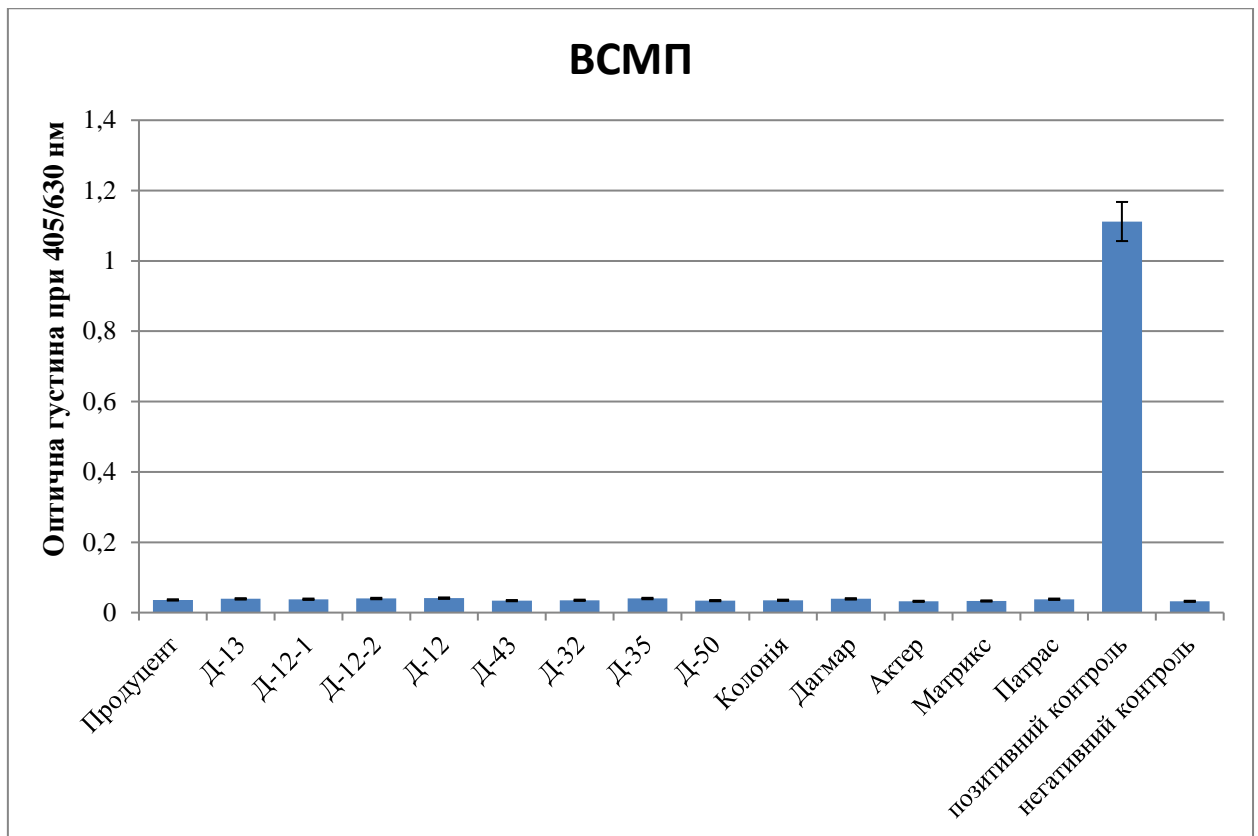


Рис. 3.5. Вміст антигенів ВСМП у рослинах пшениці. Комерційний препарат (Loewe, Німеччина, каталожний номер 07048РС) використовували як позитивний контроль, візуально здорові рослини використовували як негативний контроль

Таким чином, результати ІФА показали відсутність антигенів ВСМП у всіх досліджуваних зразках пшениці.

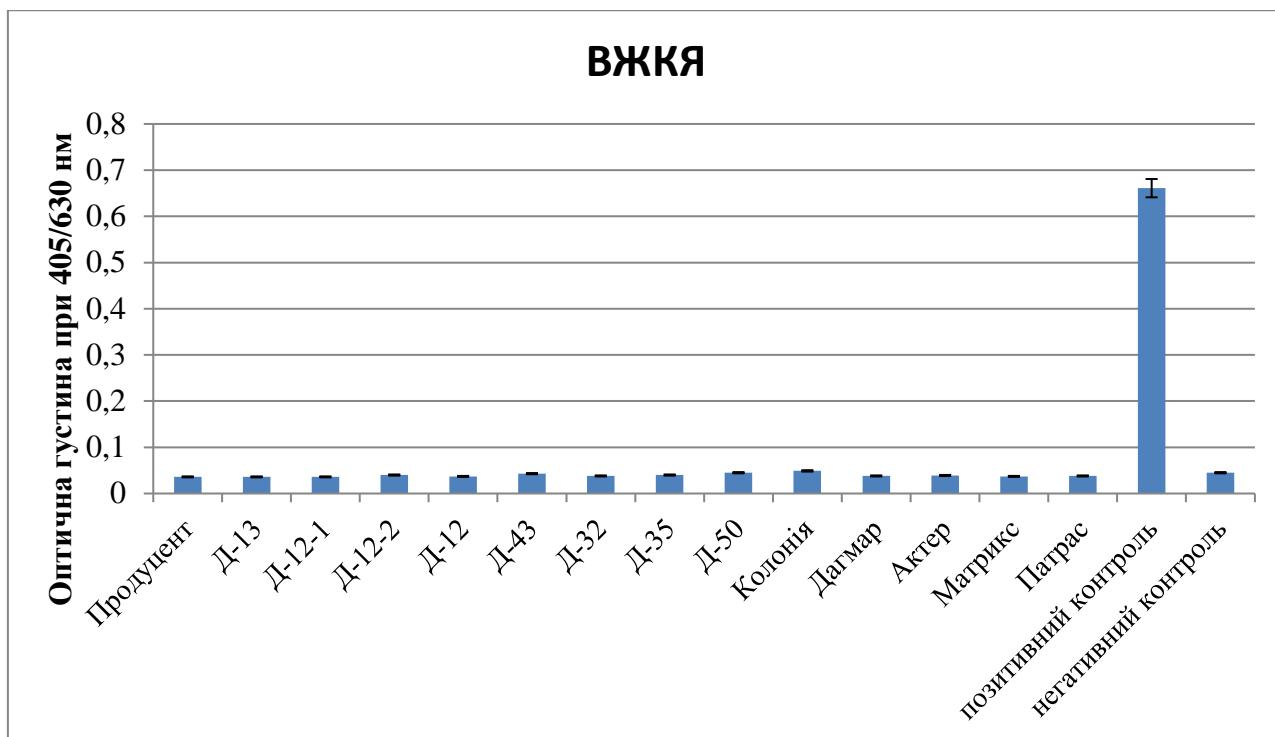


Рис. 3.6. Вміст антигенів ВЖКЯ у рослинах пшениці. Комерційний препарат (Loewe, Німеччина, каталожний номер 07005РС) використовували як позитивний контроль, негативний контроль – візуально здорові рослини

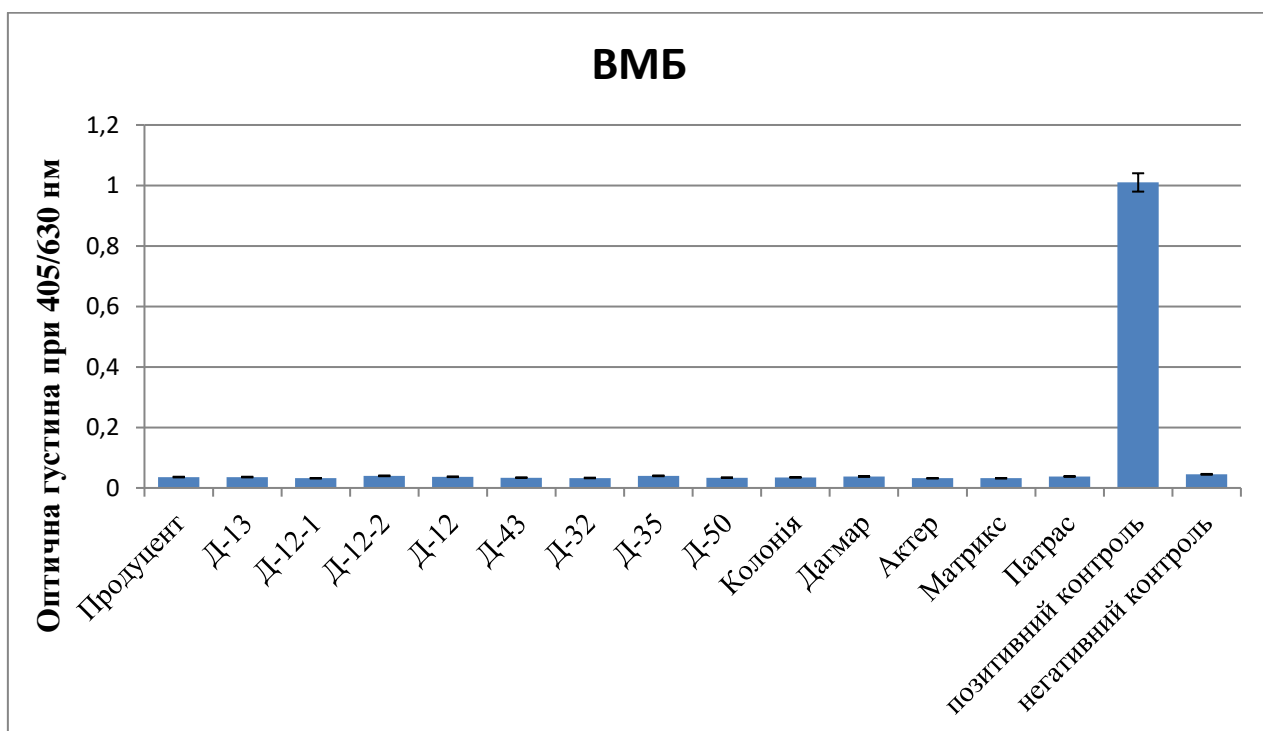


Рис. 3.7. Вміст антигенів ВМБ у рослинах пшениці. Позитивний контроль – комерційний препарат (Loewe, Німеччина, каталожний номер 07016РС), негативний контроль – візуально здорові рослини

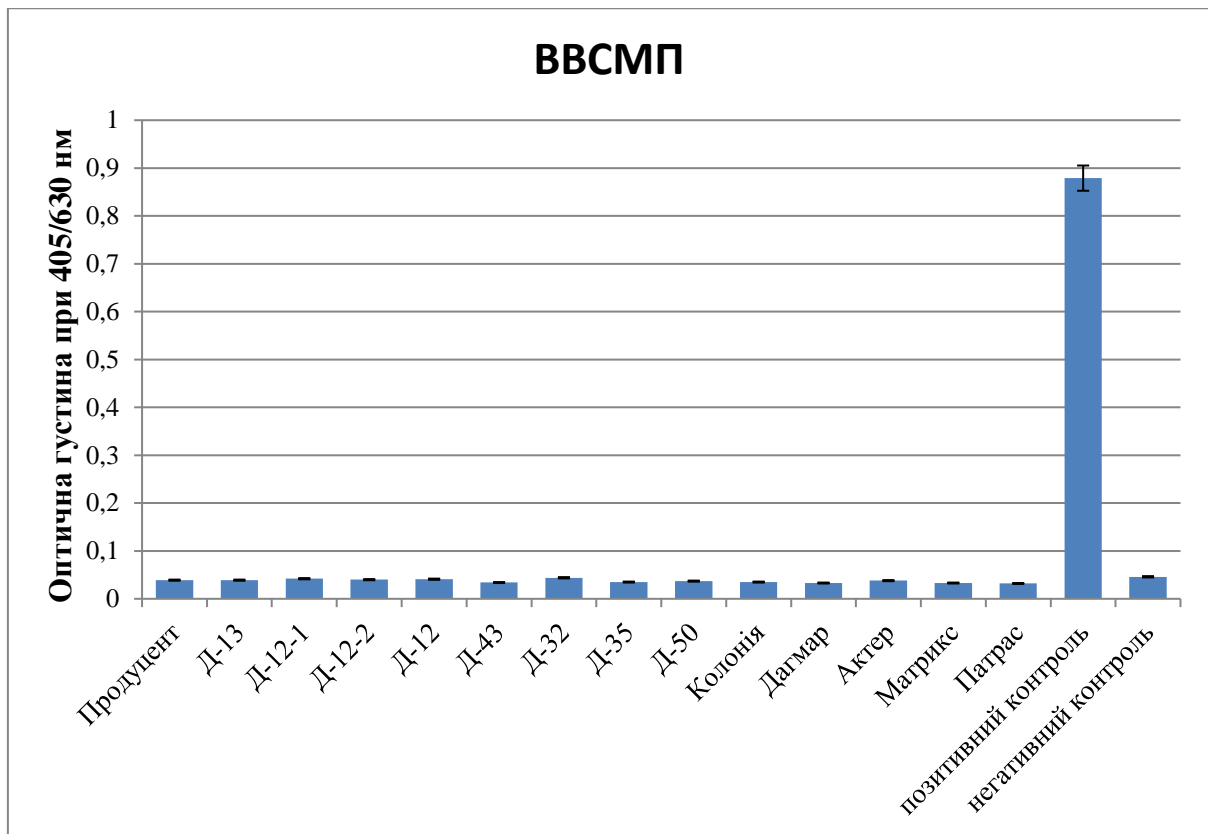


Рис. 3.8. Вміст антигенів ВВСМП у рослинах пшениці. Комерційний препарат (Loewe, Німеччина, каталожний номер 07171РС) використовували як позитивний контроль, а візуально здорові рослини використовували як негативний контроль

Таким чином, результати ІФА показали відсутність усіх перерахованих вірусів у пшениці з симптомами карликовості і невиколошування. Встановлено, що виявлені симптоми на рослинах пшениці індуковані інфекцією, спричиненою ВКП.

3.3. Діагностика вірусу карликовості пшениці методом ПЛР

Результати ІФА були підтверджені ПЛР, яка показала наявність у всіх 14-ти досліджуваних сортах і лініях пшениці продуктів ампліфікації розміром 783 пн, що відповідають гену капсидного білка вірусу карликовості пшениці (рис.

3.9). У якості негативного контролю використовували ДНК, виділену з візуально здорових рослин.

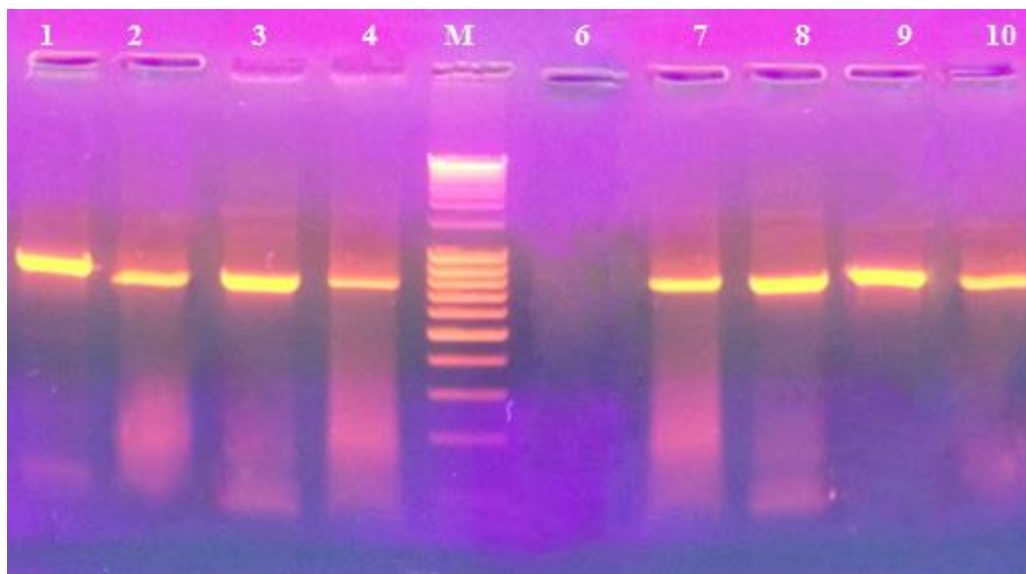


Рис. 3.9. Електрофореграма продуктів ПЛР: трек 1– позитивний контроль ПЛР; 2 – сорт Актер; 3 – сорт Колонія; 4 – Дагмар; 6 – негативний контроль; 7 – Патрас; 8 – Продуцент; 9 – лінія Д-13; 10 – лінія Д-35; М – ДНК маркери CSL-MDNA-100bp (Cleaver Scientific, Велика Британія)

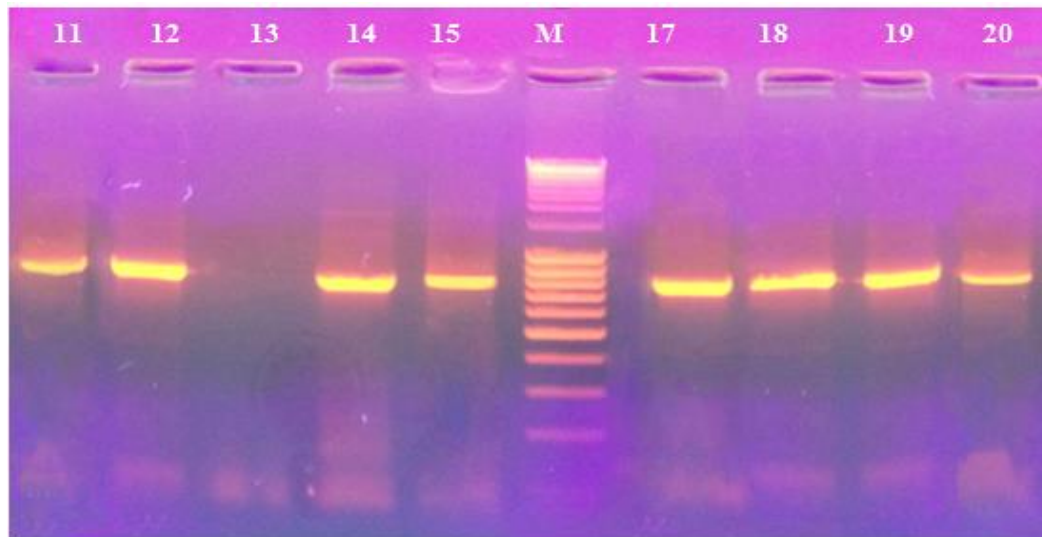


Рис. 3.10. Електрофореграма продуктів ПЛР: трек 11 – позитивний контроль ПЛР; 12 – лінія Д-12-1; 13 – негативний контроль; 14 – Д-12; 15 – Д-12-2; 17 – лінія Д-43; 18 – Д-32; 19 – лінія Д-50; 20 – сорт Матрикс; Трек позначений М містить ДНК маркери CSL-MDNA-100bp (Cleaver Scientific, Велика Британія)

На основі проведених досліджень можна зробити кілька висновків. Перш за все, результати імуноферментного аналізу були підтверджені за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Наявність ампліконів розміром 783 пн, що відповідають гену капсидного білка вірусу карликовості пшениці, свідчить про ураження рослин цим вірусом.

Таким чином, отримані результати свідчать про поширення вірусу карликовості пшениці у всіх досліджуваних сортах і лініях пшениці. Це має важливе значення для подальшого вивчення цього вірусу та розробки заходів контролю за його поширенням, зокрема у вирощуванні пшениці.

3.4. Філогенетичний аналіз послідовностей гена капсидного білка ізолятів вірусу карликовості пшениці

3.4.1. Визначення штамової приналежності ізолятів

Ділянки гена капсидного білка (*CP*) двох ізолятів ВКП 1-Укр та 3-Укр, були сиквензовані. Для подальших молекулярно-генетичних та філогенетичних досліджень було відібрано два ізоляти ВКП: ізолят 1-Укр (виділений з рослин озимої пшениці сорту Колонія, Хмельницька область) та ізолят 3-Укр (з пшениці озимої Д-12-1, Київська область).

Для проведення філогенетичного аналізу послідовності двох досліджуваних ізолятів ВКП порівнювали з послідовностями гена *CP* 47-ми ізолятів/штамів, відібраними з НСВІ Генбанку.

З метою визначення штамової приналежності досліджуваних ізолятів ВКП було проведено аналіз їх нуклеотидних та амінокислотних послідовностей та побудову філогенетичного дерева методом зв'язування найближчих сусідів.

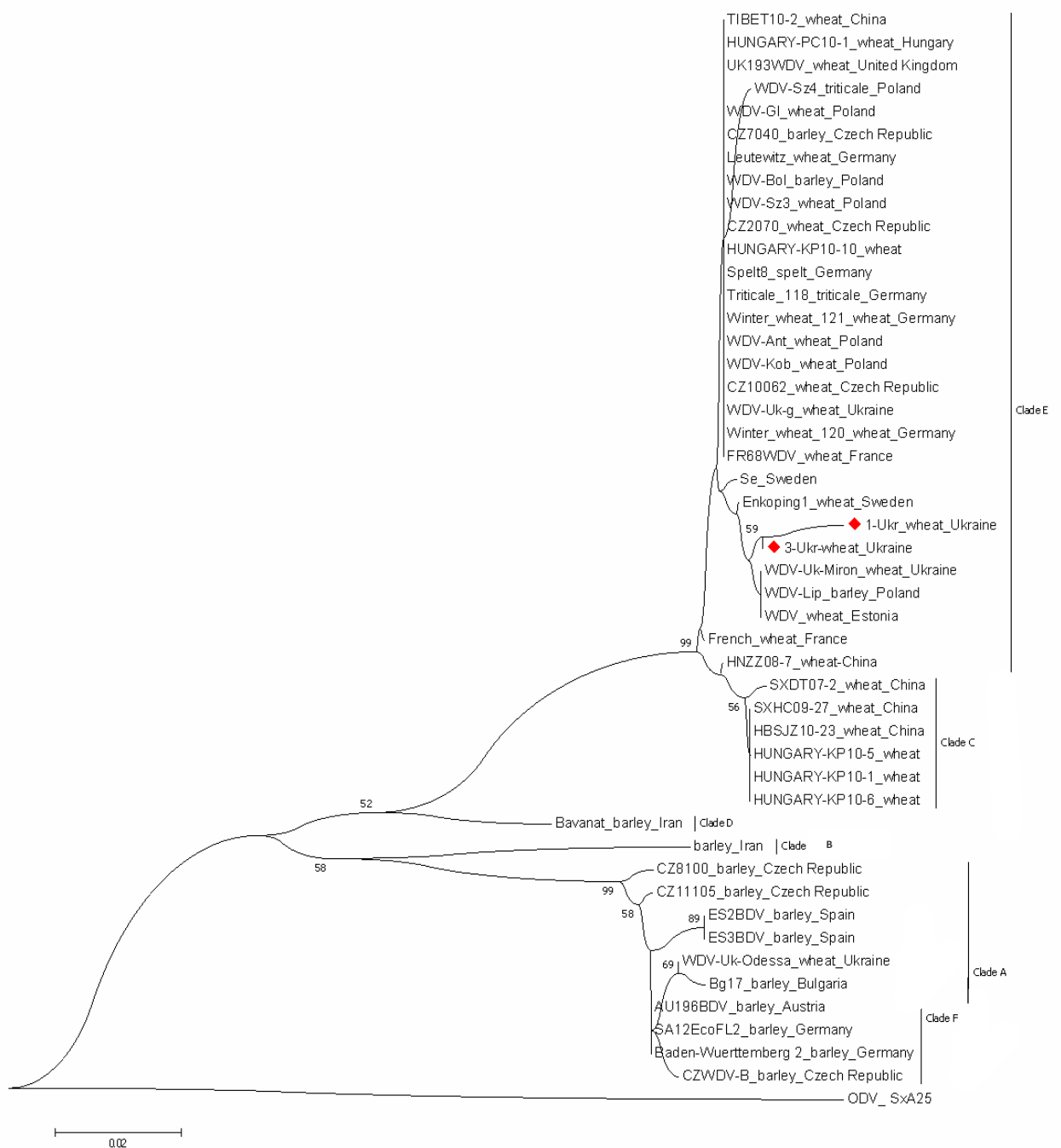


Рис. 3.12. Філогенетичне дерево за амінокислотними послідовностями ізолятів ВКП ділянки гена капсидного білка розміром 700 нуклеотидів, побудоване методом зв'язування найближчих сусідів та моделі p-distance. Досліджувані ізоляти ВКП позначені ромбами червоного кольору. Ізолят SxA25 Oat dwarf virus (Ac. No AM296025) використаний для побудови кореня дерева. Масштабна шкала показує кількість замінів на основу

Досліджувані ізоляти знаходяться на одній гілці з польським ячмінним ізолятом WDV-Lip, а також з пшеничними ізолятами: з України WDV-Uk-Miron та Естонії.

З ізолятами клади Е, досліджуваний ізолят 1-Ukr має ідентичність 97,4% – 99,0% за нуклеотидною послідовністю та 97,4%-98,3% за амінокислотною (рис. 3.13, табл.3.2).; ізолят 3-Ukr – 98,0%-99,7% за нуклеотидною та 98,7% - 99.6% за амінокислотною послідовністю ділянки гена капсидного білка (рис. 3.12, табл. 3.3).

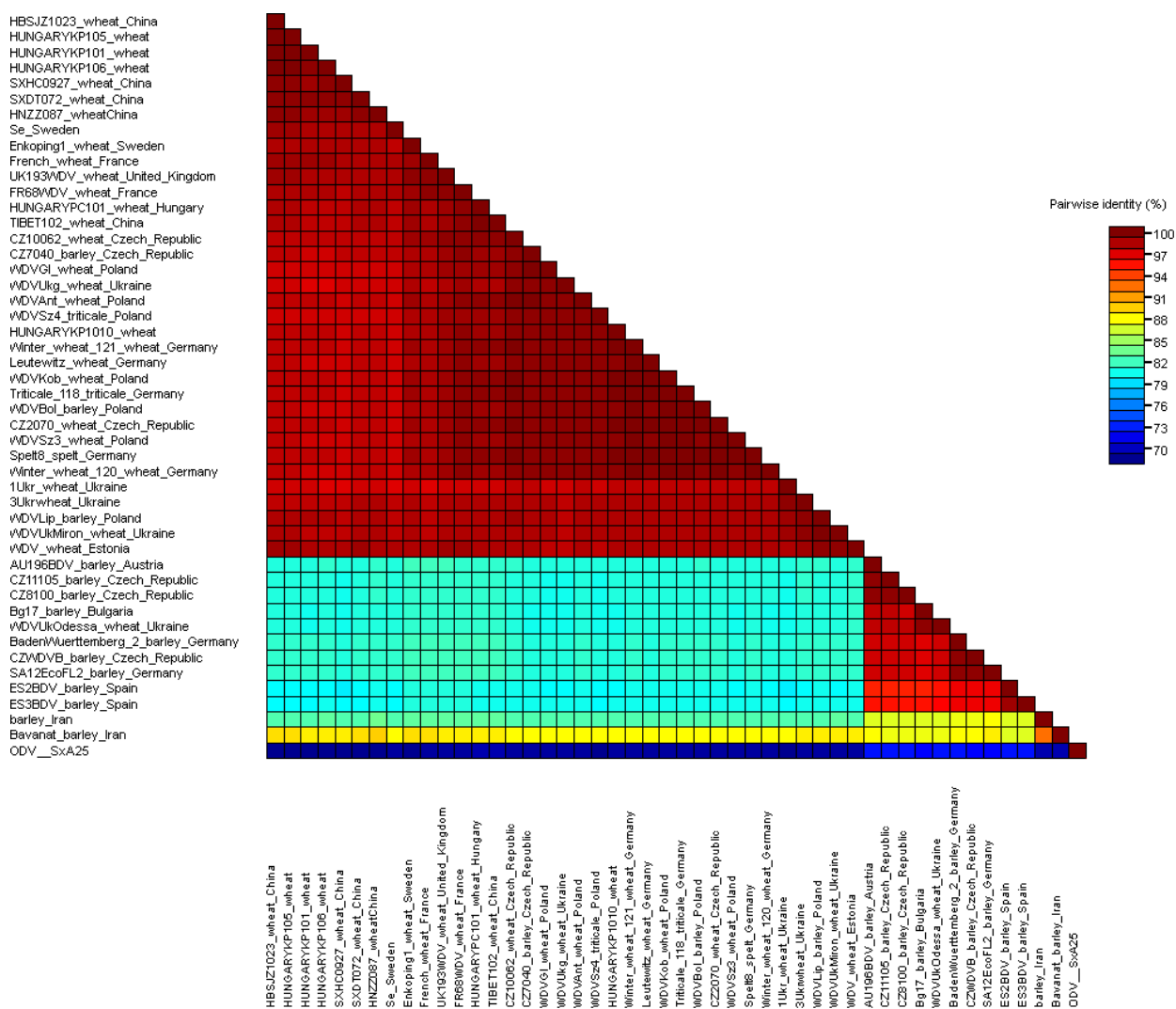


Рис. 3.13. Відсоток ідентичності 49-ти ізолятів ВКП за нуклеотидною послідовністю ділянки гена капсидного білка розміром 700 нуклеотидів

Показник ідентичності послідовностей гена *CP* ізолятів 1-Ukr та 3-Ukr між собою становить 99,3% та 98,7% за нуклеотидною та амінокислотною послідовністю, відповідно (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Ідентичність нуклеотидної (нт) та амінокислотної (аа) послідовності ділянки гена *CP* досліджуваного ізоляту 1-Ukr з ВКП ізолятами/штамами з інших країн (%)

П/П	Номер у Генбанку	Назва ізоляту	Хазяїн	Країна	Рік виявлення	нт	аа	Клас
1	MW176037	3-Ukr	пшениця	Україна	2020	99.3	98.7	Е
2	KY781940	WDV-Lip	ячмінь	Польща	2015	99.0	98.3	Е
3	FN806784	WDV-Uk-Miron	пшениця	Україна	2009	98.8	98.3	Е
4	MK193742	-----	пшениця	Естонія	2017	98.6	98.3	Е
5	NC_003326	Enkoping1	пшениця	Швеція	-----	97.8	98.3	Е
6	FJ546187	CZ10062	пшениця	Чехія	-----	98.1	97.8	Е
7	KY781939	WDV-Kob	ячмінь	Польща	2015	98.0	97.8	Е
8	KY781933	WDV-Ant	пшениця	Польща	2014	98.0	97.8	Е
9	KJ473705	Winter_wheat_121	пшениця	Німеччина	2008	98.0	97.8	Е
10	KJ473703	Triticale_118	тритикале	Німеччина	2008	98.0	97.8	Е
11	KJ473695	Spelt8	полба	Німеччина	2008	98.0	97.8	Е
12	JQ647462	Hungary-KP10-10	пшениця	Угорщина	2010	98.0	97.8	Е
13	FJ546186	CZ2070	пшениця	Чехія	-----	98.0	97.8	Е
14	HF968637	FR68WDV	пшениця	Франція	2010	97.8	97.8	Е
15	KJ473704	Winter_wheat_120	пшениця	Німеччина	2008	97.8	97.8	Е

16	KY781945	WDV-Sz3	пшениця	Польща	2013	97.8	97.8	Е
17	KY781934	WDV-Bol	ячмінь	Польща	2015	97.8	97.8	Е
18	HG422311	Leutewitz	пшениця	Німеччина	2013	97.8	97.8	Е
19	FJ546192	CZ7040	ячмінь	Чехія	----	97.8	97.8	Е
20	HF968634	UK193WDV	пшениця	Велика Британія	2012	97.8	97.8	Е
21	KJ536106	SXDT07-2	пшениця	Китай	2007	97.8	97.4	Е
22	KJ536095	HNZZ08-7	пшениця	Китай	2008	97.8	97.4	Е
23	JQ647454	Hungary- PC10-1	пшениця	Угорщина	2010	97.7	97.8	Е
24	JQ647508	TIBET10-2	пшениця	Китай	2010	97.7	97.8	Е
25	KY781936	WDV-Gl	пшениця	Польща	2015	97.7	97.8	Е
26	FN806783	WDV-Uk-g	пшениця	Україна	2008	97.4	97.8	Е
27	KY781946	WDV-Sz4	тритикале	Польща	2012	97.7	97.4	Е
28	KJ536140	SXHC09-27	пшениця	Китай	2009	97.2	97.0	Е
29	X02869	SE	-----	Швеція	-----	97.2	97.8	Е
30	X82104	French	пшениця	Франція	-----	97.4	97.4	Е
31	JQ647458	Hungary - KP10-5	пшениця	Угорщина	2010	97.5	97.0	С
32	JQ647476	HBSJZ10-23	пшениця	Китай	2010	97.5	97.0	С
33	JQ647455	Hungary- KP10-1	пшениця	Угорщина	2010	97.5	97.0	С
34	JQ647459	Hungary- KP10-6	пшениця	Угорщина	2010	97.4	97.0	С
35	JN791096	Bavanat	ячмінь	Іран	2010	87.2	90.1	Д
36	FJ620684	----	ячмінь	Іран	2006	80.7	84.5	В
37	HF968646	AU196BDV	ячмінь	Австрія	2012	78.4	85.3	А
38	FJ546179	CZ8100	ячмінь	Чехія	-----	78.2	85.3	А
39	FJ546180	CZ11105	ячмінь	Чехія	-----	78.2	85.3	А

40	FN806787	WDV-Uk-Odessa	пшениця	Україна	2009	78.1	84.9	A
41	AM989927	Bg17	ячмінь	Болгарія	2006	78.1	84.5	A
42	HF968645	ES3BDV	ячмінь	Іспанія	2012	77.1	84.5	A
43	HF968641	ES2BDV	ячмінь	Іспанія	2012	76.9	84.5	A
44	AM922262	SA12EcoFL2	ячмінь	Німеччина	2007	78.8	85.3	F
45	AM411652	Baden-Wuerttemberg 2	ячмінь	Німеччина	2005	78.8	85.3	F
46	FJ546193	CZWdV-B	ячмінь	Чехія	----	78.8	84.9	F

Найвища ідентичність досліджуваного ізоляту 1-Ukr виявлена з польським ячмінним ізолятом WDV-Lip, яка становить 99,0% за нуклеотидною послідовністю і 98,3% за амінокислотною послідовністю *CP*, а також з пшеничними ізолятами: з України WDV-Uk-Miron (98,8% нт і 98,3% аа) та Естонії (98,6% нт і 98,3% аа) (табл. 3.2).

Найвищий рівень ідентичності послідовності *CP* досліджуваний ізолят 3-Ukr має з ізолятом WDV-Lip з Польщі, виділеним з рослин ячменю (99,7% нт і 99,6% аа) та пшеничними: українським WDV-Uk-Miron (99,6% за нт та ак послідовністю) і естонським (99,3% нт і 99,6% ак) (табл. 3.3). Обидва ізоляти мають високу ідентичність з пшеничним ізолятом Enkoping1 з Швеції.

Таблиця 3.3

Ідентичність нуклеотидної (нт) та амінокислотної (аа) послідовності ділянки гена *CP* досліджуваного ізоляту 3-Ukr з ВКП ізолятами/штамами з інших країн (%)

П/П	Номер у Генбанку	Назва ізоляту	Хазяїн	Країна	Рік виявлення	нт	аа	Класифікація
1	MW176036	1-Ukr	пшениця	Україна	2020	99.3	98.7	E

2	KY781940	WDV-Lip	ячмінь	Польща	2015	99.7	99.6	Е
3	FN806784	WDV-Uk-Miron	пшениця	Україна	2009	99.6	99.6	Е
4	MK193742	-----	пшениця	Естонія	2017	99.3	99.6	Е
5	NC_003326	Enkoping1	пшениця	Швеція	-----	98.4	99.6	Е
6	FJ546187	CZ10062	пшениця	Чехія	-----	98.7	99.1	Е
7	KY781939	WDV-Kob	ячмінь	Польща	2015	98.6	99.1	Е
8	KY781933	WDV-Ant	пшениця	Польща	2014	98.6	99.1	Е
9	KJ473705	Winter_wheat_121	пшениця	Німеччина	2008	98.6	99.1	Е
10	KJ473703	Triticale_118	тритикале	Німеччина	2008	98.6	99.1	Е
11	KJ473695	Spelt8	полба	Німеччина	2008	98.6	99.1	Е
12	JQ647462	Hungary-KP10-10	пшениця	Угорщина	2010	98.6	99.1	Е
13	FJ546186	CZ2070	пшениця	Чехія	-----	98.6	99.1	Е
14	HF968637	FR68WDV	пшениця	Франція	2010	98.4	99.1	Е
15	KJ473704	Winter_wheat_120	пшениця	Німеччина	2008	98.4	99.1	Е
16	KY781945	WDV-Sz3	пшениця	Польща	2013	98.4	99.1	Е
17	KY781934	WDV-Bol	ячмінь	Польща	2015	98.4	99.1	Е
18	HG422311	Leutewitz	пшениця	Німеччина	2013	98.4	99.1	Е
19	FJ546192	CZ7040	ячмінь	Чехія	----	98.4	99.1	Е
20	HF968634	UK193WDV	пшениця	Велика Британія	2012	98.4	99.1	Е
21	KJ536106	SXDT07-2	пшениця	Китай	2007	98.6	98.7	Е
22	KJ536095	HNZZ08-7	пшениця	Китай	2008	98.6	98.7	Е
23	JQ647454	Hungary-PC10-1	пшениця	Угорщина	2010	98.4	99.1	Е
24	JQ647508	TIBET10-2	пшениця	Китай	2010	98.4	99.1	Е

25	KY781936	WDV-G1	пшениця	Польща	2015	98.3	99.1	E
26	FN806783	WDV-Uk-g	пшениця	Україна	2008	98.0	99.1	E
27	KY781946	WDV-Sz4	тритикале	Польща	2012	98.3	98.7	E
28	KJ536140	SXHC09-27	пшениця	Китай	2009	98.0	98.3	E
29	X02869	SE	-----	Швеція	-----	98.0	99.1	E
30	X82104	French	пшениця	Франція	-----	98.0	98.7	E
31	JQ647458	Hungary - KP10-5	пшениця	Угорщина	2010	98.3	98.3	C
32	JQ647476	HBSJZ10-23	пшениця	Китай	2010	98.3	98.3	C
33	JQ647455	Hungary- KP10-1	пшениця	Угорщина	2010	98.1	98.3	C
34	JQ647459	Hungary- KP10-6	пшениця	Угорщина	2010	98.1	98.3	C
35	JN791096	Bavanat	ячмінь	Іран	2010	87.9	90.9	D
36	FJ620684	----	ячмінь	Іран	2006	80.9	84.9	B
37	HF968646	AU196BDV	ячмінь	Австрія	2012	79.2	86.2	A
38	FJ546179	CZ8100	ячмінь	Чехія	-----	79.0	86.2	A
39	FJ546180	CZ11105	ячмінь	Чехія	-----	79.0	86.2	A
40	FN806787	WDV-Uk- Odessa	пшениця	Україна	2009	78.8	85.8	A
41	AM989927	Bg17	ячмінь	Болгарія	2006	78.8	85.3	A
42	HF968645	ES3BDV	ячмінь	Іспанія	2012	77.7	85.3	A
43	HF968641	ES2BDV	ячмінь	Іспанія	2012	77.5	85.3	A
44	AM922262	SA12EcoFL2	ячмінь	Німеччина	2007	79.4	86.2	F
45	AM411652	Baden- Wuerttemberg 2	ячмінь	Німеччина	2005	79.4	86.2	F
46	FJ546193	CZWV-DV-B	ячмінь	Чехія	----	79.4	85.8	F

При порівнянні послідовностей досліджуваних ізолятів ВКП та раніше описаних в Україні виявлено, що ізолят 3-Ukr має вищу ідентичність послідовності з ізолятом 2009 року WDV-Uk-Miron, ніж ізоляти 1-Ukr і WDV-Uk-g. Це може бути пояснене спільним географічним походженням ізолятів 3-Ukr і WDV-Uk-Miron, обидва детектовані у Миронівці Київської області. З українським ізолятом 2009 року WDV-Uk-Odessa, який належить до класу А, ізолят 1-Ukr має низьку ідентичність (78,1% нт і 84,5% аа), а ізолят 3-Ukr – 78,8% і 85,3% за нуклеотидною та амінокислотною послідовностями, відповідно. Натомість ізолят 1-Ukr має нижчу ідентичність з WDV-Uk-Miron та має найвищу ідентичність з польським ячмінним WDV-Lip, що може свідчити про різне походження.

Тому наступним етапом було дослідити можливе походження ізолятів.

3.4.2. Дослідження походження ізолятів

Для дослідження можливого походження ізолятів (для встановлення відсотку гомології між ними) було побудовано філогенетичне дерево методом максимальної правдоподібності (ML). У результаті виявлено, що обидва досліджувані ізоляти знаходяться на одній гілці з WDV-Lip та WDV-Uk-Miron, що може свідчити про їх спільне походження (рис. 3.14).

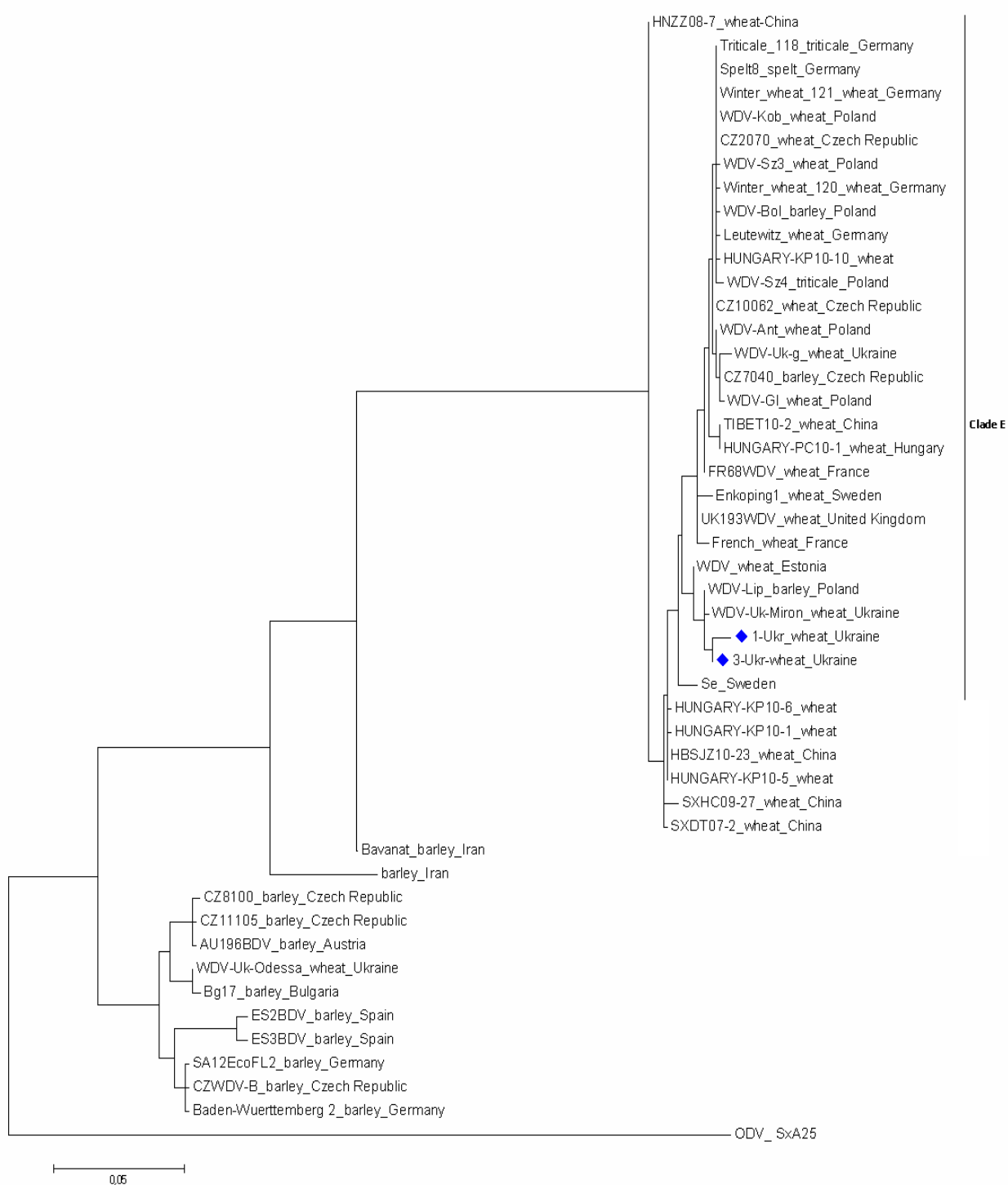


Рис. 3.14. Філогенетичне дерево за нуклеотидними послідовностями ізолятів ВКП ділянки гена *CP* розміром 700 нуклеотидів, побудоване методом максимальної правдоподібності. Досліджувані ізоляти ВКП представлені червоним кольором. Ізолят SxA25 *Oat dwarf virus* (Ac. No AM296025) використаний для побудови кореня дерева. Масштабна шкала показує кількість замін на основу

3.4.3. Аналіз амінокислотних мутацій

Виявлено амінокислотні заміщення у досліджуваній ділянці гена капсидного білка ізолятів. У ізоляту 3-Укр виявлено 1 мутацію (M/L→V у позиції 1) (рис. 3.15, 3.16).



Рис. 3.15. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей українських ізолятів ВКП з іншими штамми. Числа вгорі представляють положення амінокислоти у СР. Показані лише відмінності. На малюнку представлено амінокислоти у позиціях 1- 135

надходження генетичного матеріалу в ядро. Низька частота мутацій у генах призводить до сильнішого негативного відбору (Wei, 2024).

Можна підсумувати, що у ізоляту 1-Ukr та 3-Ukr були ідентифіковані унікальні амінокислотні мутації, які не були виявлені у інших досліджуваних ізолятів, що може бути пов'язане з їх географічним поширенням, екологічними, біотичними та абіотичними факторами.

Однак, не дивлячись, що на ML-філогенетичному дереві досліджувані ізоляти знаходяться на одній гілці з польським WDV-Lip і українським WDV-Uk-Miron, вони розміщені дещо відокремлено (рис.3.14). Це може бути пояснене різною інтенсивністю селекційного тиску. Різниця між dN і dS дає інформацію про напрямок та інтенсивність відбору. Таким чином, $dN > dS$ вказує на позитивний або адаптивний відбір, $dN < dS$ вказує на негативний або очисний відбір, а $dN = dS$ вказує на нейтральну еволюцію; чим більша різниця між dN і dS , тим більший тиск відбору.

Тому наступним етапом було визначити швидкість синонімічних замін на синонімічну ділянку (dS) і швидкість несинонімічних замін (що призводять до змін амінокислот) на несинонімічну ділянку (dN) для двох досліджуваних ізолятів ВКП порівняно з іншими 47-ма ізолятами. Встановлено, що для *CP* гена ізолята № 1 характерні показники: $dN=0,0387$ і $dS=0,2589$ (співвідношення dN/dS 0,1495); для MIP-12-Ukr - $dN=0,0318$ і $dS=0,2559$ (співвідношення dN/dS 0,1242) (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Значення dN і dS для послідовностей гена *CP* українських ізолятів та найбільш подібних до них ізолятів ВКП

п/п	Номер у Генбанку	Назва ізоляту	Країна	dN	dS	dN/dS
1	MW176036	1-Ukr	Україна	0,0387	0,2589	0,1495
2	MW176037	3-Ukr	Україна	0,0318	0,2559	0,1242

3	KY781940	WDV-Lip	Польща	0,0334	0,2614	0,1277
4	FN806784	WDV-Uk-Miron	Україна	0,0334	0,2704	0,1235
5	MK193742	-----	Естонія	0,0324	0,2518	0,1286
6	FN806783	WDV-Uk-g	Україна	0,0457	0,4032	0,1133
7	FN806787	WDV-Uk-Odessa	Ukraine	0,0794	0,6468	0,1227
8	Середнє значення порівнянь між 47-ма ізолятами ВКП			0,0516	0,4133	0,1248

Співвідношення dN/dS для всіх послідовностей, взятих для дослідження, становить 0,1248 ($p < 0,01$), що вказує на негативний відбір через функціональні та структурні обмеження, який має місце в білках, що досягли високого рівня адаптації.

У дослідженні аналізу можливого впливу відбору на геном WDV (Wei, 2024) та визначення співвідношення несинонімічних до синонімічних замін (dN/dS) виявлено негативний відбір у кодуючих ділянках всього геному WDV. Зокрема, для гену *CP* виявлено найсильніший тиск селекції серед чотирьох генів, які кодують білки. Також було встановлено, що ячмінний ізолят WDV піддавався сильнішому негативному відбору порівняно з пшеничним. П'ять позитивно відібраних сайтів були знайдені в генах, що кодують білки реплікації в WDV-пшениці, причому три з них розташовані в генах *Rep* і *RepA*. Крім того, в генах *CP* і *MP* не було виявлено позитивно відібраних сайтів.

Можна зробити припущення, що ізолят 1-Ukr має вищий потенціал дивергенції, якщо порівнювати його з ізолятом 3-Ukr. На це можуть вказувати такі фактори, як більший відсоток невколошування у ізоляту 1-Ukr, що мав більшу кількість мутацій у гені капсидного білка і саме тому послідовність *CP* містить більше несинонімічних змін, які підлягають відбору. Подібний результат вже спостерігався для вірусу смугастості кукурудзи, де було

виявлено, що на функціональність вірусу може впливати навіть невелика кількість амінокислотних заміщень (Shepherd, 2005).

Таким чином, серед усіх українських ізолятів, а також найбільш близькоспоріднених, найвищий показник dN/dS для гена *CP* виявлено для ізоляту 1-Ukr з Хмельницької області, що може вказувати на підвищений епідемічний потенціал цього ізоляту вірусу карликовості пшениці.

Підсумовуючи отримані результати, ми визначили приналежність досліджуваних послідовностей до клади E, за розташуванням на філогенетичному дереві ізоляти 1-Ukr та 3-Ukr мають спільне походження з польським ячмінним WDV-Lip та пшеничними ізолятами з України WDV-Uk-Miron і Естонії, а ізолят 1-Ukr за швидкістю мутацій має підвищений епідемічний потенціал, що може вказувати на його шкодочинність.

ВИСНОВКИ

1. У рослинах пшениці озимої та м'якої із симптомами карликовості, невиколошування рослин та пожовтіння листків з Вінницької, Хмельницької, Київської, Чернігівської та Черкаської областей виявлено вірус карликовості пшениці (WDV), що доведено методами ІФА та ПЛР.
2. Показана відсутність у зразках із зазначеними симптомами антигенів вірусу смугастої мозаїки пшениці (WSMV), жовтої карликовості ячменю (BYDV), мозаїки бромусу (BMV) та вірусу веретеновидної смугастої мозаїки пшениці (WSSMV).
3. Встановлено, що ізоляти вірусу карликовості пшениці 1-Ukr і 3-Ukr належать до філогенетичної класи E, з якими мають ідентичність за нуклеотидною послідовністю гена капсидного білка від 97,4% до 99,7% та за амінокислотною від 97,4% до 99,6%, відповідно.
4. Розташування на філогенетичному дереві досліджуваних ізолятів ВКП та найвищий відсоток ідентичності за нуклеотидною та амінокислотною послідовностями їх гена *CP* з ячмінним польським ізолятом WDV-Lip та пшеничними ізолятами з України WDV-Uk-Miron і Естонії, вказують на їх спільне походження.
5. Виявлено унікальні амінокислотні заміщення у досліджуваній ділянці гена капсидного білка, які є нехарактерними для ізолятів з інших країн. Ізолят 3-Ukr має мутацію M/L→V у позиції 1; ізолят 1-Ukr – 4 заміщення (M/L→V у позиції 1, G→E у позиції 4, F/C/V→S у позиції 184, G→D у позиції 221).
6. Встановлено, що серед усіх українських ізолятів найбільша швидкість мутацій (показник dN/dS) у гені *CP* характерна для ізоляту 1-Ukr з Хмельницької області, що може вказувати на його підвищений епідемічний потенціал, ризик швидкого поширення та високої шкодочинності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гуляєва І., Шевченко О., Снігур Г., Бисов А. та Мілкус Б. (2011). Поширення вірусу карликовості пшениці на півдні України. *Мікробіологія та біотехнологія*, № 3, сс. 71-77.
2. Міщенко, Л. (2009). Вірусні хвороби озимої пшениці. К.: *Фітосоціоцентр*.
3. Міщенко, Л., Дуніч, А., Будзанівська, І. та Міщенко, І. (2018). Вірусні інфекції пшениці озимої і сої та їх вплив на урожайність культур за умов змін клімату. *Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер. Біологія*, 75 (№1), сс. 11-21.
4. Пересипкін, В., Марков, І. та Шелестова, В. (2000). Практикум із основ наукових досліджень у захисті рослин: Київ.
5. Abt, I., Derlink, M., Mabon, R., Virant-Doberlet, M. and Jacquot, E. (2018). Integrating multiple criteria for the characterization of Psammotettix populations in European cereal fields. *Bulletin of entomological research*, 108(2), pp. 185–202.
6. Abt, I., Souquet, M., Angot, G., Mabon, R., Dallot, S., Thébaud, G. and Jacquot, E. (2019). Functional Transcomplementation between *Wheat Dwarf Virus* Strains in Wheat and Barley. *Viruses*, 12(1), pp. 34.
7. Ai, T., Zhang, L., Gao, Z., Zhu, C.X. and Guo, X. (2011). Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants. *Plant Biol.* 13, pp. 304–316.
8. Anhalt, M. D. and Almeida, R. P. (2008). Effect of temperature, vector life stage, and plant access period on transmission of banana bunchy top virus to banana. *Phytopathology*, 98(6), pp. 743–748.
9. Benkovics, A. H., Vida, G., Nelson, D., Veisz, O., Bedford, I. and Silhavy, D. (2010). Partial resistance to *Wheat dwarf virus* in winter wheat cultivars. *Plant Pathol.* 59, pp. 1144–1151.
10. Chung, B.N., Choi, K.S., Ahn, J.J., Joa, J.H., Do, K.S. and Park, K. (2015). Effects of temperature on systemic infection and symptom expression of *Turnip*

- mosaic virus* in Chinese cabbage (*Brassica campestris*). *Plant Pathology Journal*, 31, pp. 363–370.
11. Cillo, F. and Palukaitis, P. (2014). Transgenic resistance. *Adv. Virus Res.*, 90, pp. 35–146.
 12. Commandeur, U. and Huth, W. (1999). Differentiation of strains of wheat dwarf virus in infected wheat and barley plants by means of polymerase chain reaction. *J. Plant Dis. Protect.*, 106, pp. 550–552
 13. Crowther, J. (1995). ELISA. Theory and practice. N.Y.: Hamana Press.
 14. Damsteegt, V.D. (1984). *Maize streak virus*: effect of temperature on vector and virus. *Phytopathology*, 74, pp. 1317–1319.
 15. Ekzayez, A. M., Kumari, S. G. and Ismail, I. (2011). First Report of *Wheat dwarf virus* and Its Vector (*Psammotettix provincialis*) Affecting Wheat and Barley Crops in Syria. *Plant disease*, 95(1), pp. 76.
 16. Fahim, M., Millar, A.A., Wood, C.C. and Larkin, P.J. (2012). Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnol. J.*, 10, pp. 150–163.
 17. Fohrer, F., Lebrun, I. and Lapierre, H. (1992). Acquisitions récentes sur le virus du nanisme du blé. *Phytoma Défense Végétaux*, 443, pp. 18–20.
 18. Ghodoum Parizipour, M. H., Ramazani, L. and Sardrood, B.P. (2018). Temperature affected Transmission, Symptom Development and Accumulation of *Wheat Dwarf Virus*. *Plant Protect. Sci.*, 54(4), pp. 222–233.
 19. Ghodoum Parizipour, M.H., Behjatnia S.A.A., Afsharifar A., Izadpanah K. (2016). Natural hosts and efficiency of leafhopper vector in transmission of *Wheat dwarf virus*. *Journal of Plant Pathology*, 98, pp. 483–492.
 20. Ghodoum Parizipour, M.H., Behjatnia, S.A.A., Izadpanah, K. (2014). Effect of temperature on the infection of sugar beet plants by *Beet severe curly top virus* and on recovery of virus-infected plants. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 43, pp. 123–136.
 21. Ghoshal, B. and Sanfaçon, H. (2014). Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* a plants infected with tomato ringspot virus is

- associated with reduced translation of viral RNA2 and requires Argonaute 1. *Virology*, 456–457, pp. 188–197.
22. Hu, Q., Niu, Y., Zhang, K., Liu, Y. and Zhou, X. (2011). Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. *Virol. J.*, 8, pp. 41.
23. Kasai, A., Ohnishi, S., Yamazaki, H., Funatsuki, H., Kurauchi, T., Matsumoto, T., Yumoto, S. and Senda, M. (2009). Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean. *Plant Cell Physiol.* 50, pp. 1090–1098
24. Kis, A., Hamar, É., Tholt, G., Bán, R. and Havelda, Z. (2019). Creating highly efficient resistance against *wheat dwarf virus* in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant biotechnology journal*, 17(6), pp. 1004–1006.
25. Kis, A., Tholt, G., Ivanics, M., Várallyay, É., Jenes, B. and Havelda, Z. (2016). Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to *Wheat dwarf virus* in barley is highly efficient at low temperature. *Molecular plant pathology*, 17(3), pp. 427–437.
26. Köklü G., Ramsell J., and Kvarnheden A. (2007). The complete genome sequence for a Turkish isolate of Wheat dwarf virus (WDV) from barley confirms the presence of two distinct WDV strains. *Virus Genes*, 34(3), pp. 359-66.
27. Köklü, G., Ramsell, J. N. and Kvarnheden, A. (2007). The complete genome sequence for a Turkish isolate of *Wheat dwarf virus* (WDV) from barley confirms the presence of two distinct WDV strains. *Virus genes*, 34(3), pp. 359–366.
28. Kundu, J. K., Gadiou, S. and Cervená, G. (2009). Discrimination and genetic diversity of *Wheat dwarf virus* in the Czech Republic. *Virus genes*, 38(3), pp. 468–474.
29. Kung, Y.J., Lin, S.S., Huang, Y.L., Chen, T.C., Harish, S.S., Chua, N.H. and Yeh, S.D. (2012). Multiple artificial microRNAs targeting conserved motifs of the replicase gene confer robust transgenic resistance to negative-sense single-stranded RNA plant virus. *Mol. Plant Pathol.*, 13, pp. 303–317.

30. Lemmetty, A. and Huusela-Veistola, E. (2005). First report of WDV in winter wheat in Finland. *Plant Dis.*, 89, pp. 912.
31. Li, D., Chen, P., Shi, A., Shakiba, E., Gergerich, R. and Chen, Y. (2009). Temperature affects expression of symptoms induced by *soybean mosaic virus* in homozygous and heterozygous plants. *Journal of Heredity*, 100, pp. 348–354.
32. Lindblad, M. and Arenö, P. (2002). Temporal and spatial population dynamics of *Psammotettix alienus*, a vector of wheat dwarf virus. *International Journal of Pest Management*, 48, pp. 233–238.
33. Lindblad, M. and Sigvald, R. (2004). Temporal spread of *wheat dwarf virus* and mature plant resistance in winter wheat. *Crop Prot.*, 23, pp. 229–234.
34. Lindblad, M. and Waern, P. (2002). Correlation of wheat dwarf incidence to winter wheat cultivation practices. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 92, pp. 115–122.
35. Lindbland, M., and Waern, P. (2002). Correlation of wheat dwarf incidence to winter wheat cultivation practices. *Agriculture, Ecosystems & Environment.*, 92(2–3), pp. 115-122.
36. Lindsten, K. and Lindsten, B. (1999). Wheat dwarf – an old disease with new outbreaks in Sweden. *J. Plant Dis. Protect.*, 106, pp. 325–332.
37. Manurung, B., Witsack, W., Mehner, S., Gruntzig, M. and Fuchs, E. (2004). The epidemiology of *Wheat dwarf virus* in relation to occurrence of the leafhopper *Psammotettix alienus* in Middle-Germany. *Virus Res.*, 100, pp. 109–113.
38. Manurung, B., Witsack, W., Mehner, S., Gruntzig, M. and Fuchs, E. (2005). Studies on biology and population dynamics of the leafhopper *Psammotettix alienus* Dahlb. (Homoptera : Auchenorrhyncha) as vector of *Wheat dwarf virus* (WDV) in Saxony-Anhalt, Germany. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.*, 112, pp. 497–507.
39. Maramorosch, K., Thresh, J.M. and Shatkin, A.L. (2006). *Plant Virus Epidemiology*. Elsevier Press.

40. Mehner, S., Manurung, B., Gruntzig, M., Habekuß, A., Witsack, W. and Fuchs, E. (2003). Investigations into the ecology of the *Wheat dwarf virus* (WDV) in Saxony-Anhalt, Germany. *J. Plant. Dis. Prot.*, 110, pp. 313–323.
41. Muhire, B., Martin, D. P., Brown, J. K., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Zerbini, F. M., Rivera-Bustamante, R., Malathi, V. G., Briddon, R. W. and Varsani, A. (2013). A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*). *Archives of virology*, 158(6), pp. 1411–1424.
42. Niu, Q.W., Lin, S.S., Reyes, J.L., Chen, K.C., Wu, H.W., Yeh, S.D. and Chua, N.H. (2006). Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat. Biotechnol.* 24, pp. 1420–1428.
43. Nygren, J., Shad, N., Kvarnheden, A., and Westerbergh, A. (2015). Variation in susceptibility to *Wheat dwarf virus* among wild and domesticated wheat. *PLoS one*, 10(4).
44. Owor, B., Shepherd, D., Taylor, N., Edema, R., Monjane, A., Thomson, J., Martin, D., Varsani, A. (2007) Successful application of FTA Classic Card technology and use of bacteriophage phi29 DNA polymerase for large-scale field sampling and cloning of complete maize streak virus genomes. *J. Virol Methods*, 140(1-2), pp. 100-5.
45. Pfrieme, A. K., Ruckwied, B., Habekuß, A., Will, T., Stahl, A., Pillen, K. and Ordon, F. (2022). Identification and Validation of Quantitative Trait Loci for *Wheat Dwarf Virus* Resistance in Wheat (*Triticum* spp.). *Frontiers in plant science*, 13, 828639.
46. Pouramini, N., Heydarnejad, J., Massumi, H., and Varsani, A. (2019). Identification of the wild and cultivated hosts of *wheat dwarf virus* and *oat dwarf virus* in Iran. *Virusdisease*, 30(4), pp. 545–550.
47. Ramsell, J., Boulton, M., Martin, D., Valkonen, J., Kvarnheden, A. (2009). Studies on the host range of the barley strain of *Wheat dwarf virus* using an agroinfectious viral clone. *Plant Pathol.*, 58, pp. 1161–1169.

48. Ramsell, J.N.E., Boulton, M.I., Martin, D.P., Valkonen, J.P.T. and Kvarheden, A. (2009). Studies on the host range of the barley strain of *Wheat dwarf virus* using an agroinfectious viral clone. *Plant Pathol*, 58, pp. 1161–1169.
49. Schubert, J., Habekuss, A., Kazmaier, K., Jeske, H. (2007). Surveying cereal-infecting geminiviruses in Germany-diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. *Virus Res*, 127(1), pp. 61-70.
50. Schubert, J., Habekuß, A., Wu, B., Thieme, T., and Wang, X. (2014). Analysis of complete genomes of isolates of the Wheat dwarf virus from new geographical locations and descriptions of their defective forms. *Virus Genes*, 48(1), pp. 133-9.
51. Seo, J.K., Wu, J.G., Lii, Y.F., Li, Y. and Jin, H.L. (2013). Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. *Mol. Plant–Microbe Interact.*, 26, pp. 617–625.
52. Shepherd, D., Martin, D., McGivern, D., Boulton, M., Thomson, J., and Rybicki, E. (2005). A three-nucleotide mutation altering the Maize streak virus Rep pRBR-interaction motif reduces symptom severity in maize and partially reverts at high frequency without restoring pRBR-Rep binding. *J Gen Virol*, 86(3), pp. 803-813.
53. Simon-Mateo, C. and Garcia, J.A. (2006). MicroRNA-guided processing impairs *Plum pox virus* replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *J. Virol.*, 80, pp. 2429–2436.
54. Simon-Mateo, C. and Garcia, J.A. (2011). Antiviral strategies in plants based on RNA silencing. *Biochim. Biophys. Acta*, 1809, pp. 722–731.
55. Širlová, L., Vacke, J., and Chaloupková, M. (2005). Reaction of selected winter wheat varieties to autumnal infection with Wheat dwarf virus. *Plant Protect.*, 41, pp. 1–7.
56. Širlová, L., Vacke, J. and Chaloupková, M. (2005). Reaction of selected winter wheat varieties to autumnal infection with *Wheat dwarf virus*. *Plant Prot. Sci.*, 41, pp. 1–7.

57. Smyrnioudis, I.N., Harrington, R., Hall, M., Katis, N. and Clark S.J. (2001). The effect of temperature on variation in transmission of a BYDVPAV-like isolate by clones of *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *European Journal of Plant Pathology*, 107, pp. 167–173.
58. Sugiyama, M., Yoshioka, Y. and Sakata, Y. (2009). Effect of temperature on symptom expression and viral spread of *Melon yellow spot virus* in resistant cucumber accessions. *Journal of General Plant Pathology*, 75, pp. 381.
59. Tiwari, M., Sharma, D. and Trivedi, P.K. (2014) Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant Mol. Biol.* 86, pp. 1–18.
60. Tóbiás I., Shevchenko O., Kiss B., Bysov A., Snihur H., Polischuk V., Salánki K., Palkovics L. (2011) Comparison of the nucleotide sequences of wheat dwarf virus (WDV) isolates from Hungary and Ukraine. *Pol J Microbiol.* Vol. 60(2). – pp.125-31.
61. Tóbiás, I., Shevchenko, O., Kiss, B., Bysov, A., Snihur, H., Polischuk, V., Salánki, K. and Palkovics, L. (2011). Comparison of the nucleotide sequences of *wheat dwarf virus* (WDV) isolates from Hungary and Ukraine. *Polish journal of microbiology*, 60(2), pp. 125–131.
62. Vacke J. (1961). Wheat dwarf virus disease. *Biol. Plant.*, 3, pp. 228–233.
63. Vacke, J. (1972). Host plants range and symptoms of *Wheat dwarf virus*. *VÚRV Praha Ruzyně*, 17, pp. 151–162.
64. Vacke, J. and Cibulka, R. (1999). Silky bent grass (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.)-A new host and reservoir of wheat dwarf virus. *Plant Protect. Sci.* 35, pp. 47–50.
65. Vacke, J. and Cibulka, R. (2000). Response of selected winter wheat varieties to *Wheat dwarf virus* infection at an early growth stage. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 36, pp. 1–4.
66. Velázquez, K., Renovell, A., Comellas, M., Serra, P., García, M.L., Pina, J.A., Navaro, L. and Guerri, J. (2010). Effect of temperature on RNA silencing of a

- negative-stranded RNA plant virus: *Citrus psorosis virus*. *Plant Pathology*, 59, pp. 982–990.
67. Vu, T.V., Choudhury, N.R. and Mukherjee, S.K. (2013) Transgenic tomato plants expressing artificial microRNAs for silencing the pre-coat and coat proteins of a begomovirus, Tomato leaf curl New Delhi virus, show tolerance to virus infection. *Virus Res.* 172, pp. 35–45.
68. Wang, M.B., Masuta, C., Smith, N.A. and Shimura, H. (2012). RNA silencing and plant viral diseases. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 25, pp. 1275–1285.
69. Wang, X.F., Wu, B. and Wang, J.F. (2008). First report of Wheat dwarf virus infecting barley in Yunnan, China. *J. Plant Pathol.*, 90, pp. 400.
70. Wang, Y., Mao, Q., Liu, W., Mar, T., Wei, T., Liu, Y. and Wang, X. (2014). Localization and distribution of *wheat dwarf virus* in its vector leafhopper, *Psammotettix alienus*. *Phytopathology*, 104(8), pp. 897–904.
71. Wei S., Liu L., Chen G., Yang H., Huang L., Gong G., Luo P., Zhang M. (2024) Molecular evolution and phylogeographic analysis of wheat dwarf virus. *Front Microbiol*, doi: 10.3389/fmicb.2024.1314526.
72. Wu B., Melcher U., Guo X., Wang X., Fan L., Zhou G. (2008) Assessment of codivergence of mastreviruses with their plant hosts. *BMC Evol Biol*, 8, pp. 335.
73. Wu X., Weigel D., Wigge J. (2002) Signaling in plants by intercellular RNA and protein movement. *Genes Dev*, 16, pp.151–158.
74. Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A. and Ictv Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *The Journal of general virology*, 98(2), pp. 131–133.
75. Zhang P., Liu Y., Liu W., Massart S. Wang X. (2014) Simultaneous detection of wheat dwarf virus, northern cereal mosaic virus, barley yellow striate mosaic virus and rice black-streaked dwarf virus in wheat by multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 249. – pp.170-174.
76. Zhang, X., Li, H., Zhang, J., Zhang, C., Gong, P., Ziaf, K. Xiao, F. and Ye, Z. (2011). Expression of artificial microRNAs in tomato confers efficient and

stable virus resistance in a cell-autonomous manner. *Transgenic Res.* 20, pp. 569–581.