

ГАЛАЄВ О. В.[✉], ГАЛАЄВА М. В.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортівивчення,
Україна, 65036, м. Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, ORCID: 0000-0001-8133-5184, 0000-0001-7247-2910

[✉] galaev7@ukr.net

ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ШТАМІВ ВІРУСІВ ЖОВТОЇ КАРЛИКОВОСТІ В ПОСІВАХ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ НА ПІВДНІ УКРАЇНИ ТА В УГОРЩИНІ

Мета. Виявлення вірусів жовтої карликовості у посівах м'якої пшениці на Півдні України та в Угорщині, а також ідентифікація штамів BYDV із використанням молекулярно-генетичних методів. **Методи.** Метод візуальної діагностики. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (RT-PCR). Електрофорез у поліакриламідному гелі. **Результати.** Проведено обстеження посівів м'якої пшениці на Півдні України та в Угорщині на наявність вірусів жовтої карликовості ячменю (BYDV), жовтої карликовості злаків (CYDV) та жовтої карликовості кукурудзи (MYDV). При дослідженні посівів пшениці з використанням молекулярно-генетичних методів віруси CYDV та MYDV не були виявлені. Вірус BYDV був виявлений як на Півдні України та і в Угорщині. На Україні (м. Одеса) виявлено два штами вірусу жовтої карликовості ячменю BYDV-PAS та BYDV-PAV. У посівах на Угорщині циркулював лише один штам цього вірусу BYDV-PAS. **Висновки.** Використання молекулярно-генетичних методів для ідентифікації вірусів BYDV, CYDV, MYDV та їх окремих типів (штамів) дозволить формувати ефективніші системи моніторингу фітозахворювань, прогнозувати спалахи інфекцій та запобігати епіфітотіям.

Ключові слова: пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.), вірус жовтої карликовості ячменю (BYDV), полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (RT-PCR), молекулярно-генетичні маркери.

Вірус жовтої карликовості ячменю (BYDV – *Barley Yellow Dwarf Virus*) є надзвичайно небезпечним патогеном не лише для ячменю, але й для пшениці та інших злакових культур [1–3]. Його поширення в посівах пшениці завдає суттєвих економічних збитків, особливо в регіонах з тривалою теплою осінню, що сприяє розвитку попелиць – переносників вірусу.

В результаті інфікування вірусом рослин пшениці зменшується висота рослин, що прямо впливає на біомасу, відбувається пожовтіння листя, що ускладнює фотосинтез, відбувається вкорочення та недорозвиненість колоса, що призводить до зменшення кількості зерен, знижується маса 1000 зерен, погіршується якість зерна. При сильному ураженні, особливо за раннього інфікування в осінній період, рослини пшениці можуть навіть загинути.

Залежно від сорту, фази зараження та погодних умов втрати врожаю пшениці можуть становити від 10 до 50%. У роки масового розмноження попелиць і відсутності захисту посівів втрати можуть бути катастрофічними [2, 4, 5].

Вірусні захворювання злакових культур, зокрема вірус жовтої карликовості ячменю (BYDV), становлять серйозну загрозу для аграрного сектору через значні втрати врожаю, зниження якості продукції та порушення фітосанітарного балансу. Ефективна система моніторингу є ключовим інструментом для своєчасного виявлення і локалізації вогнищ інфекції, що забезпечує прийняття адекватних заходів реагування.

Застосування молекулярних маркерів у діагностиці вірусних захворювань дозволяє: виявляти вірус на ранніх стадіях інфекції, ще до появи видимих симптомів; оцінювати рівень інфікування посівів для прийняття агротехнічних або хімічних заходів; забезпечити контроль за розповсюдженням переносників, зокрема попелиць. Класичні методи діагностики (візуальна оцінка, біологічні проби) не дозволяють швидко й точно визначити тип збудника, особливо у випадках змішаних інфекцій або нетипових проявів. Натомість методи полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (qPCR) та зворотної транскрипції з подальшою ПЛР (RT-PCR) забезпечують високу специфічність, чутливість і можливість одночасного тестування великої кількості зразків. Таким чином, викори-

© ГАЛАЄВ О. В., ГАЛАЄВА М. В.

стання молекулярних маркерів для моніторингу BYDV є необхідним елементом сучасного фітосанітарного нагляду, сприяє запобіганню епідеміям і забезпечує стабільність виробництва зернових культур [6, 7].

Вірус жовтої карликовості ячменю (BYDV) є комплексним патогеном, що включає низку штамів (серотипів), які істотно відрізняються між собою за вірулентністю, спектром рослин-хазяїв і переносників. Найбільш поширені типи BYDV – PAV, MAV, PAS, SGV [3]. Також до вірусів жовтої карликовості (YDV) належать вірус жовтої карликовості злаків CYDV (Cereal yellow dwarf virus) та вірус жовтої карликовості кукурудзи MYDV (Maize yellow dwarf virus), які представлені штамми CYDV-RPV та MYDV-RMV відповідно [8]. В деяких дослідженнях зазначені штами відносять до штамів BYDV.

Для ефективного управління фітосанітарною ситуацією важливо не лише виявляти віруси жовтої карликовості (YDV) у посівах пшениці та інших злакових культур, а й визначати, яким саме типом (штамом) заражені рослини. Ідентифікація різних типів вірусу жовтої карликовості ячменю (BYDV) є надзвичайно актуальною в сучасних дослідженнях з низки причин. По-перше, різні типи BYDV передаються різними видами попелиць. Знання конкретного штаму дає змогу точніше прогнозувати ризики зараження і відповідно застосовувати адекватні методи захисту. По-друге, існують сорти злакових культур, які мають стійкість або толерантність до певних штамів BYDV. Без точного визначення типу вірусу ефективна селекція та впровадження стійких сортів значно ускладнюються. Використання молекулярних методів для ідентифікації штамів BYDV дозволяє формувати ефективні системи моніторингу, прогнозування та запобігання епіфітотіям.

В Україні, як і в низці інших європейських країн, ідентифікація різних типів BYDV раніше не проводилася, і на сьогодні достеменно не відомо, які саме штами є найбільш поширеними на її території. Отже, метою нашого дослідження було виявлення вірусів жовтої карликовості у посівах на Півдні України та в Угорщині, а також ідентифікація штамів BYDV із використанням молекулярно-генетичних методів.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень слугували листя рослин пшениці з візуальними ознаками захворювань. Листя рослин були добрані у квітні та травні 2023 року на полях Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (м. Одеса), листя рослин з ознаками захворювань добрані у травні 2023 року на полях Cereal Research Non-Profit Ltd. (м. Сегед, Угорщина).

РНК виділяли з використанням «Набору реагентів для виділення РНК/ДНК Genomic RNA/DNA Extraction kit» (ТОВ «Виробнича фірма Сіместа», Україна) згідно інструкції. Вимірювання концентрації та оцінювання якості екстрагованої РНК здійснювали методом спектрофотометрії на спектрофотометрі «NanoDrop 2000» (ThermoScientific, Великобританія).

ПЛР зі зворотною транскрипцією 3Т-ПЛР проводили на термоциклері CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Реакційні суміші для виявлення різних штамів вірусу BYDV об'ємом 20 мкл містила наступні компоненти: суміш для одноетапної ПЛР зі зворотною транскрипцією 2×One-Step RT-PCR Mix (ТОВ «Виробнича фірма Сіместа», Україна); суміш специфічних праймерів (містить специфічні праймери для детекції певного типу вірусу, по 150 нМ кожного) - 5 мкл; РНК виділена з листя хворих рослин 15-30 нг / 5 мкл. Умови 3Т-ПЛР та послідовності специфічних праймерів наведено в наукових публікаціях [6, 7].

Продукти ампліфікації (10 мкл аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували у 12% неденатуруючому поліакриламідному гелі (ПААГ) у 1хTBE. Електрофорез у поліакриламідному гелі проводили за постійної напруги 400 V в апараті для вертикального гелі-електрофорезу. Візуалізацію продуктів електрофоретичного розподілу проводили імпрегуванням гелів нітратом срібла згідно з Budowle та інші. (1991). Відеозображення ампліфікованих фрагментів отримували за відеосистеми «omniDOC Gel Documentation System» («Cleaver Scientific», UK) згідно з інструкцією. Калібрування молекулярної маси отриманих ампліконів здійснювали з використанням стандарту pUC19/MspI та 20 bp DNA Ladder.

Результати та обговорення

На попередньому етапі досліджень проводили моніторинг посівів пшениці на наявність вірусних захворювань на полях Селекційно-

генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (м. Одеса) у квітні та травні 2023 року та на полях Cereal Research Non-Profit Ltd. (м. Сегед, Угорщина) у травні 2023 року. В результаті у м. Одеса було добрано 32 рослини пшениці м'якої з видимими ознаками захворювань, характерними для вірусних інфекцій, наприклад такими як хлороз та зміна кольору листя, почервоніння або пожовтіння, світло-зелені і жовті смуги, що тягнуться паралельно жилкуванню, відставання у рості.

З фрагментів листків усіх відібраних рослин було виділено РНК та проведено RT-PCR з використанням специфічних праймерів для виявлення вірусів BYDV, CYDV, MYDV і їхніх штамів (табл.). Під час дослідження зразків пшениці, зібраних на полях м. Одеси, вірус BYDV було виявлено у п'яти рослин. Найпоширенішим штамом виявився BYDV-PAS (рис.), який зафіксовано у чотирьох випадках (80 %), тоді як штам BYDV-PAV – лише в одній рослині (20 %). Інші штами, такі як BYDV-MAV та BYDV-SGV, на території СГІ-НЦНС (м. Одеса) не виявлено. Також не зафіксовано наявності вірусу жовтої карликовості злаків CYDV (Cereal yellow dwarf virus) та вірусу жовтої карликовос-

ті кукурудзи MYDV (Maize yellow dwarf virus), зокрема штамів CYDV-RPV і MYDV-RMV, серед посівів пшениці Півдня України.

Цікаво, що з 32 рослин із підозрою на вірусні захворювання на Півдні України вірус жовтої карликовості ячменю (BYDV) було виявлено лише у п'яти рослин (16 %). Інші рослини могли бути уражені такими вірусами, як вірус смугастої мозаїки пшениці (WSMV), вірус ґрунтової мозаїки пшениці (SBWMV), вірус карликовості пшениці (WDV) або вірус мозаїки пшениці (TriMV). Усі зазначені віруси є шкодо-чинними для пшениці та викликають симптоми, подібні до тих, що спричиняє BYDV.

При дослідженні посівів пшениці в Угорщині віруси CYDV та MYDV також не були виявлені. З досліджених восьми рослин, що були дібрані біля м. Сегед, вірус жовтої карликовості ячменю виявлено у п'яти рослин (63 %). Для всіх п'яти хворих рослин був характерний штам BYDV-PAS (рис.). Штamu BYDV-PAV на полях Угорщини не було виявлено. Можна зробити припущення, що BYDV є найбільш розповсюдженим вірусом на полях Угорщини і пре-валюючим штамом є саме BYDV-PAS.

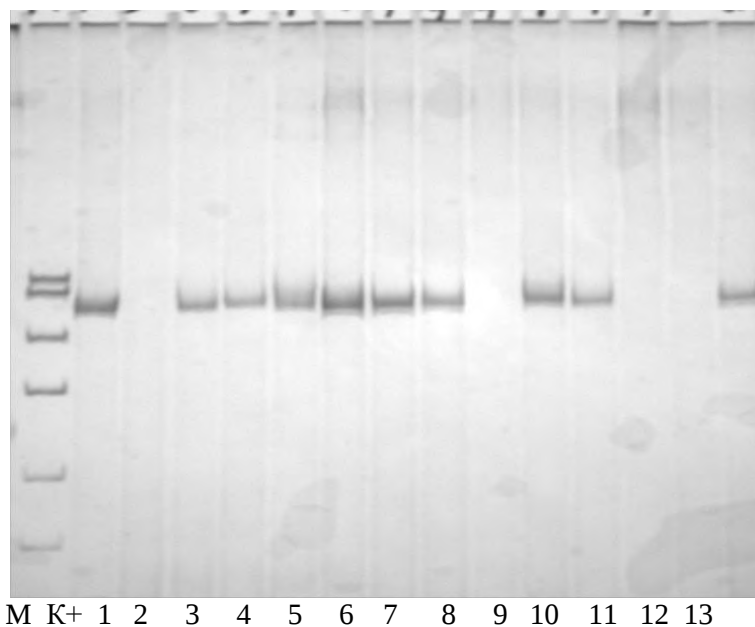


Рис. Детекція BYDV-PAS за допомогою RT-PCR. М - маркер молекулярної маси pUC19/*MspI*, 1 – зразок № 32, 2 - зразок № 27, 3 - зразок № 30, 4 - зразок № 31, 5 - зразок № 33, 6 - зразок № 34, 7 - зразок № 35, 8 - зразок № 36, 9 - зразок № 37, 10 - зразок № 38, 11 - зразок № 39, 12 - зразок № 40, 13 - зразок № 10.

Таблиця. Результати детекції вірусів BYDV, CYDV, MYDV та штамів BYDV в посівах м'якої пшениці на Півдні України та в Угорщині з використанням RT-PCR

№ зраз- ка	Місто	BYDV	Штам					
			BYDV- PAV	BYDV- MAV	BYDV- PAS	BYDV- SGV	CYDV- RPV	MYDV- RMV
1	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
2	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
3	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
4	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
5	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
6	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
7	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
8	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
9	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
10	м. Одеса	+	-	-	+	-	-	-
11	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
12	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
13	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
14	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
15	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
16	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
17	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
18	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
19	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
20	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
21	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
22	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
23	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
24	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
25	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
26	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
27	м. Одеса	+	-	-	+	-	-	-
28	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
29	м. Одеса	+	+	-	-	-	-	-
30	м. Одеса	+	-	-	+	-	-	-
31	м. Одеса	+	-	-	+	-	-	-
32	м. Одеса	-	-	-	-	-	-	-
33	м. Сегед	+	-	-	+	-	-	-
34	м. Сегед	+	-	-	+	-	-	-
35	м. Сегед	+	-	-	+	-	-	-
36	м. Сегед	-	-	-	-	-	-	-
37	м. Сегед	+	-	-	+	-	-	-
38	м. Сегед	+	-	-	+	-	-	-
39	м. Сегед	-	-	-	-	-	-	-
40	м. Сегед	-	-	-	-	-	-	-

Висновки

У результаті дослідження посівів м'якої пшениці на Півдні України та в Угорщині з використанням молекулярно-генетичних методів наявність вірусів жовтої карликовості ячменю (BYDV), жовтої карликовості злаків (CYDV) та жовтої карликовості кукурудзи (MYDV) виявлено наявність BYDV та відсутність CYDV та MYDV в обох регіонах.

На Півдні України виявлено два штамів вірусу жовтої карликовості ячменю BYDV-PAS та BYDV-PAV. В посівах Угорщині циркулював лише один штам цього вірусу BYDV-PAS.

Використання молекулярно-генетичних методів для ідентифікації вірусів BYDV, CYDV, MYDV та їх окремих типів (штамів) дозволить формувати більш ефективні системи моніторингу фітозахворювань, прогнозувати спалахи інфекцій та запобігати епіфітотіям.

References

1. Choudhury S., Al-Shammar D., Hu H., Meinke H., Westmore G., Birchall C., Larkin P. and Zhou M. A screening method to detect BYDV-PAV resistance in cereals under glasshouse conditions. *Plant Pathol.* 2018. Vol. 67. P. 1987–1996. <https://doi.org/10.1111/ppa.12888>.
2. Mc Namara L., Gauthier K., Walsh L., Thébaud G., Gaffney M., Jacquot E. Management of yellow dwarf disease in Europe in a post-neonicotinoid agriculture. *Pest Management Science.* 2020. Vol. 76. P. 2276–2285. <https://doi.org/10.1002/ps.5835>.
3. Miller W. A., Lozier Z. Yellow dwarf viruses of cereals: taxonomy and molecular mechanisms. *Annual Review of Phytopathology.* 2022. Vol. 60. P. 121–141. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-121421-125135>.
4. Dewar A. M., Ferguson A., Pell J. K., Nicholls C., Watts J. A Review of Pest Management in Cereals and Oilseed Rape in the UK | AHDB. AHDB Cereals & Oilseeds. 2016. Retrieved from: <https://ahdb.org.uk/a-review-of-pest-management-in-cereals-and-oilseed-rape-in-the-uk>.
5. Choudhury S., Larkin P., Meinke H., Hasanuzzaman M.D., Johnson P., Zhou M. Barley yellow dwarf virus infection affects physiology, morphology, grain yield and flour pasting properties of wheat. *Crop and Pasture Science.* 2019. Vol. 70. P. 16–25. <https://doi.org/10.1071/CP18364>.
6. Malmstrom C. M., Shu R. Multiplexed RT-PCR for streamlined detection and separation of barley and cereal yellow dwarf viruses. *Journal of Virological Methods.* 2004. Vol. 120. P. 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.04.005>.
7. Deb M., Anderson J. M. Development of a multiplexed PCR detection method for Barley and Cereal yellow dwarf viruses, Wheat spindle streak virus, Wheat streak mosaic virus and Soil-borne wheat mosaic virus. *Journal of Virological Methods.* 2008. Vol. 148. P. 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.015>.
8. Adams M. I., Lefkowitz E. I., King A. M. Q., Carstens E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of viruses. *Arch Virol.* 2014. Vol. 159. P. 2831–2841. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2114-3>.

HALAIEV O. V., HALAIEVA M. V.

Plant Breeding and Genetic Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolska Doroha, 3

DETECTION AND IDENTIFICATION OF YELLOW DWARF VIRUS STRAINS IN SOFT WHEAT CROPS IN SOUTHERN UKRAINE AND HUNGARY

Aim. Detection of yellow dwarf viruses in soft wheat crops in southern Ukraine and Hungary, as well as identification of BYDV strains using molecular genetic methods. **Methods.** Visual diagnostic method. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Polyacrylamide gel electrophoresis. **Results.** Surveys of soft wheat crops were conducted in southern Ukraine and Hungary to detect Barley yellow dwarf virus (BYDV), Cereal yellow dwarf virus (CYDV) and Maize yellow dwarf virus (MYDV). In the analysis of wheat crops using molecular genetic methods, CYDV and MYDV were not detected. BYDV was identified in both southern Ukraine and Hungary. In Ukraine (Odesa), two strains of Barley yellow dwarf virus – BYDV-PAS and BYDV-PAV – were detected. In the Hungarian wheat crops, only one strain, BYDV-PAS, was found to be circulating. **Conclusions.** The use of molecular genetic methods for the identification of BYDV, CYDV, MYDV viruses and their specific types (strains) enables the development of more effective plant disease monitoring systems, prediction of infection outbreaks, and prevention of epiphytotic.

Keywords: soft wheat (*Triticum aestivum* L.), Barley yellow dwarf virus (BYDV), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), molecular genetic markers.