

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ПОЖИЛОВ ІЛЛЯ МИКОЛАЙОВИЧ**

УДК 578.5; 633.11; 632.9

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**БІОРІЗНОМАНІТТЯ ЕМАРАВІРУСІВ РОСЛИН РОДИН *ROSACEAE* ТА**  
***ROSEAE* В УКРАЇНІ ТА ЇХ ВЛАСТИВОСТІ**

Спеціальність – 091 «Біологія»

Галузь знань – 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біології

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

\_\_\_\_\_ І.М. Пожилов

Науковий керівник: Будзанівська Ірина Геннадіївна, доктор біологічних наук, професор.

Київ–2023

## АНОТАЦІЯ

Пожилов І.М. Біорізноманіття емаравірусів рослин родин *Rosaceae* та *Roaceae* в Україні та їх властивості. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091-Біологія (09 – Біологія) – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, МОН України, Київ, 2023.

Представники роду *Emaravirus* є високошкодочинними патогенними агентами сільськогосподарських та декоративних культур, що призводять до зменшення врожайності, погіршення якості плодів, зниження естетичної привабливості та загибелі уражених рослин. Також емаравіруси є об'єктами підвищеного наукового інтересу для фундаментальної науки завдяки особливостям організації їх генетичної інформації, механізмам еволюції та біологічним властивостям. Досліджень щодо виявлення емаравірусів та вивчення їх властивостей в Україні не проводилося. Метою роботи була ідентифікація емаравірусів рослин родин *Rosaceae* та *Roaceae* в Україні та вивчення їх молекулярно-біологічних властивостей. Завданнями дослідження були: провести скринінг рослин за візуальними симптомами в агро- та урбоценозах України; ідентифікація емаравірусів за допомогою комплементарних вірусологічних методів дослідження: молекулярно-біологічних і серологічних; філогенетичний аналіз фрагментів послідовностей українських ізолятів емаравірусів; дослідити час дивергенції українських ізолятів емаравірусів від ізолятів з інших країн; рекомбінаційний аналіз послідовностей українських ізолятів емаравірусів; проаналізувати поширеність емаравірусів в моно- та сумісних інфекціях з іншими патогенами в Україні.

Об'єктом дослідження були віруси роду *Emaravirus*: HPWMoV, RLBV, RRV, BLMaV, PCLSaV та EMARaV. Предметом дослідження є біорізноманіття та властивості українських ізолятів емаравірусів.

У ході виконання дисертаційної роботи було досліджено різноманіття емаравірусів у агро- і урбоценозах різних областей України використовуючи серологічні та молекулярні методи дослідження та проаналізовано генетичне різноманіття ідентифікованих українських ізолятів RLBV і HPWMoV – двох емаравірусів, присутність яких на території України була доведена в результаті роботи.

Першим етапом роботи був відбір рослин родин *Poaceae* та *Rosaceae* із симптомами інфікування High Plains wheat mosaic virus (HPWMoV) та European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV), Rose Rosette Virus (RRV), Pear chlorotic leaf spot-associated virus (PCLSaV), Blackberry leaf mottle-associated virus (BLMaV) і Raspberry leaf blotch virus (RLBV), відповідно. У результаті візуальної діагностики були відібрані зразки рослин із симптомами вірусної інфекції та кліщової інфестації: груші із симптомами деформації листкової пластинки, галовими наростами; малини з симптомами, характерними RLBD: деформацією листків, хлорозами, що також пов'язані із ураженням рослини ериофідним кліщем; кукурудзи із штрихуватою мозаїкою, почервонінням листків та стебла, скрученням листків, і затримкою росту; ожини з хлоротичною плямистістю та деформацією листків; троянд із зміною забарвлення (почервоніння стебел та листків), деформацією стеблами, надмірним ростом шипів; горобини із кільцевою плямистістю, хлорозами, галовими утвореннями; пшениці із смугастою мозаїкою, дрібною штрихуватою мозаїкою, затримкою росту та скрученням листків; яблуні із зміною забарвлення, деформацією листків та галовими наростами. Скринінг симптоматичних рослин пшениці з різних регіонів України показав розбіжність у симптомах на рослинах різного віку (в залежності від фази росту), сорту, ураження HPWMoV в моноінфекції, або ж із змішаною інфекцією HPWMoV+WSMV.

За допомогою оптичної мікроскопії зразків перелічених рослин виявлено колонії ериофідних кліщів, що є потенційними переносниками емаравірусів. Із

використанням трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) було виявлено сферичні частинки у зразках рослин малини, пшениці і кукурудзи, що за своєю морфологією та розмірами характерні для емаравірусів.

Наступним етапом роботи було дослідження зразків рослин з вірусоподібними симптомами за допомогою зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Для проведення скринінгу використовувались пари праймерів, що були опубліковані в профільних виданнях, до EMARaV, RLbV, HPWMoV, BLMaV, PCLSaV і RRV. Для тестування були обрані саме емаравіруси, що уражують рослини родин Розоцвіті та Злакові, оскільки вони широко розповсюджені в Україні та мають економічне значення.

У результаті скринінгу симптоматичних рослин родин *Rosaceae* і *Poaceae* було протестовано відібрані зразки рослин на присутність зазначених шести емаравірусів за допомогою ЗТ-ПЛР, вперше в Україні було показано циркуляцію двох видів емаравірусів: RLbV на рослинах малини, що були відібрані у Київській області і HPWMoV на рослинах пшениці і кукурудзи, що були відібрані з центральних і східних регіонів України: у Вінницькій, Донецькій, Дніпропетровській, Запорізькій, Київській, Полтавській та Харківській областях. Це перше повідомлення про виявлення HPWMoV в Європі.

Для вивчення молекулярно-генетичних особливостей та філогенетичних зв'язків українського ізоляту RLbV, який було названо UA-RLbV-1, проведено секвенування послідовності РНК3 (RNA3) і розміщено у міжнародній науковій базі даних GenBank (номер доступу MK123270). Послідовність була проаналізована за допомогою програми BLAST, що підтвердило її належність до РНК3 RLbV, а також показало найбільш ідентичні послідовності. Виявилось, що за нуклеотидною послідовністю фрагменту РНК3 українського ізоляту має найвищу ідентичність (99,62%) з ізолятом M46-BiH з Боснії і Герцеговини. Філогенетичний аналіз показав близькість українського ізоляту (UA-RLbV-1) з

ізолятами з Фінляндії, що може свідчити про їх спільне еволюційне минуле. Це перше дослідження емаравірусу RLBV в Україні.

За допомогою взаємодоповнюючих молекулярно-біологічних і серологічних методів досліджено поширення емаравірусу мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV) в різних регіонах України. Використовуючи комерційну тест систему для діагностики HPWMoV методом імуоферментного аналізу (ІФА), було виявлено антигени цього вірусу у зразках пшениці і кукурудзи із Вінницької, Харківської, Запорізької, Полтавської, Київської, Дніпропетровської та Донецької областей. Показано присутність вірусу в 81-му з досліджених 238-ми зразків, що становить 34%. Отже, в ході скринінгу симптоматичних рослин пшениці та кукурудзи, що відібрані з десяти областей різних агрокліматичних зон України, показано присутність HPWMoV на рослинах кукурудзи і пшениці. Це перший випадок детекції HPWMoV не тільки в Україні, але й у Афросвразії. HPWMoV був виявлений у зразках з семи областей, що говорить про широкий ареал розповсюдження цього вірусу на території України. Встановлено, що у посівах озимої пшениці емаравірус мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV) циркулює переважно у змішаній інфекції з вірусом смугастої мозаїки пшениці (WSMV) (22% інфікованих зразків), тоді як моноінфекція виявилася менш типовою для даного патогена (13% інфікованих зразків). Скринінг симптоматичних рослин пшениці з різних регіонів України показав розбіжність у симптомах на рослинах різного віку (в залежності від фази росту), сорту, ураження HPWMoV в моноінфекції, або ж із змішаною інфекцією HPWMoV+WSMV. Показано, що популярні в Україні сорти озимої пшениці Гарантія одеська, Донецька 48, Достаток, Новосмуглянка, Подолянка, Скаген (Skagen) є сприйнятливими до емаравірусу мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV). Усі досліджені сорти, крім сорту Новосмуглянка, також були уражені вірусом смугастої мозаїки пшениці (WSMV), що вказує на необхідність пошуку альтернативних сортів та ліній.

Філогенетичний аналіз фрагменту послідовності РНК3 HPWMoV, попри високу генетичну варіабельність послідовностей українських ізолятів цього емаравірусу, показав що вони мають спільне еволюційне минуле, що може бути свідченням походження цього вірусу з однієї спільної локації. Отже, дослідження фрагменту РНК6 українського ізоляту HPWMoV біоінформатичними методами показало його приналежність до однієї з двох клад — групи А. До цієї групи належать ізоляти зі США, в той час до групи В належать ізоляти з США, Австралії та Канади. Філогенетичний аналіз імовірного походження та часу появи українських емаравірусів методом молекулярного годинника свідчить, що український ізолят емаравірусу плямистості листя малини (RLBV), вірогідно, походить від одного з фінських ізолятів даного вірусу, і їх дивергенція відбулась на початку 2000-х років. При цьому дивергенція між українськими ізолятами емаравірусу мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV) та ізолятами даного вірусу зі США відбулась приблизно в 1995-2000 роках.

**Ключові слова:** емаравіруси, філогенетичний аналіз, біорізноманіття, віруси, рослини.

## SUMMARY

Pozhylov I.M. Biodiversity of emaraviruses of *Rosaceae* and *Poaceae* families plants in Ukraine and their properties. - Qualification scientific work on the rights of the manuscript

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 091-Biology (09 – Biology) - ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Culture of Ukraine, Kyiv, 2023.

Representatives of the genus *Emaravirus* are highly harmful pathogenic agents of agricultural and ornamental crops, which lead to a decrease in yield, deterioration of fruit quality, decrease in aesthetic appeal and death of affected plants. Emaraviruses are objects of increased scientific interest from the point of view of fundamental science due to the peculiarities of the organization of their genetic information, mechanisms of evolution and biological properties. Research on the detection of emaraviruses and the study of their properties has not been conducted in Ukraine. The aim of the work was the identification of emaraviruses of plants of the *Rosaceae* and *Poaceae* families in Ukraine and the study of their molecular biological properties. The tasks of the research were: to screen plants by visual symptoms in the agro- and urban coenoses of Ukraine; identification of emaraviruses using complementary virological research methods: molecular-biological and serological; phylogenetic analysis of sequence fragments of Ukrainian isolates of emaraviruses; to investigate the time of divergence of Ukrainian isolates of emaraviruses from isolates from other countries; recombination analysis of sequences of Ukrainian isolates of emaraviruses; to analyze the prevalence of emaraviruses in mono- and co-infections in Ukraine.

Symptomatic plants were tested for the following emaraviruses: High Plains wheat mosaic virus (HPWMoV), European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV), Rose Rosette Virus (RRV), Pear chlorotic leaf spot-associated virus

(PCLSaV), Blackberry leaf mottle-associated virus (BLMaV) and Raspberry leaf blotch virus (RLBV). In the course of the dissertation work, the diversity of emaraviruses in the agro- and urban coenoses of different regions of Ukraine was investigated using serological and molecular research methods, and the genetic diversity of the identified Ukrainian isolates of RLBV and HPWMoV - two emaraviruses whose presence on the territory of Ukraine was proven as a result of the work - was analyzed.

The object of the study is viruses of the genus *Emaravirus*: HPWMoV, RLBV, RRV, BLMaV, PCLSaV and EMARaV. The subject of the study is the biodiversity and properties of Ukrainian isolates of emaraviruses.

The first stage of the work was the selection of plants of the *Rosaceae* and *Poaceae* families with symptoms of High Plains wheat mosaic virus (HPWMoV) and European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV), Rose Rosette Virus (RRV), Pear chlorotic leaf spot-associated virus (PCLSaV), Blackberry leaf mottle-associated virus (BLMaV), Raspberry leaf blotch virus (RLBV) infection, respectively. As a result of visual diagnostics, samples of the following plants with symptoms of viral infection and mite infestation were selected: pears with symptoms of deformation of the leaf plate, gall growths; raspberries with symptoms characteristic of RLBD: deformation of leaves, chlorosis, which are also associated with damage to the plant by the eriophid mite; corn with hatched mosaic, reddening of leaves and stems, twisting of leaves, growth retardation; blackberries with chlorotic spotting and leaf deformation; roses with a change in colour (redness of stems and leaves), deformed stems, excessive growth of thorns; mountain ash with chlorotic ringspots, chlorosis, gall formations; wheat with striped mosaic, growth retardation, twisting of leaves; apple plants with a change in colour and deformation of leaves and gall growths.

With the help of optical microscopy, colonies of eriophid mites, which can be potential vectors of emaraviruses, were detected in samples of the listed plants. With the help of TEM, spherical particles were detected in samples of raspberry, wheat and

corn plants, which in terms of their morphology and size are characteristic of emaraviruses.

The next stage of the work was the study of plant samples with virus-like symptoms by means of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

For screening, primer pairs acquired from specialized publications, were used for EMARaV, RLBV, HPWMoV, BLMaV, PCLSaV and RRV detection. Emaraviruses affecting plants of the *Rosaceae* and *Poaceae* families were chosen for testing, as they are widespread in Ukraine and have economic importance.

As a result of the screening with RT-PCR of symptomatic plants of the *Rosaceae* and *Poaceae* families, the selected plant samples were tested for the presence of the selected six emaraviruses. For the first time in Ukraine, the presence of two species of emaravirus was shown: RLBV on raspberry plants, which were collected in the Kyiv region, and HPWMoV on wheat and corn plants, which were collected in the central and eastern regions of Ukraine: in Vinnytsia, Donetsk, Dnipropetrovsk, Zaporizhzhya, Kyiv, Poltava and Kharkiv regions. It is the first report of the presence of HPWMoV in Europe.

To study the molecular genetic features and phylogenetic relationships of the Ukrainian RLBV isolate, which was named UA-RLBV-1, the sequence of RNA3 was sequenced and placed in the international scientific database GenBank (accession number MK123270). The sequence was analyzed using the BLAST program, which confirmed its belonging to RLBV RNA3 and also showed the most identical sequences. It turned out that according to the nucleotide sequence of the RNA3 fragment of the Ukrainian isolate, it has the highest identity (99.62%) with the M46-BiH isolate from Bosnia and Herzegovina. Phylogenetic analysis showed a high affinity of the Ukrainian isolate (UA-RLBV-1) with isolates from Finland, which may indicate their shared evolutionary past. This is the first study of RLBV in Ukraine.

Using complementary molecular-biological and serological methods, the spread of High Plains wheat mosaic emaravirus (HPWMoV) in oblast regions of Ukraine was investigated. Using a commercial test system for diagnosing HPWMoV by

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), antigens of this virus were detected in wheat and corn samples from Vinnytsia, Kharkiv, Zaporizhzhya, Poltava, Kyiv, Dnipropetrovsk, and Donetsk regions. ELISA showed the presence of the virus in 81 of the 238 samples tested, which is more than 34% of wheat and corn samples. Therefore, during the screening of symptomatic wheat and corn plants that were selected from ten regions of different agro-climatic zones of Ukraine, the presence of HPWMoV on corn and wheat plants was shown. This is the first case of detection of HPWMoV not only on the territory of Ukraine, but also in Afro-Eurasia. HPWMoV was detected in samples from Vinnytsia, Kharkiv, Zaporizhzhya, Poltava, Kyiv, Dnipropetrovsk, and Donetsk regions, which indicates a wide range of distribution of this virus on the territory of Ukraine. It was found that in winter wheat crops, High Plains wheat mosaic emaravirus (HPWMoV) circulates mainly in mixed infection with wheat stripe mosaic virus (WSMV) (22% of infected samples), while monoinfection was less typical for this pathogen (13% of infected samples). It has been shown that the winter wheat varieties Garantia Odeska, Donetska 48, Dostatok, Novosmuglyanka, Podolyanka, Skagen, popular in Ukraine, are susceptible to High Plains wheat mosaic emaravirus (HPWMoV). All studied varieties, except Novosmuglianka, were also affected by the wheat streak mosaic virus (WSMV), which indicates the need to find alternative varieties and lines.

Based on the analysis of the RNA3 sequence fragment of HPWMoV, despite the high genetic variability of the sequences of the Ukrainian isolates of this emaravirus, they have a common evolutionary past, which may be evidence of the origin of this virus from one common location. Therefore, the study of the RNA6 fragment of the Ukrainian HPWMoV isolate using bioinformatics methods showed that it belongs to one of two clades — group A. This group includes isolates from the USA, while isolates from the USA, Australia, and Canada belong to group B. Despite lower percentages of identity among representatives of this group, the separation of the ancestor of the Ukrainian isolate took place only about 23 years before the time of sampling.

**Keywords:** emaraviruses, phylogenetic analysis, biodiversity, plant viruses.

## Список публікацій здобувача

### Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. First report of High Plains wheat mosaic virus on different hosts in Ukraine. Snihur, H., **Pozhylov, I.**, Budzanivska, I., & Shevchenko, O. (2020). Journal of Plant Pathology, 102(2), 545-546. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00435-y>  
*(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку)* (Scopus, Web of Science)
2. Phylogenetic analysis of Ukrainian isolate of raspberry leaf blotch virus. **Pozhylov, I.**, Snihur, H., & Budzanivska, I. (2021). AGROFOR, 6(1). p. 19-25. <https://doi.org/10.7251/AGRENG2101019P>  
*(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку)*
3. Occurrence and Characterization of Wheat Streak Mosaic Virus Found in Mono-and Mixed Infection with High Plains Wheat Mosaic Virus in Winter Wheat in Ukraine. **Pozhylov, I.**, Snihur, H., Shevchenko, T., Budzanivska, I., Liu, W., Wang, X., & Shevchenko, O. (2022). Viruses, 14(6), 1220. <https://doi.org/10.3390/v14061220>  
*(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку)* (Scopus, Web of Science)
4. Захворюваність та поширення вірусів злакових культур у 2020–2021 роках в Україні. **Пожилов І.**, Снігур Г. Вісник Київського Національного Університету Імені Тараса Шевченка, 3(90)/2022, с.14-19. <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2022.90.14-19>  
*(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку)*

### Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. Phylogenetic analysis of ukrainian isolate of raspberry leaf blotch virus. International Agriculture Symposium 'Agrosym', 2020, с. 283, **Pozhylov I.**, H. Snihur, I. Budzanivska.  
*(Особистий внесок здобувача –проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка тез)*
2. Control of risks imposed by plant viruses as the component of biosecurity in Ukraine. SEAB-2021, с.306. O. Shevchenko, K. Tager, **I. Pozhylov**, H. Snihur, T. Shevchenko, I. Budzanivska.  
*(Особистий внесок здобувача –проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка тез)*
3. HPWMOV Is An Emerging Cereal Virus In Ukraine. AGBIOL 2021, с. 188. **I. Pozhylov**, H. Snihur, I. Budzanivska, O. Shevchenko  
*(Особистий внесок здобувача –проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка тез)*
4. Long-term and current trends of cereal viruses in Ukraine. International conference Bioresources and viruses, 2019, p. 48, I. Pozhylov, H. Snihur, O. Shevchenko  
*(Особистий внесок здобувача –проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка тез)*

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ <i>EMARAVIRUS</i> РОДИНИ <i>FIMOVIRIDAE</i> .....	21
1.1 Загальна характеристика представників роду <i>Emaravirus</i> .....	21
1.2 Організація геному і реалізація генетичної інформації емаравірусів.....	26
1.3. Характеристика представників роду <i>Emaravirus</i> , що уражують рослини родин <i>Rosaceae</i> та <i>Roaceae</i> , та можуть бути потенційними збудниками вірусних інфекцій рослин на території України.....	28
1.3.1. Вірус, пов'язаний із кільцевою плямистістю горобини (EMARaV).....	28
1.3.2. Вірус розетковості троянд (RRV).....	33
1.3.3. Вірус плямистості листя малини (RLBV).....	38
1.3.4 Вірус мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV).....	42
1.3.5 Вірус, пов'язаний із плямистістю листя ожини (BLMaV).....	44
1.3.6 Вірус, пов'язаний із хлоротичною плямистістю листя груші (PCLSaV).....	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	48
2.1 Матеріали, що застосовувались у роботі.....	48
2.2.1 Методи, що застосовувались у роботі.....	49
2.2.2 Трансмійна електронна мікроскопія.....	50
2.2.3 Виділення тотальної РНК.....	50
2.2.4 ЗТ-ПЛР.....	52
2.2.5 Електрофорез НК в агарозному гелі.....	57
2.2.6 Імуноферментний аналіз .....	57
2.2.7 Виділення та очистка ДНК з гелю.....	58
2.2.8 Секвенування кДНК.....	60
2.2.9 Порівняння подібності послідовностей та філогенетичний аналіз.....	60

2.2.10 Оптична мікроскопія препаратів листків рослин.....	62
2.2.11 Статистична обробка даних.....	63
РОЗДІЛ 3. ПЕРВИННИЙ СКРИНІНГ ЕМАРАВІРУСІВ ТА ЇХ ПЕРЕНОСНИКІВ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ.....	64
3.1 Скринінг рослин родин <i>Rosaceae</i> та <i>Poaceae</i> методами візуальної діагностики.....	66
3.2. Виявлення кліщів-потенційних переносників емаравірусів.....	77
3.3. Візуалізація емаравірусних часточок методом трансмісійної електронної мікроскопії.....	80
РОЗДІЛ 4. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЕМАРАВІРУСІВ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	83
4.1. Молекулярна діагностика емаравірусів на території України.....	83
РОЗДІЛ 5. РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ RLBV БІОІНФОРМАТИЧНИМИ МЕТОДАМИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	94
5.1. Особливості українського ізоляту RLBV.....	94
РОЗДІЛ 6. ОСОБЛИВОСТІ ТА ПОШИРЕННЯ УКРАЇНСЬКИХ ІЗОЛЯТІВ HPWMoV.....	108
6.1. Поширеність HPWMoV в Україні.....	108
6.2. Молекулярно-генетичні властивості українських ізолятів HPWMoV.....	113
6.2.1. Молекулярно-генетичні властивості українських ізолятів HPWMoV за аналізом фрагмента геномного сегменту РНК3.....	113
6.2.2. Молекулярно-генетичні властивості українських ізолятів HPWMoV за аналізом фрагмента геномного сегменту РНК6.....	121
УЗАГАЛЬНЕННЯ .....	130
ВИСНОВКИ .....	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	139

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АК	— амінокислота
ЗТ-ПЛР	— полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією
НК	— нуклеїнова кислота
ПН	— пара нуклеотидів
ТЕМ	— трансмісійна електронна мікроскопія
BLMaV	— Blackberry leaf mottle-associated virus
EMARaV	— European mountain ash ringspot-associated virus
FMV	— Fig mosaic virus
HPD	— High Plains disease
HPWMoV	— High Plains wheat mosaic virus
RRD	— Rose Rosette Disease
RRV	— Rose Rosette Virus
PPSMV	— Pigeonpea sterility mosaic virus
RLBD	— Raspberry leaf blotch disorder
RLBV	— Raspberry leaf blotch virus
PCLSaV	— Pear chlorotic leaf spot-associated virus
WSMV	— Wheat streak mosaic virus
RdRp	— RNA-dependent RNA polymerase
GPC	— glycoprotein precursor
NP	— nucleocapsid protein
MP	— movement protein
ORF	— open reading frame

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** *Emaravirus* – новий рід вірусів рослин, геном яких представлений сегментованою одноланцюговою (-)РНК, нуклеокапсид має ротаційно-трансляційний тип симетрії, віріони сферичної форми, розміром 80-150 нм, мають ліпідну оболонку. Ці віруси розповсюджуються завдяки переносникам – кліщами родини *Eriophyidae* (Mielke-Ehret 2012). Наразі різноманітні представники роду *Emaravirus* були знайдені на території Аргентини, Австралії, Австрії, Німеччини, Фінляндії, Великобританії, США, Словаччини, Сербії, Росії, Китаю, Туреччини, Польщі, Індії, Швеції, та ін., загрожуючи зниженням врожайності сільськогосподарських культур і втратою декоративних рослин (Rehanek 2022). Хвороба Високих Рівнин, що пов'язується із кількома видами збудників, в тому числі і емаравірусним (HPWMoV), спричинила значні збитки сільському господарству, оскільки уражені рослини пшениці, кукурудзи та деяких інших культур масово марніли та гинули, таким чином помітно зменшувався врожай (Tatineni 2021). RRD, хвороба розетковості троянд, що спричиняється однойменним емаравірусом, досягла досить широкого поширення у США, є найсерйознішою загрозою для галузі в цій країні (Babu 2017). Дослідження емаравірусів є необхідним і важливим не тільки з точки зору сільського господарства, але і з боку фундаментальної науки, оскільки представники цього роду мають досить незвичайну будову генетичного апарату – фрагментовану «-»РНК, на відміну від більшості відомих вірусів рослин, що мають несегментований «+»РНК геном. До того ж цікавим є те, що кількість сегментів РНК у вірусів із фрагментованим геномом може бути не постійною, тобто у різних вірусних частках кількість сегментів може бути різною, через що до однієї окремої клітини можуть потрапити не всі сегменти, що як виявилось, не є необхідним, оскільки вірусні білки можуть транспортуватись між клітинами, забезпечуючи репродукцію

вірусної популяції (Sicard 2019), а емаравіруси можуть, потенційно, бути схильними до подібної форми життєвого циклу. Також ретельного дослідження вимагають структура та функції емаравірусних білків, особливості взаємодії із хазяями та переносниками, еволюція та штамове різноманіття тощо. Крім цього, до теперішнього часу, поки ми не долучились до цієї теми, емаравіруси не досліджувались на території України.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалась в межах теми кафедри вірусології № 16КФ036-05 «Структура та функції вірусів при різних екологічних станах» та науково-дослідної теми кафедри вірусології № 21БФ036-02 «Вірусологічний менеджмент небезпечних захворювань рослин як складова біобезпеки України» (№ держреєстрації 0121U109863).

**Мета і завдання дослідження:** ідентифікація емаравірусів рослин родин *Rosaceae* та *Poaceae* в Україні та вивчення їх молекулярно-біологічних властивостей.

Завданнями дослідження були:

- провести скринінг рослин за візуальними симптомами в агро- та урбоценозах України;
- ідентифікація емаравірусів за допомогою комплементарних вірусологічних методів дослідження: молекулярно-біологічних і серологічних;
- філогенетичний аналіз фрагментів послідовностей українських ізолятів емаравірусів;
- дослідити час дивергенції українських ізолятів емаравірусів від ізолятів з інших країн;
- рекомбінаційний аналіз послідовностей українських ізолятів емаравірусів;
- проаналізувати поширеність емаравірусів в моно- та сумісних інфекціях в Україні.

**Об'єкт дослідження:** віруси роду *Emaravirus*: HPWMoV, RLBV, RRV, BLMaV, PCLSaV та EMARaV.

**Предмет дослідження:** біорізноманіття та властивості український емаравірусів.

**Методи дослідження:** Візуальна діагностика, електронна мікроскопія, метод рослин-індикаторів, серологічні методи (імуноферментний аналіз), ЗТ-ПЛР, BLAST-аналіз, метод попарного порівняння, рекомбінаційний аналіз, філогенетичний аналіз, статистичні методи обробки даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше в Україні виявлено емаравіруси: HPWMoV у зразках пшениці і кукурудзи, а також RLBV у рослинах малини. Досліджено їх ареал розповсюдження в Україні, деякі властивості, отримано фрагментарні послідовності геномних сегментів РНК3 RLBV і РНК3 та РНК6 HPWMoV, а також вивчено можливі механізми еволюції, потенційні шляхи потрапляння в Україну.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати можна використовувати для пошуку стійких до HPWMoV сортів пшениці та кукурудзи, а також для розробки заходів боротьби з емаравірусами. Матеріали дисертації впроваджені в навчальний процес Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка на кафедрі вірусології при викладанні навчальних дисциплін: «Еволюція вірусів», «Віруси рослин», «Вірусологія».

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною роботою автора. Автором особисто одержано основну частину експериментального матеріалу, викладеного в дисертації, а саме: сформульовано мету і завдання роботи, проаналізовано літературні джерела за тематикою дослідження, відібрано зразки та їх подальше дослідження, проведено аналіз послідовностей фрагментів геномів виявлених ізолятів емаравірусів HPWMoV і RLBV біоінформатичними методами дослідження.

**Апробація результатів дисертації** Одержані результати дисертації були

апробовані на всеукраїнських і міжнародних наукових конференціях: International Agriculture Symposium 'Agrosym' 2020; SEAB-2021; AGBIOL 2021, та Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві XV, 2022 р.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 8 праць: 4 статті, з яких 2 статті у виданні, що індексується SCOPUS, 1 стаття — у виданні, що належить до списку періодичних фахових видань, затверджених МОН України, 1 стаття — у фаховому зарубіжному виданні; 4 тези наукових доповідей на всеукраїнських і міжнародних наукових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Загальний обсяг дисертації складає 159 сторінок, основну частину роботи викладено на 138 сторінках. Робота ілюстрована 5 таблицями та 57 рисунками. Перелік використаних джерел літератури налічує 176.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *EMARAVIRUS* РОДИНИ *FIMOVIRIDAE*

##### 1.1 Загальна характеристика представників роду *Emaravirus*

*Emaravirus* – новий рід вірусів, деякі представники якого є високошкодочинними патогенами сільськогосподарських та декоративних культур. Наприклад, у Індії хвороба мозаїчної стерильності горобинного гороху серйозно шкодить сільському господарству – близько трьохсот мільйонів американських доларів втрат, станом на 1993 рік (Jones 2004), спричиняючи хвороби пшениці та кукурудзи (Jensen 1996), голубиноного гороху, троянд і багрянника канадського (Laneу 2010), горобини (Mielke 2007) та інших представників розоцвітих (von Bargaen 2018). Також різні представники цієї родини уражують різноманітні рослини, такі представники як клен (Rumbou 2020), *Actinidia spp* (Shang 2022), лопух повстистий (Bi 2012), *Parkinsonia florida* (Ilyas 2018), ясен звичайний (Gaskin 2021), цикламен (Elbeaino 2018) і смоківницю (Walia 2009), осику (von Bargaen 2020), дуб звичайний (Bandte 2020), фісташка (Buzkan 2019), а також багато інших і цей список постійно поповнюється (таблиця 1.1).

Таблиця 1.1 – Види, що входять до роду *Emaravirus* за даними ICTV та їх рослини-хазяї (Walker 2022)

Вид	Назва вірусу	Абревіатур а	Хазяї	В роботі
<i>Emaravirus aceris</i>	Maple Mottle-Associated Virus	MaMaV	Клен	

<i>Emaravirus actinidiae</i>	Actinidia Chlorotic Ringspot-Associated Virus	AcCRaV	<i>Actinidia</i> spp.	
<i>Emaravirus cajani</i>	Pigeonpea Sterility Mosaic Virus 1	PPSMV-1	Голубиний горох	
<i>Emaravirus camelliae</i>	Camellia Japonica-Associated Virus 1	CjaV-1	Камелія	
<i>Emaravirus cercidis</i>	Redbud Yellow Ringspot-Associated Virus	RYRSaV	Багрянник канадський	
<i>Emaravirus cordylinae</i>	Ti Ringspot-Associated Virus	TiRSaV	Корділина	
<i>Emaravirus fici</i>	Fig Mosaic Virus	FMV	Смоківниця, цикламен	
<i>Emaravirus idaeobati</i>	Raspberry Leaf Blotch Virus	RLBV	Малина	◀
<i>Emaravirus kiwii</i>	Actinidia Virus 2	AcV-2	<i>Actinidia</i> spp.	
<i>Emaravirus parkinsoniae</i>	Palo Verde Broom Virus	PVBV	Паркінсонія	
<i>Emaravirus perillae</i>	Perilla Mosaic Virus	PerMV	Перілла	
<i>Emaravirus pistaciae</i>	Pistacia Virus B	PiVB	Фісташка	
<i>Emaravirus populi</i>	Aspen Mosaic-Associated Virus	AsMaV	Осика	
<i>Emaravirus pyri</i>	Pear Chlorotic Leaf Spot-Associated Virus	PCLSaV	<i>Pyrus</i> spp.	◀
<i>Emaravirus quercus</i>	Common Oak Ringspot-Associated Virus	CORaV	Дуб	
<i>Emaravirus rosae</i>	Rose Rosette Virus	RRV	<i>Rosa</i> spp.	◀
<i>Emaravirus rubi</i>	Blackberry Leaf Mottle-Associated Virus	BLMaV	Ожина, малина	◀
<i>Emaravirus sorbi</i>	European Mountain Ash Ringspot-Associated Virus	EMARaV	Горобина та інші яблуневі	◀
<i>Emaravirus syringae</i>	Lilac Chlorotic Ringspot-Associated Virus	LiCRaV	Бузок	
<i>Emaravirus toordali</i>	Pigeonpea Sterility Mosaic Virus 2	PPSMV-2	Голубиний горох	
<i>Emaravirus tritici</i>	High Plains Wheat Mosaic Virus	HPWMoV	Злакові	◀
<i>Emaravirus verbanni</i>	Camellia Japonica-Associated	CjaV-2	Камелія	

	Virus 2			
<i>Emaravirus ziziphi</i>	Jujube Yellow Mottle-Associated Virus	JYMaV1	Унабі	
<i>Emaravirus chrysanthemi</i>	chrysanthemum mosaic-associated virus	ChMaV	хризантеми	
<i>Emaravirus vitis</i>	Vitis emaravirus	VEV	виноград	
<i>Emaravirus fraxini</i>	Ash shoestring-associated emaravirus	ASaV	ясень	
<i>Emaravirus corynocarpi</i>	Karaka Ōkahu purepure emaravirus	KŌPV	Corynocarpus spp.	
<i>Emaravirus visci</i>	Arceuthobium sichuanense-associated virus 1	ArSaV-1	<i>Arceuthobium</i> spp.	

Генетичний апарат емаравірусів представлений чотирма (або більше) лінійними одноланцюговими «мінус»-сенсовими РНК, розміром від однієї до восьми тисяч основ кожна, що оточені білком нуклеокапсиду та мають комплекс з полімеразою. Віріони сферичної або плеоморфної форми, 80-150 нм у діаметрі (рис.1.1).

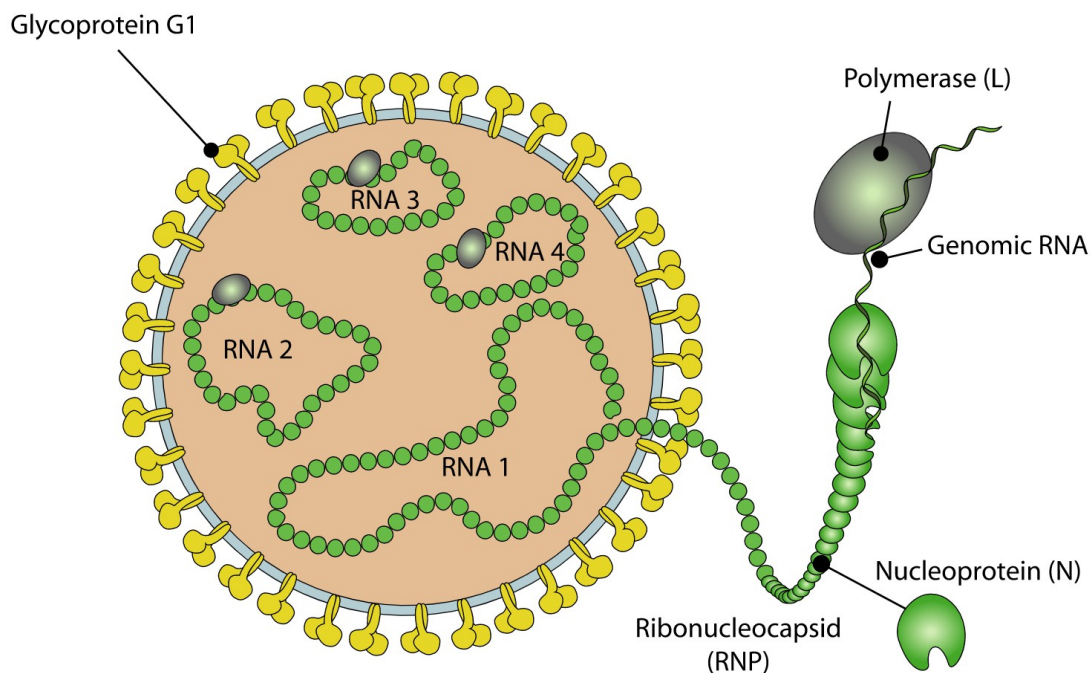


Рис.1.1 — морфологія вірусної частинки емаравірусів (Hulo 2011)

Усі види емаравірусів мають окрім чотирьох «основних» ланцюгів РНК, що кодують РНК-залежну РНК-полімеразу, попередник глікопротеїну, капсидний білок і транспортний білок, які дуже важливі для активності вірусу і тому присутні в всіх видах емаравірусів, ще також у кількох «додаткових» РНК, функції деяких з яких залишаються невідомими (Mielke-Ehret 2012).

Циркулятивна пропaгaтивна передача емаравірусів відбувається галовими кліщами родини *Eriophyidae*, як це було показано для EMARaV, що передається грушевим галовим кліщем, *Phytoptus pyri* (Vincenz 2010), FMV, *Aceria ficus* (1955), RRV, *Phyllocoptes fructiphilus* (Allington 1968) і *P. arcani* (Druciarek 2023), RLBV, *Phyllocoptes gracilis* (Jones 1984), PPSMV-1/PPSMV-2, *Aceria cajani* (Kulkarni 2002), HPWMoV, *Aceria tosichella* (Seifers 1997), PerMV, *Shevtchenkella sp* (Kubota 2020). Наразі відомий лише один емаравірус, який передається кліщами з родини *Diptilomiopidae* — JSARaV (Shimomoto 2022)

Також для багаторічних рослин досліджена передача через прищеплювання для емаравірусів EMARaV (Mielke-Ehret 2012), FMV (Walia 2009), RRV (Hindal 1988), RYRSaV (Di Bello 2016), AsMaV (von Bargaen 2020), CORaV (Führling 1995), MaMaV (Führling 1998), VEV (Fan 2021). Механічна передача можлива введенням до чутливих рослин (як того ж виду, що і хазяї, так і широкоживаних у наукових дослідженнях з експериментального інфікування рослин-індикаторів, такі як, наприклад, *Nicotiana glutinosa*, *N. benthamiana*) соку уражених рослин, що було продемонстровано для EMARaV (Führling 1995), RRV (Rohozinski 2001), PloAEV (Cao 2021), LiCRaV (Wang 2020), PerMV (Kubota 2020), TiRSaV (Olmedo-Velarde 2019), AcCRaV (Zheng 2017), PPSMV-1 (Kumar 2003) і PPSMV-2 (Elbeaino 2015), RLBV (McGavin), (з меншою ймовірністю) насіннева передача. Між клітинами рослин передача вірусу здійснюється через плазмодесми за участі М білка (Mielke-Ehret 2012).

Наразі різноманітні представники роду *Emaravirus* були знайдені на території Аргентини, Австралії, Австрії, Німеччини, Фінляндії, Великобританії,

США, Словаччини, Сербії, Чорногорії, Росії, Китаю, Туреччини, Польщі, Індії, Швеції, та ін., загрожуючи зниженням врожайності сільськогосподарських культур і втратою декоративних рослин.

Симптоми захворювань, що спричиняються емаравірусами були помічені ще у першій половині двадцятого сторіччя. Так, перші випадки хвороби мозаїчної стерильності голубиного гороху в Індії відомі з 1931 року (Mitra 1931, Kumar 1999), а хвороби розетковості троянд, у США, ще на початку сорокових років двадцятого сторіччя (Connors 1941, Laney 2011). За останні 10 років кількість відомих емаравірусів збільшилась в рази завдяки використанню сучасних методів досліджень, зокрема секвенуванню нового покоління (next generation sequencing, NGS) і розвитку метагеноміки, що дозволяють ефективніше досліджувати вірусні популяції (Kyryuchenko 2021). Наразі, окрім видів емаравірусів, що вже знаходяться у звіті ICTV (Lefkowitz 2018), відкрито деякі види, що є дуже близькими до них, але поки не включені до цієї родини: Pea Associated Emaravirus (PaEV) (Gaafar 2020), alfalfa ringspot-associated virus (ARaV) (Samarfard 2020), Woolly burdock yellow vein virus, (WBYVV) (Bi 2012), Viburnum line pattern-associated virus (VibLPaV) (Sabanadzovic 2011), ailanthus crinkle leaf-associated emaravirus (ACrLaV) (An 2022), Pueraria lobata-associated emaravirus (PloAEV) (Cao 2021).

## **1.2 Організація геному і реалізація генетичної інформації емаравірусів.**

Емаравіруси відрізняються від інших споріднених вірусів (ортотосповірусів і ортобуньявірусів) тим, що мають більшу кількість сегментів геномної РНК (рис. 1.2). Кожний сегмент від РНК1 до РНК4 кодує один білок. Функція білків, що кодуються іншими сегментами (від РНК5 до РНК8) залишаються невідомими для більшості емаравірусів і потребують подальшого дослідження. Як і інші віруси з «–»РНК загалом (Lin 2017) та буньявіруси зокрема, емаравіруси використовують «кеп-снетчінг» для ініціації транскрипції

та полегшення трансляції їх мРНК (Olschewski 2020), як це було доведено у випадках PPSMV (Kumar 2017), RRV (Laney 2011) та FMV (Walia 2012). Також, як і у інших представників порядку *Bunyavirales* (Kormelink 2021), всі сегменти геномної РНК емаравірусів мають консервативні кінці: перші 14 (або 11 чи 12, в залежності від виду емаравірусу) нуклеотидів 5' кінця і останні 11-14 нуклеотидів 3' кінця збігаються у всіх геномних РНК, і мають сигнали ініціації реплікації для РНК-залежної РНК-полімерази. Ці 11-14 нуклеотидів на кожному кінці є зворотньо-комплементарні один одному і утворюють вторинну структуру, що спостерігається у членів інших «-»РНК вірусів, так звані «panhandle-подібні» структури (Mielke-Ehret 2012).

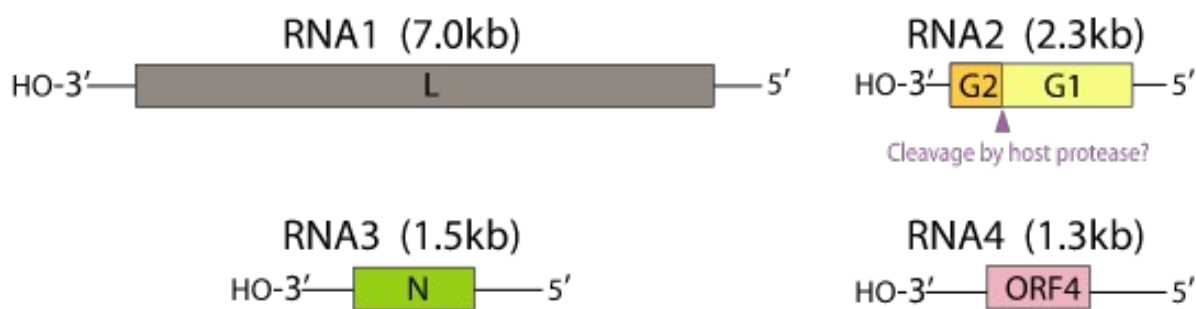


Рис.1.2 — Генетичний апарат емаравірусів (Hulo 2011).

РНК1, довжиною близько 7000 -7300 нуклеотидів, має одну Відкриту рамку зчитування або ORF (від англ. open reading frame) ORF (ORF1), що кодує РНК-залежну РНК-полімеразу, масою від 226.9 кДа у AcCRaV (Zheng 2020), до 269 кДа у PerMV (Kubota 2020). Подібно до інших буньявірусів та РНК-вмісних вірусів загалом (Amgoun 2017), емаравірусна РНК-залежна РНК-полімераза містить фрагмент, що складається з 11 консервативних мотивів (Pre-A, F, A, B, C, D і E), серед яких з них найбільш консервативними є мотиви F, A і B (Kubota 2021).

РНК2, довжиною від 1941 нуклеотидів у KOPV (Rabidge 2021) до 2400 нуклеотидів у TiRSaV (Olmedo-Velarde 2019), кодує білок-попередник глікопротеїну (glycoprotein precursor — GP, p2, 73–76,6 кДа), який, як

передбачається, розщеплюється на продукти 21,5–25,0 та 51–52 кДа за допомогою протеаз хазяя. В подальшому отримані глікопротеїни інкорпуються в мембрану, що стане оболонкою віріонів емаравірусів (McGavin 2012).

РНК3, довжиною від 1106 у TiRSaV (Olmedo-Velarde 2019) до 1686 нуклеотидів у JSARaV (Shimomoto 2022) кодує нуклеокапсидний білок (nucleoprotein — NP, р3, 32–35,6 кДа). Дозрілий білок представляє собою глобулу, зібрану із 10 альфа-спіралей та бета-складки, від якої відходять 2 кінці (так звані “N” і “C” руки), якими ці білки об’єднуються у капсид. В центральній частині глобули розміщується сайт зв’язування з РНК. Капсомери, прикріплюючись “руками” до глобул одне одного, об’єднуються у групу з чотирьох білків, таким чином формуючи дископодібний тетрамер (рис.1.3), що за рахунок комплементарності зарядів поверхонь збираються (із одноланцюговою РНК всередині, при чому на кожний тетрамер припадає по 42 нуклеотиди) у довгий, тонкий та гнучкий рибонуклеопротеїн (Izhaki-Tavor 2023).

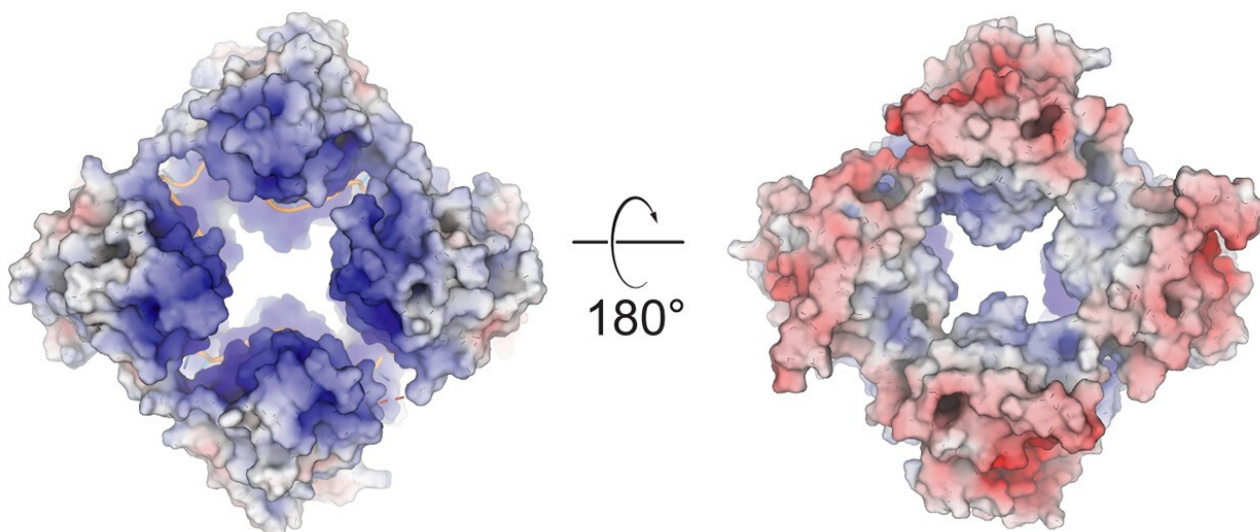


Рис.1.3 — Модель збірки рибонуклеопротеїну FMV. Кольорами показано поверхневі електростатичні потенціали з обох сторін тетрамерів у комплексі з олРНК (Izhaki-Tavor 2023).

РНК4, довжиною від 1294 у PerMV (Kubota 2020) до 1682 нуклеотидів у HPWMoV (Tatineni 2014) кодує білок руху (movement protein — MP, p4, приблизно 40,5–43,6 кДа (Elbeaino 2018). Експериментально та біоінформатичними методами функцію міжклітинного руху для цього білку було показано для FMV (Ishikawa 2013) і RLBV (Yu 2013).

Структура, кількість та функції інших сегментів відрізняються для різних видів. Так, наприклад, РНК 6-8 RLBV, що відповідають за супресію сайленсингу, подібні між собою, але відрізняються від РНК інших емаравірусів (Lu 2015). РНК5 CJaV схожа на РНК7 HPWMoV, і вони також можуть відповідати за супресію сайленсингу (Zhang 2020).

### **1.3. Характеристика представників роду *Emaravirus*, що уражують рослини родин *Rosaceae* та *Poaceae*, та можуть бути потенційними збудниками вірусних інфекцій рослин на території України**

#### **1.3.1. Вірус, пов'язаний із кільцевою плямистістю горобини (EMARaV)**

Дослівно назва цього вірусу перекладається українською як «Вірус, пов'язаний із кільцевою плямистістю горобини». Вперше симптоми хвороби, кільцевої плямистості горобини, яку може спричиняти даний вірус, були помічені на листках горобини (Рис.1.4 а) на початку і в середині двадцятого сторіччя на території сучасної Німеччини (Baur 1907, Kegler 1960), а також Фінляндії (Jamalainen 1957). Крім цього, подібні симптоми були знайдені на листках горобини, у зразках в яких було показано присутність EMARaV у багатьох країнах Європи (Dieckmann 2013): Великобританії (Robel 2013), Чехії (Grimová 2011), Польщі (Druciarek 2019), Росії (Valkonen 2010), Швеції (Kallinen 2009, Von Barga 2013), Австрії (Mielke 2007, Robel 2013), Норвегії (Von Barga 2014).

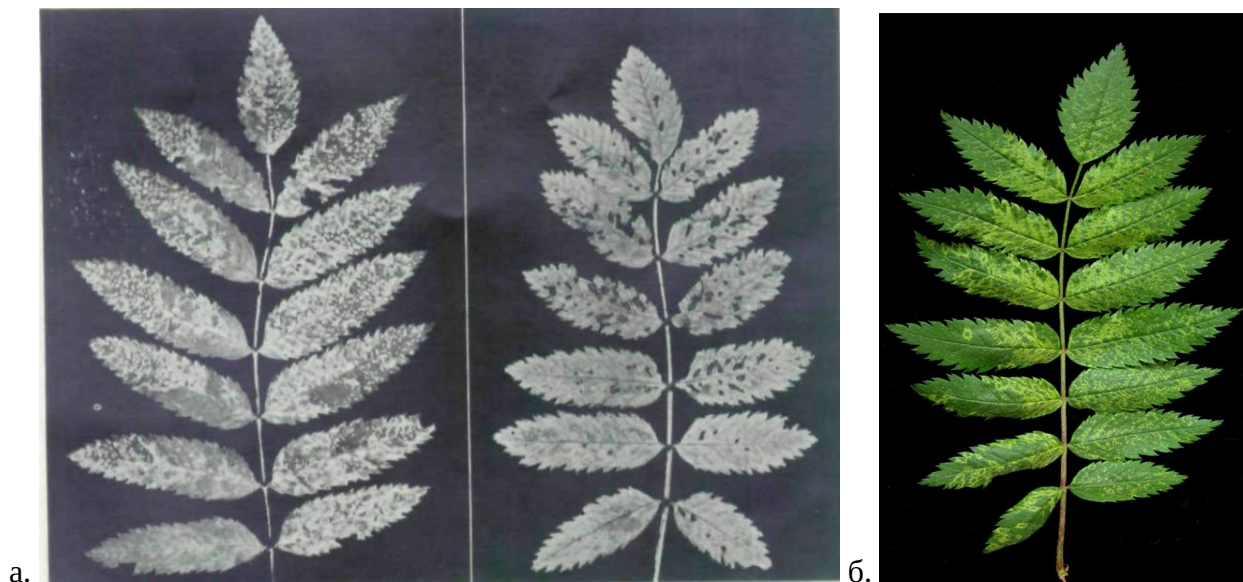


Рис.1.4 — Зображення листків горобини із хлоротичними плямами (а) і кільцевої плямистості (б) (Mielke-Ehret 2012).

Симптоми хвороби проявляються у вигляді кільцевих хлоротичних плям на листковій пластинці горобини (Рис.1.4 б), але їх не завжди можна знайти на листах однієї гілки або ж навіть на різних сторонах листка. Також вірус може успішно перезимувати у гілках горобини, але детальних спостережень проведено не було. Всі зібрані у Фінляндії (Наміна, Helsingi, Joroinen, Jyväskylä, Jämsä, Kuopio, Leppävirta, Mikkelä, Pirkkala, Ristiina, Ruukki, Siilinjärvi, Sipoo, Toijala, Turku, Vihti) і Росії (Viipuri (Виборг)) зразки горобини були заражені (Kallinen 2009).

Найбільш ймовірно, що вірус розповсюджується за допомогою переносника – галового кліща *Eriophyes pyri* (Pagenstecher 1857), що також має синонімічні назви *Epitrimerus*, *Eriophyes*, *Phytoptus pyri (piri)*; *Eriophyes*, *Phytoptus sorbi* (Canestrini 1890); *Eriophyes variolatus* ; *E. pyri (piri) var. Variolata* (Nalera 1892). Це невелика тварина з родини Галових кліщів (*Eriophyidae*) (Mohanasundaram 1990) з тілом веретеноподібної форми, розмірами близько 0,2 мм, при чому самиці є трохи більшими, мають довжину близька 200  $\mu$ , самці — 170  $\mu$  (Nalera 1898) з двома парами коротких ніжок на передньому кінці тіла, що має біло-золотисте забарвлення, зображена на Рис.1.5.

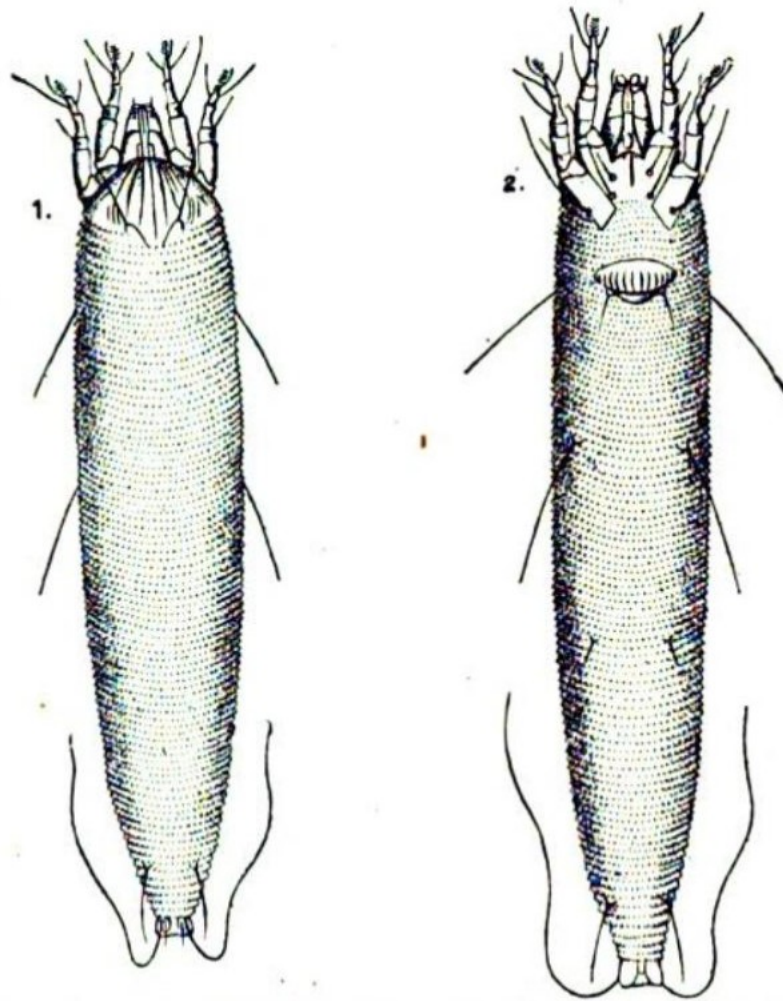


Рис.1.5 — Кліщ *Eriophyes pyri* за Налепюю. Вид з дорзальної (1) і вентральної (2) сторін (Quaintance 1912).

Про те, що галові кліщі є переносниками свідчать знайдені в їх тілах як «-»РНК, так і «+»РНК, тому, можливо, як і Тосповіруси, емаравіруси можуть розмножуватися в тілі хазяїна (Mielke-Ehret 2012). Крім цього у певних органах галових кліщів, в здебільшому у кишківнику, було помічено накопичення білку нуклеокапсиду р3 EMARaV (Mielke-Ehret 2010). Білок нуклеокапсиду також було знайдено в ооцитах та яйцях кліщів, отже можлива вертикальна передача вірусу від заражених кліщів до їх нащадків. Також можливе ураження рослини механічно, але з меншою ефективністю (Mielke-Ehret 2010). Попри те, що вірус складно передається механічним шляхом, була показана можливість підтримувати реплікацію вірусу у суспензійній і калюсній культурах клітин

*S. aiscuparia*, які були отримані із інфікованих EMARaV паростків (Svensson 2014).

Геном EMARaV представлений чотирма одноланцюговими РНК (Рис.1.6): перша є найбільшою, має довжину сім тисяч основ і кодує РНК-залежну РНК-полімеразу масою 266 кДа, що дуже подібна до РНК-залежних РНК-полімераз у Буньявірусів і Теніювірусів (*bunyaviruses* і *tenuiviruses*) (Benthack 2005), а також на ній можливо визначити премотив А та мотиви А-Е.

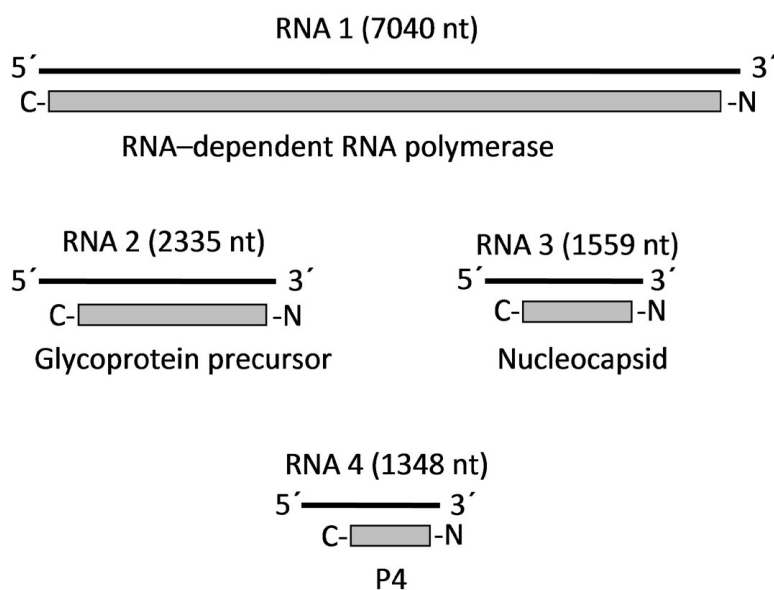


Рис.1.6 — Геномна організація EMARaV. Чорними смужками зображені одноланцюгові « - » смислові РНК, сірими – білки (Mielke-Ehret 2012).

Друга за розміром РНК має довжину більше двох тисяч основ і кодує попередник глікопротеїну масою 75 кДа, що має консервативну послідовність, подібну до такої у *Phlebovirus* (*Bunyavirales*) (Liu 2003), до того ж за допомогою комп'ютерного моделювання були встановлені сайти N-глікозилування, трансмембранні спіралі, N-термінальний сигнальний пептид та місце, в якому цей попередник глікопротеїну може бути розділений на два окремих глікопротеїна масами 52 кДа і 23 кДа. Структура попередника глікопротеїна також подібна до такої структури у Буньявірусів. Третя РНК має довжину трохи більшу за півтори тисячі основ, і кодує N-білок масою 35 кДа, що є білком

нуклеокапсиду вірусу. Найменша, четверта РНК, має розмір 1,3 тисяч основ і кодує білок масою 27 кДа із достовірно невідомими функціями, але скоріше за все цей білок відповідає за міжклітинний транспорт, як було показано для подібних білків у RRV і FMV (Ishikawa 2014).

Використовуючи метод Нозерн-блоттингу було показано відсутність додаткових РНК (additional RNAs). Але за допомогою високопродуктивного сиквенування була показана наявність ще двох додаткових геномних сегментів: РНК5 (RNA5) довжиною 1629 нуклеотидів, що, як припускається, кодує білок руху (MP) з молекулярною масою 42.4 кДа і РНК6 (RNA6) довжиною 1362 нуклеотидів, що кодує білок з молекулярною масою 26.8 кДа і має подібність до білка Р4 EMARaV, що кодується сегментом РНК4 (von Bargaen 2019).

Популяції вірусу EMARaV є досить генетично гомогенними, маючи ідентичність кодуєчих ділянок геномного сегменту РНК3 в межах 97 to 99%. Відмінність у нуклеотидних послідовностях не була пов'язана із географічним розподілом місць відбору досліджених зразків (Kallinen 2009, Robel 2013), і лише ізоляти з Норвегії мали більше відмінностей (лише 68-73% ідентичності до ізолятів з інших країн), формуючи окрему групу (Von Bargaen 2014). Аналіз кодуєчих фрагментів послідовностей геномних сегментів РНК3 і РНК4 показав сильну дію очищуючого відбору, що виражалось у переважанні синонімічних заміщень над несинонімічними:  $dN/dS = 0.050$  для РНК4 і  $dN/dS = 0.116$  для РНК3, що призводить до стабілізації вірусної популяції і підтримки функціональної цілісності білків, що кодуються цими геномними сегментами (Roßbach 2015).

Беручи до уваги те, що ареал горобини звичайної простягається з півночі Кольського півострову до південних меж широколистяних і мішаних лісів України майже неперервно (Raspe 2000), а EMARaV крім горобини може уражати інші види горобини — *Sorbus aria* і *S. intermedia* (Robel 2013), крім цього, широкомасштабний скринінг в Британії показав пристуність EMARaV у *S. aucuparia subsp. sibirica*, *S. glomerulata*, *S. rehderiana*, *S. sp. aff. scalaris* і

*S. pteridophylla* (Harju 2017), а також інші яблуневі рослини такі як, наприклад, ірга (Grimová 2015), аронія (von Bargaen 2018) та їх гібридах, такі як *Karpatisorbus × hybrida* (von Bargaen 2020), можна зробити припущення, що на території України (принаймні північних і західних областей країни) може бути присутній EMARaV.

### 1.3.2. Вірус розетковості троянд (RRV)

Троянди є одними з найбільш цінних декоративних рослин на Землі, що використовується не тільки для прикрашання вулиць та парків, але і у промисловості та зміцнюванні ґрунтів, і зараз розповсюджені по всьому світу (Eckardt 1987). Троянди є чутливими до багатьох хвороб, що тільки у Великобританії завдають шкоди на £630 мільйонів від £10 мільярдів прибутків від садівництва та виробництва декоративних рослин. Поки RRV не був виявлений у Європі, але завдяки торгівлі між США та країнами Європи ймовірність його занесення не може виключатись (Vazquez-Iglesias 2020). Хвороба, що спричиняється цим вірусом — хвороба розетковості троянд (rose rosette disease, RRD), вважається дуже небезпечною для рослин, загрожуючи поступовою загибеллю рослин, що може призвести до втрати більше ніж 93% рослин у щільних насадженнях (Amrine 1996), знищуючи 2-4% рослин щорічно (Windham 2014). Крім США, хвороба зустрічається у Канаді та Індії (Chakraborty 2017).

Вважалось, що вірус розетковості троянд має чотири геномні сегменти (Laneu 2011) (Рис.1.7), що є дуже подібним до геномної організації EMARaV. Але за новішими даними була показана наявність ще двох додаткових РНК: РНК5 і РНК6 (Babu 2016), а також сьомий сегмент — РНК7 (Di Bello 2015) додаткових РНК: RNA 5 довжиною 1665 основ, що кодує білок р5 з молекулярною масою 55 kDa; RNA 6, що містить 1,402 основ і кодує два білки (Рис.1.8). Менша ORF, що кодує білок рба масою 7.4kDa, має два

трансмембранні домени і пов'язаний із секреторними шляхами (secretory pathway) та не спостерігався у інших емаравірусів, а другий, р6b, масою 27.1 kDa має деяку подібність до білку р4 EMARaV; RNA 7 має довжину 1649 основ, має одну ORF, кодує білок р7 масою 54.1 kDa. RRV р7 має подібну амінокислотну послідовність N-термінальної вторинної структури з усіма білками р5 різних емаравірусів і білком р6 WMoV.

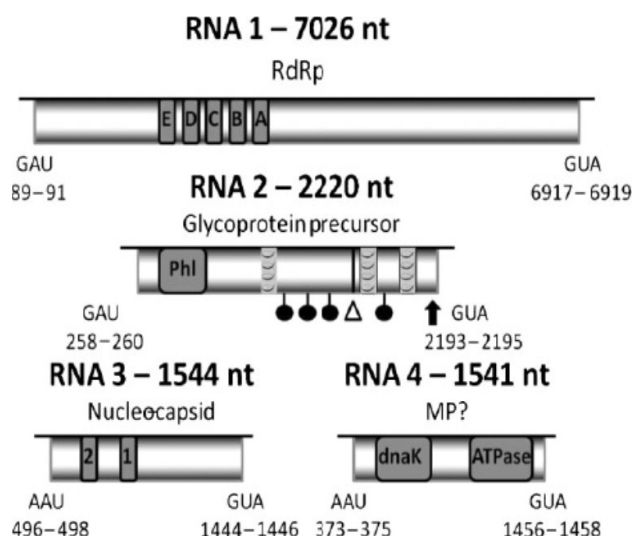


Рис.1.7 — Схематичне зображення організації геному RRV і передбачення структури білків. Стрілочкою позначено місце сигналу секреції. Булавкою позначені сайти N-зв'язаного глікозилювання, спіралями – трансмембранні домени, трикутником – ймовірне місце розщеплення білку –глікопротеїнового попередника. Ділянки А-Е – консервативні мотиви RdRp (Laney 2011).

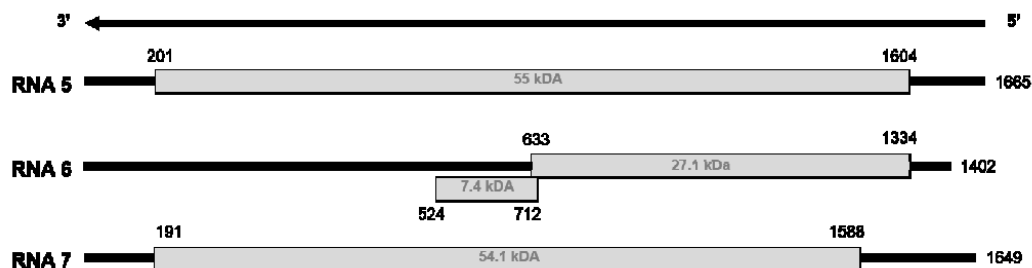


Рис.1.8 — Схематичне зображення організації геному RRV і передбачення структури білків, що кодуються РНК5, РНК6 і РНК7 (Di Bello 2015).

Популяція RRV має досить низьке генетичне різноманіття, маючи 97–100% ідентичності нуклеотидних послідовностей для більшості геномних сегментів, а відмінності в нуклеотидних послідовностях не пов'язані з географічним розповсюдженням. Це пояснюється сильною дією негативного відбору та нещодавньою появою вірусу (Katsiani 2020). Ізоляти поділяються на 6 основних груп, і аналіз окремих сегментів дозволяє вислідити випадки реасортацій, що відбувались у минулому (Verchot 2023).

Симптоми хвороби розетковості троянд, зображені на рис.1.9, можуть проявлятися у вигляді (a) посиленій проліферації листя у вузлах, (b) червоній пігментації стебел і листя, (c) утворення відьминих мітел та (d) неправильно сформованих листкових пластинок.

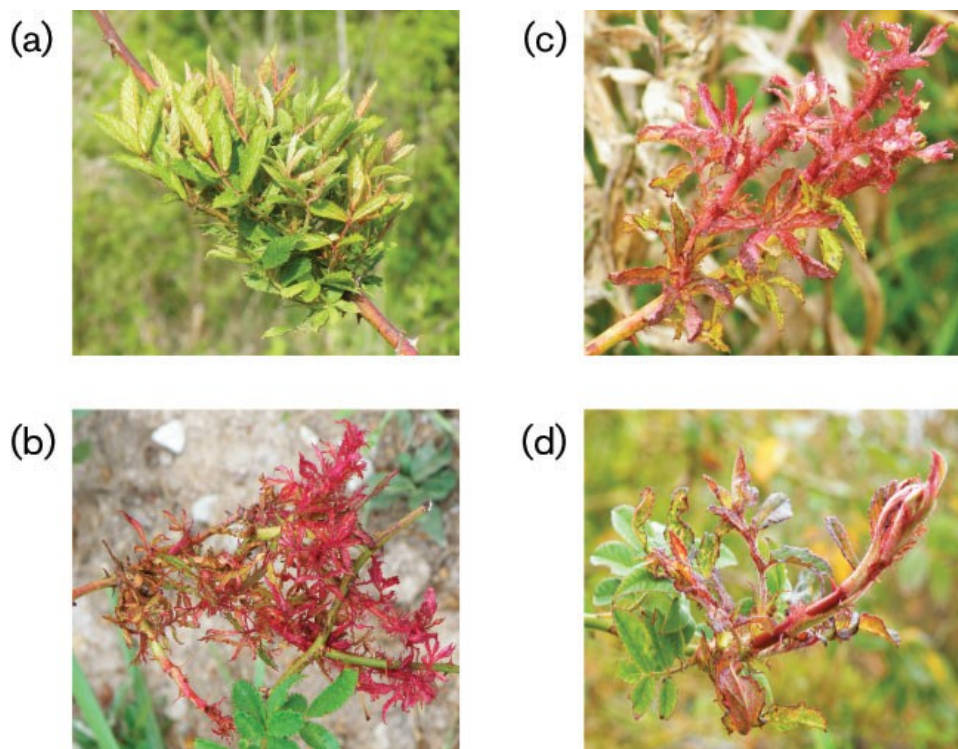


Рис.1.9 — Фотографії із зображенням симптомів RRD (Laney 2011).

Крім троянд, дослідження з експериментального ураження рослин інокуляцією інфекційним соком уражених троянд показали сприйнятливість рослин перцю, огірка і *N. benthamiana* до RRV методами TEM (Atallah 2022).

RRV, як і інші емаравіруси, поширюється ериофідним кліщем. Поки що достовірно відомо лише про один вектор для цього вірусу - *Phyllocoptes fructiphilus*, а також розглядається *Phyllocoptes arcani* sp. Nov. на роль другого вектора (Druciarek 2021). *P. fructiphilus* має типову для ериофідних кліщів будову: веретеноподібне білувато-прозоре тіло довжиною 140-175  $\mu$  і 40-50 в ширину, дві пари ніг (Vauchan 2017). Самиці відкладають по одному яйцю діаметром 20-25 щодня протягом 30 днів, з яких за 3-4 дні вилупляється личинка, що за тиждень досягає стадії імаго (Amrine 1998). З невідомих причин щільність популяцій кліщів у США спадає з півночі на південь (Solo 2020). Можливо, справа у вологості, оскільки особини *P. fructiphilus* віддають перевагу місцям із нормальною (60%) відносною вологістю (Monterrosa 2021). Крім цього, вони люблять високу (32.2°C) температуру більше за низьку (15.6 і 21.1°C), що проявляється у більшій кількості особин на рослинах у відповідних умовах (Joseph 2022). На відміну від багатьох інших емаравірусів, саме вірус, а не кліщ-переносник відповідає за яскраві симптоми RRD на трояндах, оскільки було помічено ериофідних кліщів і на безсимптомних безвірусних трояндах, в той час як симптоматичні рослини завжди мають і емаравірусну інфекцію, і еридоз (Otero-Colina 2018).

Продовжується розробка нових схем (Claros 2022) та методів для детекції та дослідження RRV. Був розроблений новий метод детекції – ізотермічна зворотно-транскрипційно-рекомбіназна полімеразна ампліфікація (RT-echoRPA), використовуючи праймер / зонд, розроблений на основі гену нуклеокапсиду RRV (рис.1.10), що відрізняється високою специфічністю і чутливістю, із здатністю розпізнавати вірусну НК у концентраціях до 1 fg/ $\mu$ l та застосовує нову стандартизовану швидкісну техніку виділення тотальної РНК, що займає менше п'яти хвилин (Babu 2017). Крім цього розробляються та

удосконалюються методи для проведення рутинної діагностики RRV: нові пари праймерів для ендпоінт ЗТ-ПЛР, кількісної ЗТ-ПЛР, High Resolution Melt (HRM) ЗТ-ПЛР (Dobhal 2016) для однієї цілі та для кількох цілей на різних геномних сегментах: РНК2 і РНК3 (Babu 2016); новий варіант Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) для детекції RRV (Salazar 2021); запропоновано метод попередньої діагностики за допомогою Раманівської спектроскопії (Farber 2019); розробляються антитіла до нуклеопротеїну для створення тест-систем для ІФА та Вестерн-блотингу (Jordan 2016).

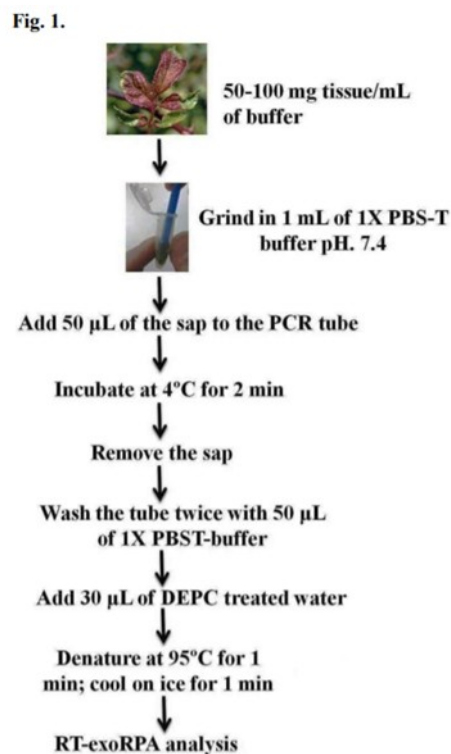


Рис.1.10 — Схематичне зображення етапів RT-exoRPA (Babu 2017)..

Новий метод дослідження RRV, що використовує штучні ДНК копії (Constructed DNA copies), застосовується для дослідження реплантації вірусу у живих рослинах. Він полягає у введенні в рослину змінених антигеномних РНК і дослідженні флуоресценції від рослини (Verchot 2020). А для досліджень реплікації та збірки віріонів була розроблена система на основі зеленого

флюорисціюючого білка (green fluorescent protein, GFP), що може застосовуватись і для вивчення інших емаравірусів (Urrutia 2022).

### 1.3.3. Вірус плямистості листя малини (RLBV)

В останні десятиліття було помічено на плантаціях малини Англії і Шотландії (Великобританія) захворювання, що проявляється у вигляді плям на листках малини, некрозах, деформації листкової пластинки, відмиранні бічних пагонів, рис.1.11. Було вражено види малини звичайної (*Rubus idaeus*) і гібридної малини (*Rubus hybrids*), тауберрі (*Rubus fruticosus* x *R. idaeus*). В тому числі було вражено рослини сорту «Glen Ample», що знаходились у закритих теплицях (McGavin 2012). Раніше вважалось, що хвороба, що була названа як «розлад малини, пов'язаний із плямистістю листя» (RLBD), викликається паразитичними кліщами *Phyllocoptes gracilis* (Jones 1984, Gordon 1976).

RLBV поширений у багатьох країнах Європи: Фінляндії (Vi 2012), Чорногорії (Zindović 2015), Боснії і Герцеговині (Delić 2020), Болгарії (Pleško 2014), а також у Сербії (Jevremović 2016), де цей вірус часто спостерігається у сумісній інфекції разом із іншими економічно-важливими вірусами малини: black raspberry necrosis virus (BRNV), Rubus yellow net virus (RYNV) і raspberry leaf mottle virus (RLMV) (Paunović 2020), які відомі як Комплекс мозаїки малини, Raspberry mosaic disease complex (RMD), при чому RLBV зустрічається у 92,3% зразках інфікованих рослин, що мали сумісну інфекцію) (Martin 2013).



А)Б)

Рис.1.11 — Симптоми хвороби плямистості листя малини (Martin 2013).

Кліщ-переносник, *Phyllocoptes gracilis*, синоніми: *E. gracilis* (Nal.) 1890 і *Cecidophyes gracilis*, веретеноподібна тварина шириною 30  $\mu$  і 100 та 120  $\mu$  довжиною для самців і самиць відповідно, що зустрічається у країнах Центральної Європи на рослинах малини (Nalera 1898).

Геном вірусу плямистості листя малини представлений вісьмома сегментами РНК: чотири перші характерні для всіх емаравірусів, а п'ятий є унікальним і характерний лише для цього вірусу. РНК5 кодує білок Р5, функція якого ще не до кінця з'ясована, але можливо він причетний до процесів фузії. Білок Р4, хоча і має приблизно таку ж саму довжину, що і аналогічні білки інших емаравірусів, має сигнальну послідовність на його N-кінці, а тому, можливо, виконує ще якусь функцію, окрім міжклітинного транспортування вірусу (McGavin 2016). РНК6,7 і 8 є дуже подібними один до одного, але не спостерігаються в інших представників роду емаравірусів. Припускають, що ці білки беруть участь у вірусному патогенезі (Lu 2015).

Було показано, що усі емаравірусні Р4 мають сайт для процесингу, за винятком глікопротеїну RLBV, і в цьому випадку стратегія процесу розщеплення залишається невідомою (McGavin 2016).

Послідовності RLBV та HPWMoV менш консервативні у порівнянні з шістьма іншими емаравірусами. Порівняння послідовності P4 восьми емаравірусів показало суттєве збереження подібності в домені 30 K і консенсусні залишки в декількох мотивах PDE201-203, QWDVFTFPR211-219, SGK229-231, QLED254-257, GLT / NK269-172, виявлених у так званому молекулярному шапероні DnaK-регіоні на С-кінці. Вони є дещо консервативним у більшості емаравірусів крім RLBV. Збереження деяких областей (I / V і D) здається майже універсальним для членів сімейства білків MP 30 K для всіх емаравірусів (Yu 2013). Було продемонстровано, що консервативний залишок D127 має вирішальне значення для рухової активності та локалізації до плазмодесм білку P4 RLBV. Білок RLBV P4 має вторинну структуру, ідентифіковану в домені 30 K, як  $\alpha A$ ,  $\beta$ -1,  $\beta$ -2,  $\alpha B$ ,  $\beta$ -3,  $\beta$ -4,  $\beta$ -5,  $\beta$ -6 і  $\beta$ -753.

Неконсервативність різних мотивів або відсутність їх у RLBV та HPWMoV вказують на те, що MP цих вірусів належать до іншої групи, відмінної від інших емаравірусів (рис. 1.12) (Kumar 2017).

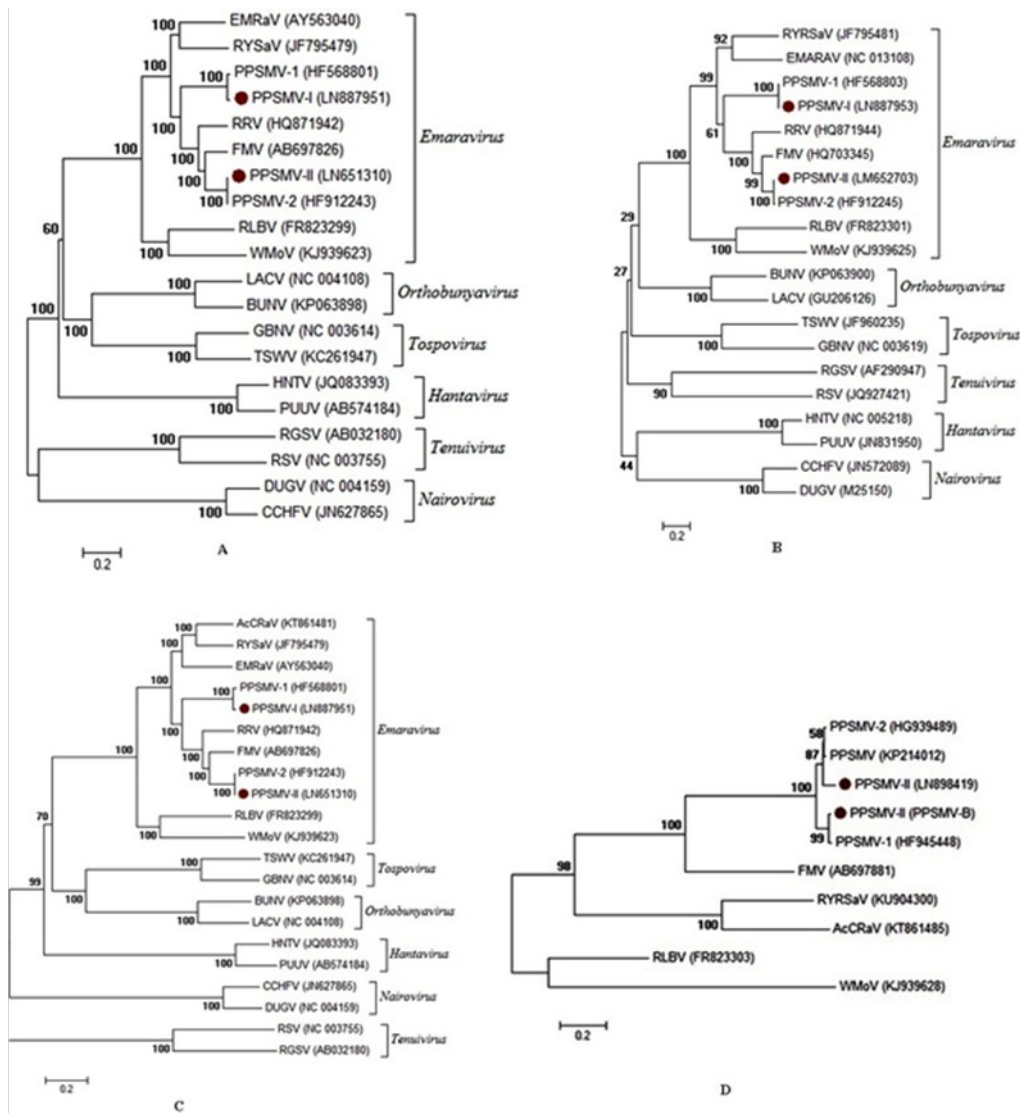


Рис. 1.12 – Зображення філогенетичних зв'язків серед емаравірусів та до інших вірусів що належать до *Bunyaviridae* і *Tenuivirus*. Філогенетичні дерева були побудовані за допомогою амінокислотних послідовностей RdRp (A), NCP (B) P4 (C) і P5 (D) за допомогою MEGA 6.0 із використанням методу neighbour joining. Досліджувано еволюційну історію та еволюційні відстані з використанням критерію максимальної правдоподібності (ML) з 1000 повторюваннями бутстрепа. Бар відображає кількість змін амінокислот на сайт (Kumar 2017).

P4 білки, як вважається, беруть участь у русі вірусу від клітини до клітини. McGavin et al. показали наявність MP білка RLBV P4-GFP в клітинній

стінці та плазмодесмах (McGavin 2016). Крім того, емаравірусні Р4 здатні забезпечити рух клітин до клітини дефектного вірусу картоплі Х за допомогою RLBV і FMV Р4, що дозволяє вважати, що Р4 цих вірусів є білками руху і є взаємозамінними.

Генетична різноманітність у популяціях також досить низька, аналіз нуклеотидних послідовностей гену білка капсиду показав 93.2–100% ідентичності між ізолятами із Сербії (Jevremović 2019) та 92.0–100% з Фінляндії (Dong 2016).

### **1.3.4 Вірус Високих рівнин (HPWMoV)**

Вірус Високих рівнин (High Plains virus, HPV), що також має синоніми Maize red stripe virus (MRSV), Wheat mosaic virus (WmoV), High Plains wheat mosaic virus (HPWMoV), викликає захворювання, що вперше виявлено в кукурудзі і пшениці в регіонах Високих рівнин (Техас, Канзас, Айдахо, Колорадо, Небраска, та Юта) Сполучених Штатів (Jensen 1994, Jensen 1996). Наразі вірус був знайдений у США, Канаді, Аргентині (Alemandri 2017) і Австралії (Coutts 2014). Також цей вірус було перехоплено у інфікованому зерні, що прямувало із США до Бразилії (Botelho 2016) та Нової Зеландії (Ochoa-Corona 2015), але свідчень про наявність HPWMoV у цих країнах немає. Електронно-мікроскопічні дослідження HPV-інфікованих листків кукурудзи та пшениці показав присутність великих подвійно-мембранних частинок (DMP), які можуть бути вірусного походження, від 150 до 200 нм діаметром в цитоплазмі клітин (Ahn 1996).

Геном складається щонайменше з 8 олРНК (рис.1.13) з від приблизно 1339 до 6981 нуклеотидів по одній ORF на кожному з сегментів. 4 сегменти (РНК1-РНК4) є стандартними і схожими до інших емаравірусів, в той час як РНК5 і РНК6 мають деяку схожість із РНК5 RLBV, а РНК7 і РНК8 є унікальними, але їх функції залишаються незрозумілими (Tatineni 2014). Можливо, РНК7 і 8

пов'язані із механізмами супресії сайленсингу (Gupta 2019, Gupta 2018). Так звана група Небраска-подібних ізолятів (Nebraska-like isolates) містить дві різні копії сегменту РНК3 (Stewart 2016).

Genomic organization of WMoV RNAs		5'-NTR	Coding region	3'-NTR
3'	RNA 1: 6981 nt N 2272 aa (268 kDa) C 5'	94 nt	nt 6913 to 98	68 nt
3'	RNA 2: 2211 nt N 667 aa (77 kDa) C 5'	128 nt	nt 2132 to 132	79 nt
3'	RNA 3: 1439 or 1441 nt N 286 or 289 aa (33 kDa) C 5'	351/352 nt	nt 1215/1222 to 358/356	224/219 nt
3'	RNA 4: 1682 nt N 364 aa (42 kDa) C 5'	475 nt	nt 1570 to 479	112 nt
3'	RNA 5: 1715 nt N 478 aa (56 kDa) C 5'	158 nt	nt 1595 to 162	120 nt
3'	RNA 6: 1752 nt N 492 aa (58 kDa) C 5'	155 nt	nt 1634 to 159	118 nt
3'	RNA 7: 1434 nt N 305 aa (36 kDa) C 5'	399 nt	nt 1317 to 403	117 nt
3'	RNA 8: 1339 nt N 178 aa (21 kDa) C 5'	715 nt	nt 1246 to 719	93 nt

Рис 1.13 — Генетична організація HPWMoV (Tatineni 2014).

У діапазоні хазяїв HPWMoV є: *Hordeum jubatum* (Abdullahi 2020), Стоколос покрівельний (*Bromus secalinus* L.), пшениця (*Triticum aestivum* L.), ячмінь (*Hordeum vulgare* L.), овес (*Avena sativa* L.), жито (*Secale cereale* L.), кукурудза (*Zea mays* L.), і деякі бур'яни, такі як жовтий лисохвост (*Setaria glauca* L.) і зелений лисохвост (*S. viridis*). Симптоми HPWMoV можуть бути сплутані з тими, що викликаються WSMV (рід *Tritimovirus*), яка має подібний діапазон хазяїв (Seifers 1998). Однак симптоми HPWMoV можуть бути набагато більш суворими ніж WSMV. Також на рослинах пшениці спостерігались більш суворі симптоми у разі змішаних інфекцій, ніж у моноінфекціях (Burrows 2009). Ці два віруси часто зустрічаються в змішаній інфекції (Jensen 1994, Mahmood 1998). Також часто зустрічається змішана інфекція вірусів, що передаються кліщем *A. tosicHELLa* — WSMV і Triticum mosaic virus (TriMV) (Byamukama 2016)

Симптоми варіюються від плям, хлорозу, некрозу і сильної затримки росту до швидкої загибелі рослини, в залежності від умов навколишнього середовища, генотипу рослин, часу зараження.

Популяція HPWMoV є досить гетерогенною. Наприклад, нуклеотидна послідовність 30 кДа білку нуклеокапсиду ізоляту U04-82 має лише 57% ідентичності з іншим ізолятом (Seifers 2009). Показано, що ізоляти з однієї популяції здатні інфікувати сорти кукурудзи (наприклад B73), що вважались стійкими до вірусу (Seifers 2004). Були зафіксовані докази випадків рекомбінацій і реасортацій (Jones 2023).

HPWMoV успішно передається з HPWMoV -інфікованого соку інокуляцією в судину. HPWMoV передається з кліщами пшениці *Aceria tosichella* Keifer (Seifers 1998), який також є вектором для WSMV і TriMV. При чому різні популяції кліщів із різною ефективністю переносять ці віруси (Seifers 2002). HPWMoV також може передаватися насінням із дуже невеликим шансом (1:10000), як це було показано для насіння кукурудзи (Forster 2001).

### **1.3.5 Вірус, пов'язаний із плямистістю листя ожини (BLMaV)**

Комплекс жовтої жилкуватості ожини є серйозною загрозою для вирощування ожини у США. Це захворювання супроводжується пожовтінням, деформацією листків, некрозами і навіть загибеллю рослини в особливо тяжких випадках (рис 1.14). Емаравірус, що спричиняє це захворювання, blackberry leaf mottle-associated virus (BLMaV), було виявлено завдяки секвенуванню випадкових кДНК, що були синтезовані на основі длРНК, що була виділена із симптоматичних рослин ожини, після чого були розроблені специфічні методи детекції цього вірусу, а філогенетичний аналіз показав належність BLMaV до емаравірусів (Hassan 2012).

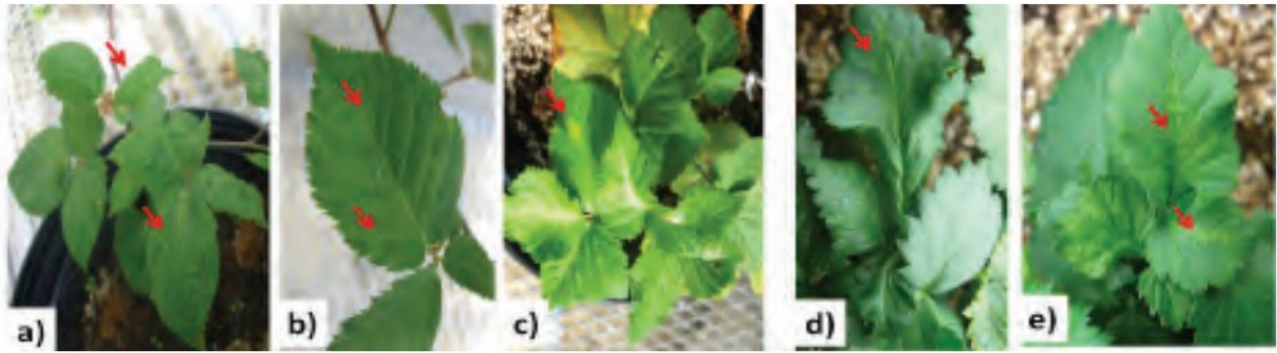


Рис. 1.14 - симптоми BLMaV на рослинах ожини. Стрілочками вказано на характерну жовту плямистість (Hassan 2012).

Було виявлено 5 геномних сегментів, 4 з яких є стандартними для всіх емаравірусів, а P5 є ортологом різних інших геномних сегментів деяких емаравірусів EMARaV p4, FMV p6, PPSMV2 p6, RRV p6, and RYRSaV p5. Поширюється вірус поки що не охарактеризованим еριοфідним кліщем (Hassan 2017). Окрім, BLMaV що зустрічався у приблизно половині відібраних рослин, також схожі симптоми викликаються іншими вірусами, такими як Blackberry yellow vein-associated virus (BYVaV), Blackberry virus Y (BVY), Blackberry chlorotic ringspot virus (BCRV), Blackberry virus E (BVE) і можуть зустрічатись у змішаній інфекції (Martin 2003). Ізоляти мають досить високу ідентичність, нуклеотидні послідовності гену білку нуклеокапсиду мали 95–100% ідентичності між собою. Кодони піддаються негативному відбору, як і очікувалось для функціональних генів, про що свідчить переважання синонімічних заміщень над несинонімічними. Також послідовності деяких ізолятів містять свідчення рекомбінаційних подій у минулому (Hassan 2019).

### 1.3.6 Вірус, пов'язаний із хлоротичною плямистістю листя груші (PCLSaV)

Pear chlorotic leaf spot-associated virus (PCLSaV) вперше було ідентифіковано у Китаї в рослинах груші азійської (*Pyrus pyrifolia*) із

симптомами дрібної хлоротичної плямистості, кільцевої плямистості, некрозами, знебарвлення жилок і деформацією листків (рис.1.15) за допомогою методу високопродуктивного секвенування (high-throughput sequencing, HTS) (Liu 2020).



Рис.1.15 — симптоми PCLSaV на рослинах груші азійської (Liu 2020).

Було виявлено 5 геномних сегментів. Що мали комплементарні консервативні кінці: (5'-GGAACACACUACU-3') на 3' кінці і (5'-AGUAGUGUUCUCC-3') на 5' кінці. 4 сегменти є стандартними для всіх емаравірусів, а РНК5 має невелику ідентичність (22,9%) із РНК7 HPWMoV, але його функція незрозуміла. TEM показала присутність сферичних вірусоподібних частинок розміром 80-100нм (рис 1.16).

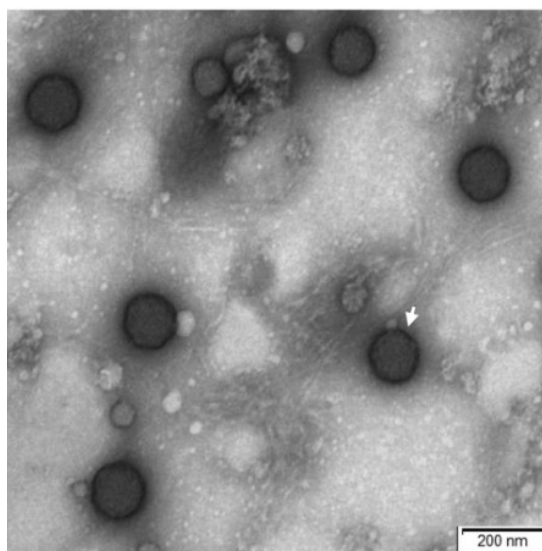


Рис.1.16 — ультраструктурний аналіз соку з уражених PCLSaV рослин із застосуванням TEM (Liu 2020). Стрілочкою вказана вірусоподібна частинка.

Окрім рослин груші азійської, подібні симптоми спостерігались на рослинах груші звичайної (*Pyrus communis*), що розповсюджена в помірних регіонах Європи, Північної Америки і Австралії. Скоріше за все розповсюджується галовим кліщем *Eriophyes chibaensis*. Також цей вірус детектовано у Японії (Kubota 2021).

Отже, представники роду *Emaravirus* є організмами з незвичними для вірусів рослин характеристиками: сегментованим геномом, що складається з 4-8 “-”РНК та віріонами сферичної або плеоморфної форми з оболонкою. Ці віруси передаються за допомогою еριοфідних кліщів, прищеплюванням та механічно, в той час як насіннева передача є досить обмеженою. Емаравіруси розповсюджені по всьому світу та уражують різноманітні рослини, більшість з яких мають економічну цінність. Внаслідок цього емаравіруси стали об’єктами дослідження для багатьох вчених в усьому світі. В Україні досі не вивчались емаравіруси. Саме тому для цієї роботи були обрані емаравіруси, чії рослини-хазяї мають широке розповсюдження в Україні та посідають важливе місце в українському сільському господарстві та садівництві.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ, ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Матеріали, обладнання і об'єкти, що застосовувались у роботі

Для приготування буферних розчинів застосовувались  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  NaOH, PVP, NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , KCl. Для розведення реактивів застосовувалась вільна від РНКаз вода (Thermo Scientific, Литва). Дистильована вода для приготування буферних розчинів отримувалась за допомогою електричного аквадистилятора ДЕ-10М (Заповіт, Україна). Зважування проводилось на електронних вагах ТВЕ-0.15-0.001-а (Техноваги, Україна), нагрівання проводились на водяній бані ДК-98-ПА (Huanghua Faithful Instrument Co., Ltd, Китай). Перевірка рН розчинів проводилась за допомогою рН-метра рН-150МИ з електродами ЕСК-10603 (ООО“Вимірювальна техніка”) Центрифугування проводилось на міні-центрифузі СМ50 (ELMI, Латвія). Для ЗТ-ПЛР використовувались термоциклери TC-412 Thermal Cycler (США) та MJ Research PTC 150 Thermal Cycler (США). Електрофорез проводився за допомогою лабораторного джерела живлення PowerPac 200 (Bio Rad, США). Відмивка під час ІФА проводилась за допомогою відмивача S 411 (VEB MLW PRUFGERATE-WERK Medingen/sitz freital, ГДР). Дозатори одноканальні різного об'єму (LabMate, Польща) застосовувались для відбору рідин, а для роботи з твердими матеріалами використовувались ножиці, скальпелі, пінцети, ступки та пестлі. Вимірювання великих об'ємів рідин (20 - 1000 мл) відбувалось за допомогою мірних циліндрів. Готові буферні розчини зберігались у скляних колбах в холодильнику за  $+4^\circ\text{C}$ , або за кімнатної температури, в залежності від розчину. Також використовувались різноманітні видатні матеріали: вата, стерильні наконечники, мікропробірки об'ємів 0,6-2 мл.

Об'єктами дослідження біли віруси роду *Emaravirus*: HPWMoV, RLbV, RRV, BLMaV, PCLSaV та EMARaV. Досліджувалось їх поширеність в Україні та інші властивості. Для аналізу біоінформатичними методами досліджень використовувались фрагменти послідовностей українських ізолятів цих вірусів.

## **2.2 Методи досліджень**

### **2.2.1 Візуальна діагностика**

Зразки для проведених досліджень являли собою листки, що були відібрані із рослин різних видів горобини, яблуні, груші, троянд, малини, ожини, пшениці та кукурудзи, що мали вірусоподібні симптоми, а саме кільцеву плямистість, хлорози на листовій пластинці для горобини; хлорозами, енаціями, галовими наростами для груші та яблуні, хлорози та енації для ожини та малини; деформація пагонів та почервоніння для троянд, смугаста мозаїка, плямистість та покручення листків для злакових. Листки зберігались у паперових конвертах до декількох діб за температури +4°C, а виділена з них тотальна РНК зберігались у холодильнику за -20°C. Також були відібрані гілки горобини та груші довжиною близько 30 сантиметрів з дерев, що знаходились у стані спокою, але під час вегетації мало ознаки вірусної інфекції. Ці гілки витримувались за кімнатної температури протягом 3 тижнів при сонячному освітленні у вазі з водопровідною водою, до появи на них листків із вірусоподібними симптомами. На відміну від оригінальної методики (Kallinen 2009), освітлення було природним, а не штучним.

## **2.2.2 Трансмійна електронна мїроскопїя**

Для дїагностики емаравїрусних часток застосували електронну мїроскопїю. Насамперед, були приготовленї плївки-пїдкладинки. Для цього знежирене (за допомогою етилового спирту) скло витримувалося у 0,1% розчинї формвару 10 секунд, пїсля того, як розчинник випарився з поверхнї скла, плївку було вїдрїзано і вїдшаровано вїд скла на поверхню води. За цим на плївку було помїщено мїдну сїточку (AGAR SCIENTIFIC, United Kingdom). Виготовлену сїточку з плївкою-пїдкладинкою було помїщено на поверхню краплини первинно очищеного гомогенату зразкїв на 2 хвилини. Очищення проводилася центрифугуванням протягом 20 хвилин, за 3500 обертїв на хвилину. Потїм поверхню плївки було промито на поверхнї краплинах фосфатного буфера і дистильованої протягом 2 хвилин. Контрастування проводилося на краплинї уранїл ацетату протягом 2 хвилин. Також замість первинно-очищеного гомогенату використовувався сїк рослини, що безпосередньо вносився в розчин з жилки листкової пластинки.

## **2.2.3. Видїлення тотальної РНК**

Видїлення тотальної РНК здїйснювалося за допомогою наборїв для видїлення нуклеїнових кислот Thermo scientific genomic DNA, Thermo scientific plant RNA purification kit (США) та Ambition purelink RNA mini kit (США). В обох випадках для початку було гомогенїзувано листковї пластинки з вїрусоподїбними симптомами в ступцї товкачиком з додаванням лїзуючого буфера, або ж гомогенїзувано з додаванням рїдкого нїтрогену в ступцї товкачиком або пробїрцї тїлом кочення пїдшипника, без додавання буфера. Якщо лїзуючий буфер не додавався пїд час гомогенїзацїї, тодї пїсля гомогенїзацїї було змїшано зразок в лїзуючому буферї (400 мкл буфера на 1-2

лишкові пластинки загальною масою близька 100 мг) та проводилась його інкубація 7 хвилин за 65 °С. Після цього додавалось 600 мкл хлороформу, обережно збовтувалось, центрифугувалось 2 хвилини за 10 тисяч обертів на хвилину. Отриманий надосад переносився в чисту пробірку, до якої додавалось 720 мкл чистої від РНКаз води та 80 мкл преципітаційного буферу, центрифугувалось 2 хвилини за 10 тисяч обертів на хвилину. Отриманий надосад зливався, до пробірки додавалось 100 мкл NaCl, збовтувалось, додавалось 300 мкл холодного етанолу та ставилось на інкубацію на добу за 4 °С, але метод допускав можливість обминання цього етапу, тому інколи виділена тотальна РНК не витримувалась добу, а одразу застосовувалась до іншого етапу — ЗТ-ПЛР. В іншому разі наступного дня зливався етанол, додавалось по 50 мкл деіонізованої води, вільної від РНКаз. Для двох інших наборів виділення також проводилось за інструкціями виробників: в першому випадку (Thermo scientific plant RNA purification kit) гомогенізований матеріал змішувався із 500 мкл лізуючого буферу, інкубувався 3 хвилини на водяній бані за температури 56°С, центрифугувався 5-10 хвилин при 8-10 тисяч обертів за хвилину. Отриманий надосад переносився та змішувався з 96% етиловим спиртом за допомогою піпетування. Суміш переносилась в колонку і центрифугувалась 1 хвилину. Після цього додавались 700 мкл відмивочного буферу 1, центрифугувалось. Після центрифугування додавалось 500 мкл відмивочного буферу 2 і знову центрифугувалось. Цей крок повторювали двічі. Потім йшло додаткове центрифугування з метою просушки мембрани колонки. Після кожного етапу із центрифугуванням вміст мікропробірки спустошувался. Для елюції використовувались 50 мкл води без рибонуклеаз.

В другому випадку, гомогенізувались листкові пластинки в рідкому нітрогені, після додавання 500 мкл ТЕ буфера, проводилось центрифугування 1 хв. за 8 тисяч обертів на хвилину. До відібраного надосаду додавалось 20 мкл 2-меркаптоетанолу і лізуючий буфер, після чого знову проводилось центрифугування 3 хвилини за 11 тисяч обертів на хв., відбиралось 500 мкл

середньої фракції, додавалось до неї 500 мкл етанолу. Після цього відбиралось 700 мкл зразку, що переносився в колонку, центрифугувався 2 хвилини за 11 тисяч обертів на хв., утворений осад зливався – тотальна РНК мала залишитись на мембрані колонки. В колонку додавався Wash Buffer 1, проводилось центрифугування 1 хвилину за 1 тисячу обертів на хв., і те, що проходило крізь колонку зливалось знову, додавалось 700 мкл Wash Buffer 2, проводилось центрифугування 1 хвилину за 1 тисячу обертів на хв., за необхідності попередня дія повторювалась знову. Після цього пуста колонка центрифугувалась 1 хвилину за режиму в 1 тисячу обертів на хв., додавалось 40 мкл вільної від РНКаз води. Отримана тотальна РНК зберігалась у холодильнику за -20 °С.

#### **2.2.4. ЗТ-ПЛР**

Полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією ставилась як в один крок, із використанням набору Qiagen one step RT-PCR Kit (Qiagen, Німеччина) так і у два кроки, при чому синтез ДНК на вірусній РНК відбувався із застосуванням відповідних специфічних (до вірусних послідовностей), для синтезу повних ДНК відповідників геномних сегментів використовувався праймер, специфічний до кінців емаравірусних сегментів ( n mielke, hp muelbach, 2007), а для синтезу ДНК колекцій застосовувалися рандомні гексамерні праймери (Thermo Scientific™ Random Hexamer Primer). В останньому випадку для першої реакції, зворотної транскрипції, використовувався набір Thermo Scientific™ RevertAid RT Reverse Transcription Kit, а для другої, ланцюгової полімеразної, використовувався набір DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific, Литва). Набори використовувались за інструкціями виробника. Температурні режими та тривалість кроків реакцій залежали від використовуваних праймерів. Загальна схема реакцій ЗТ-ПЛР зображена на таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Режими проведення ПЛР і ЗТ-ПЛР

ПЛР		One-step ЗТ-ПЛР			
Температура, °C	час	Температура, °C	час		
-	-	50	30 хв.		
95	3 хв.	95	15 хв.		
95	30 с.	30-35 циклів	94	30 с.	35 циклів
42 - 62	30 с.		42 - 62	30 с.	
72	30 - 60 с.		72	30 - 60 с.	
72	5 - 10 хв.	72	5 - 10 хв.		

Для детекції EMARaV використовувано праймери до двох з чотирьох РНК, оскільки віруси з фрагментованим геномом схильні до реасортації, і для ефективної діагностики слід використовувати праймери до більш ніж одного фрагменту (Oliver 2016). Було застосовано праймери до гену білку нуклеокапсиду NC30F(5'-TCAACAACCTCTTTTAAGCACATCA-3') і NC1190R (5'-TCGACTATGCTGGTCTTGGA-3'), з очікуваним розміром продукту 1100 пн (Kallinen 2009) та гену білку руху p4-245f (5'-STATTGGTGGAATCCAGGATGTT)/ p4r (5'-TCATTCCATTTGGTCTGATGAT-3') з очікуваним розміром продукту 433 пн та p4f (5'-ATGGAGTCCAACAAGATGAAG-3')/p4-375r (5'-ACATATTCTTCTCCATAAATAAGG-3') з очікуваним розміром продукту 397 пн (Roßbach 2015). Перша пара праймерів обмежує з обох сторін кодуєчу частину сегменту РНК3, а також, частково, його некодуєчі ділянки, що знаходяться безпосередньо біля кодуєчої частини. В другому випадку використовувались

дві пари праймерів, що перекриваються. Оскільки для секвенування за Сенгером, що необхідне для визначення послідовностей фрагментів послідовностей геномної НК українських ізолятів, небажано використовувати послідовності довші за 500пн, комбінація двох пар праймерів дозволяє отримати два продукти, разом складені послідовності яких становлять повну кодуєчу частину сегменту РНК4. Таким чином можливо використовувати ці праймери як у діагностичних цілях, так і для накопичення продуктів для подальшого секвенування.

Для детекції RRV використовувалась пара праймерів (RRV For 5'-TGAAGCTGCTCCTTGATTTCCAGGGACCTA-3' і RRV Rev 5'-AAGCACATCCAACAСТCTTGCAGCCGATAC-3'), що гібридизується із РНК3 цього вірусу і обмежує фрагмент довжиною 319пн з 3' краю кодуєчої частини. Відомо, що ці праймери застосовуються для діагностики RRV у США (Babu 2017).

Виявлення та накопичення продуктів ПЛР для НРWMoV виконувалось із використанням пари праймерів НРV-F1(5'-ТТТATGGCTCTTTGTATTGG-3') і НРV-R1 (5'-TATGTTTCCCCTCTTTGTG-3') до фрагменту довжиною 339пн кодуєчої частини сегменту РНК3 (Lebas 2005). Ці праймери часто використовуються для діагностики НРWMoV у інших країнах, а також у наукових цілях, завдяки чому при проведенні порівняння послідовностей можна знайти багато ізолятів з інших країн, що і було однією з причин обрання цієї пари праймерів до використання у роботі. Також застосовувалась пара праймерів для частини сегменту РНК6 WMoV-RR (5'-GCGATGGCTGGCACATAGTT-3') і WmoV-F1 (5'-TCCCAACTTAAAAACACAAGCCAT-3') (Abdullahi 2020).

RLBV визначався за допомогою пари праймерів 1287 (T13-5) (5'-ATCCAGTAGTGAАСТCC-3') і 1095 (5'-CACCATCAGGAАСТTGTAATGTTT-3') (Lu 2015, Waizan-Edge 2019), при чому перший праймер є специфічним до кінцевих комплементарних послідовностей всіх сегментів всіх видів роду.

Таким чином ця пара праймерів обмежує повний 5' некодуєчий і частину кодуєчого фрагменту сегменту РНК3. Ця пара праймерів також часто використовується в інших країнах.

Діагностика PCLSaV виконувалась за допомогою пари праймерів 3-F (5'-CTGCTCATACACAACAGTGGCAT-3') і 3-R (5'-TCCATTTTAAGCCTAGTCAGTTGC-3') до фрагменту довжиною 724 пн кодуєчої частини сегменту РНК3 (Liu 2020).

Визначення BLMaV відбувалось із застосуванням пари праймерів P3-For358 (5'-TACAGTTGCATCTTACCTTTTCG-3') і P3-Rev706 (5'-GAATTCATACCCAGGAACAATC-3'), до фрагменту довжиною 349 пн кодуєчої частини сегменту РНК3 (Hassan 2017).

Оскільки останні 2 емаравіруси були знайдені відносно нещодавно, досі в базі даних доступні лише ті послідовності, що були завантажені першовідкривачами PCLSaV і BLMaV. Це повні послідовності кодуєчих частин цих вірусів, або повні послідовності сегментів ізолятів, що були отримані під час перших робіт. Узагальнений список праймерів, що використовувались у роботі наведено на Таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 — Список праймерів, що використовувались у роботі

Вірус	Сегмент	Назва	Послідовність	Продукт , пн		Джерело
EMARaV	РНК3	NC30F	TCAACAACCTCTTTAAGCACATCA	1100		Kallinen 2008.
		NC1190R	TCGACTATGCTGGTCTTGGA			
	РНК4	p4-245f	СТАТТGGTGAATCCAGGATGTT	453	697	Roßbach 2015
		p4r	ТСАТТССАТТТGGTCTGATGAT			
		p4-375r	АСАТАТТСТТСТССАТАААТААGG	397		
	p4f	АТGGAGTCCAACAAGATGAAG				
RRV	РНК3	RRV For	TGAAGCTGCTCCTTGATTTCCAGGGACCT A	319		Laney 2011

		RRV Rev	AAGCACATCCAACACTCTTGCAGCCGATAC		
HPWMoV	PHK3	HPV-F1	TTTATGGCTCTTTGTATTGG	339	Lebas, 2005
		HPV-R1	TATGTTTCCCCTCTTTGTG		
	PHK6	WMoV-RR	GCGATGGCTGGCACATAGTT	418	Abdullah i 2020
		WmoV-F1	TCCCAACTTAAAAACACAAGCCAT		
RLBV	PHK3	1287 (T13-5)	ATCCAGTAGTGA ACTCC	508	McGavin 2012
		1095	CACCATCAGGAACTTGTAATGTTT		
PCLSaV	PHK3	3-F	CTGCTCATA CACAACAGTGGCAT	724	Liu 2020
		3-R	TCCATTTTAAGCCTAGTCAGTTGC		
BLMaV	PHK3	P3-For358	TACAGTTGCATCTTACCTTTCG	349	Hassan 2017
		P3-Rev706	GAATTCATACCCAGGAACAATC		

В першому випадку спочатку готувалась суміш: 5мкл 5x буферу, 1 мкл dNTP, 5 мкл Q, 1 мкл ферменту, 8 мкл деіонізованої води, по 1 мкл праймерів, 3 мкл тотальної РНК зразку. Зверху наносилась одна краплина мінеральної олії у випадках, коли використовувався ПЛР-ампліфікатор, що не має підігріву кришки. В інших випадках мінеральна олія не наносилась.

У другому випадку спочатку синтезувалась кодуєча ДНК (кДНК): суміш 1 мкл кожного з праймерів, 8,25 мкл води, 2 мкл РНК тримали 5 хв. за 65 °С, після чого негайно переносили на кригу до охолодження, потім додавалось 4 мкл п'ятикратного буферу, 2 мкл dNTP, 1 мкл транскриптази, 0,25 мкл інгібітору R. Отримана суміш ампліфікувалась 60 хвилин за температури 42 °С. Після цього йшла звичайна ПЛР: змішувались 2 мкл кДНК, 12,5 мкл Мастер Міксу, по 1 мкл праймерів, 8,5 мкл води.

Для проведення ПЛР та ЗТ-ПЛР застосовувались ампліфікатори Techne TC-412 Thermal Cycler (США), що з підігрівом кришки та MJ Research PTC 150 Thermal Cycler (США), без підігріву.

### **2.2.5. Електрофорез НК в агарозному гелі**

Електрофорез виділеної тотальної РНК і ампліфікованої ДНК ми проводили в агарозному гелі, за режиму 120 В протягом 15-25 хвилин, провідником струму служив TBE буфер. Агарозний гель 1,5% (CSL-AG5, Cleaver Scientific, Великобританія) готувався із суміші 300 міліграм агарози та 20 мілілітрів TBE буфера. TBE буфер готувався із суміші 5,4 г Tris, 2,75 г борної кислоти, 0,372г EDTA та доводився до об'єму 500 мл дистильованою водою.

### **2.2.6. Імуноферментний аналіз**

Для виявлення антигенів HPWMoV було використано комерційну тест систему фірми Agdia (USA). Застосовуючи ІФА в модифікації DAS-ELISA виявляли антигени у відібраних зразках пшениці та кукурудзи. Тестування проводилось за інструкцією виробника:

1. В лунки плашки для ІФА вносились по 100 мкл заздалегідь розведених в карбонатному буфері первинних антитіл

2. Плашка з нанесеними первинними антитілами інкубувалась у холодильнику за 4°C протягом ночі.

3. На ранок вміст лунок зливався, після чого плашку три рази відмивали у PBST (1 М PBS+Tween) буфері на шейкері (S411, VEB MLW Prüfgeräte-Werk Medingen, ГДР).

4. В лунки плашки для ІФА вносились по 100 мкл зразків, гомогенізованих у буфері зразку (0,1 М PBS pH 7,4; 0,05% Tween20, 2% полівінілпіролідол, 0,2% овальбумін).

5. Плашка з нанесеними зразками інкубувалась у холодильнику за 4°C протягом ночі.

6. На ранок вміст лунок зливався, після чого плашку три рази відмивали у PBST буфері, а також один раз у 0,1 М PBS.

7. Після промивки додавались кон'юговані з лужною фосфатазою противірусні антитіла, розведені (1:200) в суміші альбумінової сироватки з промивочним буфером

8. Плашка з нанесеними противірусними антитілами інкубувалась 1 годину за кімнатної температури в темному місці.

Детекція WSMV проводилась подібним чином за допомогою тест-системи (Loewe Biochemica GmbH, Німеччина) за вказівками виробника.

Результати, у вигляді зміни флуоресценції, були зчитані за допомогою «рідера» Thermo Labsystems Opsys MR (Thermo Fisher Scientific, США) за довжини хвилі 405 нм. При роботі з “рідером” застосовувалась програма Dynex Revelation Quicklink (Dynex Technologies Inc, США).

### **2.2.7. Виділення та очистка ДНК з гелю**

Виділення продуктів ампліфікації із агарозного гелю здійснювалось використовуючи набір Qiagen QLAquick Gel extraction kit (Німеччина) та Thermo Scientific™ та GeneJET Gel Extraction Kit (Литва).

Для першого варіанту все починалось з того, що ампліфіковані зразки відповідної молекулярної маси вирізались з агарозного гелю, переміщувались до центрифужних мікропробірок, зважувались, розраховувалась маса буферу QG, що мала складати три маси гелю, після чого цей буфер додався до гелю. Отримана суміш інкубувалась 3 хвилини за температури +50...+60 °С, до набуття розчином жовтого кольору. Потім колонка переміщувалась в збірну центрифужну мікропробірку та центрифугувалась 1 хвилину за 11 g. Після цього прибралось те, що пройшло крізь мембрану, додалось 500 мкл QG, центрифугувалось 1 хвилину за 11 g, після цього прибралось те, що пройшло крізь мембрану, додалось 750 мкл PE, центрифугувалось 1 хвилину за 11 g, а

через 2 хвилини центрифугувалось 1 хвилину за 11 g, ще раз для просушування мембрани. Потім додавалось на мембрану 50 мкл води, центрифугувалось 1 хвилину за 11 g. Під час виділення умисно пропускався етап додавання ізопропанолу, оскільки виявилась неефективність цього кроку в нашій роботі.

Під час використання другого набору (GeneJET Gel Extraction Kit, Литва). виділення проводилось наступним чином:

1. 100 мг зразку перетиралось в рідкому нітрогені.
2. Отриманий порошок змішувався із 500 мкл лізуючого буферу. Та інкубувався за температури 56°C протягом трьох хвилин, після чого проводилось центрифугування протягом 5 хвилин за близько 8000 обертів за хвилину.
3. Надосад переносився до чистої мікропробірки, де до нього додавався 96% етанол (250 мкл). Вміст перемішувався за допомогою піпетування.
4. Суміш переносилась у колонку, що було завчасно встановлено у відповідну пробірку і центрифугувалась протягом 1-2 хвилин за 8000-10000 обертів за хвилину. РНК на цьому етапі має закріпитись на мембрані колонки, тому вся рідка фаза, що пройшла крізь неї, зливалась.
5. До колонки додавалось 700 мкл попередньо розведеного 96% етанолом буферу відмивки 1. Після центрифугування рідина знову зливалась.
6. Потім додавалось 500 мкл попередньо розведеного 96% етанолом буферу відмивки 2. Проводилось центрифугування, злиття рідини. Цей крок проводився двічі.
7. Для просушування мембрани проводилось центрифугування колонки протягом 1-2 хвилин на максимальних обертах. Після цього колонку переносили у чисту мікропробірку.
8. На останньому етапі виділення, елюції, на мембрану наносилась краплина води (50 мкл) і колонка центрифугувалась. Виділена та очищена тотальна РНК разом із водою відбиралась для подальшої роботи.

Якість отриманої тотальної РНК визначалась за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

### **2.2.8. Секвенування кДНК**

Отримані амплікони, одержані в результаті постановки полімеразної ланцюгової реакції та очищені, надалі повинні бути секвеновані з метою порівняння нуклеотидних послідовностей українських ізолятів з відомими ізолятами та проведення філогенетичного аналізу. Продукти ампліфікації очищали за допомогою Qiagen QLAquick Gel extraction kit та Thermo Scientific™ та GeneJET Gel Extraction Kit, що було описано вище. Секвенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з використанням Big Dye terminators, version 3.1.

### **2.2.9. Порівняння подібності послідовностей та філогенетичний аналіз**

Використовуючи програму BLAST, в міжнародних базах даних було знайдено подібні до секвенованих послідовності, після чого за допомогою програми MEGA 7 (Kumar 2016) було додано та вирівняно між собою із застосуванням вбудованого алгоритму ClustalW знайдені послідовності та послідовності українських ізолятів, що були отримані в ході роботи. За цим послідовності було обрізано, а з отриманих даних згенеровано філогенетичне дерево за методом Maximum Likelihood. Для кожного аналізу за допомогою MEGA 7 було підібрано найбільш оптимальні моделі. Статистична підтримка забезпечувалась бутстрепінгом, із проведенням 500 раундів.

Також за допомогою програми MEGA 7 було перевірено переважання синонімічних заміщень над несинонімічними. Для цього було використано Codon-based Z-Test of Selection із наступними параметрами:

- Model/Method - Nei-Gojobori method (Proportion),

- Test Hypothesis (H<sub>A</sub>: alternative) - Purifying selection (H<sub>A</sub>: dN < dS),
- Score - Overall Average для перегляду загального результату, або
- Score - In Sequence Pairs для попарного порівняння,
- Gaps/Missing Data Treatment - Pairwise Deletion.

Отримані дані було оброблено за допомогою пакету програм LibreOffice Calc для більш зручного відображення інформації у вигляді теплової матриці. Гіпотеза (що синонімічні заміщення переважають над несинонімічними) вважалась вірною за  $p < 0.05$ . Під час перевірки на відбір при аналізі використовувались лише кодуючі частини послідовностей. (Nei 1986).

Проведення філогенетичних досліджень із застосуванням пакету програм BEAST, BEAUti, TreeAnnotator (Suchard 2018) дозволило розрахувати філогенетичні відносини між ізолятами беручи до уваги час відбору зразків. Перед роботою, файли розширення .nex та .fas було експортовано засобами пакету програм MEGA7. Використовуючи програму BEAUti, отримані файли було застосовано для генерації XML файлів за наступними параметрами:

- Tips:
  - Parse Dates: Defined just by its order
  - Order: first Parse as a number,
- Sites:
  - site heterogeneity model: gamma,
  - partition into codon position: 3 partitions: codon positions 1, 2 & 3 ,
- MCMC:
  - Length of chain: 1000000,
  - echo state to screen every: 100,
  - log parameters every: 100

Обрані параметри були змінені щоб краще пасувати для аналізу саме вірусних послідовностей. Всі інші параметри було залишено за замовчуванням. Файли з розширенням .trees було згенеровано за допомогою програми BEAST. Отримані

дерева анотувались за допомогою програми TreeAnnotator, в результаті чого отримувались файли з розширенням .tre. Отримані дерева конструювались за допомогою програми FigTree. [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> ]

Також у програмі MEGA 7 було розраховано попарні відстані між знайденою нами та тими, що вже були у базі амінокислотними та нуклеотидними послідовностями. Отримані значення були перераховані у відсотковому співвідношенні та представлені у графічному варіанті за допомогою програми Excel 2016.

Аналіз і візуалізація попарної ідентичності та графіки відсоткової попарної ідентичності послідовностей первинної структури послідовностей фрагментів РНК3 українських ізолятів емаравірусів та відповідних ділянок послідовностей ізолятів з інших країн відбувався за допомогою інструментів пакету програмного забезпечення SDTv1.2 (Muhire 2014).

Виявлення рекомбінаційних подій відбувалось за допомогою пакету програм RDP4 (Martin 2015). Для цього використовувались методи RDP, GENECONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA, SISCAN, LARD, 3SEQ, Distance Plot і TOPAL. Пошук рекомбінаційних подій проходив із застосуванням налаштувань за замовчуванням.

#### **2.2.10. Оптична мікроскопія препаратів листків рослин**

Для пошуку та доведення присутності на симптоматичних рослинах ериофідних кліщів було застосовано оптичну мікроскопію. Препарати готувались наступними двома способами:

1. епідерма абаксіальної сторони листка зчісувалась за допомогою голки чи скальпелю, а галові утворення (за наявності) руйнувались, після чого поверхня листка омивалась дистильованою водою або 96% етиловим спиртом над предметним скельцем (7105, Sail Brand, Китай), а утворена крапля вкривалась покривним скельцем ;

2. абаксіальна сторона листка вкривалась клейкою стрічкою, що потім відривалась та наклеювалась на предметне скло.

Отримані препарати роздивлялись під мікроскопом Mikrophot D 16 (Rathenower Optische Werke m.b.H, Ратенов, ГДР) за інструментальним збільшенням  $\times 390$  і  $\times 625$  для фотофіксації знайдених кліщів і за збільшення  $\times 98$  під час пошуку кліщів у препараті.

### **2.2.11 Статистична обробка даних**

Статистична обробка даних застосовувалась у роботі як для встановлення поширеності використовуючи ІФА для встановлення порогу світимості для позитивних і негативних результатів, так званий “Cut-off value” за формулою “Cut-off” = середнє значення негативних контролів + 3 стандартних відхилення., так і для еволюційних досліджень: встановлення дії відбору, філогенетичного аналізу за допомогою вбудованих програм пакету MEGA7 (Kumar 2016). В разі використання бутстреппінгу встановлювалось 1000 раундів.

### РОЗДІЛ 3

## ПЕРВИННИЙ СКРИНІНГ ЕМАРАВІРУСІВ ТА ЇХ ПЕРЕНОСНИКІВ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Відомо, що вірусні інфекції можуть проявлятися на рослинах у вигляді різноманітних симптомів: плямистості (в тому числі кільцева, мозаїчна, штрихувата), енацій, карликовості, стерильності, зміні забарвлення листків та стебел, порушенні жилкування листків та галуження пагону і т.д. Всі ці симптоми характерні для різних видів емаравірусів, та залежать від виду рослини-хазяя. Наприклад, вірусні хвороби злакових часто проявляються у вигляді штрихуватої і смугастої мозаїки, що пов'язано із паралельним жилкуванням листків цих рослин. Тому і не дивно, що ці симптоми супроводжують інфікування рослин пшениці, кукурудзи тощо емаравірусом HPWMoV. Крім перелічених ознак, вірус може пригнічувати розвиток рослин і викликати почервоніння листків кукурудзи. Щодо емаравірусів, що уражують представників родини *Rosaceae*, найбільшу загрозу для господарств становить емаравірус, який уражає троянди, RRV, що викликає почервоніння і деформацію стебел, збільшення числа шипів, карликовість, і, через недовгий час, близько року, призводить до загибелі рослини. RLBV і BLMaV, патогени малини і ожини відповідно, викликають симптоми деформації листкової пластинки, хлорози, пригнічення росту та зменшення об'єму і маси плодів, що призводить до зменшення врожайності цих рослин. Емаравірус, що може уражувати представників триби *Maleae*, таких як горобина, ірга, аронія, груша, яблуня, а також їх гібриди — EMARaV, викликає наступні симптоми: утворення кільцевої плямистості на листках, що, власне і дала назву цьому виду та роду вірусів, а також мозаїку. PCLSaV — емаравірус, що був відкритий відносно нещодавно, і, як відомо, здатен до ураження представників роду *Pyrus*, призводить до суворої деформації листків, знебарвлення листків та жилок, хлоротичної кільцевої

плямистості та жовтої мозаїки. Попри всі наведені варіанти прояву емаравірусної інфекції на різних рослинах-хазяях, також, за літературними джерелами, не рідкі випадки безсимптомної присутності вірусу у рослині.

Крім вірусних симптомів, також на рослинах можуть зустрічатись сліди годування, яйцекладіння, лялькування чи інших видів життєдіяльності тварин-переносників. Емаравіруси, як відомо з літературних даних, поширюються за допомогою еριοфідних кліщів (Mielke-Ehret 2012). А кліщі, в свою чергу, викликають на інфестованих рослинах утворення галових наростів на листях, або деформацію і пожовтіння листків (Alford 2012).

Часто симптоми хвороби можуть викликатись різними збудниками, в той час як один збудник може призводити до виникнення різних симптомів як на різних рослинах одного виду або різних видів, так і на одній рослині з плином часу. Таким чином хвороба Високих рівнин злакових пов'язана із кліщем *A. tosichella*, а також вірусами, які поширюються цим кліщем (HPWMoV, WSMV, TriMV), таким чином формуючи WCM комплекс (Navia 2013).

На рослинах малини із симптомами RLBD не завжди виявлявся вірус RLBV, оскільки дані симптоми скоріше пов'язані із життєдіяльністю кліща *P. gracilis* (Raunović 2020). Те саме можна сказати про прояв на рослинах горобини: специфічна кільцева плямистість також не завжди сигналізує про присутність вірусу EMARaV, і, скоріше за все, є фізіологічною реакцією на життєдіяльність кліща.

Отже, емаравіруси різних видів, разом із кліщами-переносниками, можуть викликати різноманітні симптоми на відповідних рослинах-хазяях, але в усіх випадках можливо співвідносити виявлений вірус із його візуальними проявами у вигляді вірусоподібних симптомів. Саме тому візуальна діагностика не може бути єдиним методом визначення етіології захворювання.

### 3.1 Скринінг рослин родин *Rosaceae* та *Poaceae* методами візуальної діагностики

Першим етапом роботи був відбір рослин родин *Rosaceae* та *Poaceae* із емаравірусоподібними симптомами, тобто із симптомами інфікування EMARaV, RLBV, HPWMoV, BLMaV, PCLSaV і RRV відповідних рослин.

Загалом, в результаті візуальної діагностики були відібрані листки рослин:

- груші з деформацією листкової пластинки, зміною забарвлення листя, галовими наростами;
- малини з симптомами RLBD: деформацією листків, хлорозами, що також пов'язані із ураженням рослини ериофідним кліщем;
- кукурудзи із штрихуватою мозаїкою, почервонінням листків та стебла, порученням листків, зниженим темпом росту;
- ожини з хлоротичною плямистістю та деформацією листків;
- троянд із зміною забарвлення (почервоніння стебел та листків), деформованими стеблами, надмірним ростом шипів;
- горобини із кільцевою плямистістю, хлорозами, галовими утвореннями;
- пшениці із мозаїкою, дрібною штрихуватою мозаїкою, зниженню темпів росту, покручення листків;
- яблуні із зміною забарвлення та деформацією листків та галовими наростами.

Скринінг симптоматичних рослин пшениці з різних регіонів України показав розбіжність у симптомах на рослинах різного віку (в залежності від фази росту), сорту, ураження HPWMoV в моноінфекції, або ж із змішаною інфекцією HPWMoV+WSMV.

Так, на рослинах пшениці сорту “Смуглянка” з моноінфекцією HPWMoV, що були відібрані у Дніпропетровській області в середині травня,

спостерігались як симптоми дрібної мозаїки, так і широкі хлоротичні смужки вздовж листків (рис.3.1 а).

На рослинах пшениці, що були відібрані наприкінці травня у Донецькій області, з моноінфекцією HPWMoV, спостерігалися як пожовтіння, так і дрібна мозаїка листків і стебел (рис. 3.1 б).

Рослини озимої пшениці сорту "Подольянка", що були відібрані в середині травня в Дніпропетровській області, що мали змішану інфекцію HPWMoV+WSMV, також мали симптоми дрібної штрихуватої мозаїки і хлоротичні плями (рис. 3.1 в).

Рослини озимої пшениці сорту "Донецька 48", що були відібрані в середині травня в Донецькій області, мали змішану інфекцію HPWMoV+WSMV, крім того, що мали симптоми дрібної штрихуватої мозаїки і хлоротичні плями, також мали пожовтіння кінчиків листків (рис. 3.1 г).

Зразки пшениці, відібраної у травні в Запорізькій області, що мали змішану інфекцію HPWMoV+WSMV, мали симптоми штрихуватої мозаїки, дрібної мозаїки і хлорози, а також покручення листків (рис. 3.1 д).

Рослини озимої пшениці сорту "Достаток", що були відібрані в середині червня в Харківській області, що мали змішану інфекцію HPWMoV+WSMV, мали яскраві симптоми дрібної штрихуватої мозаїки, а також пожовтіння і потемніння кінчиків листків (рис. 3.1 е).

Рослини озимої пшениці сорту "Скаген", що були відібрані на початку червня в Харківській області, що мали змішану інфекцію HPWMoV+WSMV, мали яскраві симптоми дрібної штрихуватої мозаїки, широкі смуги, а також некрози листків (рис. 3.1 ж).

Рослини озимої пшениці сорту "Подольянка", що були відібрані в середині листопада в Запорізькій області, що мали змішану інфекцію HPWMoV+WSMV, мали яскраві симптоми штрихуватої мозаїки і хлоротичні плями, почервоніння листків (рис. 3.1 з).

Для порівняння, рослини озимої пшениці, що були природно інфіковані на WSMV мали наступні симптоми: суворя смугаста мозаїка і пожовтіння листків пшениці, відібраної у кінці травня в Дніпропетровській області (рис.1 и), а також помірна мозаїка у рослин відібраних, на початку травня у Харківській області (рис. 3.1 к).

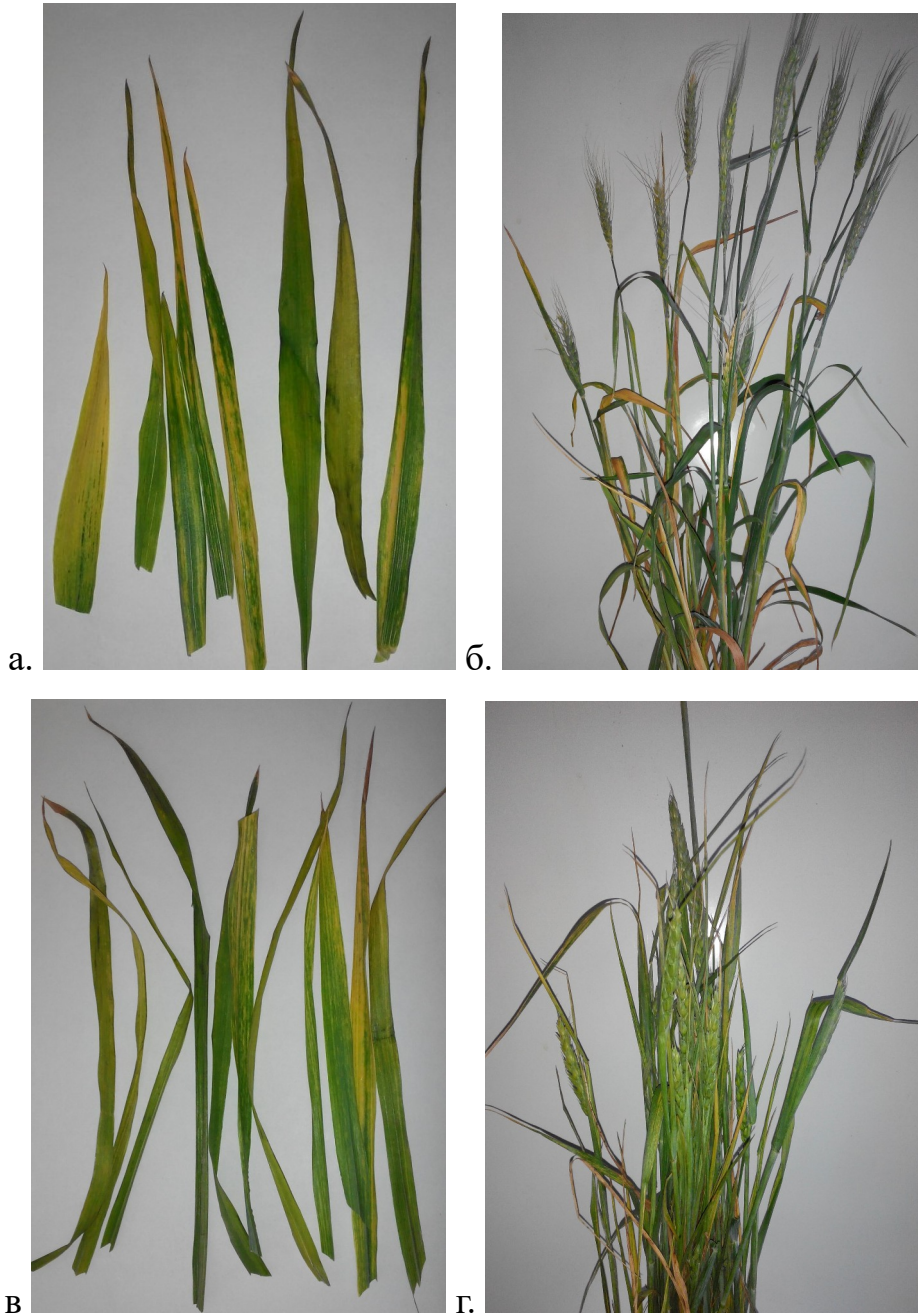




Рис. 3.1 — а-к — симптоми пшениці озимої, природньо-інфікованої NPWMoV та WSMV у сумісній і моноінфекціях. Пояснення в тексті.

Як видно з рисунку 3.1, симптоми, які спостерігаються, суворіші у рослин, що були відібрані пізніше. Так, рослини, що були відібрані на початку травня мали слабкі симптоми, в той час як рослини, що були відібрані наприкінці

травня або в червні, мали сильно виражені симптоми смугастої мозаїки. Також слід відмітити, що інфікування HPWMoV супроводжувалось появою широких жовтих смуг вздовж листків, а сумісна інфекція проявлялась у вигляді як класичних мозаїчних симптомів, так і аномальних, як, наприклад, некрози і почервоніння листків, що може бути пояснено як інфікування іншими патогенами, присутність яких не перевірялась, так і синергічною дією HPWMoV+WSMV.

При обстеженні кукурудзи були виявлені рослини із симптомами штрихуватої мозаїки, хлорозами, почервонінням листків. Симптоматичні рослини були відібрані з Вінницької, Харківської, Хмельницької, Київської областей. HPWMoV було виявлено на рослинах, що мали яскраво виражені хлоротичні плямистості на листках (рис. 3.2 а), в той час як на рослинах із симптомами смугастої мозаїки, деформації листків, почервоніннями та некрозами (рис. 3.2 б) цей вірус, в подальшому, не був детектований.



а.



б.



в.

Рис. 3.2 — Симптоматичні рослини кукурудзи, відібрані в ході скринінгу. а — симптоматична рослина кукурудзи, на якій було виявлено NRWMOV, б, в — рослини кукурудзи, із вірусоподібними симптомами на яких не було виявлено NRWMOV.

В ході візуального обстеження малини було відібрано рослини із симптомами деформації листків і хлорозами (рис. 3.3). Перелічені симптоми також викликаються асоційованим із RLBV ериофідним кліщем *Phyllocoptes gracilis*. Це може пояснити те, що лише в одному із зразків, що мали перелічені симптоми, було виявлено RLBV, в той час як на інших симптоматичних рослинах було виявлено кліща, але вірус не був детектований.



а.



б.

Рис. 3.3 — Симптоматичні рослини малини, що виявились позитивними (а) і негативними (б) на RLBV.

Серед відібраних в ході скринінгу рослин ожини в здебільшому спостерігались зразки із деформованими листками, хлоротичними плямами, мозаїкою (рис. 3.4). Тобто симптоми були досить подібними до тих, що спостерігались на малині.



Рис. 3.4 — Рослини ожини із симптомами дрібної хлоротичної плямистості (а) і хлорозами (б), що були відібрані в ході скринінгу і виявились негативними на BLMaV.

Рослини горобини відбирались за симптомами кільцевої плямистості, що є характерною ознакою ураження рослини EMARaV, некрозів, різноманітних хлорозів, а також наявністю галових наростів, що викликаються еριοфідними кліщами, що асоційовані з EMARaV (рис.3.5).

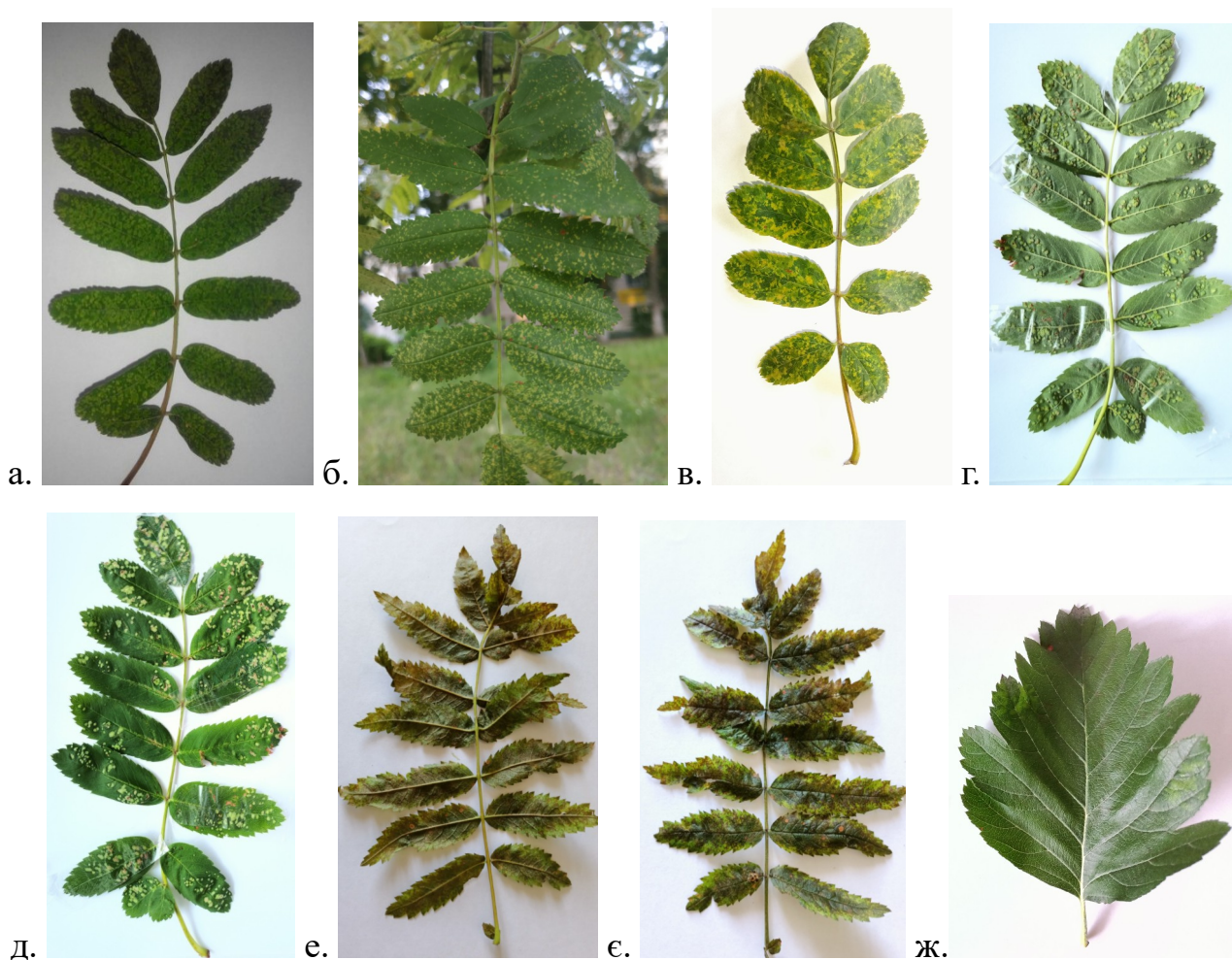


Рис. 3.5 — Листки горобини із симптомами кільцевої плямистості (а), дрібної плямистості (б), мозаїки (в), галових наростів (вид абаксіальної (г) та адаксіальної (д) сторін), із обширними хлорозами і некрозами (вид абаксіальної (е) та адаксіальної (є) сторін) та помірною мозаїкою (ж).

Також, із метою скринінгу на присутність EMARaV, були візуально відібрані зразки рослин ірги, та аронії; яблуні із симптомами хлоротичної плямистості, помірними некрозами, енаціями та галовими наростами, що викликаються еριοфідними кліщами, які потенційно можуть бути переносниками вірусу (рис. 3.6); груші із симптомами некрозів, хлорозів, почервоніння, енацієутворення та галовими наростами (рис. 3.7).



Рис. 3.6 — Листки яблуні із симптомами хлорозів, некрозів та енацій (вид абаксіальної (а) та адаксіальної (б) сторін), та із галовими наростами різного ступеню ураження (вид абаксіальної (в) та адаксіальної (г) сторін) .

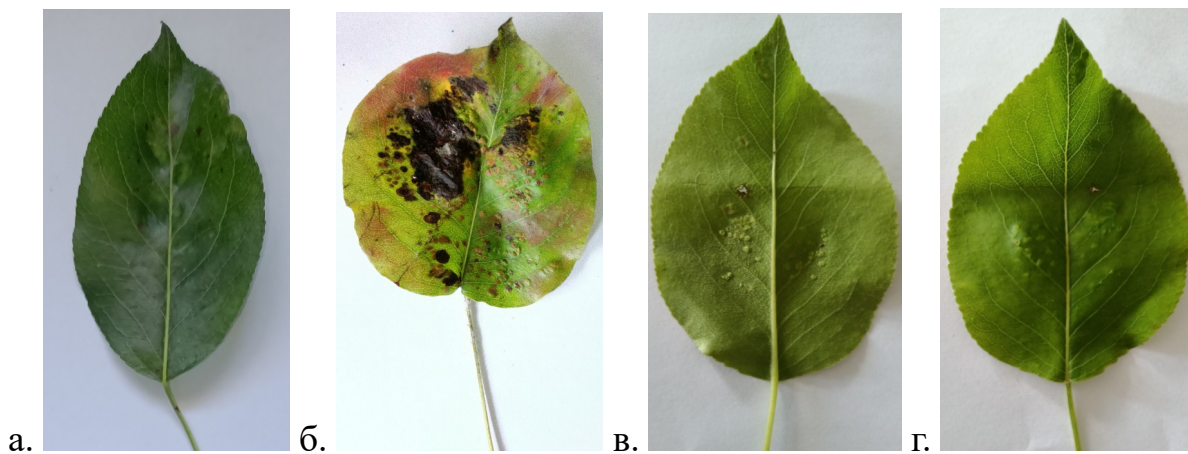




Рис. 3.7 — Листки груші із симптомами енацієутворення (а), хлорозів, некрозів, почервоніння та кліщової інфестації (б), помірне галоутворення навесні (вид абаксіальної (в) та адаксіальної (г) сторін), та із галовими наростами різного ступеню ураження восени (вид абаксіальної (д) та адаксіальної (е) сторін) .

Під час скринінгу відбирались зразки рослин троянд із надмірним почервонінням листків та стебел, деформацією листків та стебел, надмірним шипоутворенням, “відьминими мітлами”, що, за літературними даними (Laney 2011), є симптомами захворювання, що викликається RRV, а також хлоротичними плямами і некрозами, що є більш розповсюдженими симптомами вірусних захворювань рослин (рис. 3.8).



Рис. 3.8 — зразки троянд із симптомами почервоніння (а), дрібних хлорозів (б), енаціоутворення (в), некрозів (г).

Отже, в результаті скринінгу рослин горобини, груші, яблуні, ірги, аронії, троянд, малини, ожини, кукурудзи, пшениці та ін., було відібрано для подальшого дослідження рослини із характерними для вірусного захворювання симптомами, або ознаками інфестації еριοфідними кліщами.

### 3.2. Виявлення кліщів-потенційних переносників емаравірусів

Відомо, що різні віруси еволюційно виробили можливість поширюватись різними шляхами, в залежності від біологічних властивостей вірусу (виду хазяя, наявності переносників, пристосованості вірусу), фізико-хімічних властивостей вірусних частинок (наявність оболонки, поверхнева структура віріонів, морфологічні особливості), екологічних умов (щільність особин популяції хазяя, генетичного різноманіття хазяя, вірусу) тощо. Багато видів вірусів рослин розповсюджуються за допомогою інших організмів: симбіотичними рослинами (повитиця), нематодами, комахами (попелиці, трипси, білокрилки тощо), павукоподібними (кліщі). З літературних даних відомо, що емаравіруси передаються за допомогою еριοфідних кліщів. Це було показано для таких вірусів як, наприклад RLBV, HPWMoV (Rehanek 2022). Попри те, що передача кліщами не була доведена для всіх емаравірусів, вона є найбільш ймовірним варіантом розповсюдження цих вірусів, оскільки на інфікованих рослинах знаходять як симптоми кліщової інфекції, так і особин кліщів.

Саме тому, що емаравірусні інфекції пов'язують із кліщами, при проведенні візуальної діагностики відбирались рослини із симптомами інфекції еριοфідними кліщами: галовими наростами на листях горобини, груші, яблуні, аронії, ірги; покручення листя пшениці і кукурудзи; деформацією і почервонінням листків троянд; деформацією і жовтими плямами на листях малини, ожини. Для підтвердження присутності кліща у відібраних зразках було проведено їх дослідження із застосуванням світлової мікроскопії, результати якої представлені на рис. 3.9.



a.



б.



в.



г.



д.



е.



Рис. 3.9 — Кліщі, що були виявлені на відібраних зразках рослин пшениці (а), кукурудзи (б), малини (в, г), горобини (д), груші (е), яблуні (є) і троянди (ж) та можуть бути потенційними переносниками емаравірусів за допомогою оптичної мікроскопії. Інструментальне збільшення  $\times 390$  –  $\times 625$ .

Під час скринінгу були відібрані зразки рослин, що мали симптоми кліщової інфекції. Вони мали веретеноподібні прозорі тіла розмірами близько 100-200  $\mu$  в довжину та 50  $\mu$  в ширину, на передньому кінці тіла розміщені 2 пари кінцівок, щиток 50  $\mu$  у діаметрі та ротовий апарат, а на задньому кінці тіла мали присоску, тобто за морфологією вони були подібні до тих, що описуються у літературних джерелах як представники родини *Eriophyidae* (Nalepa 1898).

Таким чином, за допомогою світлової мікроскопії було показано присутність у зразках кліщів, що за морфологією були подібними до ериофідних кліщів-потенційних переносників емаравірусів. Подальші дослідження показали присутність емаравірусу HPWMoV у зразку пшениці, на якому також спостерігався кліщ (рис. 9 а), а також у зразку малини було виявлено RLbV, на якому, так само, також було виявлено кліща (рис. 9 в). З іншого боку, в нашому дослідженні, на багатьох зразках, де спостерігався кліщ, так і не було виявлено відповідних емаравірусів.

Отже, в результаті проведеної роботи було виявлено ериофідних кліщів, що є потенційними переносниками емаравірусів на рослинах пшениці, кукурудзи, малини, горобини, груші, троянди, яблуні.

### **3.3. Візуалізація емаравірусних часточок методом трансмісійної електронної мікроскопії**

Оскільки віруси є субмікроскопічними об'єктами, їх дослідження за допомогою оптичної мікроскопії є дуже обмеженим. Тільки віруси, що мають найбільші віріони (мімівіруси, поксвіруси) можуть бути детектовані із застосуванням оптичної мікроскопії. Але цитопатичний ефект, який віруси спричиняють під час розмноження в живих тканинах або культурах клітин можливо спостерігати і в оптичному діапазоні. Завдяки тому, що електрон має меншу довжину хвилі, ніж електромагнітне випромінювання оптичного діапазону, роздільна здатність сучасного електронного мікроскопу може бути менше 1 нм, в той час як для оптичного мікроскопу це параметр складає 200 нм. Використання трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) для детекції вірусних частинок бере початок ще з 30х років минулого сторіччя. На сьогодні розроблено багато різних видів електронної мікроскопії, такі як кріоелектронна мікроскопія, низьковольтна, сканувальна тощо, завдяки чому науковцям вдається досліджувати морфологічні властивості віріонів, життєвий цикл вірусів, вплив вірусу на тканинному та клітинному рівнях.

Для детекції емаравірусних частинок у відібраних зразках рослин було застосовано трансмісійну електронну мікроскопію неочищеного рослинного соку і надосаду гомогенізованих листків. З літературних даних відомо, що емаравіруси мають віріони з оболонкою, сферичної та плеоморфної форми, діаметром 80-120 нм. Крім представників роду *Emaravirus*, серед вірусів, що можуть інфікувати рослини, схожі віріони мають інші віруси порядку *Bunyavirales*, наприклад представники родини *Tospoviridae*, а також, хоч і

позбавлені оболонки, схожі віріони мають представники родин *Sedoreoviridae* (*Reovirales*) і *Caulimoviridae* (*Ortervirales*). В результаті ТЕМ було виявлено сферичні частинки розміром близька 100 нм у симптоматичних зразках рослин малини, пшениці і кукурудзи, що можуть належати емаравірусам (рис.3.10). Присутність віріонів представників перелічених вище родів мало ймовірна, порівняно із емаравірусами.

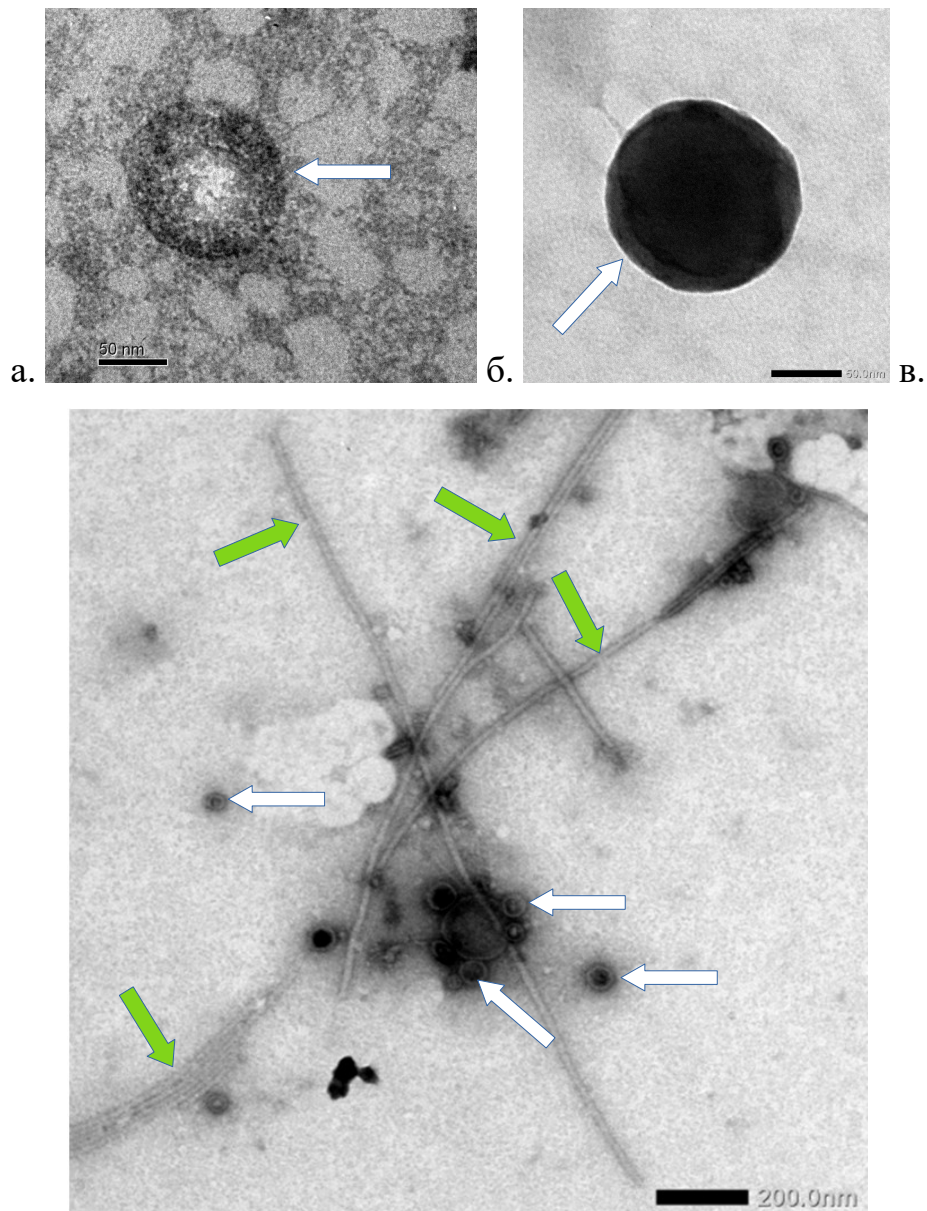


Рис. 3.10 — Зображення вірусоподібних частинок, отриманих при дослідженні соку рослин: А – малини, Б – кукурудзи, В – пшениці. Білими стрілками відзначені сферичні віріони, що можуть належати емаравірусам,

зеленими — нитковидні віріони WSMV. Інструментальне збільшення x10000-x50000.

Для підтвердження припущення щодо присутності емаравірусів у зразках надалі було проведено скринінг відібраних зразків із використанням серологічних та молекулярних методів дослідження.

Отже, в результаті проведеної первинної діагностики було відібрано рослини горобини, груші, яблуні, ірги, аронії, троянд, малини, ожини, кукурудзи, пшениці та інші, із симптомами вірусної інфекції та кліщової інфестації. За допомогою оптичної мікроскопії зразків перелічених рослин було виявлено колонії ериофідних кліщів, що можуть бути потенційними переносниками емаравірусів. За допомогою ТЕМ було виявлено сферичні частинки у зразках рослин малини, пшениці і кукурудзи, що можуть належати емаравірусам.

## РОЗДІЛ 4

### ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЕМАРАВІРУСІВ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Наступним етапом роботи був скринінг зразків рослин з емаравірусоподібними симптомами за допомогою ЗТ-ПЛР із використанням праймерів, специфічних до ділянок різних досліджуваних емаравірусів, послідовності яких були запозичені із літературних джерел, оскільки ПЛР є найбільш вживаним методом для діагностики емаравірусної інфекції. Для всіх відкритих емаравірусів вченими з різних країн світу запропоновано праймери для отримання майже повних послідовностей для кожного відомого сегменту для подальшого секвенування, а також пари праймерів для рутинної діагностики. Особливе місце займає розробка діагностичних систем для визначення найбільш небезпечних емаравірусів: RRV, HPWMoV, PPSMV.

Для проведення скринінгу використовувались згадані вище пари праймерів, що були опубліковані в профільних виданнях, до EMARaV, RLbV, HPWMoV, BLMaV, PCLSaV і RRV. Для тестування були обрані саме емаравіруси, що уражують рослини родин Розоцвіті та Злакові, оскільки вони широко розповсюджені в Україні та мають економічне значення.

#### **4.1. Молекулярна діагностика емаравірусів на території України**

Унікальність емаравірусів полягає у організації їх генетичного апарату, що представлені негативно-смісловою одноланцюговою сегментованою РНК. Внаслідок цього, для дослідження емаравірусів перед постановкою ПЛР необхідно проводити етап зворотної транскрипції, а також неможливо отримати довгі амплікони з послідовностями, щоб включали в себе декілька генів, оскільки кожен сегмент має свою одну окрему функцію. Тому для

біоінформатичних досліджень кількох послідовностей генів емаравірусів потрібно застосовувати декілька пар праймерів, або праймери для консервативних комплементарних кінців.

Складність у діагностиці емаравірусів у рослинах полягає у нерівномірному розподілі вірусу, оскільки в різних тканинах чи органах рослини накопичується різні кількості вірусу; нерівномірно розподілені в рослині і окремі сегменти геномної РНК; в рослинах часто спостерігається зниження титру вірусу. Багато з рослин-хазяїв емаравірусів містять речовини, що перешкоджають екстракції і очищенню тотальної РНК, що потрібна для тестування і подальших досліджень. Внаслідок цього зростає вірогідність отримання хибнонегативних результатів під час діагностики емаравірусних інфекцій.

Донедавна, поки не були широко вживані молекулярні методи дослідження, неможливо було виокремити емаравіруси, як окремих збудників хвороб рослин. Вірусна природа збудника розетковості троянд була показана лише у дев'яностих роках ХХ сторіччя, а сам вірус було охарактеризовано із застосуванням молекулярних методів майже двадцять років потому, а серологічні методи дослідження (ІФА, латерального потоку, імуносорбентної ЗТ-ПЛР) були розроблені десятиріччя потому. Насьогодні всі емаравіруси були відкриті саме завдяки сиквенуванню нового покоління або ЗТ-ПЛР із застосуванням вироджених праймерів. Саме тому і їх діагностика пов'язана із застосуванням молекулярних методів, такі як ЗТ-ПЛР, ЗТ-ПЛР у реальному часі тощо. Серологічні методи досліджень були розроблені лише для найбільш економічно важливих емаравірусів: існують стандартизовані та придатні для застосування у ІФА антитіла для детекції FMV, HPWMoV, RRV, PPSMV і EMARaV, а для HPWMoV також існує і комерційна Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA система, яку можна застосовувати для рутинної діагностики. Розробка нових серологічних інструментів для дослідження емаравірусів продовжується. Оскільки представники роду *Emaravirus* були відкриті

здебільшого нещодавно, для них поки нема швидких, дешевих і високочутливих методів для рутинної діагностики, але в найближчому часі ситуація має змінитись, оскільки часто емаравіруси є високо-шкодочинними патогенами економічно важливих культур, тому є нагальна необхідність у визначенні збудників захворювань як у хворих рослин, так і в тестуванні здорових рослин, що можуть мати латентну емаравірусну інфекцію, посівного матеріалу і саджанців.

Метод ПЛР полягає у використанні термостійкої полімерази для ампліфікації фрагменту нуклеотидної послідовності, що обмежена парою праймерів, які представляють собою короткі (10-25 пн) олігонуклеотиди, що компліментарно гібридизуються з кінцями обраної послідовності. Перевагами ПЛР є специфічність, швидкість, простота постановки, можливість подальшого дослідження отриманої у високій концентрації послідовності ДНК: для секвенування, рестрикційного аналізу. Сучасні методи ПЛР, такі як вкладена ПЛР і тач-даун ПЛР дозволяють покращити якість ПЛР, зменшивши утворення неспецифічних продуктів; асиметрична ПЛР, RACE та інвертована ПЛР застосовуються, коли необхідно ампліфікувати частково відому послідовність; геліказ-залежна ПЛР дозволяє проводити реакцію за постійної температури; ПЛР у реальному часі дозволяє кількісно оцінити присутність послідовності у зразку; мультиплексна ПЛР дозволяє проводити ампліфікацію декількох продуктів в одній пробірці.

Для дослідження емаравірусів застосовується ПЛР із зворотною транскрипцією, перший етап якої дозволяє отримати ДНК, комплементарну до геномної або інформаційної РНК вірусу. Для детекції емаравірусів розробляються окремі методи молекулярної діагностики, наприклад окрема модифікація Endpoint RT-PCR, що дозволяє проводити детекцію будь-яких емаравірусів, що присутні у зразку у концентрації до 100 фемтограмів на реакцію, або HRM аналіз, що у поєднанні зі звичайною ЗТ-ПЛР може бути

застосований для дослідження RRV (Dobhal 2016). Також очікуються нові модифікації quantitative thermophilic helicase dependent amplification (tHDA) і Loop-mediated amplification of DNA (LAMP), розроблені спеціально для діагностики цього емаравірусу (Salazar 2021).

У роботі використовувались пари праймерів до РНК3 до EMARaV, RLBV, HPWMoV, BLMaV, PCLSaV і RRV; РНК4 EMARaV, а також праймер до консервативних 5' і 3' кінців. Для реакції зворотної транскрипції використовувались як рандомні гексамери, так і пари специфічних праймерів, що застосовувались у наступних ПЛР.

В результаті проведеного скринінгу, під час якого було протестовано більше ніж 450 зразків рослин з родин Злакові і Розоцвіті, виявлено присутність на території України двох видів емаравірусів: RLBV на рослинах малини, що були відібрані у Київській області і HPWMoV на рослинах пшениці і кукурудзи, що були відібрані у центральних і східних регіонах України.

Для проведення ЗТ-ПЛР була виділена тотальна РНК зразків відібраних рослин (рис. 4.1). Незалежно від обраної методики, виділення тотальної РНК із зразків рослин-представників родини Розоцвіті вбувалось із більшими труднощами, аніж із Злакових: спостерігалась менша концентрація і наявність забруднення у виділеній РНК. Це пояснюється високим вмістом фенольних сполук у розоцвітих.

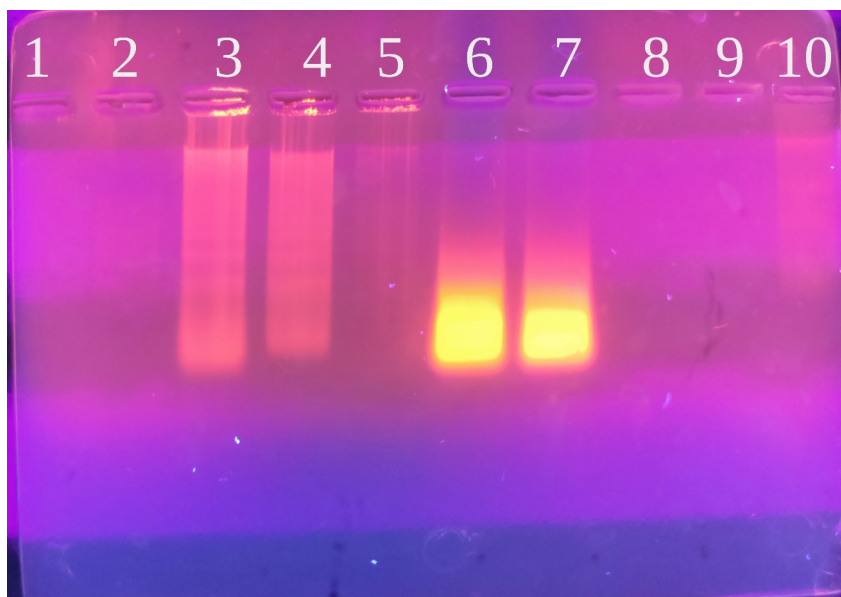


Рис. 4.1 — Результати виділення тотальної РНК з відібраних рослин, візуалізовані за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. 1, 2, 8-10 — треки, утворені тотальною РНК розоцвітих, 3-7 — треки, утворені тотальною РНК злакових.

Скринінг рослин горобини, груші, яблуни, аронії та ірги на присутність EMARaV проводився із використанням однієї пари праймерів до РНК3 NC30F: TCAACAACCTCTTTTAAGCACATCA і NC1190R: TCGACSTATGCTGGTCTTGGA, з очікуваним розміром продукту ПЛР 1100 пн, а також двох пар оверлаппінг праймерів до РНК4: p4f: ATGGAGTCCAACAAGATGAAG/p4-375r: ACATATTCTTCTCCATAAATAAGG; p4-245f: СТАТТGGTGAATCCAGGATGTT/p4r: TCATTCCATTTGGTCTGATGAT з очікуваними розмірами продуктів 375 пн і 433 пн відповідно. Здебільшого рослини обстежувались і відбирались із Києва та Київської області, а також із Черкаської, Чернігівської, Львівської та Хмельницької областей. В сукупності було відібрано близько 110 зразків цих рослин. В результаті скринінгу не було детектовано EMARaV у відібраних зразках симптоматичних рослин (рис. 4.2.). Це можна пояснити як відсутністю цього емаравірусу в урбоценозах України, в яких проводився скринінг, що є наслідком низької щільності популяції горобини

(що є основною рослиною-резервуаром EMARaV), оскільки північ нашої країни є південною межею природної поширеності горобини, так і хибно-негативними результатами ЗТ-ПЛР.

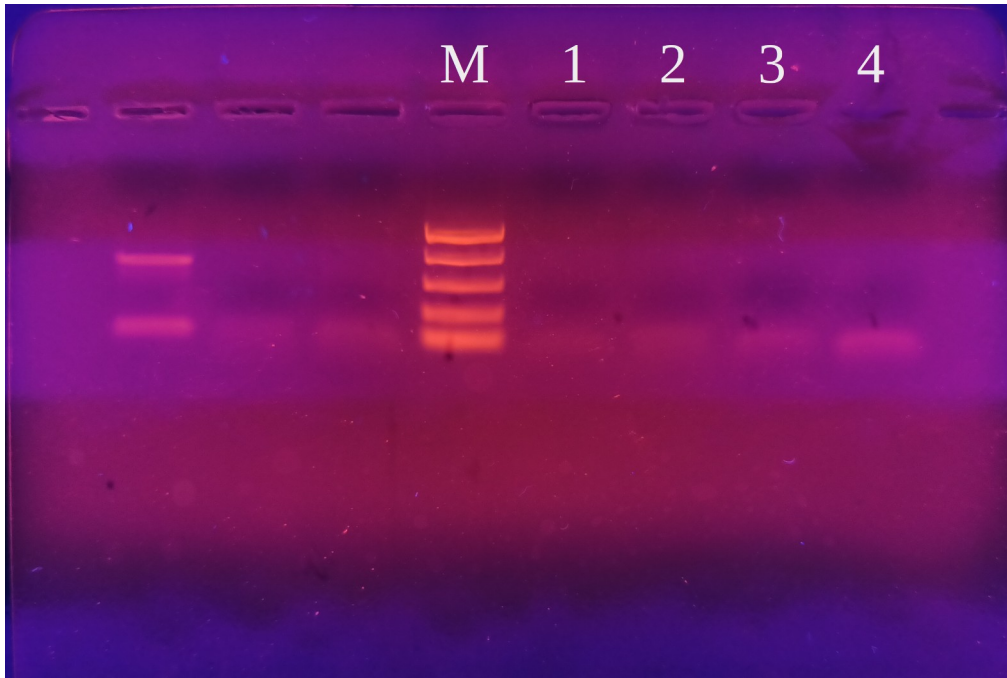


Рис. 4.2 — Результати ЗТ-ПЛР на EMARaV. Треки, утворені продуктами ЗТ-ПЛР зразків симптоматичної рослини із праймерами NC30F/NC1190R (1), p4f/p4-375r (2) і p4-245f/p4r (3); М — ДНК маркер New England BioLabs DNA Ladder №3234.

Зразки листя симптоматичних рослин груші (42 зразка) додатково були протестовані на PCLSaV із застосуванням пари праймерів до РНК3 3-F: CTGCTCATACACAACAGTGGCAT і 3-R: TCCATTTTAAGCCTAGTCAGTTGC. З очікуваним розміром продукту 724 пн. В результаті скринінгу не було детектовано PCLSaV у відібраних зразках симптоматичних рослин (рис. 4.3.). Досі цей вірус був виявлений лише у Азії, тому, можливо, PCLSaV ще не розповсюдився на території Європи. Також слід відмітити розрізненість насаджень груші в урбоценозах обстежуваних регіонів, що є серйозною перешкодою для розповсюдження вірусу.

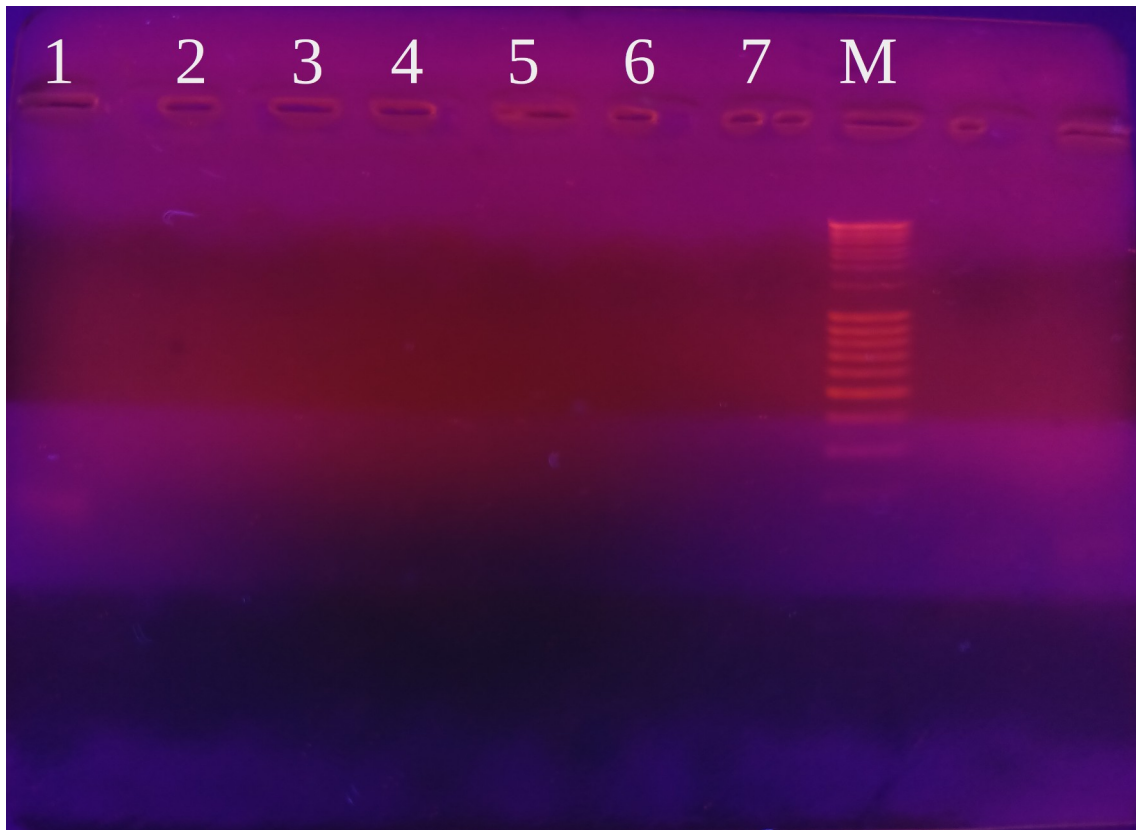


Рис. 4.3 — Результати ЗТ-ПЛР на PCLSaV. Треки, утворені продуктами ЗТ-ПЛР зразків симптоматичної рослини із праймерами 3-F і 3-R. 1-7 — негативні результати. М — ДНК маркер Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix.

На RRV перевірялись симптоматичні зразки рослин троянди, відібрані з Києва, а також із Черкаської, Хмельницької та Київської областей. Діагностика здійснювалась за допомогою ЗТ-ПЛР із застосуванням пари праймерів до ділянки сегменту РНК3, RRV For: TGAAGCTGCTCCTTGATTTCCAGGGACCTA / RRV Rev: AAGCACATCCAACACTCTTGCAGCCGATAC. Загалом було протестовано 18 зразків троянд. Як видно на рисунку 4.4, продуктів очікуваного розміру (319 пн) не було отримано. Відсутність вірусу у перевірених зразках можна пояснити як хибно-негативними результатами ПЛР, відсутністю вірусу внаслідок низької щільності і спорадичної зустрічальності троянд в урбоценозах досліджуваних регіонів. Також, оскільки RRV було виявлено лише у США та Індії, можна припустити, що цей вірус досі не розповсюдився на інші

країни, як внаслідок жорстких карантинних заходів, так і біологічних властивостей RRV: цей вірус є високопатогенним і призводить до загибелі рослини в короткий термін, а тому не в змозі вижити в ізолюваних (від крупних насаджень троянд) умовах.

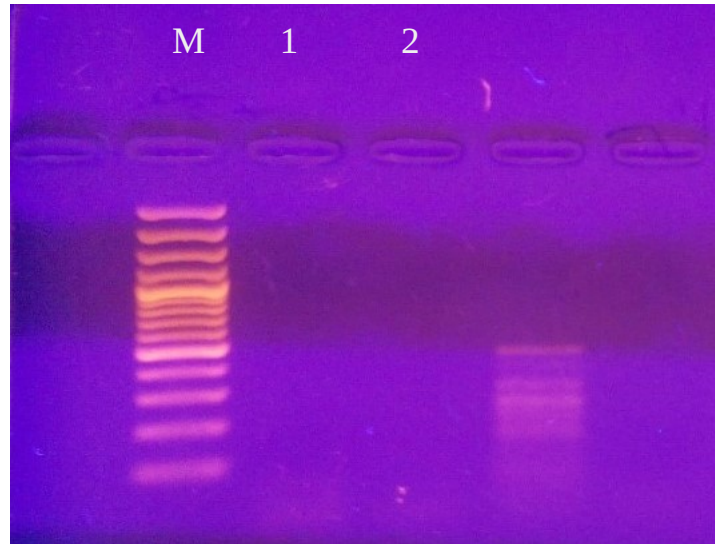


Рис. 4.4 — Результати ЗТ-ПЛР на RRV. 1,2 — треки, утворені продуктами ЗТ-ПЛР зразків симптоматичної рослини троянди із праймерами RRV For/ RRV Rev. М — ДНК маркер PCR BIO Ladder III .

Відібрані в ході скринінгу листки зразків симптоматичних рослин малини та ожини перевірялись на присутність BLMaV, використовуючи пару праймерів P3-For358: TACAGTTGCATCTTACCTTTTCG і P3-Rev706: GAATTCATACCCAGGAACAATC. Зразки рослин відбирались з Києва і Київської, Вінницької, Хмельницької, Черкаської, Львівської, Одеської та Чернігівської областей. Всього було відібрано 64 зразка цих рослин. В результаті скринінгу не було виявлено цей вірус (рис. 4.5), оскільки не було отримано продуктів ЗТ-ПЛР розміром 349 пн. Поки BLMaV було виявлено лише у східній частині США (Hassan 2019) .

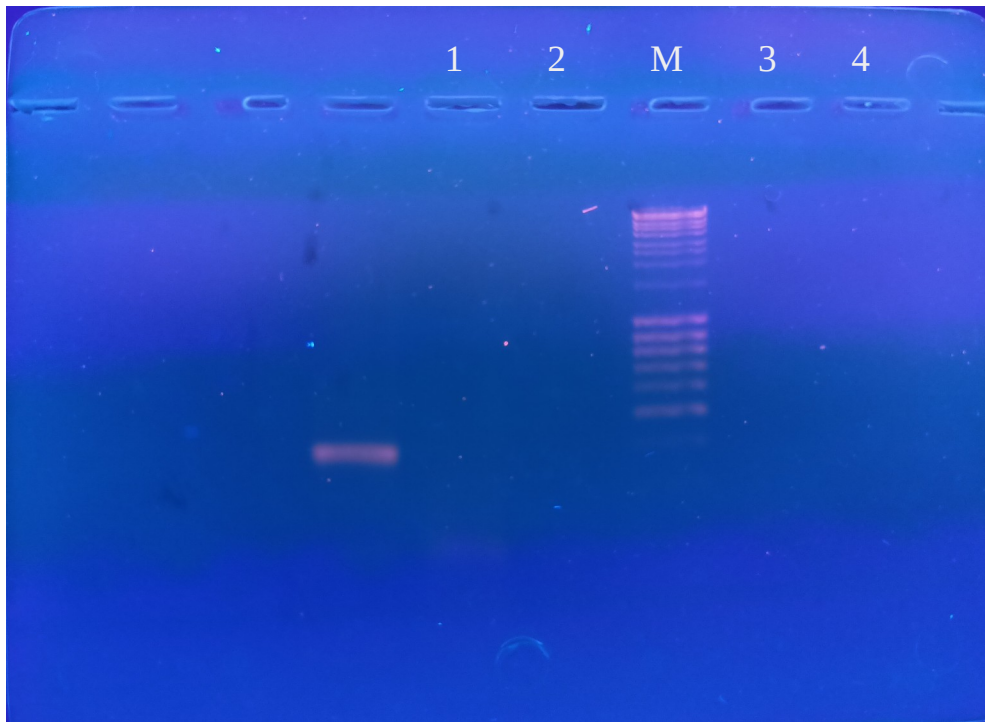


Рис. 4.5 — Результати ЗТ-ПЛР на BLMaV. Треки, утворені продуктами ЗТ-ПЛР зразків симптоматичної рослини малини (1, 2) та ожини (3, 4) із праймерами P3-For358 і P3-Rev706. М — ДНК маркер Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix.

Крім цього, симптоматичні рослини малини (всього 47 зразків) також були перевірені на RLBV. Для цього застосовувалась пара праймерів до РНК3 RLBV: 1287 (T13-5): ATCCAGTAGTGAАСТСС і 1095: САССАТСАGGAАСТТGTAАТGТТТ із очікуваним розміром продукту 508 пн. В результаті ЗТ-ПЛР із праймерами 1287/1095 було отримано продукт дещо більше 500 пн, як і очікувалось (рис. 4.6). Позитивний на RLBV зразок листків симптоматичних рослин малини було відібрано у Київській області. На цьому ж зразку було встановлено присутність ериофідних кліщів-потенційних переносників емаравірусів. RLBV є досить поширеним на території Європи. Цей вірус зустрічається у Болгарії, Боснії і Герцеговині, Великобританії, Франції, Фінляндії, Македонії, Сербії, Словаччини. Як видно, RLBV є дуже розповсюдженим у країнах Балканського регіону, оскільки вирощування

малини залишаються важливою галуззю сільського господарства країн колишньої Югославії. Завдяки цьому можна робити припущення щодо шляхів розповсюдження RLBV по Європі, а також знайти пояснення присутності цього емаравірусу на території нашої країни.

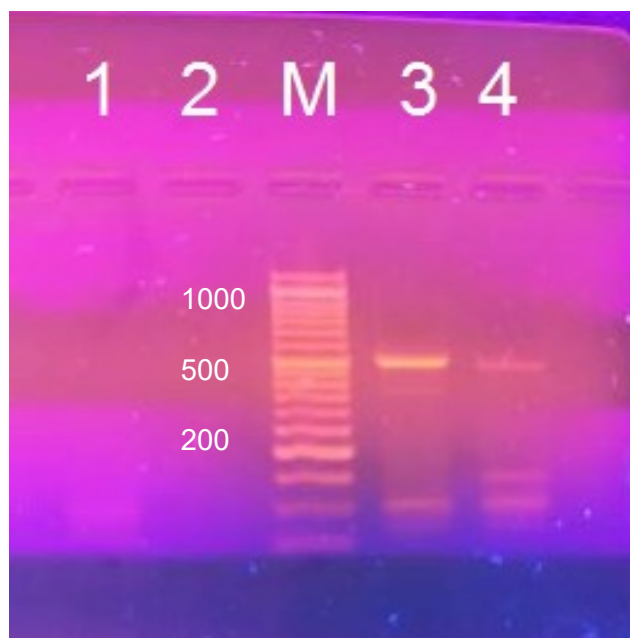


Рис. 4.6 — Результати ЗТ-ПЛР на RLBV. Треки, утворені продуктами ЗТ-ПЛР зразків симптоматичної рослини із праймерами . М – ДНК маркер PCR BIO Ladder III, 1 – негативний контроль, 2 – контроль здорового соку, 3 – позитивний контроль, 4 - зразок

Для проведення скринінгу на присутність High Plains wheat mosaic virus (HPWMoV) були відібрані зразки злакових рослин, здебільшого пшениці і кукурудзи, із вірусоподібними симптомами із Київської, Черкаської, Вінницької, Донецької, Дніпропетровської, Харківської та Запорізької областей. Загалом було відібрано не менше 260 зразків злакових. Для проведення ЗТ-ПЛР використовувались праймери до ділянки гену білка нуклеокапсиду HPV-F1: TTTATGGCTCTTTGTATTGG/ HPV-R1: TATGTTTCCCCTCTTTGTG із очікуваною довжиною продукту 339 пн. В результаті ПЛР було отримано продукти очікуваного розміру, як із зразків пшениці з декількох областей

центральных та східних регіонів України, так і із зразка кукурудзи (рис. 4.7). У зразку пшениці, що була позитивною на HPWMoV, було також виявлено присутність еріофідного кліща-потенційного переносника емаравірусів.

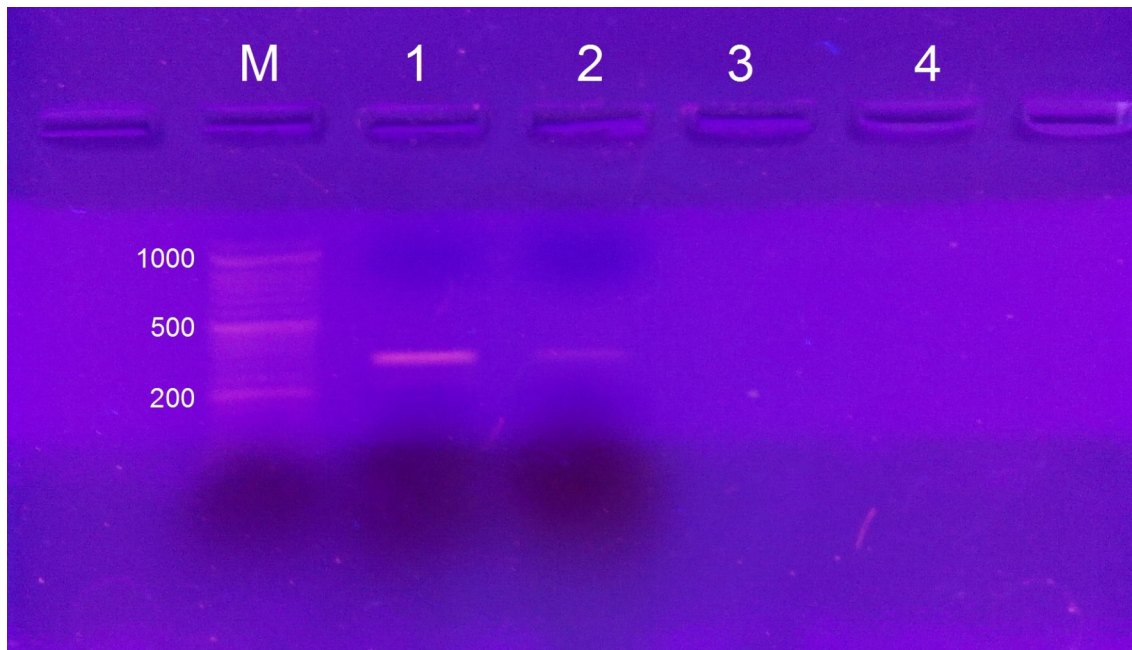


Рис. 4.7 — Результати ЗТ-ПЛР із РНК, виділеної з пшениці і кукурудзи Використовували праймери до HPWMoV гену білку нуклеокапсиду (РНК3). 1- пшениця, 2 – кукурудза, 3,4 — негативні результати. М – ДНК маркер PCR BIO Ladder III

Отже, в результаті скринінгу симптоматичних рослин родин *Rosaceae* і *Poaceae* було протестовано відібрані зразки рослин на присутність відповідних шести емаравірусів. Вперше в Україні було виявлено присутність на території двох видів емаравірусів: RLBV на рослинах малини, що були відібрані у Київській області і HPWMoV на рослинах пшениці і кукурудзи, що були відібрані у центральних і східних регіонах України: у Вінницькій, Донецькій, Дніпропетровській, Запорізькій, Київській, Полтавській та Харківській областях. Крім цього, присутність HPWMoV була показана вперше в Європі.

## РОЗДІЛ 5

### РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ RLBV БІОІНФОРМАТИЧНИМИ МЕТОДАМИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 5.1. Особливості українського ізоляту RLBV

Молекулярно-генетичні дослідження вірусу RLBV дозволяють більше дізнаватися про філогенетичні властивості, генетичні основи вірулентності та шляхів еволюції. Це допомагає в оптимізації методів молекулярної діагностики та аналізі епідемічного потенціалу цього вірусу в агроценозах України, що необхідно для розробки і впровадження методів боротьби із цим шкочочинним патогенним агентом. Крім цього, необхідно впевнитись у тому, що отримані в результаті ЗТ-ПЛР продукти дійсно є шуканими фрагментами вірусної послідовності, оскільки попри високу чутливість молекулярних методів, не можна виключати можливість того, що ампліфіковані послідовності є наслідком неспецифічної взаємодії праймерів із невірусними нуклеїновими кислотами.

Відомо, що геном RLBV представлений сегментованою негативно-смысловою РНК. У різних видів емаравірусів кількість сегментів варіює від 4 до 8 (Elbeaino 2018). RLBV має саме 8 геномних РНК: РНК1 кодує РНК-залежну РНК-полімеразу, РНК2 – прекурсор глікопротеїнів (продукт нарізується протеазою хазяя на 2 поверхневі білки вірусної оболонки), РНК3 – капсидний білок, РНК4 – білок злиття. Функції інших чотирьох сегментів поки залишаються невідомими, але припускається, що вони можуть бути пов'язані із інгібуванням сайленсингу, тобто відіграють роль у боротьбі з противірусною реакцією рослин-хазяїв, як це відбувається, наприклад, у іншого емаравірусу – HPWMoV (Gupta, 2018). Для молекулярно-генетичних досліджень було обрано РНК3. Цей сегмент є більш варіабельним ніж інші, тому пасує для внутрішньовидових філогенетичних досліджень. Крім цього, в міжнародній базі

даних GenBank вже представлено багато послідовностей РНК3 ізолятів вірусу з різних країн Європи, завдяки чому при порівнянні українського ізоляту з ними результати будуть значно точнішими. Для накопичення продуктів ампліфікації фрагменту РНК3 українського ізоляту RLBV як і в діагностичних цілях, застосовувалась наступна пара праймерів: 1287 (forward): 5'-ATCCAGTAGTGAАСТСС-3' і 1095(reverse): 5'-САССАТСАGGAАСТТGТААТGТТТ-3'. Як видно, праймер 1287 є дещо коротшим, оскільки він є спеціально розробленим для гібридизації із консервативними комплементарними 3'/5' кінцевими послідовностями емаравірусів (McGavin 2012).

На першому етапі роботи з вивчення молекулярно-генетичних особливостей RLBV було секвеновано продукт ампліфікації, що був отриманий в результаті ЗТ-ПЛР із праймерами 1287/1095 до RLBV, зразку симптоматичної малини. Отримана послідовність довжиною 503 пн була розміщена у міжнародній базі даних GenBank – ізолят UA-RLBV-1, accession MK123270. Послідовність була проаналізована за допомогою програми BLAST, що підтвердило її належність до РНК3 RLBV, а також показало найбільш ідентичні послідовності, що представлені на рисунку 5.1. Виявилось, що послідовність фрагменту РНК3 українського ізоляту є найбільш ідентичною (99,3-99,6%) до ізолятів М39-ВіН, М45-ВіН, М46-ВіН з Боснії і Герцеговини.

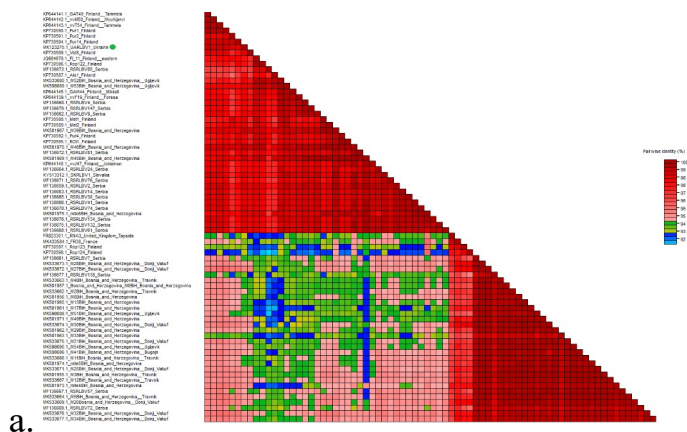
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate UA-RLBV-1 nucleocapsid protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	929	929	100%	0.0	100.00%	503	<a href="#">MK123270.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate M46-BiH nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	477	477	51%	7e-130	99.62%	261	<a href="#">MK501970.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate M45-BiH nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	331	331	36%	6e-86	99.45%	182	<a href="#">MK501969.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate M39-BiH nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	806	806	88%	0.0	99.33%	458	<a href="#">MK501967.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate vVT-54 segment RNA3 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	907	907	100%	0.0	99.20%	567	<a href="#">KP644143.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate vVM-50 segment RNA3 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	904	904	100%	0.0	99.01%	567	<a href="#">KP644142.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate RS-RLBV-2 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	902	902	100%	0.0	99.01%	567	<a href="#">MF136659.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate Pur-1 nucleocapsid protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	902	902	100%	0.0	99.01%	615	<a href="#">KP730590.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate GAT-49 segment RNA3 nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	902	902	100%	0.0	99.01%	567	<a href="#">KP644141.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Emaravirus idaeobati isolate mite6-BiH nucleocapsid protein (NP) gene, partial cds</a>	<a href="#">Emaravirus idaeobati</a>	355	355	39%	4e-93	98.99%	198	<a href="#">MK501975.1</a>





Рис. 5.3 — Кодон-залежний тест негативного відбору для порівнюваних ізолятів RLBV. Зеленим кольором показані статистично достовірні ( $p$  менше 0,05) випадки синонімічних заміщень. Теплова мапа побудована із застосуванням пакету програм MEGA7 (Nei 1986).

Як видно із рисунку 5.4, ізоляти RLBV поділяються на дві групи. До першої групи належать наш ізоляти з України разом з ізолятами з Фінляндії, Сербії, Словачії та Боснії і Герцеговини. До другої групи належать ізоляти з Британії, Франції, Сербії, та Боснії і Герцеговини. Цікавим є те, що ідентичність послідовностей ізолятів є досить високою як всередині груп (96-99% для нуклеотидних послідовностей і 97-100% для амінокислотних), так і між групами (92-95% для нуклеотидних послідовностей і 95-96% для амінокислотних), що є свідченням гомогенності. Як видно, відсотки ідентичності вище для амінокислотних послідовностей, ніж для нуклеотидних, що є свідченням присутності синонімічних мутацій.



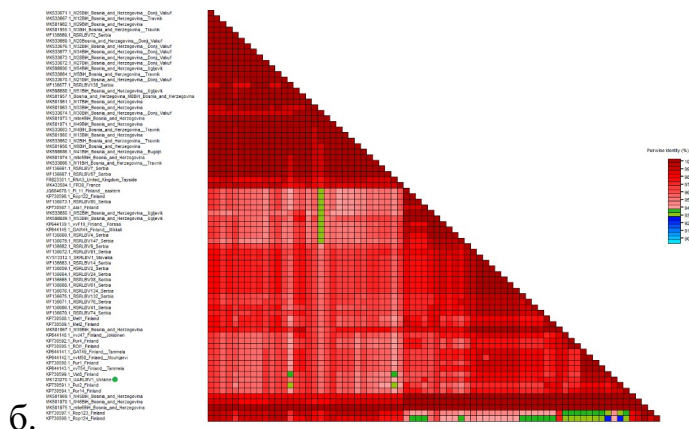


Рисунок 5.4 – теплові матриці ідентичності нуклеотидних (а) і амінокислотних (б) послідовностей ізолятів RLBV. Український ізолят позначено зеленою крапкою. Шкала відображає відсоток ідентичності послідовностей, від 89% (синій) до 100% (червоний).

Графіки відсоткової ідентичності послідовностей фрагменту РНК3 ізолятів RLBV (рис. 5.5), що були побудовані за допомогою інструментів пакету програмного забезпечення SDTv1.2, також вказують на існування двох груп ізолятів, оскільки на обох з них можна спостерігати по два піки, що відповідають кожній з груп ізолятів. Правий пік відповідає за ідентичність ізолятів всередині груп, що також, як і у випадку з тепловими матрицями складає 96-98% для нуклеотидних і 98-100% для амінокислотних послідовностей. Другий пік, що знаходиться лівіше, відповідає за ідентичність ізолятів у різних групах, що склала 93-94% для нуклеотидних і 95-97% для амінокислотних послідовностей. Як можна побачити, піки на графіку відсоткової ідентичності амінокислотної послідовності знаходяться ближче, аніж на відповідному графіку для нуклеотидної послідовності, що є свідченням меншої різниці між ізолятами різних груп, що також підтверджує переважання синонімічних заміщень.

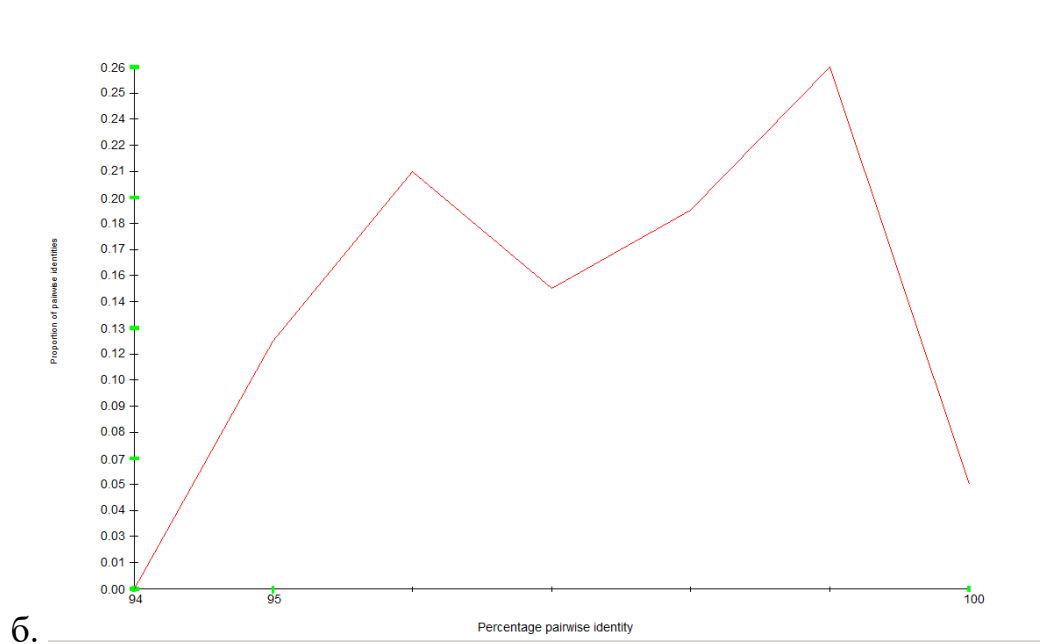
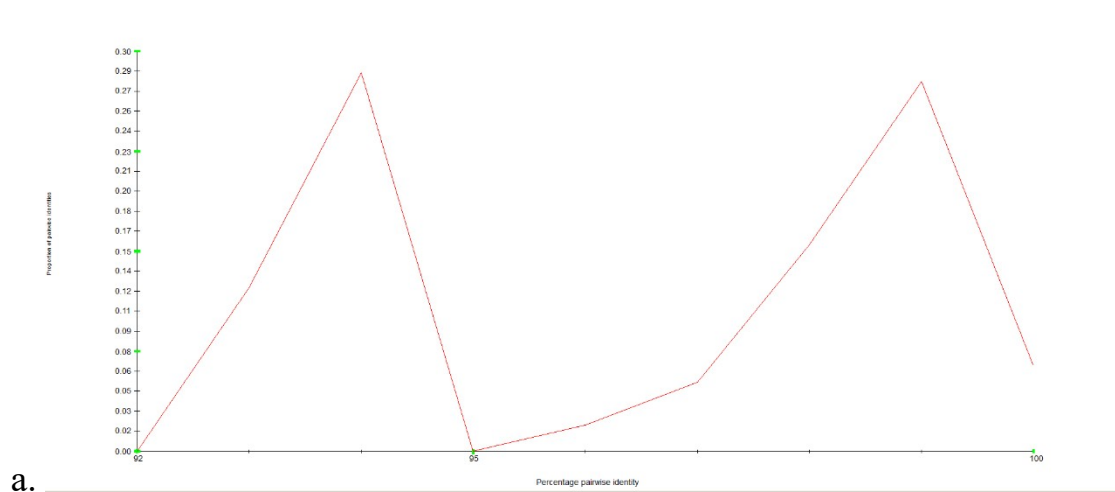
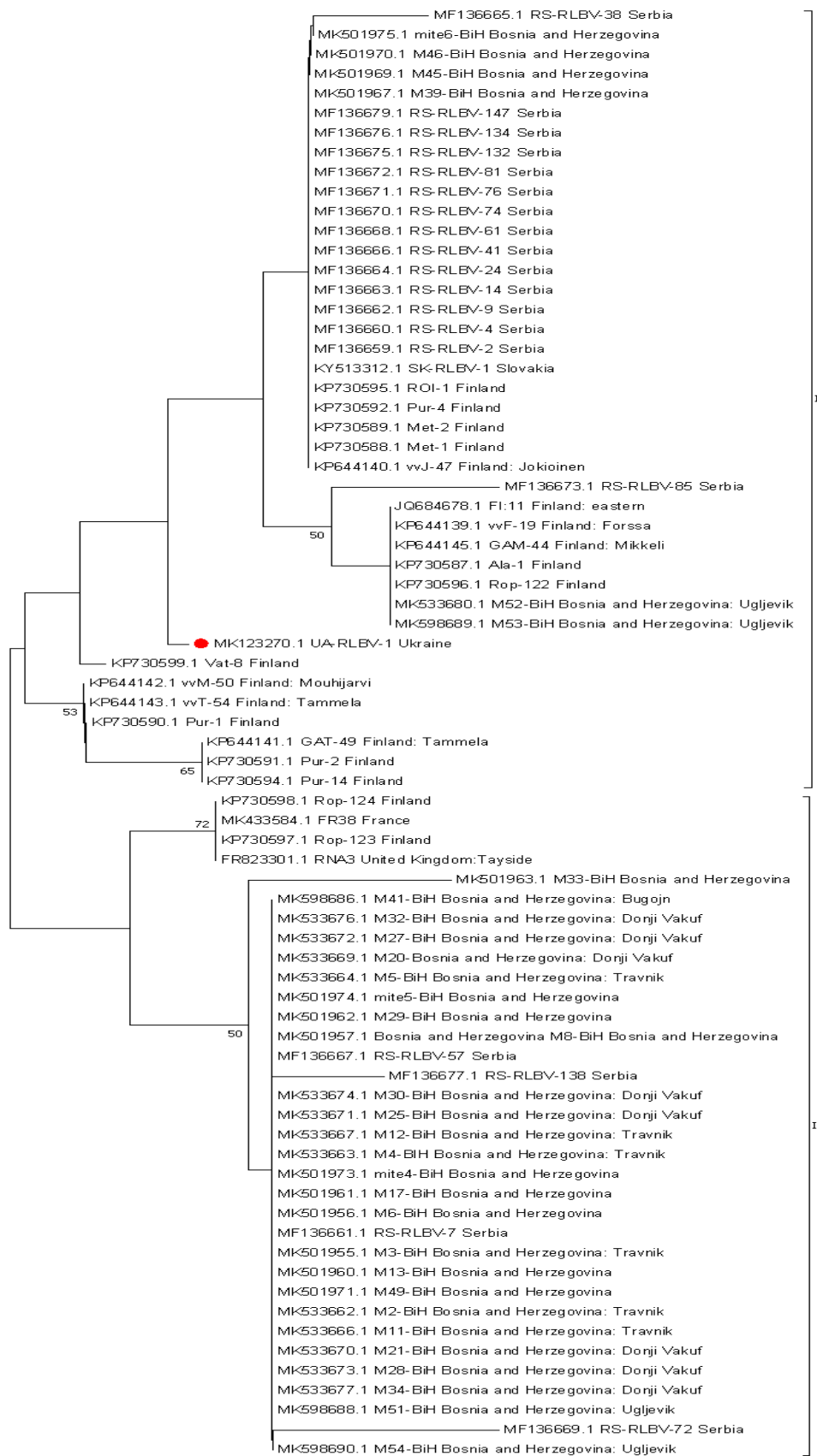


Рисунок 5.5 – Графіки відсоткової ідентичності послідовностей фрагменту РНК3 нуклеотидних (а) і амінокислотних (б) послідовностей ізолятів RLBV.

Використовуючи програму MEGA 7 було додано нуклеотидні послідовності РНК3 RLBV та вирівняно між собою за допомогою вбудованої програми ClustalW. За цим послідовності було обрізано до однакової довжини, а з отриманих даних згенеровано філогенетичне дерево за методом Maximum Likelihood. Статистична підтримка забезпечувалась бутстрепом, із проведенням 1000 раундів. Нуклеотидні послідовності було трансльовано у амінокислотні, використовуючи вбудований інструмент програми MEGA 7. За отриманими послідовностями також було побудовано філогенетичне дерево за методом

Maximum Likelihood. Статистична підтримка забезпечувалась бутстрепінгом, із проведенням 1000 раундів. Таким чином було отримано філогенетичні дерева (рис. 5.6), на яких видно загальну відповідність утворених кластерів до значень подібності послідовностей на рисунку 5.4.



a.

0.005

0.0000005	FR823301.1 RNA3 United Kingdom:Tayside
0.0000005	JQ684678.1 FI:11 Finland: eastern
0.0000005	KP644139.1 vvF-19 Finland: Forssa
0.0000005	KP644140.1 vvJ-47 Finland: Jokioinen
0.0000005	KP644141.1 GAT-49 Finland: Tammela
0.0000005	KP644142.1 vvM-50 Finland: Mouhjarvi
0.0000005	KP644143.1 vvT-54 Finland: Tammela
0.0000005	KP644145.1 GAM-44 Finland: Mikkeli
0.0000005	KP730587.1 Ala-1 Finland
0.0000005	KP730588.1 Met-1 Finland
0.0000005	KP730589.1 Met-2 Finland
0.0000005	KP730590.1 Pur-1 Finland
0.0000005	KP730591.1 Pur-2 Finland
0.0000005	KP730592.1 Pur-4 Finland
0.0000005	KP730594.1 Pur-14 Finland
0.0000005	KP730595.1 ROI-1 Finland
0.0000005	KP730596.1 Rop-122 Finland
0.0000005	KP730597.1 Rop-123 Finland
0.0000005	KP730598.1 Rop-124 Finland
0.0000005	KP730599.1 Vat-8 Finland
0.0000005	KY513312.1 SK-RLBV-1 Slovakia
0.0000005	MF136659.1 RS-RLBV-2 Serbia
0.0000005	MF136660.1 RS-RLBV-4 Serbia
0.0000005	MF136661.1 RS-RLBV-7 Serbia
0.0000005	MF136662.1 RS-RLBV-9 Serbia
0.0000005	MF136663.1 RS-RLBV-14 Serbia
0.0000005	MF136664.1 RS-RLBV-24 Serbia
0.0000005	MF136666.1 RS-RLBV-41 Serbia
0.0000005	MF136667.1 RS-RLBV-57 Serbia
0.0000005	MF136665.1 RS-RLBV-38 Serbia
0.0000005	MF136668.1 RS-RLBV-61 Serbia
0.0000005	MF136669.1 RS-RLBV-72 Serbia
0.0000005	MF136670.1 RS-RLBV-74 Serbia
0.0000005	MF136671.1 RS-RLBV-76 Serbia
0.0000005	MF136672.1 RS-RLBV-81 Serbia
0.0000005	MF136673.1 RS-RLBV-85 Serbia
0.0000005	MF136675.1 RS-RLBV-132 Serbia
0.0000005	MF136676.1 RS-RLBV-134 Serbia
0.0000005	MF136677.1 RS-RLBV-138 Serbia
0.0000005	MF136679.1 RS-RLBV-147 Serbia
0.0000005	● MK123270.1 UA-RLBV-1 Ukraine
0.0000005	MK433584.1 FR38 France
0.0000005	MK501955.1 M3-BiH Bosnia and Herzegovina: Travnik
0.0000005	MK501956.1 M6-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501957.1 Bosnia and Herzegovina M8-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501960.1 M13-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501961.1 M17-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501962.1 M29-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501963.1 M33-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501967.1 M39-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501969.1 M45-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501970.1 M46-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501971.1 M49-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501973.1 mte4-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501974.1 mte5-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK501975.1 mte6-BiH Bosnia and Herzegovina
0.0000005	MK533662.1 M2-BiH Bosnia and Herzegovina: Travnik
0.0000005	MK533663.1 M4-BiH Bosnia and Herzegovina: Travnik
0.0000005	MK533664.1 M5-BiH Bosnia and Herzegovina: Travnik
0.0000005	MK533666.1 M11-BiH Bosnia and Herzegovina: Travnik
0.0000005	MK533667.1 M12-BiH Bosnia and Herzegovina: Travnik
0.0000005	MK533669.1 M20-Bosnia and Herzegovina: Donji Vakuf
0.0000005	MK533670.1 M21-BiH Bosnia and Herzegovina: Donji Vakuf
0.0000005	MK533671.1 M25-BiH Bosnia and Herzegovina: Donji Vakuf
0.0000005	MK533672.1 M27-BiH Bosnia and Herzegovina: Donji Vakuf
0.0000005	MK533673.1 M28-BiH Bosnia and Herzegovina: Donji Vakuf
0.0000005	MK533674.1 M30-BiH Bosnia and Herzegovina: Donji Vakuf
0.0000005	MK533676.1 M32-BiH Bosnia and Herzegovina: Donji Vakuf
0.0000005	MK533677.1 M34-BiH Bosnia and Herzegovina: Donji Vakuf
0.0000005	MK533680.1 M52-BiH Bosnia and Herzegovina: Ugljevik
0.0000005	MK598686.1 M41-BiH Bosnia and Herzegovina: Bugojn
0.0000005	MK598688.1 M51-BiH Bosnia and Herzegovina: Ugljevik
0.0000005	MK598689.1 M53-BiH Bosnia and Herzegovina: Ugljevik
0.0000005	MK598690.1 M54-BiH Bosnia and Herzegovina: Ugljevik

6.

0.00000010

Рис. 5.6 – Філогенетичний аналіз послідовностей РНК3 ізолятів RLBV. Філогенетичні дерева побудовані за методом Maximum Likelihood використовуючи нуклеотидні (а) і амінокислотні (б) фрагменти послідовностей РНК3 ізолятів RLBV. Український ізолят RLBV, отриманий нами в ході цієї роботи, позначено червоною точкою. Числа на початках гілок – бутстреп підтримка, %.

На даних філогенетичних деревах, що були побудовані як із використанням нуклеотидних, так і амінокислотних послідовностей, видно, що український ізолят, отриманий нами в ході цієї роботи належить до одного кластеру з деякими фінськими, боснійськими, сербськими та словацькими ізолятами, разом формуючи кладу I, але британські, французькі та інші словацькі і фінські ізоляти належать до інших кластерів, формуючи кладу II. Порівнюючи ці два дерева між собою можна відмітити їх високу топологічну подібність: на обох деревах спостерігається поділ на клади I і II, знаходження українського ізоляту у одній субкладі разом із фінськими ізолятами в складі клади I, поділ клади II на дві субклади тощо. З іншого боку, є деякі відмінності між цими філогенетичними деревами: різниця у кількості заміщень між різними послідовностями значно більша для дерева, побудованого за нуклеотидними послідовностями, на ньому видно більш значне галуження, що є наслідком присутності синонімічних заміщень у порівнюваних послідовностях.

Для встановлення часу відділення українського ізоляту RLBV від ізолятів з інших країн, було застосовано філогенетичний аналіз із використанням молекулярного годинника за допомогою програми BEAST та допоміжних утиліт BEAUti, Tree Annotator. Філогенетичне дерево будувалось за допомогою програми FigTree. Отримане філогенетичне дерево (рис. 5.7) показує розходження двох основних клад RLBV I і II у 1960 роках. Український ізолят RLBV відділився від найбільш ідентичного ізоляту з Фінляндії на початку 2000-х років. Можливо, саме в цей час RLBV було занесено на територію України,

але складно визначити місце, з якого поширюється цей вірус. Не відомо, чи був обмін посадковим матеріалом між Україною та Фінляндією на початку двохтисячних років, але більш ймовірним є варіант набуття обома країнами ураженого матеріалу окремо, з третьої країни, з подальшим розповсюдженням вірусу природнім шляхом. Ймовірно, завдяки обміну посадковим матеріалом між країнами філогенетично близькі ізоляти знаходяться у досить географічно віддалених регіонах: Центральній і Північній Європі, Балканах.

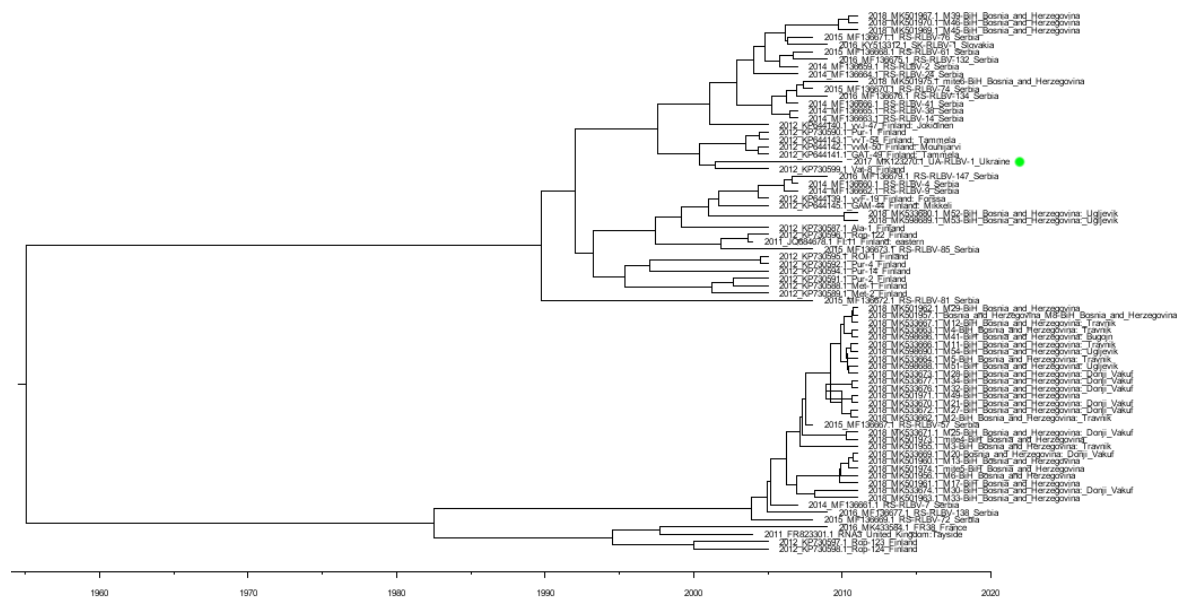


Рис. 5.7 — Філогенетичний аналіз послідовностей РНК3 ізолятів RLBV із застосуванням молекулярного годинника. Український ізолят відмічено зеленою крапкою. На шкалі відображено роки.

Отже, як видно із наведених рисунків та таблиць, послідовності деяких фінських ізолятів мають більшу подібність до українського, утворюючи таким чином з ним один кластер, аніж словацькі і британський зразки, а також деякі інші фінські зразки, що утворюють свої кластери. Як видно, ізоляти з різних кластерів можуть зустрічатися в одній країні, в той час як ізоляти з одного кластеру зустрічаються по всій Європі. Це означає, що приналежність до кластеру не пов'язана з географічним розповсюдженням, що може бути

результатом обміну посадкового матеріалу малини між різними країнами, а високий ступінь гомогенності популяції може свідчити нещодавнє розповсюдження вірусу і воно, скоріше за все не пов'язане із рекомбінаційними заміщеннями, оскільки пакет програм RDP4 не виявив слідів рекомбінації серед досліджуваних послідовностей.

Наразі RLBV був виявлений лише на території Європи: крім вже згаданих країн, є підтвердження із Болгарії, Польщі та Чорногорії, але для ізолятів з цих країн були розміщені у базі даних інші сегменти геномної РНК, тому взаємозв'язки з іншими ізолятами складно встановити. З вже відомих даних можна припустити, що внаслідок високої гомогенності популяції спостерігатиметься подібне розподілення ізолятів на дві клади, з присутністю ізолятів з країн Балканського півострову в обох з них.

Відомо, що RLBV розповсюджується за допомогою ериофідного кліща-переносника *Phyllocoptes gracilis*, що викликає хворобу листя малини, а також із посадковим матеріалом. Впровадження сурових карантинних заходів із обмеженням поширення кліщів із застосуванням як акарицидів, так і біологічних заходів, наприклад застосування хижих видів кліщів, а також обмеження обігу посадкового матеріалу та усунення неперервних насаджень кущів малини можуть посприяти зменшенню негативного впливу від вірусу, але багато аспектів поширеності, біології та еволюції RLBV залишається невідомим. Наприклад те, що, оскільки RLBV має сегментований геном, то цей вірус здатен не тільки до мутацій: точкових заміщень і рекомбінацій, але і до реасортацій, що, потенційно, може призвести до збільшення вірулентності та патогенності цього збудника вірусних хвороб рослин. Саме тому подальше дослідження цієї теми допоможе краще зрозуміти місце походження та механізми розповсюдження RLBV у Європі, що сприятиме у розробці заходів попередження інфікування цим вірусом рослин у господарствах.

Отже, було проаналізовано послідовність фрагменту послідовності РНК3 українського ізоляту RLBV, досліджено його молекулярно-генетичні

особливості та філогенетичні зв'язки. Показано високу ідентичність ізолятів RLBV з різних країн. Виявилась висока ідентичність українського ізоляту з ізолятами з Фінляндії, що може свідчити про їх спільне еволюційне минуле. Це перше дослідження емаравірусу RLBV в Україні.

Дані результати опубліковані в наступних виданнях:

1. Pozhylov I. Phylogenetic analysis of Ukrainian isolate of raspberry leaf blotch virus/ I. Pozhylov, H. Snihur, I. Budzanivska //AGROFOR. – 2021. – V. 6. – №. 1. –pp. 19-25.

2. Phylogenetic analysis of ukrainian isolate of raspberry leaf blotch virus. Illia Pozhylov, Halyna Snihur, Irena Budzanivska, XI International Scientific Agriculture Symposium “AGROSYM 2020”p.283.

## РОЗДІЛ 6

### ОСОБЛИВОСТІ ТА ПОШИРЕННЯ УКРАЇНСЬКИХ ІЗОЛЯТІВ НРWMoV

#### 6.1. Поширеність НРWMoV в Україні

Попередньо, в ході цієї роботи, було показано присутність НРWMoV у зразку кукурудзи. Для подальшого вивчення поширеності цього вірусу необхідно було протестувати значну кількість зразків. В цьому випадку є більш доцільним використання ІФА, а не ПЛР. Зазвичай масштабний скринінг рослин на присутність емаравірусів здійснюється із застосуванням різноманітних модифікацій ЗТ-ПЛР, оскільки серологічні системи для вивчення цих вірусів розроблялись лише для кількох з них, оскільки їх отримання супроводжується труднощами, що пов'язані із біологічними і морфологічними особливостями емаравірусів. Для НРWMoV існує комерційна тест-система фірми Agdia (USA), яку і було застосовано для проведення попередньої діагностики вірусу в зразках злакових рослин, що були відібрані в ході моніторингу. Використовуючи зазначену комерційну тест систему на НРWMoV, було отримано позитивні результати у зразках пшениці із Вінницької, Харківської, Запорізької, Полтавської, Київської, Дніпропетровської та Донецької областей, а також кукурудзи із Вінницької, Запорізької Київської, Харківської, Хмельницької і Чернігівської областей, тобто майже у більшості з досліджуваних. ІФА показав присутність вірусу в 81 з досліджених 238 зразків, що складає більше ніж у 34% зразків пшениці та кукурудзи (таблиця 6.1). Поширеність НРWMoV і його розподілення по регіонам показано на мапі (рис. 6.1).

Таблиця 6.1

## Виявлення HPWMoV у зразках пшениці та кукурудзи за допомогою ІФА

Область, з якої було відібрано зразок	2018		2019		2020		2021		всього	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Вінницька	1	5	0	10	0	2	0	2	1	19
Донецька	20	20	-	-	-	-	-	-	20	20
Дніпропетровська	10	10	20	40	-	-	-	-	30	50
Київська	0	10	0	5	1	7	0	5	1	27
Харківська	5	35	5	15	2	9	1	4	13	63
Полтавська	-	-	-	-	0	3	4	10	4	13
Запорізька	10	10	0	10	1	1	1	2	12	23
Черкаська	-	-	0	5	-	-	0	1	0	6
Чернігівська	-	-	-	-	-	-	0	6	0	6
загалом	36	90	25	85	4	22	6	24	71	227

Як видно з мапи (рис. 6.1), було виявлено HPWMoV у зразку кукурудзи із Вінницької області, а також у зразках пшениці із Харківської, Запорізької, Полтавської, Київської, Дніпропетровської та Донецької областей, в той час як в протестованих зразках із Хмельницької, Черкаської та Чернігівської областей не було виявлено цей вірус. Отже можна сказати, що попри навіть відносно невелику вибірку, HPWMoV може бути досить розповсюдженим на території України.

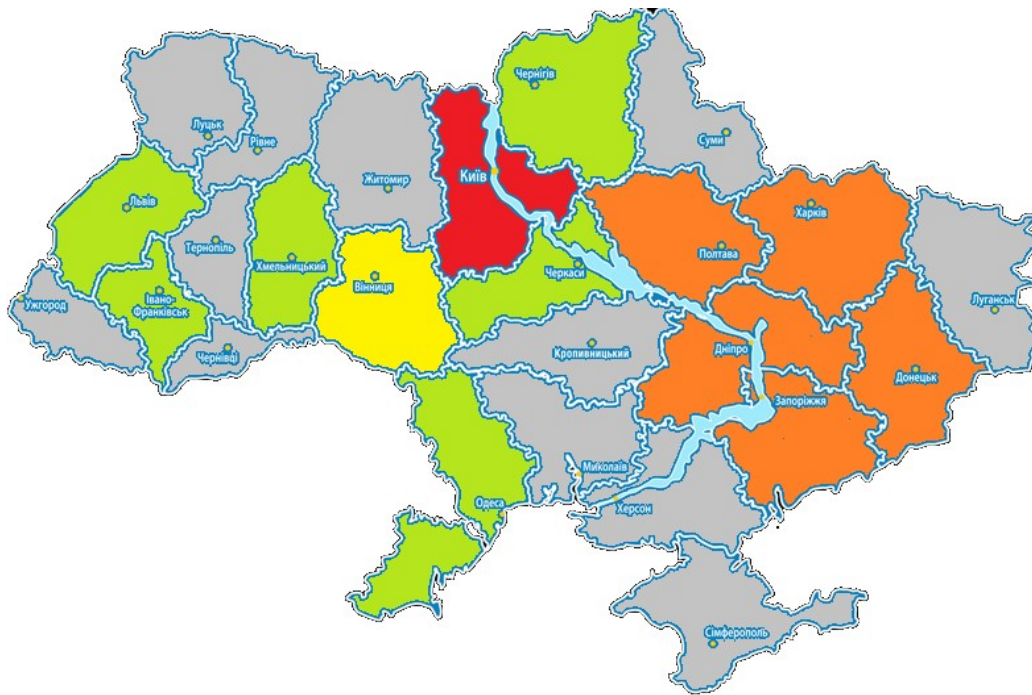


Рис.6.1 — Виявлені випадки HPWMoV і RLbV на території України. Жовтим – у зразках кукурудзи, помаранчевим — у зразках пшениці, червоним — області, де було виявлено HPWMoV і RLbV, зеленим – області, у зразках з яких не було виявлено вірусу, сірим — області, де не проводився моніторинг.

З літературних даних відомо, що HPWMoV часто зустрічається у змішаній інфекції разом із Wheat streak mosaic virus (WSMV) та Triticum mosaic virus (TriMV) (Буатікама 2016). Також відомо, що в Україні поширений WSMV, ізоляти якого належать до класу В (Mishchenko 2019). В результаті скринінгу було виявлено, що 65% симптоматичних рослин пшениці були моноінфіковані WSMV, 13% були моноінфіковані HPWMoV, а 22% мали змішану інфекцію WSMV і HPWMoV (рис. 6.2). Отримані дані узгоджуються із даними з літературних джерел. TriMV не був виявлений в досліджених зразках.

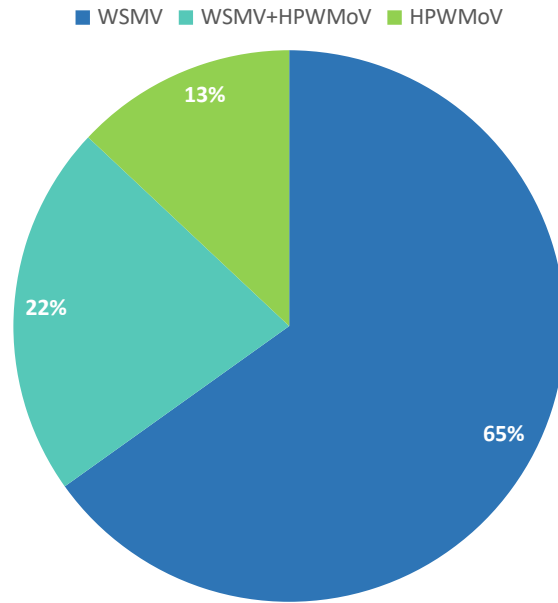


Рис. 6.2 — Відсоток ураженості на HPWMoV та WSMV серед позитивних на ці віруси зразків.

В ході скринінгу було виявлено HPWMoV в рослинах пшениці сортів Гарантія одеська, Донецька 48, Достаток, Новосмуглянка, Подолянка, Скаген (Skagen), в той час як в досліджених зразках пшениці сортів Богдана, Еміль (Emil), Зимоярка, Золотоколоса, Кубус (Cubus), Місія одеська та Смуглянка не було виявлено цього вірусу (таблиця 6.2).

Таблиця 6.2

Ураженість різних сортів пшениці на HPWMoV та WSMV

Сорт	Країна походження сорту	Ураженість вірусом	
		HPWMoV	WSMV
Богдана	Україна	-	+
Гарантія одеська	Україна	+	+
Донецька 48	Україна	+	+

Достаток	Україна	+	+
Еміль (Emil)	Німеччина	-	+
Зимоярка	Україна	-	+
Золотоколоса	Україна	-	+
Кубус (Cubus)	Німеччина	-	+
Місія одеська	Україна	-	+
Новосмуглянка	Україна	+	-
Подолянка	Україна	+	+
Скаген (Skagen)	Німеччина	+	+
Смуглянка	Україна	-	+

Поки не було виявлено стійких сортів до HPWMoV, але відомі сорти, що є стійкими до кліща-переносника. Подальше дослідження допоможе знайти стійкі до HPWMoV сорти та дослідити механізми стійкості.

Отже, в ході скринінгу симптоматичних рослин пшениці та кукурудзи, що були відібрані з десяти областей різних агрокліматичних зон України, було показано присутність HPWMoV на рослинах кукурудзи і пшениці. Це перший випадок детекції HPWMoV не тільки на території України, але і у Афроевразії. HPWMoV був виявлений у зразках з Вінницької, Харківської, Запорізької, Полтавської, Київської, Дніпропетровської та Донецької областей, що говорить про широкий ареал розповсюдження цього вірусу на території України. Вірус було виявлено у зразках рослин сортів Гарантія одеська, Донецька 48, Достаток, Новосмуглянка, Подолянка, Скаген (Skagen), що говорить про чутливість даних сортів до цього патогену. Подальші дослідження допоможуть краще визначити розповсюдженість HPWMoV, зрозуміти механізми стійкості, визначити стійкі сорти.

## 6.2. Молекулярно-генетичні властивості українських ізолятів HPWMoV

Для того, щоб підтвердити результати ІФА та мати уявлення про молекулярно-генетичні особливості (філогенетичні відносини українських ізолятів до інших, можливі рекомбінації між ізолятами тощо), було проведено ЗТ-ПЛР із подальшим секвенуванням отриманих продуктів. В роботі аналізувались фрагменти послідовностей двох геномних сегментів HPWMoV: РНК3 і РНК6.

### 6.2.1. Молекулярно-генетичні властивості українських ізолятів HPWMoV за аналізом фрагмента геномного сегменту РНК3

Послідовності було проаналізовано за допомогою програми BLAST, результати чого представлені на рис.6.3.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Wheat mosaic virus segment RNA3 nucleoprotein gene, complete cds</a>	233	233	43%	4e-57	91%	<a href="#">gi 999944420 KT995102.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate K1 segment RNA3, complete sequence</a>	233	233	43%	4e-57	91%	<a href="#">gi 999944403 KT988889.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate H1 segment RNA3 1501, complete sequence</a>	233	233	43%	4e-57	91%	<a href="#">gi 999944389 KT988882.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate H1 segment RNA3, complete sequence</a>	233	233	43%	4e-57	91%	<a href="#">gi 999944387 KT988881.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate W1 segment RNA3, complete sequence</a>	233	233	43%	4e-57	91%	<a href="#">gi 999944335 KT970501.1</a>
<a href="#">Maize red stripe virus nucleocapsid gene, complete cds</a>	233	233	43%	4e-57	91%	<a href="#">gi 84374248 DQ324466.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate Balcarce segment RNA3 nucleoprotein gene, partial cds</a>	204	204	43%	2e-48	88%	<a href="#">gi 1214998176 KX912695.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate Manfredi segment RNA3 nucleoprotein gene, partial cds</a>	204	204	43%	2e-48	88%	<a href="#">gi 1214998174 KX912694.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate Tres Arroyos segment RNA3 nucleoprotein gene, partial cds</a>	204	204	43%	2e-48	88%	<a href="#">gi 1214998172 KX912693.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate Otamendi segment RNA3 nucleoprotein gene, partial cds</a>	204	204	43%	2e-48	88%	<a href="#">gi 1214998170 KX912692.1</a>

Рис.6.3 – Результати BLAST аналізу послідовності 300 пн отриманої після секвенування продукту ПЛР зразка із кукурудзи на HPWMoV. Показано перші 10 результатів.

Всі три отримані послідовності українських ізолятів мали досить високий відсоток подібності до інших ізолятів HPWМоV (86-91%). Найбільш подібними були ізоляти з Огайо (США).

Перевірка гіпотези переважання синонімічних заміщень над несинонімічними проводилась за допомогою пакету програм MEGA7. Ця гіпотеза виявилась вірною, що відповідало очікуванням (рис. 6.4).

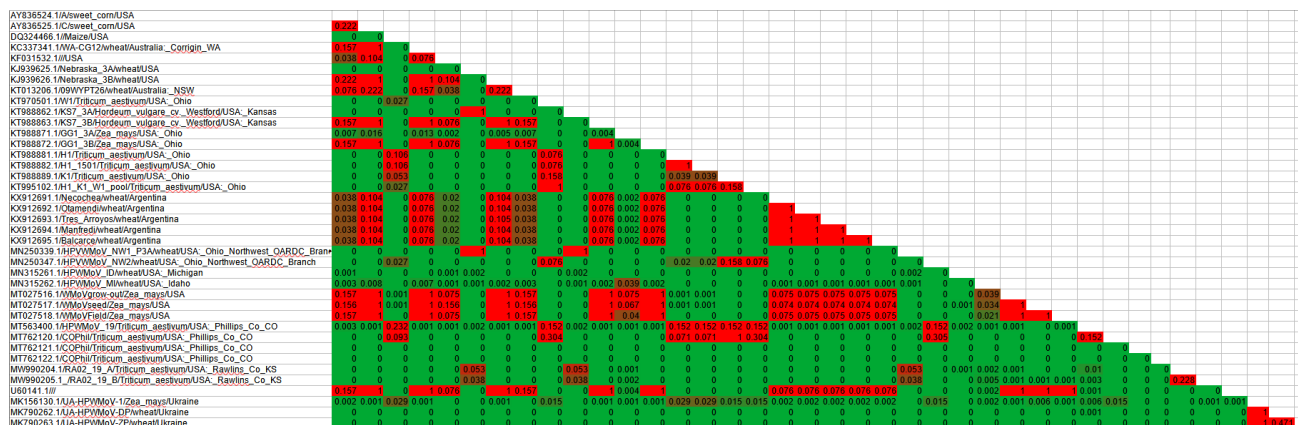


Рис. 6.4 — Кодон-залежний тест негативного відбору для порівнюваних ізолятів HPWМоV. Зеленим кольором показані статистично значущі ( $p$  менше 0,05) випадки переважання синонімічних заміщень. Теплова мапа побудована із застосуванням пакету програм MEGA7 (Nei 1986).

З метою визначення попарних подібностей ізолятів HPWМоV було побудовано теплові мапи, застосовуючи деякі з інструментів пакету програмного забезпечення SDTv1.2 [Muhire et al., 2014]. Отримані теплові матриці (рис. 6.5) показують наявність трьох основних груп ізолятів. Внаслідок переважання синонімічних заміщень над несинонімічними, відсотки подібностей при попарному порівнянні амінокислотних послідовностей ізолятів HPWМоV загалом дещо вищі за відповідні нуклеотидних послідовностей.

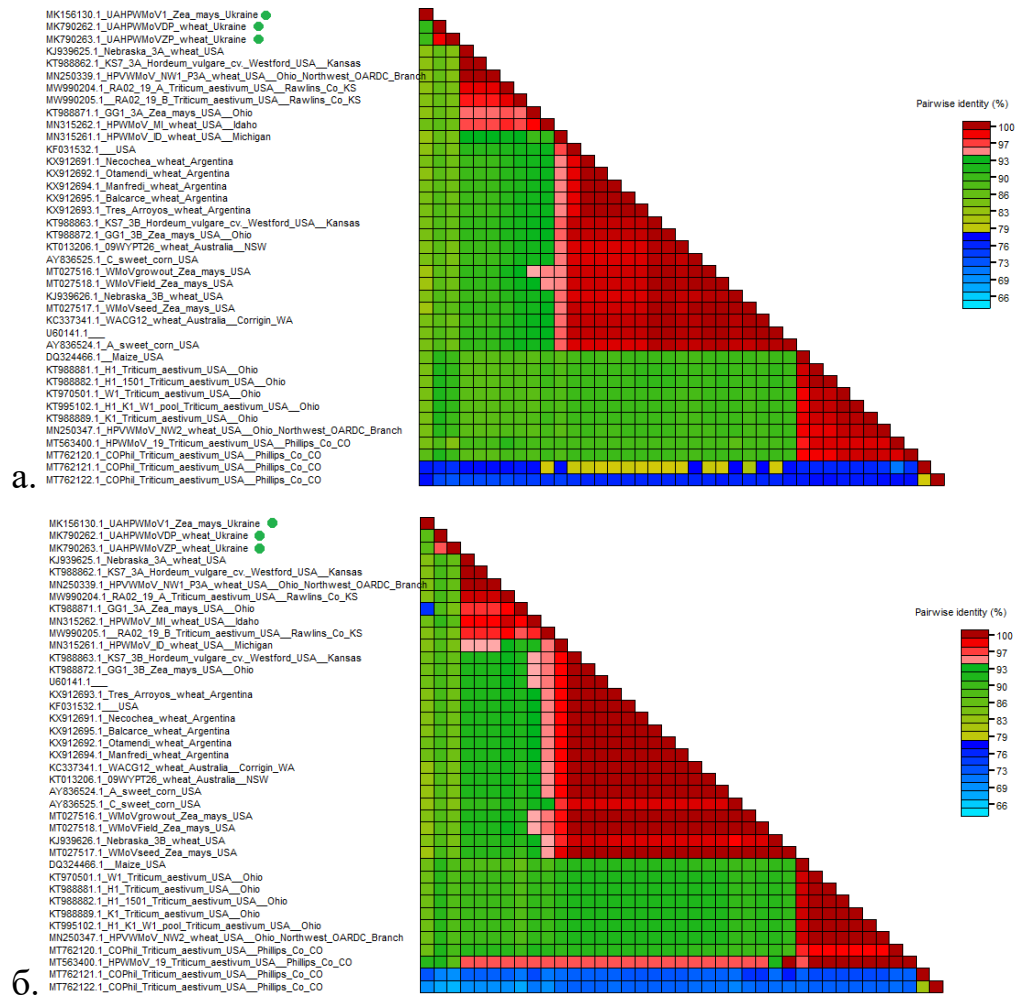


Рис. 6.5 – теплові матриці ідентичності нуклеотидних (а) і амінокислотних (б) послідовностей ізолятів HPWMoV. Українські ізоляти відзначені зеленими крапками.

Отримані графіки відсоткової ідентичності послідовностей фрагменту РНК3 нуклеотидних і амінокислотних послідовностей ізолятів HPWMoV, що були отримані за допомогою пакету програмного забезпечення SDTv1.2, показують присутність трьох піків, що також означає розподіл ізолятів HPWMoV у три кластери (рис. 6.5). Звичайно, завдяки переважанню синонімічних заміщень над несинонімічними, більшість піків на графіку для амінокислотних послідовностей здвинуті праворуч, відносно піків на графіку для нуклеотидних послідовностей, оскільки ідентичності амінокислотних послідовностей вищі.



Рисунок 6.6 – Графіки відсоткової ідентичності послідовностей фрагменту РНК3 нуклеотидних (а) і амінокислотних (б) послідовностей ізолятів HPWMoV.

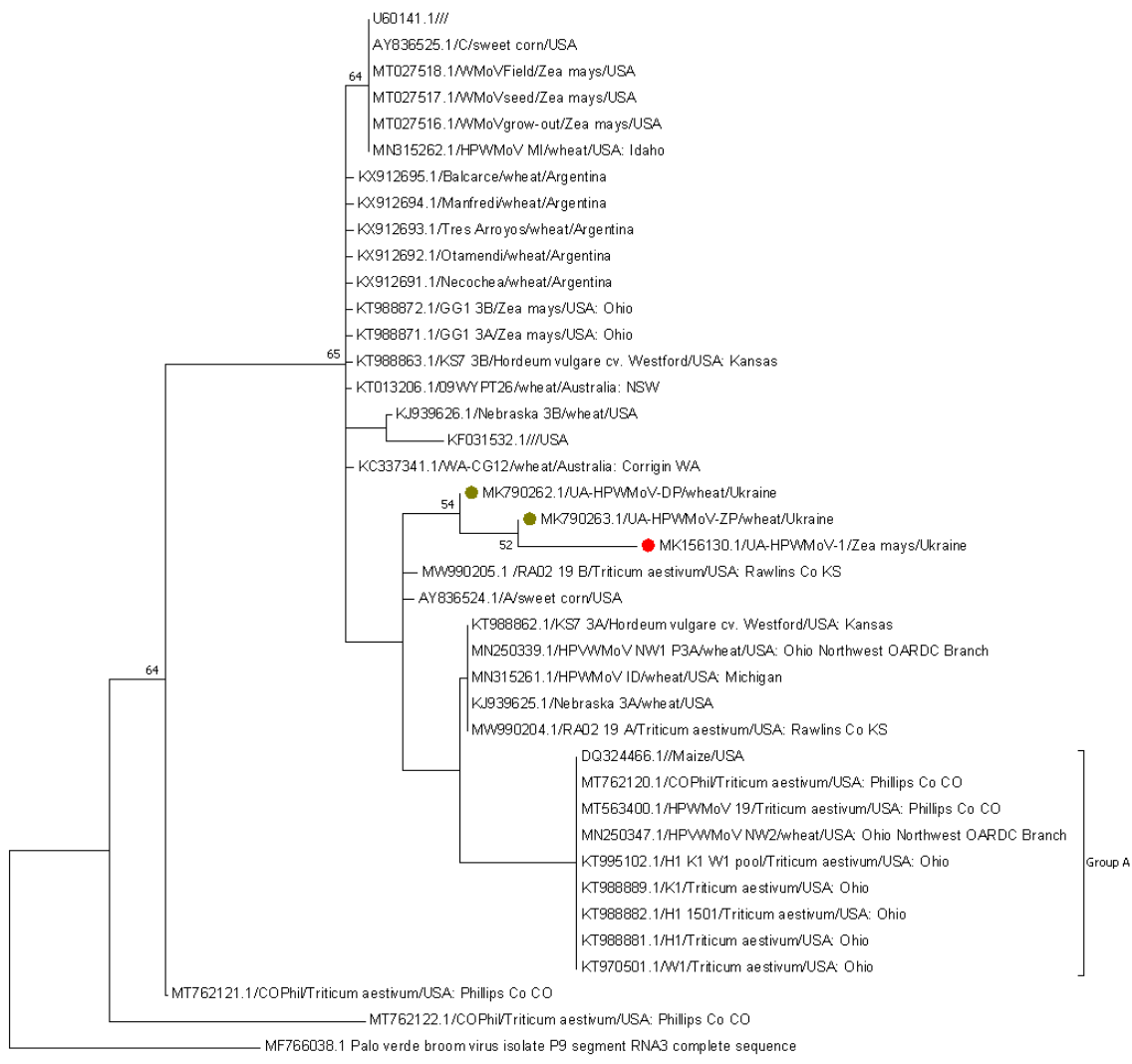
Крім точкових мутацій, для емаравірусів відомі випадки рекомбінацій та реасортацій. Є дуже важливим дослідження виникнення цих генетичних змін, оскільки, як відомо, для інших вірусів із сегментованими геномами, рекомбінації та реасортації можуть призвести до збільшення вірулентності, патогенності та зміни спектру хазяїв, що, в свою чергу, може бути причиною виникнення епіфітотій. Для визначення наявності рекомбінацій між послідовностями HPWMoV було застосовано пакет програм RDP4 (рис. 6.7). Для цього застосовувались методи RDP, GENECONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA, SISCAN, LARD, 3SEQ, Distance Plot і TOPAL. Деякі з цих методів виявили свідчення рекомбінацій між ізолятами HPVWMoV\_NW1 P3A

(MN250339.1, пшениця, США, Огайо) та KS7 3В (KT988863.1, ячмінь, США, Канзас); HPVWMoV\_NW1 P3A і Nebraska 3В (KJ939626.1, пшениця, США, Небраска); KS7 3В і KS7 3А (KT988862.1, ячмінь, США, Канзас). Як видно, рекомбінаційні події зафіксовано лише для деяких ізолятів із США. Відсутність доказів рекомбінації в українських ізолятах може бути наслідком як відсутності таких подій, так і хибними результатами, що спричинені дослідженням занадто коротких послідовностей, оскільки, здебільшого, рекомбінаційні події траплялись межах сайтів 353-760, 874-1052, 355-556, 1281-1389, 1169-1401, і 311-334, в той час як послідовності українських ізолятів розташовувались в межах 707-1008, при загальній довжині послідовності РНК3 у, приблизно, 1465 нуклеотидів. Тобто більшість рекомбінаційних подій відбувались поза досліджуваної ділянки.

Event no.	Fnd in	Recomb.	Major parent	Minor parent	Detection methods						
					R	G	B	M	C	S	T
1	1	MW990205.1 E	MN250339.1 E	KT988863.1 Wh	+	+	-	+	+	+	+
2	1	MN315261.1 E	MN250339.1 Em	KJ939626.1 Em	+	+	+	+	+	+	+
3	1	KT988871.1 Wh	MN250339.1 Em	KT988863.1 Wh	+	+	-	+	+	+	+
4	1	KT988871.1 Wh	KT988862.1 Wh	KT988863.1 Wh	+	+	-	+	+	-	+
5	1	MW990205.1 E	MN250339.1 Em	KJ939626.1 Em	+	+	-	+	+	+	+
6	1	KJ939626.1 Em	KT988863.1 Wh	Unknown	+	-	-	-	-	-	-

Рис. 6.7 — Результати рекомбінаційного аналізу із застосуванням методів RDP (R), GENECONV (G), BOOTSCAN (B), MAXCHI (M), CHIMAERA (C), SISCAN (S), TOPAL (S)

Для встановлення філогенетичних зв'язків між ізолятами було проведено філогенетичний аналіз, застосовуючи пакет програм MEGA7. На рисунках представлено отримані філогенетичні дерева, що побудовані із використанням нуклеотидних (рис. 6.8 а) і амінокислотних (рис. 6.8 б) послідовностей ізолятів HPVWMoV.



a. 0.02



Рис.6.8 – Філогенетичний аналіз послідовностей РНК3 ізолятів HPWMoV. Філогенетичні дерева побудовані за методом Maximum Likelihood використовуючи нуклеотидні (а) і амінокислотні (б) фрагменти послідовностей РНК3 ізолятів HPWMoV із використанням моделей Kimura 2-parameter model і Le Gascuel model для нуклеотидних і амінокислотних послідовностей відповідно. Українські ізоляти HPWMoV, отримані в ході цієї роботи, позначено червоною (отриманих із зрізків рослин кукурудзи) і жовтими (пшениці) точками. Числа на початках гілок – бутстреп підтримка, %.

Як видно із філогенетичного дерева на рис. 6.6.а, українські ізоляти дещо відрізняються як від послідовностей ізолятів з інших регіонів, так і одне від одного, але, попри це, формують свій окремий кластер, що говорить про спільне еволюційне минуле цих ізолятів. Ймовірно, НРWMoV потрапив на територію України одного разу, а потім зміг розповсюдитись, або з одного джерела, але декілька разів. Значні відмінності між українськими ізолятами можна пояснити пристосуваннями до життєдіяльності у різних рослинах хазяях (пшениці і кукурудзі), а також довгим часом з моменту розходження, що дало змогу до накопичення цих еволюційних змін. Щодо філогенетичного дерева на рисунку 6.6. б, то на ньому видно, що більшість ізолятів зібрані в одному кластері. Це є свідченням того, що, попри високу мінливість нуклеотидної послідовності, популяція НРWMoV досі є досить гомогенною. Можливо, вірус лише відносно нещодавно зміг розповсюдитись на інші континенти, а більша частина його еволюційної історії проходила в одному замкненому регіоні.

За допомогою програми BEAST та супутніх утиліт було проведено філогенетичний аналіз фрагментів послідовностей сегменту РНК3 НРWMoV із залученням методу молекулярного годинника (рис.6.9). Відділення клади з українськими ізолятами від інших ізолятів, більшість з яких належать до групи А відбулося на початку двохтисячних років. Отже, українські ізоляти мали спільного предка з ізолятами групи А, що відділився від решти ізолятів на початку дев'яностих років минулого сторіччя. Можливо, саме близько 20 років тому НРWMoV потрапив на територію України і, оскільки всередині клади українських ізолятів немає ізолятів з інших країн можна припустити, що вірус потрапив одноразово і всі мутації набув вже під час поширення в Україні. З іншого боку, можливо, ми не маємо достатньо даних і розбіжність між українськими ізолятами можна пояснити кількарізовим занесенням НРWMoV на територію України.

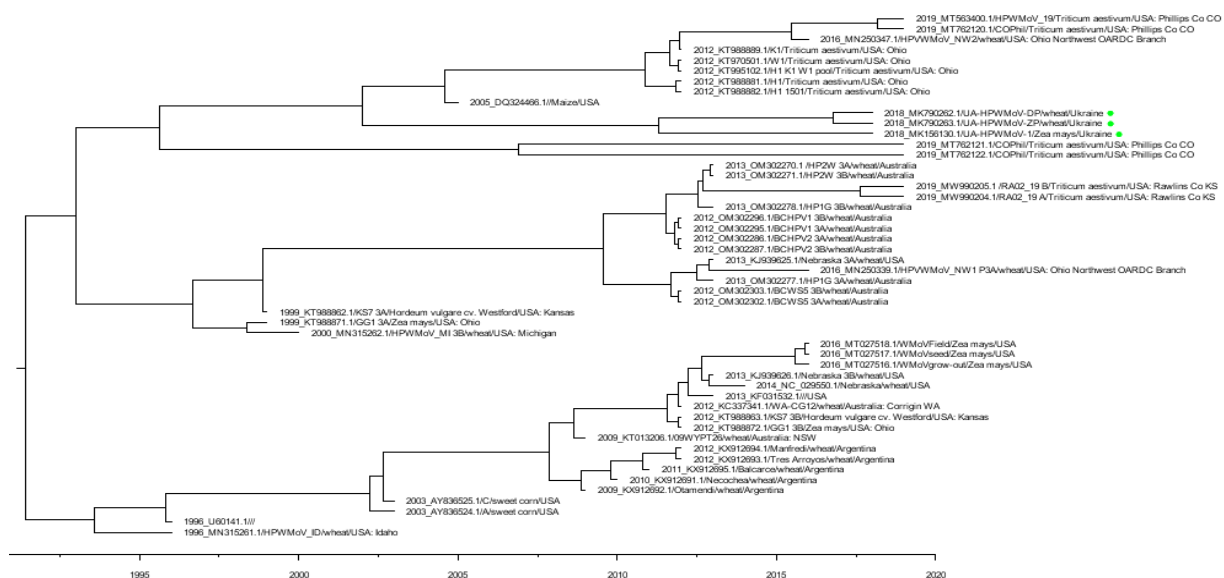


Рис. 6.9 — Філогенетичний аналіз послідовностей РНК3 ізолятів HPWMoV із застосуванням молекулярного годинника. Українські ізоляти відмічено зеленими крапками. Шкала відображає роки.

Отже, судячи з аналізу фрагменту послідовності РНК3 HPWMoV, попри високу генетичну варіабельність послідовностей українських ізолятів цього емаравірусу, вони мають спільне еволюційне минуле, що може бути свідченням походження цього вірусу з однієї спільної локації. Подальші дослідження допоможуть краще зрозуміти переважні механізми еволюції HPWMoV і шляхи його розповсюдження.

### 6.2.2. Молекулярно-генетичні властивості українських ізолятів HPWMoV за аналізом фрагмента геномного сегменту РНК6

Для перевірки наявності можливих реасортацій в геномах українських ізолятів було обрано використання пари праймерів до РНК6, оскільки в міжнародній базі даних було представлено більше (20 проти 4-12, не враховуючи відомі ізоляти з відомими, хоча б частково, послідовностями РНК3, яких в базі даних налічується близько п'ятдесяти) ізолятів, для яких було

зроблено секвенування цього геномного сегменту. Аналіз проводився тими самими методами, що і для фрагменту сегменту РНК3.

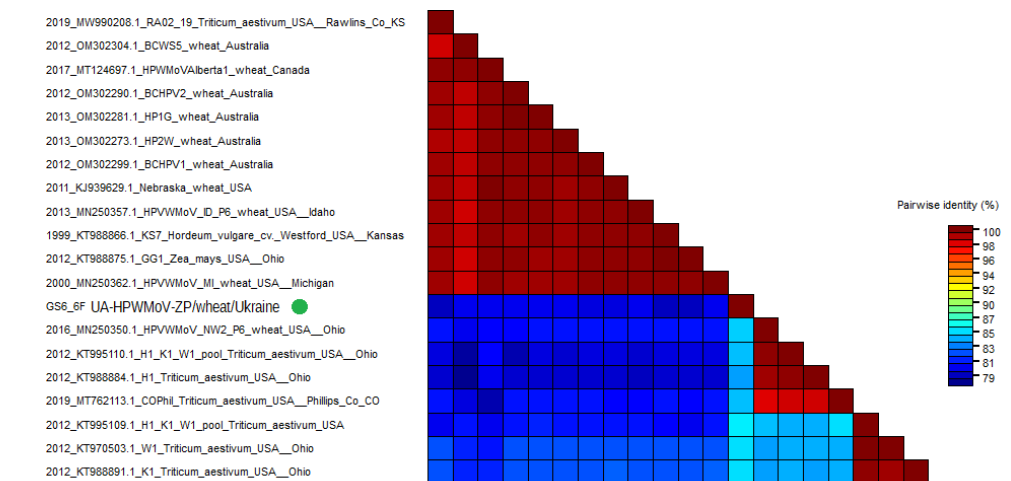
За результатами ЗТ-ПЛР і секвенування було отримано фрагмент послідовності сегменту РНК6 HPWМоV, що було ізольовано із зразку пшениці, яка була відібрана у Запорізькій області. На рисунку 6.10 представлено результати BLAST аналізу цієї послідовності. Як видно, найбільший відсоток ідентичності (більше 85%) із українським ізолятом мають ізоляти із США (КТ995109.1 і КТ970503.1).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Wheat mosaic virus segment RNA6 hypothetical protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Wheat mosaic virus</a>	422	422	100%	3e-113	85.37%	492	<a href="#">KT995109.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate W1 segment RNA6, complete sequence</a>	<a href="#">Wheat mosaic virus</a>	422	422	100%	3e-113	85.37%	1728	<a href="#">KT970503.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate K1 segment RNA6, complete sequence</a>	<a href="#">Wheat mosaic virus</a>	411	411	100%	7e-110	84.88%	1747	<a href="#">KT988891.1</a>
<a href="#">Emaravirus tritici isolate HPWМоV_NW2_P6 hypothetical protein gene, complete cds</a>	<a href="#">Emaravirus tritici</a>	394	394	96%	8e-105	84.89%	1797	<a href="#">MN250350.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus segment RNA6 hypothetical protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Wheat mosaic virus</a>	387	387	96%	1e-102	84.63%	1277	<a href="#">KT995110.1</a>
<a href="#">Wheat mosaic virus isolate H1 segment RNA6 hypothetical protein gene, partial cds</a>	<a href="#">Wheat mosaic virus</a>	381	381	96%	6e-101	84.38%	1041	<a href="#">KT988884.1</a>
<a href="#">Emaravirus tritici isolate COPhil_P6 hypothetical protein gene, complete cds</a>	<a href="#">Emaravirus tritici</a>	346	346	84%	2e-90	85.01%	1619	<a href="#">MT762113.1</a>
<a href="#">Emaravirus tritici isolate HPWМоV_ID_P6 hypothetical protein gene, complete cds</a>	<a href="#">Emaravirus tritici</a>	311	311	99%	8e-80	80.72%	1743	<a href="#">MN250357.1</a>
<a href="#">Emaravirus tritici isolate BCWS5 segment RNA6, complete sequence</a>	<a href="#">Emaravirus tritici</a>	311	311	99%	8e-80	80.72%	1721	<a href="#">OM302304.1</a>
<a href="#">Emaravirus tritici isolate BCHPV2 segment RNA6, complete sequence</a>	<a href="#">Emaravirus tritici</a>	311	311	99%	8e-80	80.72%	1794	<a href="#">OM302290.1</a>

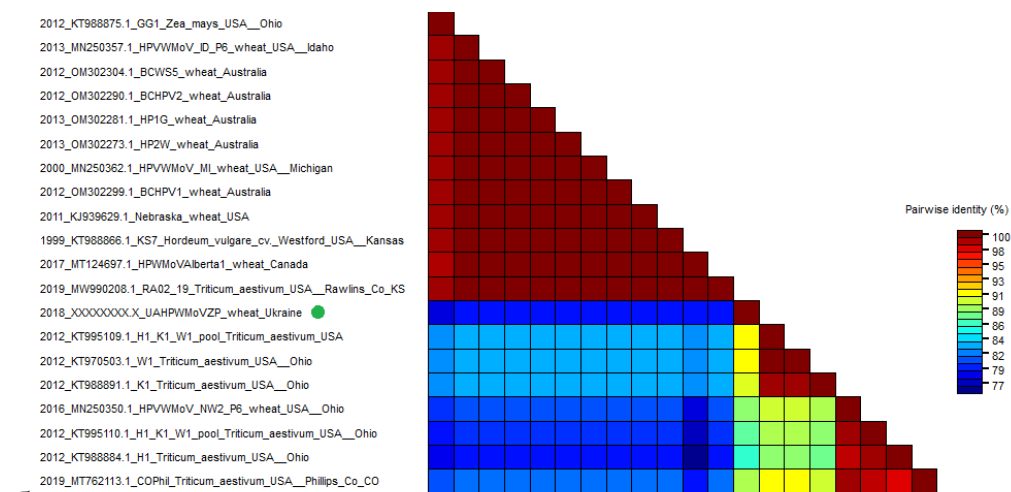
Рис.6.10 – Результати BLAST аналізу послідовності фрагменту сегменту РНК6 409 пн отриманої після секвенування продукту ПЛР зразка із пшениці на HPWМоV. Показано перші 10 результатів.

Перевірка гіпотези про переважання синонімічних заміщень над несинонімічними показала свою достовірність, що представлено на таблиці 6.5. Цікавим є те, що частина секвенсів, що мають вищу ідентичність із послідовністю українського ізоляту, мали, здебільшого, значно менший відсоток несинонімічних заміщень.





а.



б.

Рисунок 6.12 – теплові матриці ідентичності нуклеотидних (а) і амінокислотних (б) фрагментів послідовностей РНК6 ізолятів HPWMoV. Український ізолят відмічено зеленою крапкою.

Отримані за допомогою пакету програмного забезпечення SDTv1.2 графіки відсоткової ідентичності нуклеотидних і амінокислотних послідовностей фрагменту РНК6 HPWMoV (рис. 6.13) також показують поділ ізолятів на групу із високою ідентичністю послідовностей (всередині цієї групи) і окремі групи з низькою ідентичністю, однак, якщо на графіку порівняння нуклеотидних послідовностей видно диференціацію ізолятів з утворенням розподілу від 78% до 87% подібності, що об'єднують декілька піків, то на графіку порівняння амінокислотних послідовностей розподіл вже займає 75-91% подібності, але з

більш чітким поділом на ділянки 75-83% і 84-91%, що може свідчити про розподіл ізолятів на дві групи, одна з яких має нижчу ідентичність ізолятів всередині себе і, можливо, складається з кількох кластерів ізолятів.

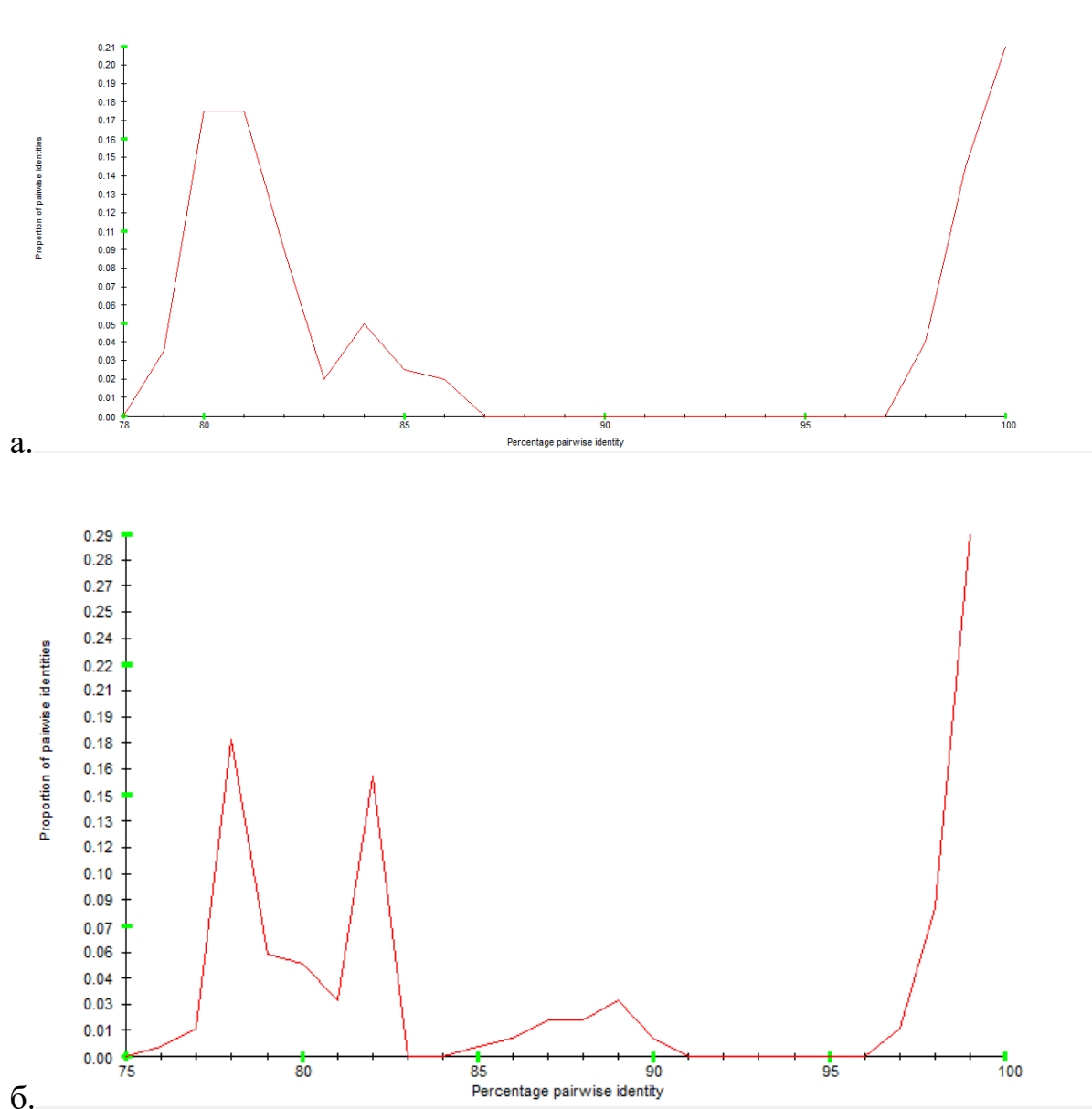


Рисунок 6.13 – Графіки відсоткової ідентичності фрагменту РНК6 нуклеотидних (а) і амінокислотних (б) послідовностей ізолятів HPWMoV.

Пошук рекомбінаційних подій, що було виконано за допомогою пакету програм RDP4, показав лише одну подій за методом RDP між українським ізолятом та ізолятом H1 (KT988884.1) з Огайо, США., але, найімовірніше, це

артефакт вирівнювання і не є результатом рекомбінації (рис. 6.14). Рекомбінацій між іншими ізолятами виявлено не було.

Event no.	Fnd in	Recomb.	Major parent	Minor parent	Detection methods						
					R	G	B	M	C	S	T
1	1	2018_XXXXXXXXX2012_KT988884		Unknown	+	-	-	-	-	-	-

Рис. 6.14 — Результати рекомбінаційного аналізу із застосуванням методів RDP (R), GENECONV (G), BOOTSCAN (B), MAXCHI (M), CHIMAERA (C), SISCAN (S), TOPAL (S)

Філогенетичний аналіз (рис. 6.15), який було проведено за допомогою програми MEGA7, також показав поділ ізолятів на дві основні клади. Український ізолят належить до групи А. Для представників цієї групи, окрім численних точкових відмінностей, характерна делеція в 3' некодуєчій послідовності, що починається на 1613 нуклеотиді (повної послідовності РНК6) і має довжину 3 нуклеотиди для одних ізолятів і 6 нуклеотидів для інших. Український ізолят має делецію в 3 нуклеотиди. Можливо, сегмент РНК6 ізолятів групи А також має два варіанти, які мають розбіжності в некодуєчій частині послідовності, як це було показано для послідовностей сегменту РНК3 так званої “Небраска-подібної” групи ізолятів. До групи А належать ізоляти, здебільшого, зі штату Огайо, США, а також ізолят з Колорадо. До інших групи належать ізоляти з різних країн (США, Канада, Австралія), а також з різних рослин-хазяїв (пшениці, кукурудзи, ячменю). Попри це, ізоляти з цієї групи мають високий відсоток ідентичності між собою.

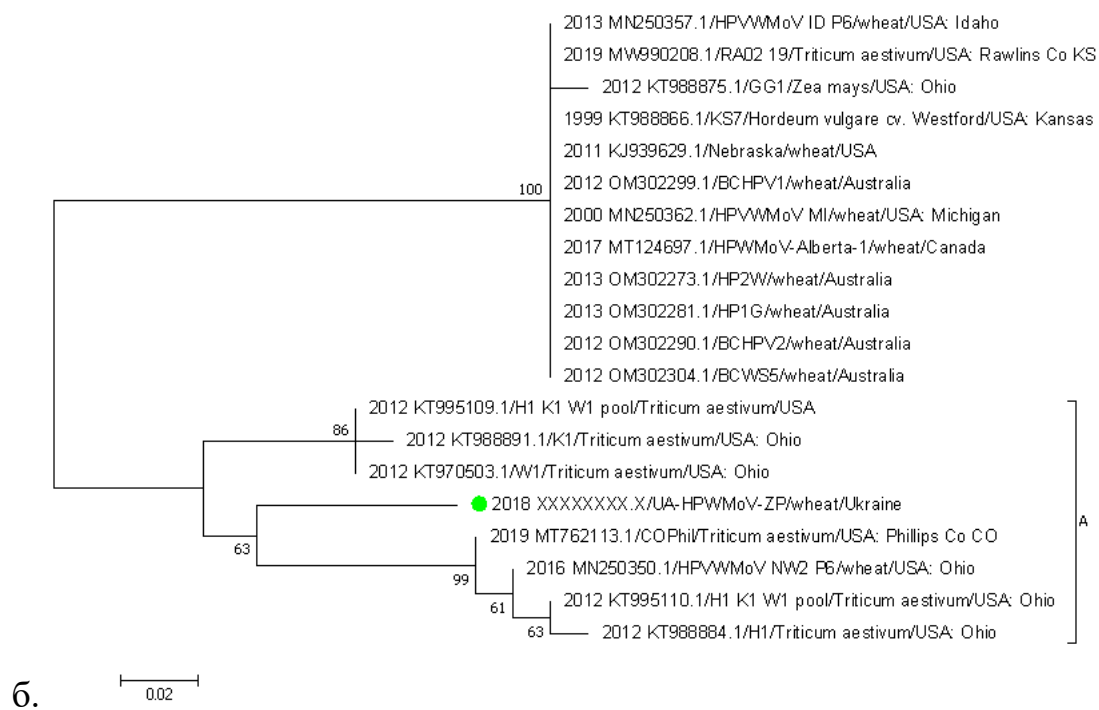
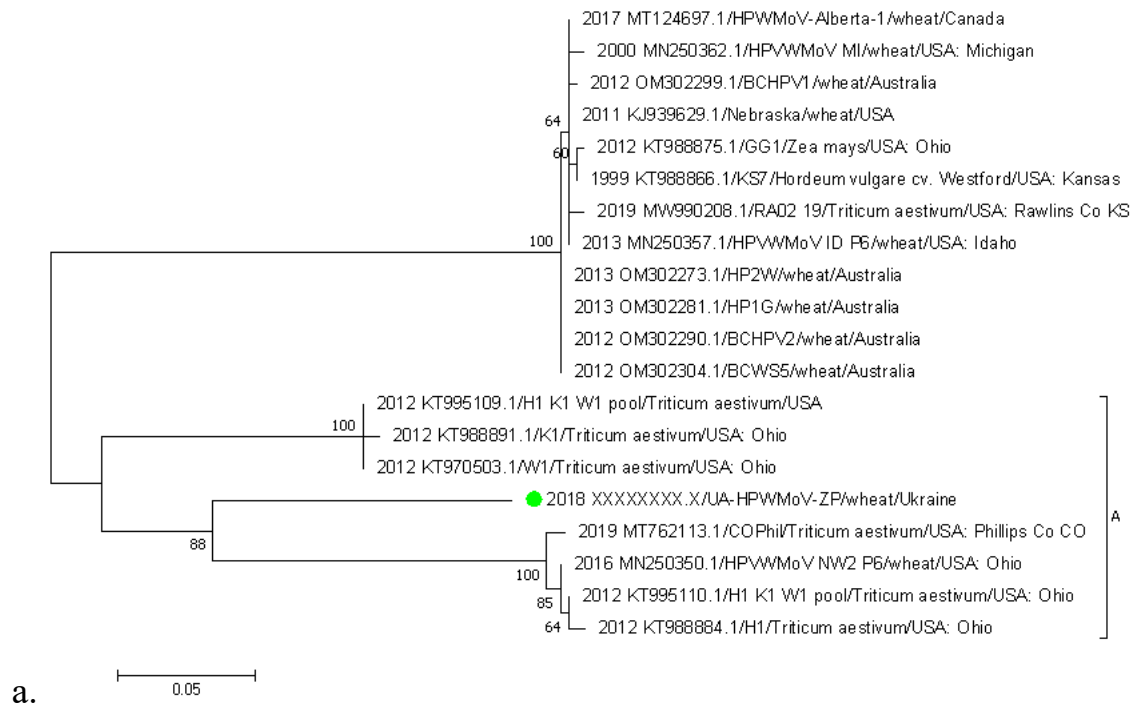


Рис.6.15 – Філогенетичний аналіз послідовностей РНК6 ізолятів HPWMoV. Філогенетичні дерева побудовані за методом Maximum Likelihood використовуючи нуклеотидні (а) і амінокислотні (б) фрагменти послідовностей РНК3 ізолятів HPWMoV із використанням моделей Kimura 2-parameter model і JTT matrix-based model для нуклеотидних і амінокислотних послідовностей

відповідно. Український ізолят HPWMoV, отриманий в ході цієї роботи, позначено зеленими точками. Числа на початках гілок – бутстреп підтримка, %.

Результати застосування методу молекулярного годинника під час проведення філогенетичного аналізу за допомогою програми BEAST представлено на рисунку 6.16. Український ізолят досі знаходиться всередині групи А, але відділення від інших ізолятів відбулось приблизно в 1995 році. Оскільки від цього часу нема інших ізолятів, тим більше з інших країн, можна припустити, що саме тоді HPWMoV міг потрапити на територію України.

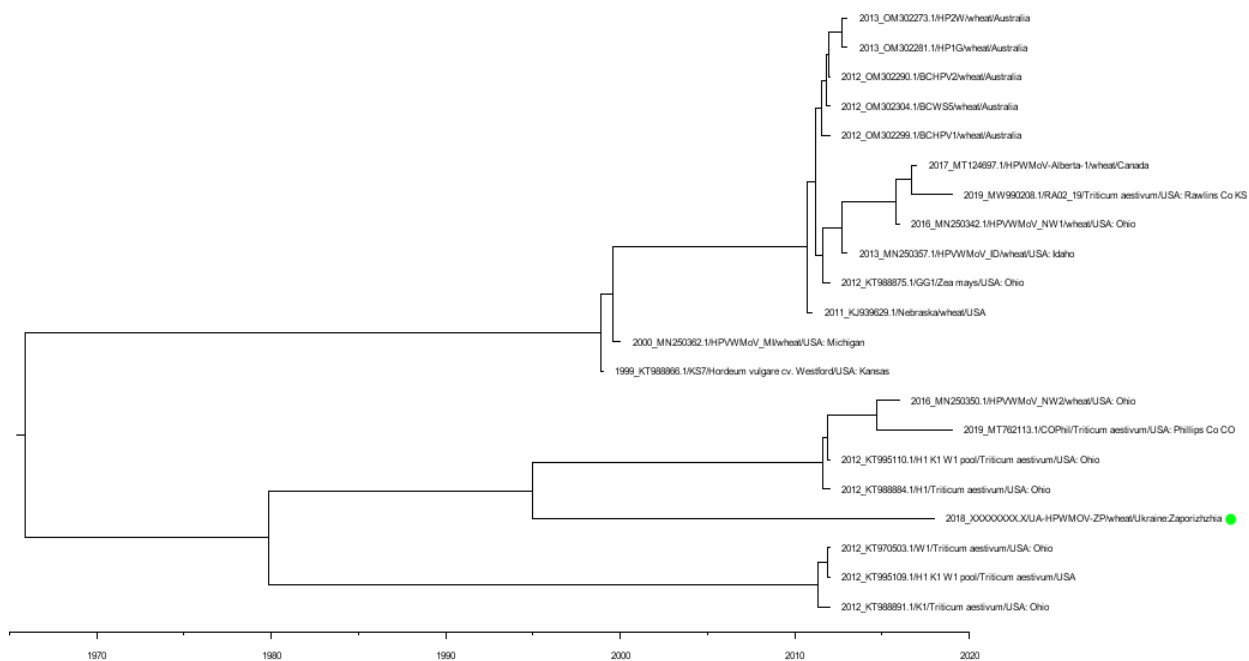


Рис. 6.16 — Філогенетичний аналіз послідовностей РНК6 ізолятів HPWMoV із застосуванням молекулярного годинника. Український ізолят відмічено зеленою крапкою. Шкала відображає роки.

Отже, дослідження фрагменту РНК6 українського ізоляту HPWMoV біоінформатичними методами показало його приналежність до однієї з двох клад — групи А. До цієї групи належать ізоляти зі США, в той час до групи В належать ізоляти з США, Австралії та Канади. Попри нижчі відсотки

ідентичності серед представників цієї групи, відділення предка українського ізоляту відбулось лише приблизно за 23 роки до моменту відбору зразку.

Дані результати опубліковані в наступних виданнях:

- Snihur, H., Pozhylov, I., Budzanivska, I. and Shevchenko, O., 2020. First report of High Plains wheat mosaic virus on different hosts in Ukraine. *Journal of Plant Pathology*, 102(2), pp.545-546.
- Pozhylov, I.; Snihur, H.; Shevchenko, T.; Budzanivska, I.; Liu, W.; Wang, X.; Shevchenko, O. Occurrence and Characterization of Wheat Streak Mosaic Virus Found in Mono- and Mixed Infection with High Plains Wheat Mosaic Virus in Winter Wheat in Ukraine. *Viruses* 2022, 14, 1220. <https://doi.org/10.3390/v14061220>
- Пожилов І., Снігур Г. Захворюваність та поширення вірусів злакових культур у 2020–2021 роках в Україні. *Вісник Київського Національного Університету Імені Тараса Шевченка*, с. 14-19, 3(90), 2022.
- Control of risks imposed by plant viruses as the component of biosecurity in Ukraine. Oleksiy Shevchenko, Kyrylo Tager, Illia Pozhylov, Halyna Snihur, Tetiana Shevchenko, Irena Budzanivska. The 5th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2021), July 01-03, 2021.
- HPWMOV is an emerging cereal virus in Ukraine. Illia Pozhylov, Halyna Snihur, Irena Budzanivska & Oleksiy Shevchenko. III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 1-3 September 2021.
- Long-term and current trends of cereal viruses in Ukraine. International conference Bioresources and viruses, 2019, p. 48, I. Pozhylov, H. Snihur, O. Shevchenko

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

Рід *Emaravirus* є новим не тільки для України, але і для всього світу. Кожного року за допомогою молекулярно-біологічних та біоінформатичних методів відкриваються все нові і нові представники цього роду. Таким чином, якщо у 2019 було відомо 19 представників роду *Emaravirus* і видів, що є подібними до емаравірусів, але не були включені в складу роду Міжнародним Комітетом з Таксономії Вірусів, то наразі, в 2023, таких видів вірусів налічується вже 33. Також з'являються нові дані щодо розповсюдження вже відомих емаравірусів, а також їх біологічних властивостей, хоча відносно цього нових публікацій стає все менше, що, з одного боку пов'язано як і з тим, що тепер потреба в дослідженні біології емаравірусів менша, оскільки вони поділяють багато спільних властивостей, тому більшість стверджень, що стосується одного емаравірусу, будуть справедливими і до всіх інших, так і з іншого боку з тим, що нові віруси відкриваються не класичними методами, а за допомогою секвенування нового покоління або дата-майнінгу, тому і характеристика нововідкритих вірусів ґрунтується, здебільше, на послідовностях геномних РНК.

В ході роботи було проведено скринінг зразків рослин-представників родів Розоцвіті та Злакові, що були отримані з більшості областей України, на наявність емаравірусів EMARaV, RRV, HPWMoV, RLBV, PCLSaV, BLMaV. В ході роботи відбирались рослини із вірусоподібними симптомами, а також рослини із симптомами інфестації ериофідними кліщами-переносниками емаравірусів. Таким чином було відібрано зразки (листя та гілки яблуневих, малини, ожини; листя троянд; листя та стебла злакових) із різноманітними симптомами: почервоніннями, некрозами, хлорозами, енаціями та галами на листках яблуневих; енаціями та хлорозами, некрозами на листках малини та

ожини, почервонінням та деформацією стебел троянд; штрихуватою мозаїкою, почервонінням, зниженим ростом, некрозами та кучерявістю листя злакові. Відбір зразків здійснювали в місті Києві і 13 областях України (Вінницька, Донецька, Дніпропетровська, Запорізька, Івано-Франківська, Київська, Львівська, Одеська, Полтавська, Черкаська, Чернігівська, Харківська, Хмельницька) різних регіонів (східні, центральні, південні, західні) та агрокліматичних зон: Полісся, лісостепової, степової.

Присутність двох з шести шуканих емаравірусів була доведена на території України: RLBV на рослинах малини в Київській області і HPWMoV на рослинах кукурудзи (у Вінницькій області) та пшениці (у Київській, Донецькій, Дніпропетровській, Харківській і Полтавській областях). Це перше свідчення присутності RLBV в Україні, дотепер цей вірус було виявлено лише в кількох інших країнах Європи. Також вперше в Україні було виявлено і HPWMoV. Раніше цей вірус виявляли у США, Аргентині, Австралії та Канаді (Rehanek 2022).

Скринінг різних областей України на присутність HPWMoV, що був проведений за допомогою ІФА, показав наявність цього вірусу у двох злакових рослинах (пшениці та кукурудзі), що широко культивуються на території України та становлять значну долю в експорті, а також в великих кількостях споживаються на внутрішньому ринку, таким чином граючи серйозну роль у вітчизняній економіці. Це може сигналізувати про проблеми в контролі якості посівного матеріалу та дотриманні заходів боротьби з розповсюдженням збудників хвороб рослин.

Було проведено аналіз симптомів відібраних рослин. На рослинах горобини спостерігались яскраві симптоми кільцевої плямистості, що, за літературними джерелами, є характерними при інфікуванні рослини EMARaV. Також було відібрано зразки інших симптоматичних яблуневих рослин, що можуть уражуватись цим вірусом (яблуні, груші, ірги), а також із симптомами кліщової інфекції. Попри це, не було виявлено цього вірусу в українських

зразках. Це можна пояснити як хибнонегативними результатами ПЛР, що пов'язано із складністю роботи з рослинами, які мають порівняно високий вміст фенольних речовин, що можуть завадити виділенню тотальної РНК та проходженню ЗТ-ПЛР, або із відсутністю вірусу у симптоматичних рослинах, а наявність симптомів в таких випадках зумовлена іншими чинниками.

Відібрані рослини троянд із симптомами почервоніння листків та стебел, хлорозами, некрозами та енаціями не виявились ураженими RRV. Слід відмітити невелику кількість рослин із вірусоподібними симптомами, що зустрічались на етапі відбору зразків, — здебільшого спостерігались рослини з грибковим ураженням. Наразі безсумнівні випадки детекції відомі лише із США, де RRV має широке розповсюдження, а також Індії, де, судячи з літературних джерел, дане захворювання має спорадичний характер розповсюдження. Можливо, карантинні заходи контролю, географічна ізоляваність та висока патогенність вірусу стримують його розповсюдження на інші континенти.

Рослини ожини, відібрані під час скринінгу мали різноманітні вірусоподібні симптоми: деформація листків, мозаїка, дрібні хлорози. BLMaV у відібраних зразках виявлено не було.

В результаті скринінгу було відібрано та протестовано рослини малини із деформацією листків та хлорозами. На одному із зразків із Київської області було детектовано RLbV. Цей вірус широко розповсюджений в Європі.

Рослини кукурудзи відбирались із наступними симптомами: хлорозами, смугастою мозаїкою, деформацією листків, некрозами і почервонінням, але HPWMoV було виявлено лише на одному зразку з Вінницької області із яскравими симптомами хлоротичної плямистості.

Також HPWMoV було виявлено на рослинах пшениці із симптомами, що виражались у появі широких і довгих жовтих смуг на лисках для випадків моноінфекції, а також смугастої мозаїки, некрозами і почервонінням у випадках

сумісної інфекції. Крім цього слід зазначити, що прояв симптомів залежав також від пори року, коли спостерігались симптоматичні рослини.

Кліщі-переносники емаравірусів були виявлені за типовими симптомами на рослинах-хазяях, а також за допомогою оптичної мікроскопії на рослинах пшениці, кукурудзи, малини, горобини, груші, яблуні, троянди, але тільки в двох випадках вірус і кліщ були знайдені в одному зразку. Звичайно, випадки знаходження кліща без емаравірусу можна пояснити тим, що кліщ був не уражений, або що отримані результати були хибнонегативними. Випадки виявлення пшениці та кукурудзи, що уражені емаравірусом, але не мали на собі кліщів можна пояснити або тим, що ці рослини були уражені шляхом насінневої передачі (що мало ймовірно само по собі не тільки для HPWMoV, але і для WSMV (Mishchenko 2018), а ще через те, що зазвичай уражені рослини були не поодинокими, а в складі групи, що займала площу близько одного м<sup>2</sup>, що свідчить про присутність кліща-переносника,), або ж тим, що від моменту відбору до дослідження зазвичай проходив деякий час, тому кліщі покидали листки відчувачи настання несприятливих умов. Завдяки використанню трансмісійної електронної мікроскопії в даній роботі було отримано зображення сферичних вірусоподібних часточок в зразках соку рослин, ураження яких емаравірусами біло підтверджено за допомогою ІФА та ЗТ-ПЛР. Звичайно, без застосування імунофлуоресцентної або імуноелектронної мікроскопії не можна стверджувати, що знайдені частинки належать емаравірусам, але у соці здорових рослин нами подібні артефакти не спостерігались.

Отже, в ході скринінгу симптоматичних рослин пшениці та кукурудзи, що були відібрані з десяти областей різних агрокліматичних зон України, було показано присутність HPWMoV на рослинах кукурудзи і пшениці. Це перший випадок детекції HPWMoV не тільки на території України, але і у Афроевразії. HPWMoV був виявлений у зразках з Вінницької, Харківської, Запорізької, Полтавської, Київської, Дніпропетровської та Донецької областей, що говорить про широкий ареал розповсюдження цього вірусу на території України. Вірус

було виявлено у зразках рослин сортів Гарантія одеська, Донецька 48, Достаток, Новосмуглянка, Подолянка, Скаген (Skagen), що говорить про чутливість даних сортів до цього патогену.

У світі найбільш географічно розповсюдженим є HPWMoV (рис.7). Цей вірус був знайдений у Північній та Південній Америках, Австралії, а тепер ще і в Україні, в той час як RLBV, згідно літературних даних, є менш розповсюдженим, і поки цей вірус знаходили тільки в країнах Європи (Rehanek 2022). Таку різницю можна пояснити як переважанням кількості досліджень з HPWMoV, оскільки злаки, що вражаються цим вірусом, становлять вищий економічний і гуманітарно-продовольчий інтерес, так і природними особливостями цих вірусів або більш інтенсивним міжконтинентальним обміном посадкового матеріалу злакових.

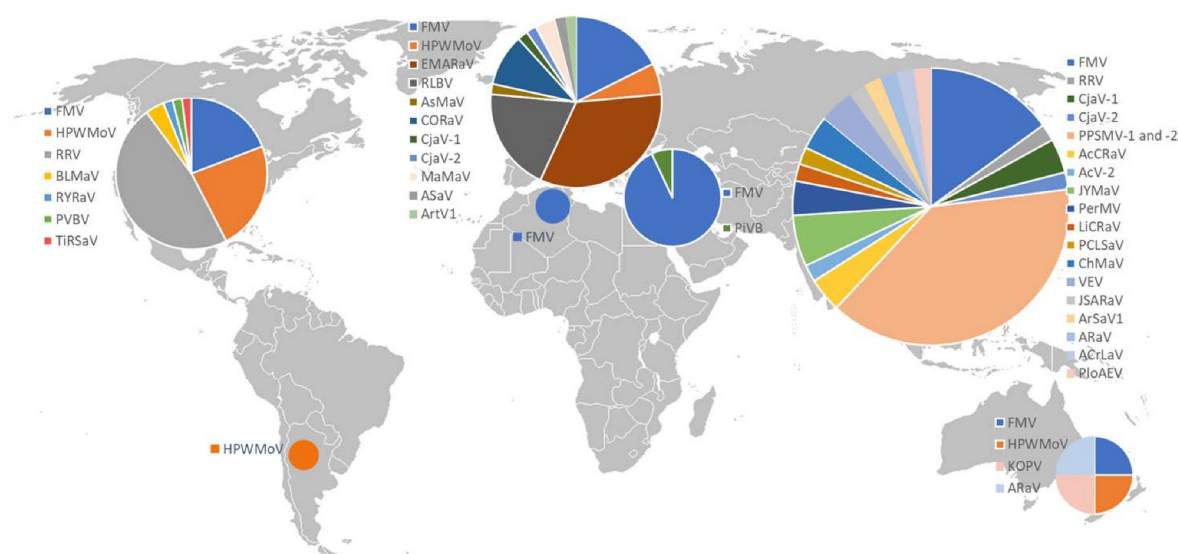


Рис. 7 — географічне розповсюдження представників роду *Emaravirus*. (Rehanek 2022).

Біоінформатичними методами дослідження було проаналізовано фрагменти послідовностей українських ізолятів. Було показано приналежність отриманих послідовностей до шуканих вірусів, виявлено ізоляти з найбільш високою ідентичністю, проведено рекомбінаційний аналіз, проведено попарне

порівняння послідовностей емаравірусів між собою, а також із українськими ізолятами, проведено філогенетичний аналіз.

Переважання синонімічних заміщень над несинонімічними для всіх проаналізованих послідовностей емаравірусів показує дію негативного (очищуючого) відбору, що спрямований на підтримку функціональної цілісності білків, що кодуються проаналізованими послідовностями.

Український ізолят RLBV є найбільш філогенетично близьким із деякими ізолятами з Фінляндії. Відомо, що всі ізоляти RLBV можна розділити на дві групи і український належить до групи I разом із частиною ізолятів з Фінляндії, Боснії і Герцеговини, Сербії і Словаччини. Загалом за послідовностями сегменту РНК3 RLBV ізоляти мають відносно високу ідентичність між собою, що особливо проявляється при аналізі амінокислотних послідовностей. Так, наприклад, на кладограмі, побудованій в ході філогенетичного аналізу амінокислотних послідовностей RLBV не видно поділу ізолятів на дві окремі групи. Попри це, в результаті використання методу молекулярного годинника показано, що ці дві групи ізолятів розійшлися в середині минулого сторіччя. Наявність в одних країнах ізолятів різних груп можна пояснити як обміном посадковим матеріалом між країнами, так і природнім поширенням вірусу. У другому випадку ареал розповсюдження RLBV має бути значно ширшим, охоплюючи країни між Боснією і Герцеговиною і Фінляндією.

Отже, судячи з аналізу фрагменту послідовності РНК3 HPWMoV, попри високу генетичну варіабельність послідовностей українських ізолятів цього емаравірусу, ізоляти, що були відібрані у США (особливо із штатів Колорадо, Канзас, Небраска) мають спільне еволюційне минуле із ізолятами, які були відібрані в Україні, що може бути свідченням походження цього вірусу з однієї спільної локації. Цікавим є те, що результати філогенетичного аналізу для різних сегментів одного ізоляту HPWMoV дещо відрізняються. За фрагментами сегменту РНК3 українські ізоляти формують окрему кладу, що має спільне походження з ізолятами групи А, і розділення трапилось лише за 14 років до

відбору, в той час як за аналізом сегменту РНК6 український ізолят досі знаходиться в групі А, і відділення від частини ізолятів цієї групи трапилось за 23 роки до відбору. Таким чином можна побачити, що, по-перше, еволюційна історія різних сегментів відрізняється, тому для отримання повнішого уявлення про еволюцію емаравірусів необхідна інформація про всі сегменти, а по-друге, швидкість накопичення еволюційних змін для різних сегментів не однакова. З іншого боку, метод молекулярного годинника також має свої обмеження, що проявляється в неточності датування коли мова йде про занадто короткі і занадто довгі проміжки часу. Крім цього, для методу грає роль характер набутих мутацій (нейтральність) та характер відбору (позитивний, негативний) (Fay 2003). Щодо українських ізолятів, то, можливо, перед потраплянням на територію України виникла реасортація сегментів з різних варіантів HPWMoV, внаслідок чого в Україну потрапив з таким набором сегментів, що мають трохи різну історію. З іншого боку, таку різницю у часі розходження на групи А і В можна пояснити обмеженнями методу молекулярного годинника, результати можуть спотворюватись як на занадто малих, так і на занадто коротких часових проміжках, а також внаслідок короткого проміжку часу, протягом якого було відібрано зразки.

## ВИСНОВКИ

В результаті проведення дисертаційного дослідження було вивчено біорізноманіття, розповсюдження і деякі властивості представників роду *Emaravirus* на території України. Так, вперше було знайдено HPWMoV і RLbV на рослинах пшениці, кукурудзи та малини, відповідно, в Україні, а також проаналізовано фрагменти геномних послідовностей українських ізолятів цих вірусів.

1. Комплексний скринінг симптоматичних рослин родин *Rosaceae* і *Poaceae* із залученням методів візуальної діагностики, оптичної та електронної мікроскопії підтвердив наявність в агроекосистемах України основних ланок епідемічного процесу, що сприяють поширенню емаравірусів, серед яких, зокрема, типові симптоми емаравірусної інфекції на чутливих рослинах (хлоротичної плямистості, мозаїки та некрозів на листках розоцвітих, та смугастої мозаїки на листках злакових), кліщі-переносники родини *Eriophyidae* на симптоматичних рослинах та вірусоподібні частинки розміром близько 100 нм у соці рослин.
2. Вперше в Україні за допомогою взаємодоповнюючих молекулярно-біологічних і серологічних методів ідентифіковані емаравірус плямистості листя малини (RLbV) на рослинах малини (родина *Rosaceae*) та емаравірус мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV) на рослинах пшениці і кукурудзи (родина *Poaceae*), який також вперше ідентифікований у Європі. Інші віруси роду *Emaravirus* (RRV, BLMaV, PCLSaV та EMARaV), типові для представників української флори, знайдені не були.
3. Філогенетичний аналіз українського ізоляту емаравірусу плямистості листя малини (RLbV) підтвердив його спорідненість з фінськими, сербськими, боснійськими і словацькими ізолятами, з якими він формує групу I. Українські ізоляти емаравірусу мозаїки пшениці Високих рівнин

(HPWMoV) утворюють окрему субкладу у групі А, до якої також належать ізоляти HPWMoV зі США.

4. Філогеографічний аналіз імовірного походження та часу появи українських емаравірусів методом молекулярного годинника свідчить, що український ізолят емаравірусу плямистості листя малини (RLBV), вірогідно, походить від одного з фінських ізолятів даного вірусу, і їх дивергенція відбулась на початку 2000-х років. При цьому дивергенція між українськими ізолятами емаравірусу мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV) та ізолятами даного вірусу зі США відбулась приблизно в 1995-2000 роках.
5. В результаті скринінгу комерційних насаджень підтверджено широке поширення емаравірусу мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV), який був ідентифікований в 7 областях України (Київська, Вінницька, Полтавська, Харківська, Дніпропетровська, Донецька та Запорізька). Встановлено, що у посівах озимої пшениці емаравірус мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV) циркулює переважно у змішаній інфекції з вірусом смугастої мозаїки пшениці (WSMV) (22% інфікованих зразків), тоді як моноінфекція виявилася менш типовою для даного патогена (13% інфікованих зразків).
6. Встановлено, що популярні в Україні сорти озимої пшениці Гарантія одеська, Донецька 48, Достаток, Новосмуглянка, Подолянка, Скаген (Skagen) є сприйнятливими до емаравірусу мозаїки пшениці Високих рівнин (HPWMoV). Всі досліджені сорти, крім сорту Новосмуглянка, також були уражені вірусом смугастої мозаїки пшениці (WSMV), що вказує на необхідність пошуку альтернативних сортів та ліній.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abdullahi, I., Bennypaul, H., Phelan, J., Aboukhaddour, R., & Harding, M. W. (2020). First report of High Plains wheat mosaic emaravirus infecting foxtail barley and wheat in Canada. *Plant Disease*, 104(12), 3272.
2. Ahn, K. K., Kim, K. S., Gergerich, R. C., Jensen, S. G., & Anderson, E. J. (1996). Comparative ultrastructure of double membrane-bound particles and inclusions associated with eriophyid mite-borne plant diseases of unknown etiology: a potentially new group of plant viruses. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 28(3), 345-355.
3. Alemandri, V., Mattio, M. F., Rodriguez, S. M., & Truol, G. (2017). Geographical distribution and first molecular detection of an Emaravirus, High Plains wheat mosaic virus, in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 149, 743-750.
4. Alford, D. V. (2012). *Pests of ornamental trees, shrubs and flowers: a colour handbook*. CRC Press.
5. Allington, W. B., Staples, R., & Viehmeyer, G. (1968). Transmission of rose rosette virus by the eriophyid mite *Phyllocoptes fructiphilus*. *Journal of Economic Entomology*, 61(5), 1137-1140.
6. Amrine Jr, J. W. "4.1. 2 *Phyllocoptes fructiphilus* and biological control of multiflora rose." *World Crop Pests*. Vol. 6. Elsevier, 1996. 741-749.
7. Amrine, J. W., & Zhao, S. (1998). Research on Aerial Dispersal of *Phyllocoptes fructiphilus* (Acari: Eriophyidae), Vector of Rose Rosette Disease. *American Rose*, 3, 28-29.
8. Amroun, A., Priet, S., de Lamballerie, X., & Quérat, G. (2017). Bunyaviridae RdRps: structure, motifs, and RNA synthesis machinery. *Critical reviews in microbiology*, 43(6), 753-778.

9. An, W., Li, C., Zhang, S., Yu, M., Cao, M., & Yang, C. (2022). A putative new emaravirus isolated from *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle with severe crinkle symptoms in China. *Archives of Virology*, 167(11), 2403-2405.
10. Atallah, O. O., Yassin, S. M., Shirley, N., & Verchot, J. (2022). Exploring the Host Range of Rose rosette Virus among Herbaceous Annual Plants. *Pathogens*, 11(12), 1514.
11. Babu, B., Jeyaprakash, A., Jones, D., Schubert, T. S., Baker, C., Washburn, B. K., ... & Paret, M. L. (2016). Development of a rapid, sensitive TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of Rose rosette virus using multiple gene targets. *Journal of virological methods*, 235, 41-50.
12. Babu, B., Washburn, B. K., Ertek, T. S., Miller, S. H., Riddle, C. B., Knox, G. W., ... & Paret, M. L. (2017). A field based detection method for Rose rosette virus using isothermal probe-based Reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay. *Journal of virological methods*, 247, 81-90.
13. Babu, B., Washburn, B. K., Miller, S. H., Poduch, K., Sarigul, T., Knox, G. W., ... & Paret, M. L. (2017). A rapid assay for detection of Rose rosette virus using reverse transcription-recombinase polymerase amplification using multiple gene targets. *Journal of virological methods*, 240, 78-84.
14. Babu, B., Washburn, B. K., Poduch, K., Knox, G. W., & Paret, M. L. (2016). Identification and characterization of two novel genomic RNA segments RNA5 and RNA6 in rose rosette virus infecting roses. *Acta virologica*, 60(2), 156-165.
15. Baizan-Edge, A., Cock, P., MacFarlane, S., McGavin, W., Torrance, L., & Jones, S. (2019). Kodoja: A workflow for virus detection in plants using k-mer analysis of RNA-sequencing data. *Journal of General Virology*, 100(3), 533-542.
16. Bauchan, G. B., Otero-Colina, G., Hammond, J., Jordan, R., & Ochoa, R. (2017, July). Rose rosette disease: It all started with a small mite. In VII

- International Symposium on Rose Research and Cultivation 1232 (pp. 227-232).
17. Baur, E. (1907). Über infektiöse Chlorosen bei Ligustrum, Laburnum, Praxinus, Sorbus und Ptelea. Gebr. Borntraeger.
  18. Benthack, W., Mielke, N., Büttner, C., & Mühlbach, H. P. (2005). Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *Archives of virology*, 150, 37-52.
  19. Bi, Y., Artola, K., Kurokura, T., Hytönen, T., & Valkonen, J. P. T. (2012). First report of Raspberry leaf blotch virus in raspberries in Finland. *Plant Disease*, 96(8), 1231-1231.
  20. Bi, Y., Tugume, A. K., & Valkonen, J. P. (2012). Small-RNA deep sequencing reveals *Arctium tomentosum* as a natural host of *Alstroemeria virus X* and a new putative *Emaravirus*.
  21. Botelho, S. R. A., Duarte, M. F., Barbosa, A. V., Lau, D., Sanches, M. M., & Fernandes, F. R. (2016). Interception of Wheat mosaic virus (WMoV) in Brazil in maize seeds from the United States. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51, 688-691.
  22. Burrows, M., Franc, G., Rush, C., Blunt, T., Ito, D., Kinzer, K., ... & Stack, J. (2009). Occurrence of viruses in wheat in the Great Plains region, 2008. *Plant Health Progress*, 10(1), 14.
  23. Buzkan, N., Chiumenti, M., Massart, S., Sarpkaya, K., Karadağ, S., & Minafra, A. (2019). A new emaravirus discovered in *Pistacia* from Turkey. *Virus research*, 263, 159-163.
  24. Byamukama, E., Tatineni, S., Hein, G., McMechan, J., & Wegulo, S. N. (2016). Incidence of Wheat streak mosaic virus, *Triticum mosaic virus*, and *Wheat mosaic virus* in wheat curl mites recovered from maturing winter wheat spikes. *Plant disease*, 100(2), 318-323.

25. Canestrini, G. (1890). La difesa dai parassiti. *Giornale d'Agricoltura*, Milano, 1(36), 282-283.
26. Cao, M., Liang, X., Mei, S., Yu, H., Zhang, S., & Wu, J. (2021). Mixed infection of an emaravirus, a crinivirus, and a begomovirus in *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi. *Frontiers in Microbiology*, 3839.
27. Chakraborty, P., Das, S., Saha, B., Karmakar, A., Saha, D., & Saha, A. (2017). Rose rosette virus: An emerging pathogen of garden roses in India. *Australasian Plant Pathology*, 46, 223-226.
28. Claros, N. A., Shires, M., Mollov, D., Hammond, J., Jordan, R., Ochoa-Corona, F., ... & Salamanca, L. R. (2022). Rose rosette Disease: A Diagnostic Guide. *Plant Health Progress*, 23(4), 482-491.
29. Conners, L. (1941). Twentieth Annual Report of the Canadian Plant Report Survey, 1940, p. 98.
30. Coutts, B. A., Cox, B. A., Thomas, G. J., & Jones, R. A. C. (2014). First report of Wheat mosaic virus infecting wheat in Western Australia. *Plant Disease*, 98(2), 285-285.
31. Delić, D., Radulović, M., Vakić, M., Sunulahpašić, A., Villamor, D. E. V., & Tzanetakis, I. E. (2020). Raspberry leaf blotch emaravirus in Bosnia and Herzegovina: population structure and systemic movement. *Molecular Biology Reports*, 47(6), 4891-4896.
32. Di Bello, P. L., Ho, T., & Tzanetakis, I. E. (2015). The evolution of emaraviruses is becoming more complex: seven segments identified in the causal agent of Rose rosette disease. *Virus research*, 210, 241-244.
33. Di Bello, P. L., Laney, A. G., Druciarek, T., Ho, T., Gergerich, R. C., Keller, K. E., ... & Tzanetakis, I. E. (2016). A novel emaravirus is associated with redbud yellow ringspot disease. *Virus research*, 222, 41-47.
34. Dieckmann, L., Robel, J., von Barga, S., & Büttner, C. (2013). 9-17 Detection of the European mountain ash ringspot associated virus (EMARaV) in several European countries. *Endophytes for plant protection: the state of the art*, 328.

35. Dobhal, S., Olson, J. D., Arif, M., Suarez, J. A. G., & Ochoa-Corona, F. M. (2016). A simplified strategy for sensitive detection of Rose rosette virus compatible with three RT-PCR chemistries. *Journal of virological methods*, 232, 47-56.
36. Dong, L., Lemmetty, A., Latvala, S., Samuilova, O., & Valkonen, J. P. T. (2016). Occurrence and genetic diversity of Raspberry leaf blotch virus (RLBV) infecting cultivated and wild *Rubus* species in Finland. *Annals of Applied Biology*, 168(1), 122-132.
37. Druciarek, T., Lewandowski, M., & Tzanetakis, I. (2021). Molecular phylogeny of *Phyllocoptes* associated with roses discloses the presence of a new species. *Infection, Genetics and Evolution*, 95, 105051.
38. Druciarek, T., Lewandowski, M., & Tzanetakis, I. E. (2019). First report of European mountain ash ringspot-associated emaravirus in *Sorbus aucuparia* in Poland. *Plant Disease*, 103(1), 166-166.
39. Druciarek, T., Lewandowski, M., & Tzanetakis, I. E. (2023). Identification of a second vector for rose rosette virus. *Plant Disease*, (ja).
40. Eckardt, N., Martin, T., & G. I. S Team. (1987). *Rosa multiflora*. Element Stewardship Abstract. The Nature Conservancy, Arlington, VA.
41. Elbeaino, T., Digiario, M., Mielke-Ehret, N., Muehlbach, H. P., & Martelli, G. P. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Fimoviridae. *Journal of General Virology*, 99(11), 1478-1479.
42. Elbeaino, T., Digiario, M., Uppala, M., & Sudini, H. (2015). Deep sequencing of dsRNAs recovered from mosaic-diseased pigeonpea reveals the presence of a novel emaravirus: pigeonpea sterility mosaic virus 2. *Archives of virology*, 160, 2019-2029.
43. Elbeaino, T., Marais, A., Faure, C., Trioano, E., Candresse, T., & Parrella, G. (2018). High-throughput sequencing reveals *Cyclamen persicum* Mill. as a natural host for Fig mosaic virus. *Viruses*, 10(12), 684.

44. Fan, X., Li, C., Zhang, Z., Ren, F., Hu, G., Shen, H., ... & Dong, Y. (2021). Identification and characterization of a novel emaravirus from grapevine showing chlorotic mottling symptoms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 694601.
45. Farber, C., Shires, M., Ong, K., Byrne, D., & Kurouski, D. (2019). Raman spectroscopy as an early detection tool for rose rosette infection. *Planta*, 250, 1247-1254.
46. Fay, J. C., & Wu, C. I. (2003). Sequence divergence, functional constraint, and selection in protein evolution. *Annual review of genomics and human genetics*, 4(1), 213-235.
47. Flock, R. A. (1955). Transmission of fig mosaic by eriophyid mite *Aceria ficus*. *Phytopathology*, 45, 52-54.
48. Forster, R. L., Seifers, D. L., Strausbaugh, C. A., Jensen, S. G., Ball, E. M., & Harvey, T. L. (2001). Seed transmission of the High Plains virus in sweet corn. *Plant Disease*, 85(7), 696-699.
49. Führling, M., & Büttner, C. (1995). Transmission experiments of viruses to woody seedlings (*Quercus robur* L. and *Sorbus aucuparia* L.) by grafting and mechanical inoculation. *Eur. J. For. Path*, 25, 129-135.
50. Führling, M., & Büttner, C. (1998). Nachweis von Tobamo-Viren in bergahorn (*Acer pseudoplatanus* L.) mit Scheckung und Blattdeformation. *Forstwissenschaftliches Centralblatt vereinigt mit Tharandter forstliches Jahrbuch*, 1(117), 92-97.
51. Gaafar, Y. Z., Herz, K., Hartrick, J., Fletcher, J., Blouin, A. G., MacDiarmid, R., & Ziebell, H. (2020). Investigating the pea virome in Germany—Old friends and new players in the field (s). *Frontiers in microbiology*, 11, 583242.
52. Gaskin, T. R., Tischendorf, M., Günther, I., Rehanek, M., Büttner, C., & von Bargen, S. (2021). Characterization of a Novel Emaravirus Affecting Ash Species (*Fraxinus* spp.) in Europe. *Forests*, 12(11), 1574.

53. Gordon, S. C., & Taylor, C. E. (1976). Some aspects of the biology of the raspberry leaf and bud mite (*Phyllocoptes* (Eriophyes) *gracilis* Nal.) Eriophyidae in Scotland. *Journal of Horticultural Science*, 51(4), 501-508.
54. Grimová, L., Marek, M., Konrady, M., & Ryšánek, P. (2015). Newly identified host range of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) and its distribution in the Czech Republic. *Forest Pathology*, 45(3), 177-189.
55. Grimová, L., Rysánek, P., & Zouhar, M. (2011). First report of European mountain ash ringspot-associated virus in the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology*, 93(4, Supplement).
56. Gupta, A. K., Hein, G. L., & Tatineni, S. (2019). P7 and P8 proteins of High Plains wheat mosaic virus, a negative-strand RNA virus, employ distinct mechanisms of RNA silencing suppression. *Virology*, 535, 20-31.
57. Gupta, A. K., Hein, G. L., Graybosch, R. A., & Tatineni, S. (2018). Octapartite negative-sense RNA genome of High Plains wheat mosaic virus encodes two suppressors of RNA silencing. *Virology*, 518, 152-162.
58. Harju, V., Adams, I., Flint, L., Jackson, L., Fowkes, A., Skelton, A., ... & Fox, A. (2017). A follow-up report regarding new hosts and distribution of European mountain ash ringspot-associated virus in *Sorbus* spp. in England. *New Disease Reports*, 36(1), 13-13.
59. Hassan, M., & Tzanetakis, I. E. (2019). Population structure, evolution and detection of blackberry leaf mottle-associated virus, an emerging emaravirus. *Plant Pathology*, 68(4), 775-782
60. Hassan, M., Di Bello, P. L., Keller, K. E., Martin, R. R., Sabanadzovic, S., & Tzanetakis, I. E. (2017). A new, widespread emaravirus discovered in blackberry. *Virus research*, 235, 1-5
61. Hassan, M., Sabanadzovic, S., Keller, K. E., Martin, R. R., & Tzanetakis, I. E. (2012). A putative new emaravirus associated with blackberry yellow vein disease. *Giornale di Patologia delle Piante*, 357.

62. Hindal, D. F., Amrine, J. W., Williams, R. L., & Stasny, T. A. (1988). Rose rosette disease on multiflora rose (*Rosa multiflora*) in Indiana and Kentucky. *Weed Technology*, 2(4), 442-444.
63. Hulo, C., De Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic acids research*, 39(suppl\_1), D576-D582.
64. Ilyas, M., Avelar, S., Schuch, U. K., & Brown, J. K. (2018). First report of an emaravirus associated with witches' broom disease and eriophyid mite infestations of the blue palo verde tree in Arizona. *Plant disease*, 102(9), 1863-1863.
65. Ishikawa, K., Maejima, K., Komatsu, K., Netsu, O., Keima, T., Shiraishi, T., ... & Namba, S. (2013). Fig mosaic emaravirus p4 protein is involved in cell-to-cell movement. *Journal of General Virology*, 94(3), 682-686.
66. Izhaki-Tavor, L. S., Yechezkel, I. G., Alter, J., & Dessau, M. (2023). RNA Encapsulation Mode and Evolutionary Insights from the Crystal Structure of Emaravirus Nucleoprotein. *Microbiology Spectrum*, e05018-22.
67. Jamalainen, E. A. (1957). On plant virus diseases and viruslike diseases in Finland. *Pubi. Finnish St. Agric. Res*, (158).
68. JENSEN, G. (1996). The High Plains virus. A newly emerging problem of maize and wheat with world wide implications. World Wide Web site at: <http://ianrwww.unl.edu/ianr/plntpath/nematode/PPATHPER/Hpv.htm>.
69. Jensen, S. G., & Lane, L. C. (1994). A new virus disease of corn and wheat in the High Plains. *Phytopathology*, 84, 1158.
70. Jensen, S. G., Lane, L. C., & Seifers, D. L. (1996). A new disease of maize and wheat in the High Plains. *Plant Disease*, 80(12), 1387-1390.
71. Jevremović, D., Leposavić, A., & Paunović, S. A. (2016). Raspberry leaf blotch virus-a common raspberry pathogen in Serbia. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 19(3), 147-156.

72. Jevremović, D., Laposavić, A., & Paunović, S. A. (2019). Genetic diversity of Raspberry leaf blotch emaravirus in red raspberries from Serbia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(1), e1004-e1004.
73. Jones, A. T., Gordon, S. C., & Jennings, D. L. (1984). A leaf-blotch disorder of tayberry associated with the leaf and bud mite (*Phyllocoptes gracilis*) and some effects of three aphid-borne viruses. *Journal of horticultural science*, 59(4), 523-528.
74. Jones, A. T., Kumar, P. L., Saxena, K. B., Kulkarni, N. K., Muniyappa, V., & Waliyar, F. (2004). Sterility mosaic disease—the “green plague” of pigeonpea: advances in understanding the etiology, transmission and control of a major virus disease. *Plant Disease*, 88(5), 436-445.
75. Jones, R. A., Vazquez-Iglesias, I., McGreig, S., Fox, A., & Gibbs, A. J. (2023). Genomic High Plains wheat mosaic virus sequences from Australia: Their phylogenetics and evidence for emaravirus recombination and reassortment. *Viruses*, 15(2), 401.
76. Jordan, R., Guaragna, M. A., & Hammond, J. (2016, June). Development of polyclonal and monoclonal antibodies to Rose rosette virus nucleoprotein. In XIV International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants 1193 (pp. 77-82).
77. Joseph, S. V. (2022). Influence of temperature on the vector of rose rosette disease, *Phyllocoptes fructiphilus*. *Southwestern Entomologist*, 47(2), 393-398.
78. Kallinen, A. K., Lindberg, I. L., Tugume, A. K., & Valkonen, J. P. T. (2009). Detection, distribution, and genetic variability of European mountain ash ringspot-associated virus. *Phytopathology*, 99(4), 344-352.
79. Katsiani, A., Stainton, D., Lamour, K., & Tzanetakis, I. E. (2020). The population structure of Rose rosette virus in the USA. *Journal of General Virology*, 101(6), 676-684.
80. Kegler, H. (1960). Das Ringfleckenmosaik der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.). *Journal of Phytopathology*, 37(2), 214-216.

81. Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217, 624-626.
82. Kormelink, R., Verchot, J., Tao, X., & Desbiez, C. (2021). The Bunyavirales: the plant-infecting counterparts. *Viruses*, 13(5), 842.
83. Kubota, K., Chiaki, Y., Yanagisawa, H., Takeyama, S., Suzuki, R., Kohyama, M., ... & Kadono, F. (2021). First report of pear chlorotic leaf spot-associated virus on Japanese and European pears in Japan and its detection from an eriophyid mite. *Plant Disease*, 105(4), 1234-1234.
84. Kubota, K., Chiaki, Y., Yanagisawa, H., Yamasaki, J., Horikawa, H., Tsunekawa, K., & Morita, Y. (2021). Novel degenerate primer sets for the detection and identification of emaraviruses reveal new chrysanthemum species. *Journal of Virological Methods*, 288, 113992.
85. Kubota, K., Usugi, T., Tomitaka, Y., Shimomoto, Y., Takeuchi, S., Kadono, F., ... & Tsuda, S. (2020). *Perilla* mosaic virus is a highly divergent emaravirus transmitted by *Shevtchenkella* sp. (Acari: Eriophyidae). *Phytopathology*, 110(7), 1352-1361.
86. Kulkarni, N. K., Kumar, P. L., Muniyappa, V., Jones, A. T., & Reddy, D. V. R. (2002). Transmission of Pigeon pea sterility mosaic virus by the eriophyid mite, *Aceria cajani* (Acari: Arthropoda). *Plant disease*, 86(12), 1297-1302.
87. Kumar, P. L. (1999). Studies on pigeonpea sterility mosaic disease: isolation and characterisation of the causal agent and assessment of genetic variation within and between populations of the mite vector, *aceria cajani* (Doctoral dissertation, Sri Venkateswara University (Tirupati)).
88. Kumar, P. L., Jones, A. T., & Reddy, D. V. R. (2003). A novel mite-transmitted virus with a divided RNA genome closely associated with pigeonpea sterility mosaic disease. *Phytopathology*, 93(1), 71-81.
89. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.

90. Kumar, S., Subbarao, B. L., & Hallan, V. (2017). Molecular characterization of emaraviruses associated with Pigeonpea sterility mosaic disease. *Scientific Reports*, 7(1), 1-20.
91. Kyrychenko, A. N., Shcherbatenko, I. S., & Kovalenko, A. G. (2021). Viruses of Wild Plants and Current Metagenomic Methods for Their Investigation. *Cytology and Genetics*, 55(3), 248-255.
92. Laney, A. G. (2010). Characterization of the causal agents of Rose rosette and Redbud yellow ringspot. University of Arkansas.
93. Laney, A. G., Keller, K. E., Martin, R. R., & Tzanetakis, I. E. (2011). A discovery 70 years in the making: characterization of the Rose rosette virus. *Journal of General Virology*, 92, 1727-1732.
94. Lebas, B. S. M., Ochoa-Corona, F. M., Elliott, D. R., Tang, Z., & Alexander, B. J. R. (2005). Development of an RT-PCR for High Plains virus indexing scheme in New Zealand post-entry quarantine. *Plant Disease*, 89(10), 1103-1108.
95. Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic acids research*, 46(D1), D708-D717.
96. Lin, W., Qiu, P., Jin, J., Liu, S., Ul Islam, S., Yang, J., ... & Wu, Z. (2017). The cap snatching of segmented negative sense RNA viruses as a tool to map the transcription start sites of heterologous co-infecting viruses. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2519.
97. Liu, D. Y., Tesh, R. B., Travassos da Rosa, A. P., Peters, C. J., Yang, Z., Guzman, H., & Xiao, S. Y. (2003). Phylogenetic relationships among members of the genus Phlebovirus (Bunyaviridae) based on partial M segment sequence analyses. *Journal of general virology*, 84(2), 465-473.
98. Liu, H., Wang, G., Yang, Z., Wang, Y., Zhang, Z., Li, L., ... & Qi, L. (2020). Identification and characterization of a pear chlorotic leaf spot-associated

- virus, a novel emaravirus associated with a severe disease of pear trees in China. *Plant Disease*, 104(11), 2786-2798.
99. Lu, Y., McGavin, W., Cock, P. J., Schnettler, E., Yan, F., Chen, J., & MacFarlane, S. (2015). Newly identified RNAs of raspberry leaf blotch virus encoding a related group of proteins. *Journal of General Virology*, 96(11), 3432-3439.
100. Mahmood, T., Hein, G. L., & Jensen, S. G. (1998). Mixed infection of hard red winter wheat with high plains virus and wheat streak mosaic virus from wheat curl mites in Nebraska. *Plant disease*, 82(3), 311-315.
101. Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., & Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus evolution*, 1(1).
102. Martin, R. R., MacFarlane, S., Sabanadzovic, S., Quito, D., Poudel, B., & Tzanetakis, I. E. (2013). Viruses and virus diseases of *Rubus*. *Plant disease*, 97(2), 168-182.
103. Martin, R. R., Tzanetakis, I. E., Gergerich, R., Fernandez, G., & Pesic, Z. (2003, July). Blackberry yellow vein associated virus: A new crinivirus found in blackberry. In X International Symposium on Small Fruit Virus Diseases 656 (pp. 137-142).
104. McGavin, W. J., Mitchell, C., Cock, P. J., Wright, K. M., & MacFarlane, S. A. (2012). Raspberry leaf blotch virus, a putative new member of the genus Emaravirus, encodes a novel genomic RNA. *Journal of General Virology*, 93(2), 430-437.
105. Mielke-Ehret, N., & Mühlbach, H. P. (2012). Emaravirus: a novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. *Viruses*, 4(9), 1515-1536.
106. Mielke-Ehret, N., Thoma, J., Schlattermund, N., & Mühlbach, H. P. (2010). Detection of European mountain ash ringspot-associated virus-specific RNA and protein P3 in the pear leaf blister mite *Phytoptus pyri* (Eriophyidae). *Archives of virology*, 155, 987-991.

107. Mielke, N., & Muehlbach, H. P. (2007). A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *Journal of General Virology*, 88(4), 1337-1346.
108. Mishchenko, L. T., Dunich, A. A., Mishchenko, I. A., Petrenkova, V. P., & Mukha, T. I. (2018). Monitoring of economically important wheat viruses under weather conditions change in Ukraine and investigation of seed transmission of Wheat streak mosaic virus. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24(4), 660-669.
109. Mishchenko, L. T., Dunich, A. A., Skrypkina, I. Y., & Kozub, N. O. (2019). Phylogenetic analysis of two Ukrainian isolates of Wheat streak mosaic virus. *Biopolymers and Cell*.
110. Mitra, M. (1931). Report of the Imperial Mycologist 1929-1930. *Sci. Rept. Imperial Agric. Res. Inst.(Pusa, India)*, 59-71.
111. Mohanasundaram, M. (1990). Studies on the genus *Aceria* (Acari: Eriophyidae) from south India. *Indian Journal of Acarology*, 12(1), 2.
112. Monterrosa, A., Iriarte, F. B., Paret, M. L., & Joseph, S. V. (2021). Effects of relative humidity on the vector of rose rosette disease, *Phyllocoptes fructiphilus* (Eriophyidae), and incidence of disease symptoms. *The Florida Entomologist*, 104(3), 173-177.
113. Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS one*, 9(9), e108277.
114. Nalepa, A. (1892). Les acarocécides de Lorraine (Suite). *Feuille jeun naturalistes Rev Mens Hist Nat, sér*, 3(22), 258.
115. Nalepa, A. (1898). *Acarina. Eriophyidae (Phytoptidae)*. *Das Tierrich*, (Edn 4).
116. Navia, D., de Mendonça, R. S., Skoracka, A., Szydło, W., Knihinicki, D., Hein, G. L., ... & Lau, D. (2013). Wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and

- transmitted viruses: an expanding pest complex affecting cereal crops. *Experimental and Applied Acarology*, 59, 95-143.
117. Nei, M., & Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular biology and evolution*, 3(5), 418-426.
118. Ochoa-Corona, F. M., Lebas, B. S. M., & Ward, L. I. (2015). New Zealand stresses that it is High Plains virus free, and the virus struggles with an identity crisis. *Journal of Virology*, 89(14), 7439.
119. Oliver, J. E., & Whitfield, A. E. (2016). The genus Tospovirus: emerging bunyaviruses that threaten food security. *Annual review of virology*, 3, 101-124.
120. Olmedo-Velarde, A., Park, A. C., Sugano, J., Uchida, J. Y., Kawate, M., Borth, W. B., ... & Melzer, M. J. (2019). Characterization of Ti ringspot-associated virus, a novel emaravirus associated with an emerging ringspot disease of *Cordyline fruticosa*. *Plant disease*, 103(9), 2345-2352.
121. Olschewski, S., Cusack, S., & Rosenthal, M. (2020). The cap-snatching mechanism of bunyaviruses. *Trends in microbiology*, 28(4), 293-303.
122. Otero-Colina, G., Ochoa, R., Amrine Jr, J. W., Hammond, J., Jordan, R., & Bauchan, G. R. (2018). Eriophyoid mites found on healthy and rose rosette diseased roses in the United States. *Journal of Environmental Horticulture*, 36(4), 146-153.
123. Pagenstecher, H. A. (1857). Ueber Milben, besonders die Gattung *Phytoptus*. *Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg* 1(2): 46-53
124. Paunović, S. A., & Jevremović, D. (2020). High proportion of mixed virus infections in raspberry plantations in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 35(1), 27-37.

125. Pleško, I. M., Marn, M. V., Lazarova, S., Peneva, V., Širca, S., & Urek, G. (2014). First detection of raspberry leaf blotch virus in red raspberry in Bulgaria. *Journal of Plant Pathology*, 96(2).
126. Pozhylov, I., & Snihur, H. (2022). INCIDENCE AND SPREAD OF CEREALS VIRUSES IN 2020–2021 IN UKRAINE. *Bulletin of Taras Shevchenko Kyiv National University. Biology*, 3(90)/2022,14-19.
127. POZHYLOV, I., SNIHUR, H., & BUDZANIVSKA, I. (2021). Phylogenetic analysis of Ukrainian isolate of raspberry leaf blotch virus. *AGROFOR*, 6(1).
128. Pozhylov, I., Snihur, H., Shevchenko, T., Budzanivska, I., Liu, W., Wang, X., & Shevchenko, O. (2022). Occurrence and Characterization of Wheat Streak Mosaic Virus Found in Mono-and Mixed Infection with High Plains Wheat Mosaic Virus in Winter Wheat in Ukraine. *Viruses*, 14(6), 1220.
129. Quaintance, A. L. (1912). The Leaf Blister Mite:(Eriophyes Pyri Pagenstecher) (No. 154). US Department of Agriculture, Bureau of Entomology.
130. Rabbidge, L. O., Blouin, A. G., Chooi, K. M., Higgins, C. M., & MacDiarmid, R. M. (2021). Characterisation and distribution of karaka Ōkahu purepure virus—A novel emaravirus likely to be endemic to New Zealand. *Viruses*, 13(8), 1611.
131. Raspe, O., Findlay, C., & Jacquemart, A. L. (2000). *Sorbus aucuparia* L. *Journal of Ecology*, 88(5), 910-930.
132. Rehanek, M., Karlin, D. G., Bandte, M., Al Kubrusli, R., Nourinejad Zarghani, S., Candresse, T., ... & Von Bargen, S. (2022). The Complex World of Emaraviruses—Challenges, Insights, and Prospects. *Forests*, 13(11), 1868.
133. Robel, J., Bandte, M., Mühlbach, H. P., von Bargen, S., & Büttner, C. (2013). Ein neuartiges Virus in *Sorbus aucuparia* L.: Nachweis und Verbreitung des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) A novel virus

- in *Sorbus aucuparia* L.: Detection and distribution of European mountain ash ringspot associated virus (EMARaV).
134. Robel, J., Büttner, T., Mühlbach, H. P., von Bargaen, S., & Büttner, C. (2013). First detection of European mountain ash ringspot-associated virus in *Sorbus aria* and *Sorbus intermedia*. In AAB Conference (Vol. 25, No. 27.09, p. 2013).
  135. Robel, J., Dieckmann, L., Mühlbach, H. P., von Bargaen, S., & Büttner, C. (2013). 9-2 Variability of the p3 and p4-coding genome region of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) in *Sorbus aucuparia* of different European regions. *Endophytes for plant protection: the state of the art*, 298.
  136. Robel, J., Dieckmann, L., von Bargaen, S., & Büttner, C. (2013). First detection of European mountain ash ringspot-associated virus in rowan trees in Scotland. *New Disease Reports*, 27, 13-13.
  137. Rohozinski, J., Epstein, A. H., & Hill, J. H. (2001). Probable mechanical transmission of a virus-like agent from rose rosette disease-infected multiflora rose to *Nicotiana* species. *Annals of applied biology*, 138(2), 181-186.
  138. Roßbach, J., Dieckmann, H. L., Büttner, T., Mühlbach, H. P., Von Bargaen, S., & Büttner, C. (2015). Genetic variability and phylogeny of European mountain ash ringspot-associated virus RNA3 and RNA4. *Forests*, 6(11), 4072-4087.
  139. Rumbou, A., Candresse, T., von Bargaen, S., & Büttner, C. (2020). A novel emaravirus identified in maple with leaf mottle symptoms by deep sequencing. *bioRxiv*, 2020-10. Bandte, M., Rehanek, M., Leder, B., von Bargaen, S., & Büttner, C. (2020). Identification of an emaravirus in a common Oak (*Quercus robur* L.) Conservation seed orchard in Germany: Implications for Oak health. *Forests*, 11(11), 1174.
  140. Sabanadzovic, S., & Abou Ghanem-Sabanadzovic, N. (2011, June). Emaravirus and cryptovirus infection of *Viburnum lantanooides* in the Great

Smoky Mountains National Park. In *Phytopathology* (Vol. 101, No. 6, pp. S158-S158). 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA: AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC.

141. Salazar, A., Ochoa-Corona, F. M., Olson, J. D., Babu, B., & Paret, M. (2021). Probing Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) targeting two gene-fragments of rose rosette virus. *Plos one*, 16(11), e0256510.
142. Samarfard, S., McTaggart, A. R., Sharman, M., Bejerman, N. E., & Dietzgen, R. G. (2020). Viromes of ten alfalfa plants in Australia reveal diverse known viruses and a novel RNA virus. *Pathogens*, 9(3), 214.
143. Seifers, D. L., Harvey, T. L., Louie, R., Gordon, D. T., & Martin, T. J. (2002). Differential transmission of isolates of the High Plains virus by different sources of wheat curl mites. *Plant disease*, 86(2), 138-142.
144. Seifers, D. L., Harvey, T. L., Martin, T. J., & Jensen, S. G. (1997). Identification of the wheat curl mite as the vector of the High Plains virus of corn and wheat. *Plant Disease*, 81(10), 1161-1166.
145. Seifers, D. L., Harvey, T. L., Martin, T. J., & Jensen, S. G. (1998). A partial host range of the High Plains virus of corn and wheat. *Plant disease*, 82(8), 875-879.
146. Seifers, D. L., Martin, T. J., Harvey, T. L., Fellers, J. P., & Michaud, J. P. (2009). Identification of the wheat curl mite as the vector of *Triticum mosaic virus*. *Plant Disease*, 93(1), 25-29.
147. Seifers, D. L., She, Y. M., Harvey, T. L., Martin, T. J., Haber, S., Ens, W., ... & Gordon, D. T. (2004). Biological and molecular variability among High Plains virus isolates. *Plant disease*, 88(8), 824-829.
148. Shang, J., Jia, Q., Zhang, L., Zhang, S., Du, J., Wang, W., & Shui, J. (2022). Occurrence and Molecular Variability of the Main Kiwifruit Viruses in the Sichuan Province of China. *Viruses*, 14(11), 2460.
149. Shimomoto, Y., Okada, T., Ikeda, K., Tatara, A., Hasegawa, Y., Yanagisawa, H., ... & Kubota, K. (2022). Japanese star anise ringspot-

- associated virus is a distinct emaravirus transmitted by the eriophyid mite (the family Diptilomiopidae). *Journal of General Plant Pathology*, 1-12.
150. Sicard, A., Pirolles, E., Gallet, R., Vernerey, M. S., Yvon, M., Urbino, C., ... & Blanc, S. (2019). A multicellular way of life for a multipartite virus. *Elife*, 8, e43599.
151. Snihur, H., Pozhylov, I., Budzanivska, I., & Shevchenko, O. (2020). First report of High Plains wheat mosaic virus on different hosts in Ukraine. *Journal of Plant Pathology*, 102, 545-546.
152. Solo, K. M., Collins, S. B., Shires, M. K., Ochoa, R., Bauchan, G. R., Schneider, L. G., ... & Windham, M. T. (2020). A survey of rose rosette virus and eriophyid mites associated with roses in the southeastern United States. *HortScience*, 55(8), 1288-1294.
153. Stewart, L. R. (2016). Sequence diversity of wheat mosaic virus isolates. *Virus Research*, 213, 299-303.
154. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ & Rambaut A (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 *Virus Evolution* 4, vey016.
155. Svensson, D., Perveen, R., Hirschfeld, C., Robel, J., & Mühlbach, H. P. (2014). In vitro cultures of *Sorbus aucuparia* sustain replication of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 119, 441-445.
156. Tatineni, S., & Hein, G. L. (2021). High Plains wheat mosaic virus: An enigmatic disease of wheat and corn causing the High Plains disease. *Molecular Plant Pathology*, 22(10), 1167-1179.
157. Tatineni, S., McMechan, A. J., Wosula, E. N., Wegulo, S. N., Graybosch, R. A., French, R., & Hein, G. L. (2014). An eriophyid mite-transmitted plant virus contains eight genomic RNA segments with unusual heterogeneity in the nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, 88(20), 11834-11845.

158. Urrutia, C. D., Romay, G., Shaw, B. D., & Verchot, J. (2022). Advancing the Rose rosette virus minireplicon and encapsidation system by incorporating GFP, mutations, and the CMV 2b silencing suppressor. *Viruses*, 14(4), 836.
159. Valkonen, J. P. T., & Rännäli, M. (2010). First Report of European mountain ash ringspot-associated virus in *Sorbus aucuparia* from Eastern Karelia, Russia. *Plant disease*, 94(7), 921-921.
160. Vazquez-Iglesias, I., Ochoa-Corona, F. M., Tang, J., Robinson, R., Clover, G. R., Fox, A., & Boonham, N. (2020). Facing Rose rosette virus: A risk to European rose cultivation. *Plant Pathology*, 69(9), 1603-1617.
161. Verchot, J., Herath, V., Jordan, R., & Hammond, J. (2023). Genetic Diversity among Rose Rosette Virus Isolates: A Roadmap towards Studies of Gene Function and Pathogenicity. *Pathogens*, 12(5), 707.
162. Verchot, J., Herath, V., Urrutia, C. D., Gayral, M., Lyle, K., Shires, M. K., ... & Byrne, D. (2020). Development of a reverse genetic system for studying rose rosette virus in whole plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(10), 1209-1221.
163. Vincenz, J., Bandte, M., Mielke-Ehret, N., Mühlbach, H. P., Schliesske, J., & Büttner, C. (2010). Investigations on the transmission of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV). *Julius-Kühn-Archiv*, (428), 369-370.
164. von Barga, S., Al Kubrusli, R., Gaskin, T., Furl, S., Hüttner, F., Blystad, D. R., ... & Büttner, C. (2020). Characterisation of a novel Emaravirus identified in mosaic-diseased Eurasian aspen (*Populus tremula*). *Annals of Applied Biology*, 176(2), 210-222.
165. Von Barga, S., Arndt, N., Robel, J., Jalkanen, R., & Büttner, C. (2013). Detection and genetic variability of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV) in Sweden. *Forest Pathology*, 43(5), 429-432.

166. von Bargaen, S., Bandte, M., Al Kubrusli, R., Jalkanen, R., & Büttner, C. (2020). First report of European mountain ash ringspot-associated virus in *Karpatisorbus x hybrida* in Finland. *New Disease Reports*, 42, 1-1.
167. Von Bargaen, S., Büttner, T., Mühlbach, H. P., Robel, J., & Büttner, C. (2014). First report of European mountain ash ringspot-associated virus in *Sorbus aucuparia* in Norway. *Plant Disease*, 98(5), 700-700.
168. von Bargaen, S., Dieckmann, H. L., Candresse, T., Mühlbach, H. P., Roßbach, J., & Büttner, C. (2019). Determination of the complete genome sequence of European mountain ash ringspot-associated emaravirus from *Sorbus intermedia* reveals two additional genome segments. *Archives of virology*, 164, 1937-1941.
169. von Bargaen, S., Tischendorf, M., & Büttner, C. (2018). First report of European mountain ash ringspot-associated virus in serviceberry (*Amelanchier* spp.) in Germany. *New Dis. Rep*, 37(19), 2044-0588.
170. Walia, J. J., & Falk, B. W. (2012). Fig mosaic virus mRNAs show generation by cap-snatching. *Virology*, 426(2), 162-166.
171. Walia, J. J., Salem, N. M., & Falk, B. W. (2009). Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. *Plant Disease*, 93(1), 4-10.
172. Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Alfenas-Zerbini, P., ... & Zerbini, F. M. (2022). Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Archives of virology*, 167(11), 2429-2440.
173. Wang, Y., Song, Y., Cao, M., Cheng, Q., Wu, J., & Hu, T. (2020). Identification of a novel emaravirus infecting lilac through next-generation sequencing. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(8), 2064-2071.
174. Windham, M., Windham, A., Hale, F., & Amrine Jr, J. (2014). Observations on rose rosette disease. *Rose*, 42(9), 56-62.

175. Yu, C., Karlin, D. G., Lu, Y., Wright, K., Chen, J., & MacFarlane, S. (2013). Experimental and bioinformatic evidence that raspberry leaf blotch emaravirus P4 is a movement protein of the 30K superfamily. *Journal of General Virology*, 94(9), 2117-2128.
176. Zhang, S., Yang, L., Ma, L., Tian, X., Li, R., Zhou, C., & Cao, M. (2020). Virome of *Camellia japonica*: discovery of and molecular characterization of new viruses of different taxa in camellias. *Frontiers in microbiology*, 11, 945.
177. Zheng, Y., Navarro, B., Wang, G., Wang, Y., Yang, Z., Xu, W., ... & Hong, N. (2017). Actinidia chlorotic ringspot-associated virus: a novel emaravirus infecting kiwifruit plants. *Molecular plant pathology*, 18(4), 569-581.
178. Zindović, J., Marn, M. V., & Pleško, I. M. (2015). First report of Raspberry leaf blotch virus in red raspberry in Montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 97(2).