

## Разработка и валидация методов диагностики вируса карликовости пшеницы (*Mastrevirus hordei*)

ЛОЗОВАЯ Е.Н.<sup>1</sup>, ПРИХОДЬКО Ю.Н.<sup>2</sup>, ЖИВАЕВА Т.С.<sup>3</sup>, БАШКИРОВА И.Г.<sup>4</sup>, ЕМЕЛЬЯНОВА А.А.<sup>5</sup>, ШНЕЙДЕР Ю.А.<sup>6</sup>

<sup>1,2,3,4,5,6</sup> ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150

<sup>6</sup> ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева), г. Москва, Россия, 127434

<sup>1</sup>ORCID: 0000-0001-8612-5127,  
e-mail: evgeniyaf@mail.ru

<sup>2</sup>ORCID: 0009-0004-9176-407X,  
e-mail: prihodko\_yuri59@mail.ru

<sup>3</sup>ORCID: 0009-0008-8312-2666,  
e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

<sup>4</sup>ORCID: 0000-0001-9014-4179,  
e-mail: bashkirova@mail.ru

<sup>5</sup>ibsh505505@gmail.com

<sup>6</sup>ORCID ID: 0000-0002-7565-1241  
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

### АННОТАЦИЯ

Вирус карликовости пшеницы (Wheat dwarf virus, или *Mastrevirus hordei*; акроним – WDV) является вредоносным патогеном пшеницы, ячменя, ржи, тритикале, овса и многочисленных видов многолетних злаковых трав. Потери урожая пшеницы в результате заражения этим вирусом могут достигать 100%. Переносчиком WDV является полосатая цикадка (*Psammotettix striatus* L.), широко распространенная на территории РФ.

Для разработки методических рекомендаций по выявлению и идентификации WDV было проведено испытание тест-системы для ИФА фирмы Loewe Biochemica GmbH (Германия), двух тест-систем для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) и семи пар праймеров для классической ПЦР.

Установлено, что испытываемая тест-система для ИФА к WDV характеризуется достаточно высокой специфичностью к целевому объекту и может быть рекомендована для проведения скрининговых тестов на наличие этого вируса. Аналогичное заключение сделано также в отношении праймеров и зонда RTIC-F/ RTIC-R/ RTIC-Probe (Wang et al., 2016), которые позволяют диагностировать изоляты штаммов WDV-B и WDV-W с высокой специфичностью, чувствительностью и воспроизводимостью тестов. Установлено, что праймеры WDV-40F/WDV-806R и WDV-WFb/WDV-WRb

## Development and validation of methods for diagnosing Wheat dwarf virus (WDV) (*Mastrevirus hordei*)

EVGENIA N. LOZOVAYA<sup>1</sup>, YURI N. PRIKHODKO<sup>2</sup>, TATIANA S. ZHIVAeva<sup>3</sup>, IDA G. BASHKIROVA<sup>4</sup>, ANASTASIA A. EMELANOVA<sup>5</sup>, YURI A. SHNEYDER<sup>6</sup>

<sup>1,2,3,4,5,6</sup> All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU “VNIKCR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

<sup>6</sup> Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia, 127434

<sup>1</sup>ORCID: 0000-0001-8612-5127,  
e-mail: evgeniyaf@mail.ru

<sup>2</sup>ORCID: 0009-0004-9176-407X,  
e-mail: prihodko\_yuri59@mail.ru

<sup>3</sup>ORCID: 0009-0008-8312-2666,  
e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

<sup>4</sup>ORCID: 0000-0001-9014-4179,  
e-mail: bashkirova@mail.ru

<sup>5</sup>ibsh505505@gmail.com

<sup>6</sup>ORCID ID: 0000-0002-7565-1241  
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

### ABSTRACT

Wheat dwarf virus (WDV), or *Mastrevirus hordei*, is a harmful pathogen of wheat, barley, rye, triticale, oats, and numerous species of perennial cereal grasses. Wheat yield losses due to infection by this virus can reach 100%. WDV is transmitted by *Psammotettix striatus* L. Widely spread in the Russian Federation.

To develop guidelines for the detection and identification of WDV, a test system for ELISA by Loewe Biochemica GmbH (Germany), two test systems for real-time PCR and 7 pairs of primers for classical PCR were tested.

The WDV ELISA test system tested was found to be characterized by a sufficiently high specificity for the target and can be recommended for screening tests for this virus. A similar conclusion was reached regarding the RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe primers and probe (Wang et al., 2016), which enable the diagnosis of WDV-B and WDV-W isolates with high specificity, sensitivity, and reproducibility. It was established that the WDV-40F/WDV-806R and WDV-WFb/WDV-WRb primers

позволяют диагностировать изоляты штаммов WDV-W и WDV-B, тогда как праймеры WDV-F/WDV-R, WDV-T-F/WDV-T-R и WDV-1F/WDV-WRb характеризуются специфичностью к штамму WDV-W, а праймеры WDV-H-F/WDV-H-R и WDV-WFb/WDV-4R – специфичностью к штамму WDV-B. Для проведения подтверждающих тестов на наличие WDV отработаны протоколы классической ПЦР с праймерами WDV-WFb/WDV-WRb и WDV-F/WDV-R, обеспечивающие высокую эксклюзивность, инклюзивность и чувствительность тестов.

**Ключевые слова.** Иммуноферментный анализ, молекулярная диагностика, полимеразная цепная реакция, праймеры, секвенирование.

## ВВЕДЕНИЕ



Зерновые культуры имеют важнейшее значение для обеспечения продовольственной безопасности нашей страны. По данным Росстата, урожай зерновых в России в 2022, 2023 и 2024 гг. составил соответственно 157,67 млн тонн, 144,96 млн тонн и 124,96 млн тонн. В 2024 г.

было произведено 82,4 млн тонн зерна пшеницы, 16,7 млн тонн зерна ячменя, 13,2 млн тонн зерна кукурузы и 12,6 млн тонн зерна прочих культур. По итогам 2025 г. ожидается сбор урожая зерновых не менее 135 млн тонн, в том числе пшеницы – не менее 93,5 млн тонн.

Одной из причин снижения урожайности зерновых культур являются вирусные болезни. В настоящее время на зерновых культурах известно не менее 128 фитопатогенных вирусов, относящихся к 36 родам 19 таксономических семейств. Растения пшеницы заражают не менее 62 вирусов, а растения кукурузы, ячменя и ржи – соответственно 52, 37 и 28 вирусов (CABI, 2025). В ФГБУ «ВНИИКР» проводились многолетние исследования зараженности посевов зерновых культур вирусами и другими фитопатогенными организмами, а также сорными растениями (Кулакова и др., 2022, Хорина Н.А. и др., 2023, Приходько и др., 2024, Живаева Т.С. и др., 2025).

Одним из наиболее вредоносных патогенов пшеницы является вирус карликовости пшеницы (Wheat dwarf virus, или *Mastrevirus hordei*; акроним – WDV). WDV заражает пшеницу, ячмень, рожь, тритикале, овес и не менее 25 видов многолетних злаковых трав, включая такие повсеместно распространенные растения, как костер безостый (*Bromus inermis* Leyss.), метлица обыкновенная (*Apera spica-venti* (L.) P.Beauv.), мятлик луговой (*Poa pratensis* L.), мятлик однолетний (*Poa annua* L.), овсюг (*Avena fatua* L.), райграс пастбищный (*Lolium perenne* L.), ячмень мышиный (*Hordeum murinum* L.) (Nygren et al., 2014; Pfrieme et al., 2023).

Вирус распространен в 17 странах Европы, включая сопредельные с Российской Федерацией Польшу, Украину, Финляндию и Эстонию, а также в Ираке, Иране, Китае, Сирии, Турции, Египте,

enable the diagnosis of isolates of the WDV-W and WDV-B strains, while the WDV-F/WDV-R, WDV-T-F/WDV-T-R and WDV-1F/WDV-WRb primers are characterized by specificity to the WDV-W strain, and the WDV-H-F/WDV-H-R and WDV-WFb/WDV-4R primers are specific to the WDV-B strain. To conduct confirmatory tests for the presence of WDV, classical PCR protocols with the WDV-WFb/WDV-WRb and WDV-F/WDV-R primers have been developed, ensuring high exclusivity, inclusiveness and sensitivity of tests.

**Key words.** Enzyme-linked immunosorbent assay, molecular diagnostics, polymerase chain reaction, primers, sequencing.

## INTRODUCTION



Grain crops are crucial for ensuring Russia's food security. According to Rosstat, the grain harvest in Russia in 2022, 2023, and 2024 amounted to 157.67 million tons, 144.96 million tons, and 124.96 million tons, respectively. In 2024, 82.4 million tons of wheat, 16.7 million tons of barley, 13.2 million tons of corn, and 12.6 million tons of other grains were produced. By the end of 2025, the grain harvest is expected to be at least 135 million tons, including at least 93.5 million tons of wheat.

One of the reasons for the decline in grain crop yields is viral diseases. Currently, at least 128 phytopathogenic viruses belonging to 36 genera of 19 taxonomic families are known to infect grain crops. Wheat plants are infected by at least 62 viruses, and corn, barley, and rye plants by 52, 37, and 28 viruses, respectively (CABI, 2025). FGBU "VNIICR" has conducted long-term studies of the infestation of grain crops by viruses and other phytopathogenic organisms, as well as weeds (Kulakova et al., 2022, Khorina N.A. et al., 2023, Prikhodko et al., 2024, Zhivaeva T.S. et al., 2025).

One of the most harmful pathogens of wheat is the wheat dwarf virus, or *Mastrevirus hordei*. WDV infects wheat, barley, rye, triticale, oats, and at least 25 species of perennial grasses, including such common plants as *Bromus inermis* Leyss., *Apera spica-venti* (L.) P.Beauv., *Poa pratensis* L., *Poa annua* L., *Avena fatua* L., *Lolium perenne* L., *Hordeum murinum* L. (Nygren et al., 2014; Pfrieme et al., 2023).

The virus is widespread in 17 European countries, including Poland, Ukraine, Finland, and Estonia, which border the Russian Federation, as well as in Iraq, Iran, China, Syria, Turkey, Egypt, Zambia, and Tunisia (CABI, 2025). It is included in the list of quarantine pests in Egypt.

Замбии и Тунисе (CABI, 2025). Входит в перечень карантинных вредных организмов Египта.

Название вируса происходит от его основных характеристик: нарушения роста побегов и ненормального образования многочисленных слабо развитых побегов, что приводит к развитию симптомов карликовости. Уже осенью пораженные WDV растения озимого ячменя и озимой пшеницы выделяются на поле желтым цветом и очень высокой степенью кущения. В течение зимы инфицированные осенью растения могут погибнуть, что приводит к изреженности посевов. Выжившие растения часто имеют карликовый вид, их колосья могут быть стерильными или образуют щуплозерно.

Симптомы сначала появляются на самых молодых листьях, а затем переходят на более старые листья. На листьях развивается хлороз начиная с кончиков и краев листьев. Характерным признаком является деформация самого молодого листа. Верхняя часть листьев пшеницы иногда приобретает красноватый оттенок.

Симптомы на растениях озимого ячменя аналогичны симптомам на озимой пшенице, но без образования красной окраски. Яровой ячмень реагирует меньшей степенью карликовости и пожелтения листьев. На растениях озимой ржи часто развивается покраснение листьев. У яровой ржи наблюдается лишь незначительная депрессия развития, немногочисленные пятна на листьях и отсутствие нарушений генеративных органов. У растений овса наблюдается незначительная депрессия развития, пожелтение и светло-красная окраска листьев.

Вызываемые WDV симптомы визуально очень схожи с симптомами, вызываемыми вирусом желтой карликовости ячменя (BYDV). Два этих вируса могут быть дифференцированы лишь с помощью серологических и/или молекулярных методов диагностики (Manurung et al. 2004; Nygren et al., 2014; Mishchenko et al., 2022; Pfrieme et al., 2023).

Вирус карликовости пшеницы является представителем рода *Mastrevirus* семейства *Geminiviridae*.

Как и у других геминивирусов, вирионы WDV состоят из двух неполных икосаэдров размером 30×18 нм. Нуклеокапсид в общей сложности состоит из 22 капсомеров, в свою очередь состоящих из 110 белковых субъединиц, которые формируют типичный для геминивирусов вирион квазиизометрической формы, состоящий из двоянных вирионов. Вирионы энкапсидированы единственным белком оболочки с молекулярной массой 28 кДа (Brunt et al., 1996).

Геном WDV состоит из единственной молекулы одноцепочечной кольцевой ДНК, состоящей из 2733-2749 нуклеотидов. Геномная ДНК содержит четыре открытые рамки считывания (ОРС), каждая из которых кодирует по одному белку. ОРС V1 и V2 с плюс-смысловой последовательностью нуклеотидов кодируют, соответственно, белок оболочки (СР) и транспортный белок (МР). ОРС С1 и С2 с антисмысловой последовательностью нуклеотидов кодируют, соответственно, ассоциированный с репликацией белок (RepA) и белок инициации репликации (Rep). ОРС с плюс-смысловыми и антисмысловыми последовательностями

The virus's name derives from its primary characteristics: impaired shoot growth and the abnormal formation of numerous underdeveloped shoots, leading to the development of dwarfing symptoms. Already in the fall, winter barley and winter wheat plants infected with WDV are noticeable in the field by their yellow color and very high tillering rate. During the winter, fall-infected plants may die, resulting in sparse crops. Surviving plants often have a dwarfed appearance, with sterile ears or shrunken grain.

Symptoms first appear on the youngest leaves and then progress to older leaves. Chlorosis develops on the leaves, beginning at the tips and margins. A characteristic sign is the youngest leaf deformation. The upper surface of wheat leaves sometimes takes on a reddish tint.

Symptoms in winter barley plants are similar to those in winter wheat, but without the red coloration. Spring barley responds with a lesser degree of dwarfing and yellowing of leaves. Winter rye plants often develop reddening of leaves. Spring rye exhibits only minor developmental delay, a few leaf spots, and no damage to reproductive organs. Oat plants exhibit minor developmental delay, yellowing, and light red leaf coloration.

The symptoms caused by WDV are visually very similar to those caused by barley yellow dwarf virus (BYDV). These two viruses can only be differentiated using serological and/or molecular diagnostic methods (Manurung et al. 2004; Nygren et al., 2014; Mishchenko et al., 2022; Pfrieme et al., 2023).

WDV is a member of the *Mastrevirus* genus of the *Geminiviridae* family.

Like other geminiviruses, WDV virions consist of two incomplete icosahedra measuring 30 × 18 nm. The nucleocapsid consists of a total of 22 capsomeres, which in turn consist of 110 protein subunits, which form the quasi-isometric virion typical of geminiviruses, consisting of double virions. The virions are encapsidated by a single envelope protein with a molecular mass of 28 kDa (Brunt et al., 1996).

The WDV genome consists of a single molecule of single-stranded circular DNA, consisting of 2733-2749 nucleotides. Genomic DNA contains four open reading frames (ORFs), each encoding one protein. ORFs V1 and V2, with a plus-sense nucleotide sequence, encode the coat protein (CP) and the transport protein (MP), respectively. ORFs C1 and C2, with an antisense nucleotide sequence, encode the replication-associated protein (RepA) and the replication initiation protein (Rep), respectively. ORFs with plus-sense and antisense sequences are separated by a large (LIR) and short (SIR) non-coding intergenic sequences (Wei et al., 2024).

WDV is characterized by two groups of isolates – WDV-W and WDV-B – that specialize in infecting wheat and barley, respectively. The identity of the whole-genome nucleotide sequences of these strains does not exceed 84%. There are only a few reports of the detection of barley strain isolates on wheat, while the

разделены большой (LIR) и короткой (SIR) некодирующими межгенными последовательностями (Wei et al., 2024).

Для WDV характерно наличие двух групп изолятов – WDV-W и WDV-B, специализирующихся, соответственно, на заражении пшеницы и ячменя. Идентичность полногеномных последовательностей нуклеотидов этих штаммов не превышает 84%. Имеются лишь немногочисленные сообщения о выявлении изолятов ячменного штамма на пшенице, тогда как пшеничный штамм достаточно часто встречается на ячмене (Tobias et al., 2011; Pfrieme et al., 2023; Wei et al., 2024).

Идентичность последовательностей нуклеотидов внутри группы WDV-W обычно составляет не менее 98%. Изоляты группы WDV-B являются более вариабельными и могут отличаться по последовательности нуклеотидов на 6% и более. Наиболее вариабельными участками генома WDV являются большой (LIR) и короткий (SIR) межгенные участки (Kundu et al., 2009; Pfrieme et al., 2023; Wei et al., 2024).

Переносчиком WDV является полосатая цикадка (*Psammotettix striatus* L.). В зарубежной литературе этот вид часто фигурирует под синонимическими названиями *Psammotettix alienus* Dahlb. и *Psammotettix provincialis* Rib.

*Psammotettix striatus* представляет собой голарктический вид, обитающий на лугах, пахотных землях и залежных участках. В Европейской части Российской Федерации распространена повсеместно, кроме районов Крайнего Севера. Распространена также в Камчатская области, Хабаровском и Приморском краях. *Psammotettix striatus* является полифагом и питается на многочисленных растениях семейства *Poaceae*. Сообщалось также о возможности питания этой цикадки на некоторых двудольных растениях, таких как люцерна, морковь и амброзия полыннолистная. Зимует в стадии яйца. В умеренном климатическом поясе развивается от двух до четырех поколений полосатой цикадки в год в зависимости от условий окружающей среды (Бей-Биенко, 1972; Орлов, 2006).

*Psammotettix striatus* распространяет WDV полуперсистентным способом, т. е. вирус проникает в слюнные железы особей цикадки, длительное время сохраняется в них, но не передается потомству через яйца. WDV способны передавать как имаго, так и все личиночные стадии цикадки. Как правило, первичное заражение WDV растений озимого ячменя и озимой пшеницы происходит взрослыми особями цикадки, мигрирующими на поля с многолетних злаковых трав в осенний период (Brunt et al., 1996).

Наблюдающееся потепление климата способствует удлинению периода активности *Psammotettix striatus*, успешной перезимовке и распространению этого вида в новые места обитания, что привело к увеличению значимости WDV на большей части Европы (Pfrieme et al., 2023).

WDV не передается при механической инокуляции, не передается контактным путем между растениями, не распространяется семенами и пылью, не сохраняется в почве (CABI, 2025).

WDV характеризуется чрезвычайно высокой вредоносностью. На Украине было установлено,

wheat strain is quite common on barley (Tobias et al., 2011; Pfrieme et al., 2023; Wei et al., 2024).

The nucleotide sequence identity within the WDV-W group is typically at least 98%. Isolates of the WDV-B group are more variable and can differ in nucleotide sequence by 6% or more. The most variable regions of the WDV genome are the large intergenic region (LIR) and short intergenic region (SIR) (Kundu et al., 2009; Pfrieme et al., 2023; Wei et al., 2024).

The vector of WDV is *Psammotettix striatus* L. In international literature, this species often appears under synonymous names *Psammotettix alienus* Dahlb. and *Psammotettix provincialis* Rib.

*Psammotettix striatus* is a Holarctic species that inhabits meadows, arable lands, and fallow lands. In the European part of the Russian Federation, it is widespread, except for the regions of the Far North. It is also widespread in Kamchatka Oblast, Khabarovsk Krai and Primorsky Krai. *Psammotettix striatus* is polyphagous and feeds on numerous plants of the *Poaceae* family. It has also been reported that this leafhopper can feed on some dicotyledonous plants, such as alfalfa, carrots, and common ragweed. It overwinters in the egg stage. In the temperate climate zone, two to four generations of *Psammotettix striatus* develop per year, depending on environmental conditions (Bei-Bienko, 1972; Orlov, 2006).

*Psammotettix striatus* spreads WDV semi-persistently, meaning the virus enters the salivary glands of leafhoppers, persists there for a long time, and is not transmitted to offspring via eggs. Both adult and all larval stages of leafhoppers are capable of transmitting WDV. Typically, primary WDV infection of winter barley and winter wheat plants occurs through adult leafhoppers migrating from perennial cereal grasses into fields in the fall (Brunt et al., 1996).

The observed warming of the climate contributes to the extension of the active period of *Psammotettix striatus*, successful overwintering and the spread of this species to new habitats, which has led to an increase in the importance of WDV in most of Europe (Pfrieme et al., 2023).

WDV is not transmitted by mechanical inoculation, is not transmitted by contact between plants, is not spread by seeds and pollen, and does not persist in soil (CABI, 2025).

WDV is characterized by extremely high harmfulness. In Ukraine, it was found that infection of wheat plants with this virus leads to a 3.3-fold decrease in the number of grains per ear, 3.4-fold decrease in ear weight, and 1000-grain weight by 1.9-3.3 times. In heavily infested fields, the proportion of plants without heading varied from 50% to 100% (Mishchenko et al., 2021). In Sweden, during the WDV epiphytotic outbreak of 1997, wheat yield losses averaged 35%, but reached 90% in some fields (Lindblad, Waern, 2002). In 2004, in Finland, winter wheat yield losses due to WDV infection varied from

что заражение этим вирусом растений пшеницы приводит к снижению количества зерен в колосе в 3,3 раза, массы колосьев в 3,4 раза и массы 1000 зерен в 1,9-3,3 раза. На сильно зараженных полях количество растений с отсутствием колошения варьировало от 50 до 100% (Mishchenko et al., 2021). В Швеции во время эпифитотии WDV в 1997 г. потери урожая пшеницы в среднем составили 35%, но на отдельных полях достигали 90% (Lindblad, Waern, 2002). В 2004 г. в Финляндии потери урожая озимой пшеницы в результате заражения WDV варьировали в пределах 20–40%, но на отдельных полях достигали 100% (Lemmetty, Huusela-Veistola, 2005). В Чехии после искусственного заражения WDV растений 25 сортов пшеницы наблюдалось снижение их урожайности от 87,3% до 100% (Širlová et al., 2005). Ввиду столь высокой вредоносности, WDV в настоящее время считается наиболее экономически значимым вирусом пшеницы в Европе (Pfrieme et al., 2023).

Помимо WDV, из известных мастревирусов растения пшеницы заражают также вирус карликовости пшеницы из Индии (Wheat dwarf India virus, WDIV), вирус полосатости кукурузы (Maize streak virus, MSV) и вирус полосатой мозаики хлориса (Chloris striate mosaic virus, CSMV; синоним: Wheat striate mosaic virus). MSV и CSMV заражают также растения ячменя, овса и кукурузы. MSV преимущественно распространен в странах Африки, а также в Индии, Индонезии и Йемене. Распространенность WDIV ограничена Индией, а CSMV распространен лишь в Австралии. Таким образом, WDV является единственным мастревирусом, распространенным на зерновых культурах в Европе (Pfrieme et al., 2023), что облегчает разработку методов его диагностики.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись:

- референтный изолят WDV PV-0840 (DSMZ, Германия) и WDV +K (Loewe, Германия);
- изоляты WDV выявленные в 2024–2025 гг. в посевах пшеницы на территории Алтайского, Краснодарского, Ставропольского краев, Волгоградской и Воронежской областей.
- референтные изоляты бимовируса слабой мозаики ячменя (BaMMV), бимовируса желтой мозаики ячменя (BaYMV), бимовируса веретеновидной полосатой мозаики пшеницы (WSSMV), бромовируса мозаики костра (BMV), лютеовируса желтой карликовости ячменя (BYDV-MAV, BYDV-PAV), почвообитающего фурувируса мозаики пшеницы (SBWMV), тритимовируса полосатой мозаики пшеницы (WSMV), тритимовируса полосатой мозаики костра (BStMV), хордеивируса штриховатой мозаики ячменя (BSMV), которые использовали в экспериментах по оценке специфичности испытываемых тест-систем.

Обследования посевов пшеницы в Краснодарском крае проводили совместно с сотрудниками ФГБНУ «Национальный центр зерна имени П.П. Лукьяненко».

Для проведения серологических тестов испытывали тест-систему для ИФА к WDV фирмы Loewe Biochemica GmbH (Германия). Эти тест-системы использовали согласно прилагаемой к набору инструкции фирмы-производителя.

20-40%, but reached 100% in some fields (Lemmetty, Huusela-Veistola, 2005). In the Czech Republic, after artificial infection of 25 wheat varieties with WDV, yield reductions ranging from 87.3% to 100% were observed (Širlová et al., 2005). Due to its high severity, WDV is currently considered the most economically significant wheat virus in Europe (Pfrieme et al., 2023).

In addition to WDV, other known mastreviruses that infect wheat plants include Wheat dwarf India virus (WDIV), Maize streak virus (MSV), and Chloris striate mosaic virus (CSMV; synonym: Wheat striate mosaic virus). MSV and CSMV also infect barley, oats, and maize. MSV is predominantly detected in African countries, as well as in India, Indonesia, and Yemen. WDIV is limited to India, and CSMV is found only in Australia. Thus, WDV is the only mastrevirus common in cereal crops in Europe (Pfrieme et al., 2023), facilitating the development of diagnostic methods.

### MATERIALS AND METHODS

The objects of the research were:

- reference isolate WDV PV-0840 (DSMZ, Germany) and WDV +K (Loewe, Germany);
- WDV isolates detected in 2024-2025 in wheat crops in the Altai Krai, Krasnodar Krai, Stavropol Krai, Volgograd Oblast and Voronezh Oblast.
- Reference isolates of Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV), Barley yellow mosaic virus (BaYMV), Wheat Spindle Streak Mosaic Virus (WSSMV), Brome mosaic virus (BMV), Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV-MAV, BYDV-PAV), Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV), Soil-borne wheat mosaic virus (SBWMV), Wheat Streak Mosaic Virus (WSMV), Brome Streak Mosaic Virus (BStMV), Barley stripe mosaic virus (BSMV), which were used in experiments to assess the specificity of the tested test systems.

Surveys of wheat crops in Krasnodar Krai were carried out jointly with specialists of the P.P. Lukyanenko National Grain Center".

For serological testing, we used the WDV ELISA test system by Loewe Biochemica GmbH (Germany). These test systems were used according to the manufacturer's instructions included with the kit.

DNA extraction for polymerase chain reaction (PCR) was performed using commercial reagent kits "Proba-NK" (Agrodiagnostika, Russia) and "FitoSorb-M" (Synthol, Russia) according to the manufacturers' instructions.

The diagnostics of WDV using the PCR method was carried out with the primers and probes presented in Table 1.

Real-time PCR tests were performed with Russian reagent kits: 2.5x reaction mixture for RT-PCR in the presence of ROX (Synthol), qPCR mix HS (Evrogen), 5x Genta qPCR master mix and 5x Genta Taq-AB qPCR master mix (GenTerra), and tests in the classical PCR format were performed with reagent kits 5x Genta PCR PRIZM (GenTerra) and 5x Mas<sup>DP</sup>TaqMIX -2025 (Dialat) with the development of thermal cycling modes, primer concentrations and templates.

The resulting amplicons were sequenced using a modified Sanger method on an AB-3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA). BioEdit 7.0.5.3 software (Hall, 1999) and the BLASTN and Needleman-

**Табл. 1. Праймеры и зонды, используемые для отработки диагностики WDV методом ПЦР**  
**Table 1. Primers and probes used for WDV diagnostics using PCR**

Название праймера Primer	Последовательность 5'→3' Sequence 5'→3'	Целевой участок генома Target genome region	Продукт (п.о.) Product (bp)	Автор Author
RTIC-F	AAGCTTGTCTGCACGAGAACGTGC	Ген Rep Gene Rep	206	Wang et al., 2016
RTIC-R	CCATGGCCTCTTCATCTACACCCAG			
RTIC-Probe	FAM-ATCCATCTTCGTGGAGCTC-BHQ			
WDV-For	CCCCGGTTCGATCTGATT	Ген CP Gene CP	70	Hao et al., 2021
WDV-Rev	CGGTCTGATTTGTATGCCGATT			
WDV-T	FAM-CCTGTTTTTGTCTAGGGTAAGG CCGAT-BHQ1	Ген Rep Gene Rep	346	Abt et al., 2020
WDV-1F	GAGGCGAACGAGTAGTTGAT			
WDV-WRb	GGAAAGACTTCCTGGGCAAG			
WDV-WFb	CCACTGACATCTTTACGATGC	Ген CP+SIR Genes CP+SIR	935	Abt et al., 2020
WDV-WRb	GGAAAGACTTCCTGGGCAAG			
WDV-WFb	CCACTGACATCTTTACGATGC	Ген CP+SIR Genes CP+SIR	610	Abt et al., 2020
WDV-4R	AGGGTGAATCATCTTCG			
WDV-40F	TGAGTGC GCGGAGGCTTTTGG	Гены CP+MP Genes CP+MP	767	Wu et al. 2008
WDV-806R	TCTGGCATTCCTGTTTCGG			
WDV-F	ATGGTGACCAACAAGGACTCC	Ген CP Gene CP	783	Zhang et al., 2017
WDV-R	TTACTGAATGCCGATGGCTTTG			
WDV-H-F	CAAGGGGCGAGATCACACA	SIR	385	Trzmiel, Klejdysz, 2018
WDV-H R	CCACAАCTACTACAACAGCC			
WDV-T-F	CGAGTAGTTGATGAATGACTCG	Ген RepA Gene RepA	735	Trzmiel, Klejdysz, 2018
WDV-T-R	GGCTGTTTCAACTCCAGGTCG			

Экстракцию ДНК для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили коммерческими наборами реагентов «Проба-НК» (Агродиагностика, Россия) и «ФитоСорб-М» (Синтол, Россия) согласно инструкциям фирм-производителей.

Отработку диагностики WDV методом ПЦР проводили с праймерами и зондами, представленными в табл. 1.

Тесты в формате ПЦР в реальном времени проводили с отечественными наборами реагентов: 2,5x реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол), qPCR mix HS (Евроген), 5x Genta qPCR мастер-микс и 5x Genta Taq-AB qPCR мастер-микс (ГенТерра), а тесты в формате классической ПЦР – с наборами реагентов 5x Genta PCR PRIZM (ГенТерра) и 5x Mas<sup>dd</sup>TaqMIX -2025 (Диалат) с отработкой термоциклических режимов, концентраций праймеров и температуры.

Полученные ампликоны подвергали секвенированию по модифицированному методу Сэнгера на генетическом анализаторе AB-3500 (Applied Biosystems, США). Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей использовали программное обеспечение BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) и алгоритмы выравнивания BLASTN и Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA11 (Tamura et al., 2021).

Wunsch Global Align Nucleotide Sequences (blast.ncbi.nlm.nih.gov) alignment algorithms were used to analyze the resulting nucleotide sequences. Phylogenetic analysis was performed using the MEGA11 program (Tamura et al., 2021).

**RESULTS AND DISCUSSION**

The analytical specificity of the Loewe WDV ELISA test system was determined for 21 isolates of 16 cereal-infecting viruses that can occur in mixed infections with WDV, taxonomically belonging to the genera Bromovirus (BMV), Bymovirus (BaMMV, BaYMV, WSSMV), Furovirus (SBCMV, SBWMV), Hordeivirus (BSMV), Luteovirus (BYDV-MAV, BYDV-PAV), Emaravirus (HPWMoV), Nepovirus (ArMV), Polerovirus (CYDV), Tobamovirus (TMV), and Tritimovirus (BrSMV, WSMV). The WDV reference isolate PC-0840 (DSMZ) was used as an additional positive control sample.

In the experiment, a positive signal was observed not only for the positive control and reference isolate of the target, but also for the barley streak mosaic virus isolate BSMV PC-0330 (DSMZ). BSMV is known to belong to the *Hordeivirus* genus and is serologically unrelated to WDV, which belongs to the *Mastrevirus* genus. Therefore, it can be assumed that the freeze-

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аналитическую специфичность тест-системы для ИФА к WDV фирмы Loewe определяли в отношении 21 изолята 16 вирусов, заражающих зерновые культуры, которые могут встречаться в смешанной инфекции с WDV, в таксономическом отношении относящихся к родам Bromovirus (BMV), Ymovirus (BaMMV, BaYMV, WSSMV), Furovirus (SBCMV, SBWMV), Hordeivirus (BSMV), Luteovirus (BYDV-MAV, BYDV-PAV), Emaravirus (HPWMoV), Nepovirus (ArMV), Polerovirus (CYDV), Tobamovirus (TMV) и Tritimovirus (BrSMV, WSMV). В качестве дополнительного положительного контрольного образца использовали референтный изолят WDV PC-0840 (DSMZ).

В проведенном эксперименте положительный сигнал наблюдался не только для положительного контроля и референтного изолята целевого объекта, но и для изолята вируса штриховатой мозаики ячменя BSMV PC-0330 (DSMZ). Как известно, BSMV относится к роду *Hordeivirus* и серологически неродственен WDV, относящегося к роду *Mastrevirus*. Поэтому можно предположить, что в образце лиофилизированных листьев, содержащем изолят BSMV PC-0330, содержится также примесь изолята WDV. Косвенным подтверждением этому является тот факт, что со вторым используемым изолятом BSMV (положительным контролем к BSMV фирмы Loewe) перекрестной реакции не наблюдалось. Для всех остальных изолятов нецелевых вирусов имел место отрицательный сигнал на уровне отрицательного контрольного образца (см. табл. 2).

В последующем данную тест-систему использовали для проведения скрининговых тестов образцов зерновых культур, отобранных при проведении обследований. На многих растениях пшеницы с сероположительной реакцией к WDV наблюдались типичные симптомы этого вируса. При наличии комбинированной инфекции WDV и вируса мозаики костра (BMV) развивались более интенсивные симптомы (см. рис. 1).

Отработку диагностики WDV методом ПЦР в реальном времени проводили с праймерами и зондами RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016) и WDV-For/WDV-Rev/WDV-T (Hao et al., 2021), комплементарных соответственно участкам генов Rep и CP целевого объекта. Эксперименты проводили с выявленными в 2024 г. изолятами WDV KrWD-1, KrWD-2 (Краснодарский край), VolWD-1, VolWD-2, VolWD-15, VolWD-19, VolWD-20, VolWD-22 (Волгоградская область), VorWD-8 (Воронежская область) и AlWD-1 (Алтайский край), а также с референтным изолятом WDV PV-0840 (DSMZ).

При испытании праймеров и зонда RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe в эксперименте с набором реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол) положительный сигнал

**Табл. 2. Определение специфичности тест-системы для ИФА к вирусу карликовости пшеницы (WDV) фирмы Loewe Biochemica GmbH (Германия)**  
**Table 2. Specificity of the ELISA test system for wheat dwarf virus (WDV) by Loewe Biochemica GmbH (Germany)**

№	Образец Sample	WDV (Loewe)		
		X Ao	Ao/Ak	**
1	BMV PV-0194 DSMZ	0,024	1,08	-
2	BMV PV-0178 DSMZ	0,030	1,38	-
3	BSMV PC-0330 DSMZ	0,192	8,86	+
4	BSMV +K Loewe	0,023	1,04	-
5	BYDV-MAV +K Agdia	0,025	1,13	-
6	BYDV-PAV +K Agdia	0,024	1,08	-
7	CYDV-RPV +K Agdia	0,025	1,13	-
8	BrSMV PC-1052 DSMZ	0,025	1,13	-
9	BaMMV PC-0329 DSMZ	0,023	1,06	-
10	BaYDV +K Loewe	0,022	1,02	-
11	WSMV PC-0356 DSMZ	0,029	1,32	-
12	WSMV +K Loewe	0,022	1,00	-
13	WSMV +K Agdia	0,024	1,11	-
14	WSSMV PC-0541 DSMZ	0,025	1,15	-
15	SBCMV PC-0552 DSMZ	0,023	1,04	-
16	SBWMV PC-0748 DSMZ	0,026	1,18	-
17	SBWMV +K Agdia	0,027	1,22	-
18	TMV PV-1195 DSMZ	0,024	1,08	-
19	ArMV +K Agdia	0,025	1,15	-
20	WDV PC-0840 DSMZ	0,359	16,32	+
21	HPWMoV +K (CPC) Agdia	0,034	1,55	-
<b>Отрицательный контроль</b>		0,022		
<b>Положительный контроль</b>		0,559		

dried leaf sample containing the BSMV PC-0330 isolate also contained an admixture of the WDV isolate. Indirect confirmation of this is the fact that no cross-reaction was observed with the second BSMV isolate used (the positive control for BSMV from Loewe). For all other non-target virus isolates, a negative signal was observed at the level of the negative control sample (Table 2).

This test system was subsequently used to screen grain samples collected during surveys. Many wheat plants that tested positive for WDV exhibited typical symptoms of this virus. Combined infections of WDV and brome mosaic virus (BMV) resulted in more intense symptoms (Fig. 1).

Real-time PCR diagnostics of WDV were tested using RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016) and WDV-For/WDV-Rev/WDV-T (Hao et al., 2021) primers and probes, complementary to the target Rep and CP gene regions, respectively. Experiments were performed with WDV isolates KrWD-1, KrWD-2 (Krasnodar Krai), VolWD-1, VolWD-2, VolWD-15, VolWD-19, VolWD-20, VolWD-22 (Volgograd Oblast),



a) Wheat, Torba variety, WDV mono-infection (KrWD-13)

b) Wheat, Hermitage variety, mono-infection with WDV (KrWD-16)

c) Wheat, Hermitage variety, co-infection with WDV + BMV (KrWD-6)

d) Wheat, variety Helmet, coinfection WDV + BMV (KrWD-12)

**Рис. 1.** Растение озимой пшеницы с симптомами заражения вирусом карликовости пшеницы (WDV) и комплексом вирусов WDV+BMV (фото авторов)

**Fig. 1.** Winter wheat plant with symptoms of infection by wheat dwarf virus (WDV) and the WDV+BMV virus complex (photo by the authors)

наблюдался для всех изолятов целевого объекта на пороговых циклах, не превышающих  $C_p=28,4$ . В эксперименте с набором реагентов Genta Taq AB UDG (ГенТерра) положительный сигнал отсутствовал для обоих изолятов целевого объекта из Краснодарского края и одного изолята из Воронежской области. В тесте с набором реагентов qPCR mix HS (Евроген) также не были выявлены три изучаемых изолята WDV (см. рис. 2).

В последующих экспериментах было установлено, что данные праймеры и зонд характеризуются очень высокой специфичностью к целевому объекту. В тестах с наборами реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX и Genta Taq AB UDG не наблюдалось неспецифичной реакции этих праймеров и зонда со всеми испытываемыми изолятами нецелевых вирусов, заражающих зерновые культуры и относящихся к родам *Bromovirus*, *Bymovirus*, *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Luteovirus*, *Polerovirus* и *Tritimovirus*. В тесте с набором реагентов qPCR mix HS неспецифичный сигнал на высоком пороговом цикле ( $C_p=35,6$ ) имел место лишь для изолята вируса карликовости ячменя (BYDV-PAV) (см. рис. 3).

На примере референтного изолята WDV PV-0840 (DSMZ) установлено, что при использовании наборов реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол) и qPCR mix HS (Евроген) аналитическая чувствительность тестов с праймерами и зондом RTIC-F/RTIC-R RTIC-Probe составляет  $10^{-5}$  со 100%-й повторяемостью результатов. Чувствительность тестов с набором реагентов Genta Taq AB UDG (ГенТерра) является менее высокой и составляет  $10^{-3}$  со 100%-й повторяемостью результатов (см. рис. 4).

По результатам проведенных экспериментов констатировано, что праймеры и зонд RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016) характеризуются высокой специфичностью к целевому объекту – вирусу карликовости пшеницы (WDV). Установлено также, что эти праймеры и зонд, ввиду высокой инклюзивности и чувствительности

VorWD-8 (Voronezh Oblast), and AlWD-1 (Altai Krai), identified in 2024, as well as with the reference isolate WDV PV-0840 (DSMZ).

When testing the RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe primers and probe in an experiment with the 2.5x Reaction Mix for real-time PCR in the presence of ROX (Synthol), a positive signal was observed for all target isolates at threshold cycles not exceeding  $C_p=28.4$ . In an experiment with the Genta Taq AB UDG reagent kit (GenTerra), a positive signal was absent for both target isolates from the Krasnodar Krai and one isolate from Voronezh Oblast. In the test with the qPCR mix HS reagent kit (Evrogen), three studied WDV isolates were also not detected (Fig. 2).

Subsequent experiments revealed that these primers and probe are highly specific to the target. In tests with the 2.5x RT-PCR Reaction Mix in the presence of ROX and Genta Taq AB UDG reagent kits, no non-specific reaction was observed between these primers and probe and all tested isolates of non-target viruses infecting grain crops and belonging to the genera *Bromovirus*, *Bymovirus*, *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Luteovirus*, *Polerovirus* и *Tritimovirus*. In the test with the qPCR mix HS reagent kit, a non-specific signal at a high threshold cycle ( $C_p=35.6$ ) was observed only for the isolate of barley dwarf virus (BYDV-PAV) (Fig. 3).

Using the reference isolate WDV PV-0840 (DSMZ) as an example, it was established that when using the 2.5x Reaction Mix for real-time PCR in the Presence of ROX (Synthol) and qPCR mix HS (Evrogen) reagent kits, the analytical sensitivity of tests with primers and the RTIC-F/RTIC-R RTIC-Probe probe is  $10^{-5}$  with 100% repeatability of results. The sensitivity of tests with the Genta Taq AB UDG reagent kit (GenTerra) is lower and is  $10^{-3}$  with 100% repeatability of results (Fig. 4).

**а) 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол)**

a) 2.5x Real-time PCR Reaction Mixture in the presence of ROX (Synthol)

Номер лунки Hole number	Идентификатор пробирки Test tube identifier	Ср, Fam Cp, Fam	Результат Result
A1	KrWD-1	28,4	+
A2	KrWD-2	27,6	+
A3	VolWD-1	18,2	+
A4	VolWD-2	22,0	+
A5	VolWD-15	20,4	+
A6	VolWD-19	24,3	+
A7	VolWD-20	17,2	+
A8	VolWD-22	24,6	+
A9	VorWD-8	23,5	+
A10	AlWD-1	26,5	+
A11	K-		-
A12	K+_(WDV-PV-0840,_DSMZ)	13,4	+

**б) Genta Taq AB UDГ (ГенТерра)**

b) Genta Taq AB UDГ (GenTerra)

Номер лунки Hole number	Идентификатор пробирки Test tube identifier	Ср, Fam Cp, Fam	Результат Result
A1	KrWD-1		-
A2	KrWD-2		-
A3	VolWD-1	19.3	+
A4	VolWD-2	24.2	+
A5	VolWD-15		-
A6	VolWD-19	28.1	+
A7	VolWD-20	19,7	+
A8	VolWD-22	27.7	+
A9	VorWD-8	26.4	+
A10	AlWD-1	30.5	+
A11	K-		-
A12	K+_(WDV-PV-0840,_DSMZ)	13.5	+

**в) qPCR mix HS (Евроген)**

c) qPCR mix HS (Evrogen)

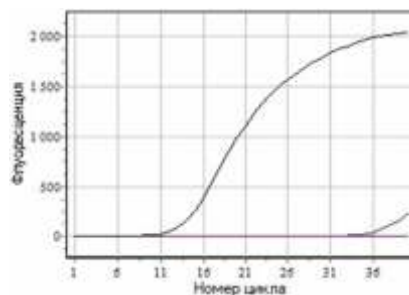
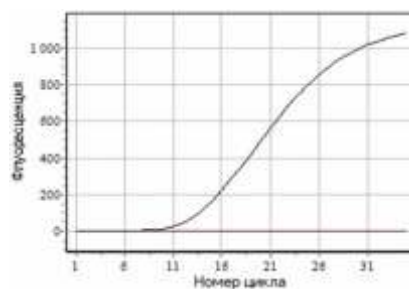
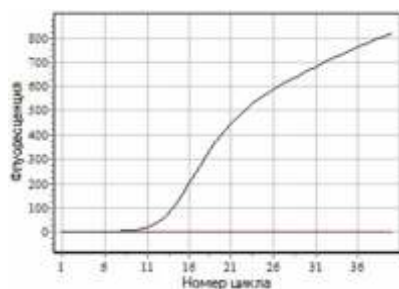
Номер лунки Hole number	Идентификатор пробирки Test tube identifier	Ср, Fam Cp, Fam	Результат Result
A1	KrWD-1		-
A2	KrWD-2	28.1	+
A3	VolWD-1		-
A4	VolWD-2	21.0	+
A5	VolWD-15		-
A6	VolWD-19	23.9	+
A7	VolWD-20	17.7	+
A8	VolWD-22	24.1	+
A9	VorWD-8	22.6	+
A10	AlWD-1	26.3	+
A11	K-		-
A12	K+_(WDV-PV-0840,_DSMZ)	12.5	+

Рис. 2. Выявление изолятов WDV методом ПЦР-РВ в тестах с праймерами и зондом RTIC-F/ RTIC-R/ RTIC-Probe (Wang et al., 2016) и тремя наборами реагентов для ПЦР-РВ

Fig. 2. Detection of WDV isolates by real-time PCR in tests with primers and probe RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016) and three reagent kits for real-time PCR

Номер лунки Hole number	Идентификатор пробирки Test tube identifier	Ср, Fam Cp, Fam	Результат Result
B1	BMV_PV-0194		-
B2	BMV_PV-0178		-
B3	BSMV_PC-330		-
B4	BSMV_Loewe		-
B5	BYDV_MAV_Agdia		-
B6	BYDV_PAV_Agdia		-
B7	CYDV_RPV_Agdia		-
B8	BrSMV_PC-1052		-
B9	BaMMV_PC-0329		-
B10	BaYMV_Loewe		-
B11	WSMV_PC-356		-
B12	WSMV_Loewe		-
C1	WSMV_Agdia		-
C2	WSSMV_PC-0541		-
C3	SBCMV_PC-0552		-
C4	SBWMV_PC-748		-
C5	SBWMV_Agdias		-
C6	-K		-
C7	K+_WDV-0840,_DSMZ)	12,1	+

Номер лунки Hole number	Идентификатор пробирки Test tube identifier	Ср, Fam Cp, Fam	Результат Result
B1	BMV_PV-0194		-
B2	BMV_PV-0178		-
B3	BSMV_PC-330		-
B4	BSMV_Loewe		-
B5	BYDV_MAV_Agdia		-
B6	BYDV_PAV_Agdia		-
B7	CYDV_RPV_Agdia		-
B8	BrSMV_PC-1052		-
B9	BaMMV_PC-0329		-
B10	BaYMV_Loewe		-
B11	WSMV_PC-356		-
B12	WSMV_Loewe		-
C1	WSMV_Agdia		-
C2	WSSMV_PC-0541		-
C3	SBCMV_PC-0552		-
C4	SBWMV_PC-748		-
C5	SBWMV_Agdias		-
C6	-K		-
C7	K+_WDV-0840,_DSMZ)	12,0	+



Номер лунки Hole number	Идентификатор пробирки Test tube identifier	Ср, Fam Cp, Fam	Результат Result
B1	BMV_PV-0194		-
B2	BMV_PV-0178		-
B3	BSMV_PC-330		-
B4	BSMV_Loewe		-
B5	BYDV_MAV_Agdia		-
B6	BYDV_PAV_Agdia	35,6	+
B7	CYDV_RPV_Agdia		-
B8	BrSMV_PC-1052		-
B9	BaMMV_PC-0329		-
B10	BaYMV_Loewe		-
B11	WSMV_PC-356		-
B12	WSMV_Loewe		-
C1	WSMV_Agdia		-
C2	WSSMV_PC-0541		-
C3	SBCMV_PC-0552		-
C4	SBWMV_PC-748		-
C5	SBWMV_Agdias		-
C6	-K		-
C7	K+_WDV-0840,_DSMZ)	13,4	+

Рис. 3. Определение аналитической специфичности праймеров и зонда RTIC-F/ RTIC-R/ RTIC-Probe (Wang et al., 2016) в тестах с тремя наборами реагентов для ПЦР-РВ

Fig. 3. Analytical specificity of primers and probe RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016) in tests with three reagent kits for real-time PCR

**а) 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол)**

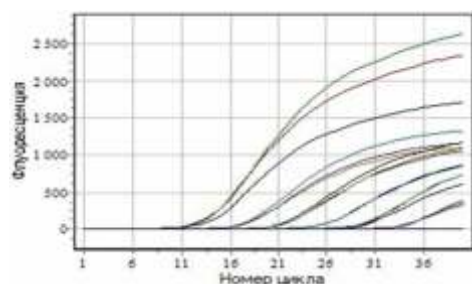
a) 2.5x Real-time PCR Reaction Mixture in the presence of ROX (Synthol)

Номер лунки Hole number	Идентификатор пробирки Test tube identifier	Ср, Fam Cp, Fam	Результат Result
A1	WDV_0840_конц.	13,3	+
A2	WDV_0840_конц.	13,1	+
A3	WDV_0840_конц.	13,7	+
A4	Разведение в 10 <sup>-1</sup>	17,1	+
A5	Разведение в 10 <sup>-1</sup>	16,8	+
A6	Разведение в 10 <sup>-1</sup>	16,9	+
A7	Разведение в 10 <sup>-2</sup>	20,8	+
A8	Разведение в 10 <sup>-2</sup>	20,9	+
A9	Разведение в 10 <sup>-2</sup>	21,0	+
A10	Разведение в 10 <sup>-3</sup>	24,9	+
A11	Разведение в 10 <sup>-3</sup>	24,9	+
A12	Разведение в 10 <sup>-3</sup>	24,9	+
B1	Разведение в 10 <sup>-4</sup>	29,0	+
B2	Разведение в 10 <sup>-4</sup>	28,7	+
B3	Разведение в 10 <sup>-4</sup>	29,0	+
B4	Разведение в 10 <sup>-5</sup>	32,4	+
B5	Разведение в 10 <sup>-5</sup>	33,1	+
B6	Разведение в 10 <sup>-5</sup>	33,0	+
B7	Разведение в 10 <sup>-6</sup>		-
B8	Разведение в 10 <sup>-6</sup>		-
B9	Разведение в 10 <sup>-6</sup>		-
C1	К-		-

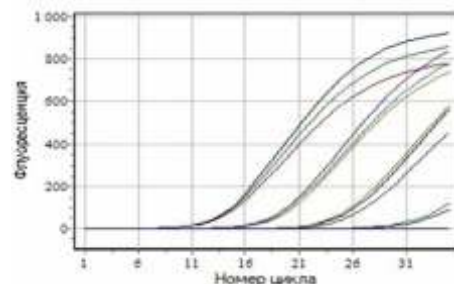
**б) Genta Taq AB UDG (ГенТерра)**

b) Genta Taq AB UDG (GenTerra)

Номер лунки Hole number	Идентификатор пробирки Test tube identifier	Ср, Fam Cp, Fam	Результат Result
D1	WDV_840_конц.	13,4	+
D2	WDV_840_конц.	13,4	+
D3	WDV_840_конц.	13,5	+
D4	Разведение в 10 <sup>-1</sup>	18,4	+
D5	Разведение в 10 <sup>-1</sup>	17,9	+
D6	Разведение в 10 <sup>-1</sup>	17,8	+
D7	Разведение в 10 <sup>-2</sup>	23,4	+
D8	Разведение в 10 <sup>-2</sup>	24,2	+
D9	Разведение в 10 <sup>-2</sup>	23,3	+
D10	Разведение в 10 <sup>-3</sup>	30,5	+
D11	Разведение в 10 <sup>-3</sup>	30,5	+
D12	Разведение в 10 <sup>-3</sup>		-
E1	Разведение в 10 <sup>-4</sup>		-
E2	Разведение в 10 <sup>-4</sup>		-
E3	Разведение в 10 <sup>-4</sup>		-
E4	Разведение в 10 <sup>-5</sup>		-
E5	Разведение в 10 <sup>-5</sup>		-
E6	Разведение в 10 <sup>-5</sup>		-
E7	Разведение в 10 <sup>-6</sup>		-
E8	Разведение в 10 <sup>-6</sup>		-
E9	Разведение в 10 <sup>-6</sup>		-
F1	К-		-



**Рис. 4.** Определение аналитической чувствительности тестов с праймерами и зондом RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016) и тремя наборами реагентов для ПЦР-РВ



**Fig. 4.** Analytical sensitivity of tests with primers and probe RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016) and three reagent kits for real-time PCR

тестов, наиболее целесообразно использовать с набором реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол). Установлено, что праймеры и зонд RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016) могут быть рекомендованы для проведения скрининговых тестов на наличие WDV в формате ПЦР в реальном времени.

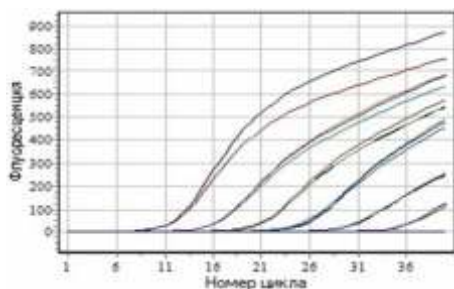
Испытание праймеров и зонда WDV-For/WDV-Rev/WDV-T (Hao et al., 2021) было проведено с четырьмя наборами для ПЦР-РВ отечественных фирм-производителей. Во всех четырех проведенных экспериментах наблюдалось эффективное выявление изолятов WDV KrWD-2, VolWD-1, VolWD-2, VolWD-15, VolWD-19, VolWD-20, VolWD-22 и VorWD-8 на невысоких пороговых циклах. Наблюдался также стабильный положительный

Based on the results of the experiments, it was established that the RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe primers and probe (Wang et al., 2016) are characterized by high specificity to the target object – wheat dwarf virus (WDV). It was also established that these primers and probe, due to the high inclusiveness and sensitivity of the tests, are most appropriate to use with the 2.5x Reaction Mix for real-time PCR in the Presence of ROX (Synthol) reagent kit. It was established that the RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe primers and probe (Wang et al., 2016) can be recommended for screening tests for the presence of WDV in the real-time PCR format.

**в) qPCR mix HS (Евроген)**

**с) qPCR mix HS (Евроген)**

Номер лунки Hole number	Идентификатор пробирки Test tube identifier	Ср, Fam Cp, Fam	Результат Result
D1	WDV_0840_конц.	11,8	+
D2	WDV_0840_конц.	11,7	+
D3	WDV_0840_конц.	11,9	+
D4	Разведение в 10 <sup>-1</sup>	16,0	+
D5	Разведение в 10 <sup>-1</sup>	15,7	+
D6	Разведение в 10 <sup>-1</sup>	15,7	+
D7	Разведение в 10 <sup>-2</sup>	20,5	+
D8	Разведение в 10 <sup>-2</sup>	20,5	+
D9	Разведение в 10 <sup>-2</sup>	20,6	+
D10	Разведение в 10 <sup>-3</sup>	24,2	+
D11	Разведение в 10 <sup>-3</sup>	25,3	+
D12	Разведение в 10 <sup>-3</sup>	24,4	+
E1	Разведение в 10 <sup>-4</sup>	29,3	+
E2	Разведение в 10 <sup>-4</sup>	29,6	+
E3	Разведение в 10 <sup>-4</sup>	29,1	+
E4	Разведение в 10 <sup>-5</sup>	34,0	+
E5	Разведение в 10 <sup>-5</sup>	35,0	+
E6	Разведение в 10 <sup>-5</sup>	34,8	+
E7	Разведение в 10 <sup>-6</sup>		-
E8	Разведение в 10 <sup>-6</sup>		-
E9	Разведение в 10 <sup>-6</sup>		-
F1	K-		-

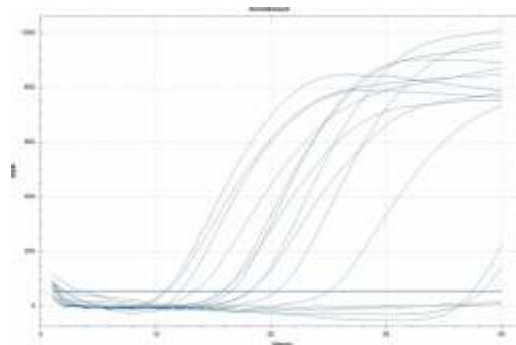


сигнал с референтным изолятом PV-0840 (DSMZ). Различия заключались в выявлении изолятов KrWD-1 и AlWD-1, характеризующихся низким титром в тестируемых образцах. Положительный сигнал для изолята KrWD-1 наблюдался в тестах с наборами реагентов Genta Taq AB UDG и 5x Genta qPCR мастер-микс (оба – ГенТерра), но отсутствовал в тестах с наборами реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол) и qPCR mix HS (Евроген). Выявление изолята AlWD-1 было достигнуто лишь в тестах с наборами реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX и 5x Genta qPCR мастер-микс (результаты не показаны).

В тесте с данными праймерами и зондом и набором реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX целевой объект был диагностирован также в 11 других образцах из Краснодарского края с сероположительной реакцией к WDV (см. рис. 5).

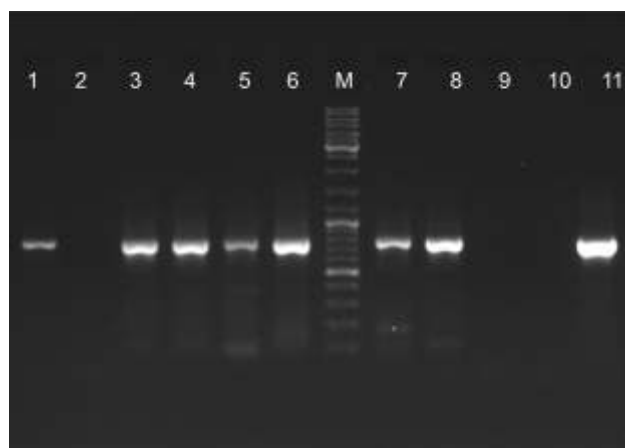
The WDV-For/WDV-Rev/WDV-T primers and probe (Hao et al., 2021) were tested with four real-time PCR assays from domestic manufacturers. All four experiments demonstrated effective detection of WDV isolates KrWD-2, VolWD-1, VolWD-2, VolWD-15, VolWD-19, VolWD-20, VolWD-22, and VorWD-8 at low threshold cycles. A stable positive signal was also observed with the reference isolate PV-0840 (DSMZ). The differences were in the detection of KrWD-1 and AlWD-1 isolates, which were characterized by low titers in the tested samples. A positive signal for the KrWD-1 isolate was observed in tests with the Genta Taq AB UDG reagent kit and 5x Genta qPCR master mix (both GenTerra), but was absent in tests with the 2.5x Reaction Mix for real-time PCR in the presence of ROX (Synthol) and qPCR mix HS (Evrogen) reagent kits. Detection of the AlWD-1 isolate was achieved

Лунка Hole	Флуор. Fluor.	Проба Sample	Сq Cq
B01	FAM	KrWD- 24	15,80
B02	FAM	KrWD --37	16,43
B03	FAM	KrWD- -45	18,18
B04	FAM	KrWD – 54	37,49
B05	FAM	KrWD- -55	15,79
B06	FAM	KrWD- 57	18,19
B07	FAM	KrWD- 66/5	13,31
B08	FAM	KrWD- -68	10,93
B09	FAM	KrWD- 77	12,13
B10	FAM	KrWD- 2	25,08
B11	FAM	KrWD- 3	38,30
B12	FAM	-K	H/O



**Рис. 5.** Выявление WDV в образцах пшеницы из Краснодарского края методом ПЦР-РВ в тестах с праймерами и зондом WDV-For/WDV-Rev/WDV-T (Hao et al., 2021) и набором реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол)

**Fig. 5.** Detection of WDV in wheat samples from Krasnodar Krai by real-time PCR in tests with primers and probe WDV-For/WDV-Rev/WDV-T (Hao et al., 2021) and a 2.5x reagent kit. Reaction mixture for real-time PCR in the presence of ROX (Synthol)



a) 5x Mas<sup>DB</sup> MIX-2025

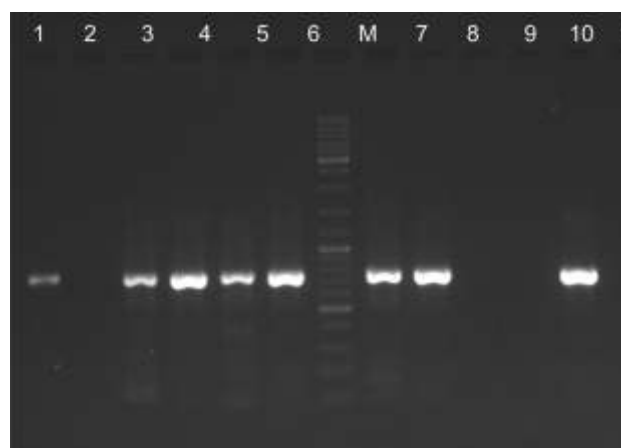
**Рис. 6.** Выявление вируса карликовости пшеницы (WDV) методом классической ПЦР с использованием праймеров WDV 40-F/WDV 806-R (Wu et al. 2008) и двух наборов реагентов

Аналитическую специфичность праймеров и зонда WDV-For/WDV-Rev/WDV-T определяли в экспериментах с четырьмя различными наборами реагентов для ПЦР-РВ. В тестах с наборами реагентов 2,5x Реакционная смесь для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол), qPCR mix HS (Евроген) и Genta Taq AB UDG (ГенТерра) было зарегистрировано наличие неспецифического положительного сигнала с изолятами нецелевых вирусов – BYDV-MAV, BYDV-PAV и CYDV-RPV, а в тестах с двумя последними наборами реагентов, кроме того, отмечен неспецифичный сигнал с изолятами нецелевых вирусов BSMV PC-0330 и SBCMV PC-0552 (оба-DSMZ). В то же время в тесте с набором реагентов 5x Genta qPCR мастер-микс (ГенТерра) неспецифичных сигналов с изолятами всех нецелевых вирусов не наблюдалось (результаты не показаны).

Изоляты BYDV-MAV, BYDV-PAV, BSMV, CYDV-RPV и SBCMV содержатся в лиофилизированных инфицированных листьях растений ячменя, тогда как изоляты всех других вирусов, анализируемых в экспериментах по оценке аналитической специфичности, содержатся в лиофилизированных листьях растений пшеницы. В связи с этим не исключена возможность, что праймеры и зонд WDV-For/ WDV-Rev/ WDV-T реагируют не с участками генома нецелевых вирусов, а с генами растений ячменя.

Было установлено также, что чувствительность теста с праймерами и зондом WDV-For/WDV-Rev/WDV-T является достаточно высокой. Выявление референтного изолята WDV PV-0840 (DSMZ) в эксперименте с набором реагентов 5x qPCR mix HS (Евроген) наблюдалось вплоть до разведения в  $10^{-5}$  включительно со 100%-й повторяемостью результатов.

Таким образом, в отношении праймеров и зонда WDV-For/WDV-Rev/WDV-T (Hao et al., 2021) были получены неоднозначные результаты. Было установлено, что эти олигонуклеотиды позволяют диагностировать многочисленные российские изоляты WDV, но воспроизводимость выявления изолятов с низким титром в определенной степени зависит от используемого набора



b) 5x Genta PCR PRIZM

**Fig. 6.** Detection of wheat dwarf virus (WDV) by classical PCR using primers WDV 40-F/WDV 806-R (Wu et al. 2008) and two reagent kits

only in tests with the 2.5x Reaction Mix for RT-PCR in the presence of ROX and 5x Genta qPCR master mix reagent kits (results not shown).

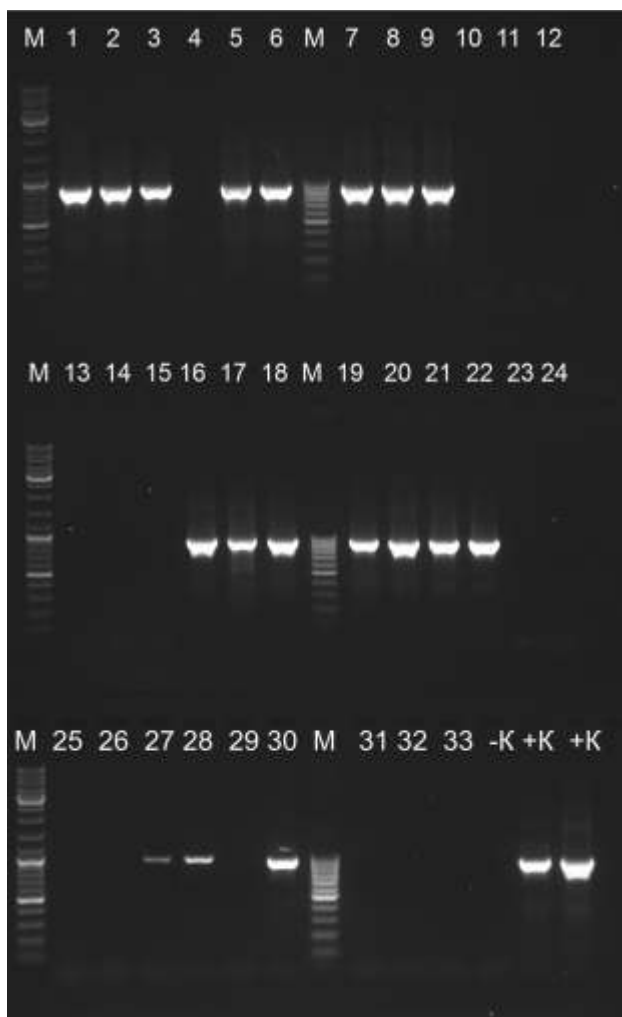
In a test with these primers and probe and a 2.5x reagent kit, the real-time PCR reaction mixture in the presence of ROX, the target object was also diagnosed in 11 other samples from the Krasnodar Territory with a seropositive reaction to WDV (Fig. 5).

The analytical specificity of the WDV-For/WDV-Rev/WDV-T primers and probe was determined in experiments with four different RT-PCR reagent kits. In tests with the 2.5x real-time PCR reaction mixture in the presence of ROX (Synthol), qPCR mix HS (Evrogen), and Genta Taq AB UDG (GenTerra) reagent kits, a nonspecific positive signal was recorded with isolates of non-target viruses – BYDV-MAV, BYDV-PAV, and CYDV-RPV. In tests with the latter two reagent kits, a nonspecific signal was also noted with isolates of non-target viruses BSMV PC-0330 and SBCMV PC-0552 (both DSMZ). At the same time, in the test with the 5x Genta qPCR master mix reagent kit (GenTerra), no non-specific signals were observed with isolates of all non-target viruses (results not shown).

Isolates of BYDV-MAV, BYDV-PAV, BSMV, CYDV-RPV, and SBCMV were found in lyophilized infected barley leaves, while isolates of all other viruses analyzed in the assay specificity experiments were found in lyophilized wheat leaves. Therefore, it cannot be ruled out that the WDV-For/WDV-Rev/WDV-T primers and probe react not with regions of the non-target virus genome, but with barley plant genes.

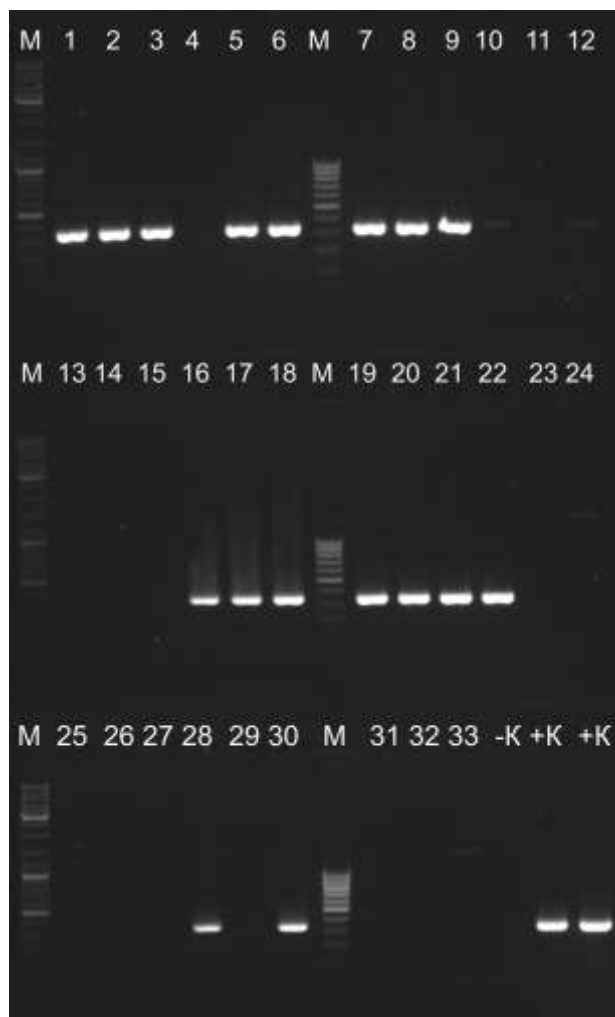
The sensitivity of the WDV-For/WDV-Rev/WDV-T primer-probe assay was also found to be quite high. Detection of the reference isolate WDV PV-0840 (DSMZ) in an experiment using the 5x qPCR mix HS reagent kit (Evrogen) was observed up to a dilution of  $10^{-5}$ , with 100% repeatability.

Thus, inconclusive results were obtained with the WDV-For/WDV-Rev/WDV-T primers and probe (Hao et al., 2021). These oligonucleotides were found to be



**а) Праймеры WDV-WFb/ WDV-WRb (гены CP+SIR штаммов WDV-B и WDV-W, 939 п.о.)**

**Рис. 7.** Выявление WDV методом классической ПЦП с использованием праймеров WDV-WFb/WDV-WRb, WDV-1F/WDV-WRb, WDV-WFb/WDV-4R (I.Abt et al., 2020) и набора реагентов 5x Mas<sup>DD</sup>TaqMIX-2025 (Диалат)



**б) Праймеры WDV-1F/ WDV-WRb (ген Rep штамма WDV-W, 346 п.о.)**

**Fig. 7.** Detection of WDV by classical PCR using primers WDV-WFb/WDV-WRb, WDV-1F/WDV-WRb, WDV-WFb/WDV-4R (I.Abt et al., 2020) and the 5x Mas<sup>DD</sup>TaqMIX-2025 reagent kit (Dialat)

реагентов для ПЦП-РВ. Чувствительность теста с этими праймерами и зондом является высокой. Однако в экспериментах по определению аналитической специфичности было установлено наличие неспецифичной реакции данных олигонуклеотидов с изолятами нецелевых вирусов зерновых культур, содержащихся в лиофилизированных листьях растений ячменя.

Отработку диагностики WDV методом классической ПЦП проводили с семью парами праймеров, специфичных к различным участкам генома целевого объекта.

Была проведена серия экспериментов с праймерами WDV 40-F/WDV 806-R (Wu et al., 2008), позволяющими амплифицировать полную последовательность олигонуклеотидов гена транспортного белка и прилегающий 5'-концевой участок гена белка оболочки геномной ДНК WDV. В эксперименте с двумя наборами реагентов отечественных фирм-производителей было установлено, что эти праймеры позволяют диагностировать изоляты WDV различного географического происхождения с высокой воспроизводимостью результатов (см. рис. 6).

capable of detecting numerous Russian WDV isolates, but the reproducibility of detecting low-titer isolates was somewhat dependent on the real-time PCR reagent kit used. The sensitivity of the test with these primers and probe was high. However, experiments to determine analytical specificity revealed a nonspecific reaction of these oligonucleotides with isolates of non-target cereal viruses contained in lyophilized barley plant leaves.

The diagnostics of WDV using the classical PCR method was carried out with seven pairs of primers specific to different regions of the target genome.

A series of experiments were conducted with WDV 40-F/WDV 806-R primers (Wu et al., 2008), which allow amplification of the complete oligonucleotide sequence of the transport protein gene and the adjacent 5-terminal region of the coat protein gene of WDV genomic DNA. An experiment

Образцы: 1 – изолят KrWD-1; 2 – здоровое растение пшеницы; 3 – изолят VolWD-1; 4 – изолят VolWD-2; 5 – изолят VolWD-15; 6 – изолят VolWD-19; 7 – изолят VolWD-20; 8 – изолят VolWD-22; 9 – здоровое растение пшеницы; 10 – отрицательный контроль (вода); 11 – изолят WDV PV-0840 DSMZ. Специфичный продукт – 746 п.о.

Секвенирование полученных продуктов амплификации позволило установить, что изолят KrWD-1 относится к штамму WDV-B, а прочие изучаемые изоляты – к штамму WDV-W.

В эксперименте с данными праймерами и набором реагентов 5x Mas<sup>DD</sup>TaqMIX-2025 (Диалат) было установлено, что выявление целевого объекта возможно вплоть до разведения в 10<sup>-6</sup> включительно со 100%-й повторяемостью (результаты не показаны).

Определение аналитической специфичности праймеров WDV 40-F/WDV 806-R проводили в экспериментах с двумя наборами реагентов для ПЦР. В обоих экспериментах наблюдалась неспецифичная реакция изучаемых праймеров с изолятами бромовируса мозаики ковра (BMV) и тритимовируса штриховатой мозаики ковра (BrSMV). Продукты амплификации этих образцов были подвергнуты секвенированию. Продукт амплификации образца BrSMV PC-1052 на 66,93-68,09% соответствовал участку гена цитокинин оксидазы/дегидрогеназы растений ячменя. Анализ продукта амплификации образца BMV PV-0194 не выявил наличие значимой идентичности с участком генома какого-либо организма. Таким образом, было установлено, что праймеры WDV 40-F/WDV 806-R не взаимодействуют с геномом нецелевых вирусов BMV и BrSMV, но могут реагировать с участком генома ячменя, вследствие чего данные олигонуклеотиды целесообразно использовать лишь для тестирования растений пшеницы.

В последующем было проведено испытание трех разработанных во Франции пар праймеров, позволяющих выявлять и дифференцировать изоляты штаммов WDV-B и WDV-W. Согласно спецификации авторов-разработчиков, праймеры WDV-1F/WDV-WRb амплифицируют участок гена Rep изолятов штамма WDV-W, праймеры WDV-WFb/WDV-4R – участок гена белка оболочки (CP) изолятов штамма WDV-B, тогда как комбинация праймеров WDV-WFb/WDV-WRb позволяет амплифицировать участок гена CP и прилегающий межгенный участок (SIR) изолятов обоих штаммов (Abt et al., 2020).

Проведенные эксперименты подтвердили спецификацию этих праймеров. Праймеры WDV-WFb/WDV-WRb реагировали с изолятом KrWD-1, относящимся к штамму WDV-B, и с 19 изолятами штамма WDV-W. Праймеры WDV-1F/WDV-WRb избирательно реагировали с изолятами штамма WDV-W (см. рис. 7). Праймеры WDV-WFb/WDV-4R реагировали лишь с изолятом KrWD-1 штамма WDV-B (результаты не показаны). Соответствие полученных продуктов амплификации заявленным участкам генома штаммов WDV-B и WDV-W было подтверждено секвенированием.

Образцы: 1 – изолят KrWD-24; 2 – изолят KrWD-37; 3 – изолят KrWD-45; 5 – изолят KrWD-55; 6 – изолят KrWD-57; 7 – изолят KrWD-66/5;

with two sets of reagents from domestic manufacturers showed that these primers allow the diagnosis of WDV isolates of different geographic origins with high reproducibility of results (Fig. 6).

Samples: 1 – Isolate KrWD-1; 2 – healthy wheat plant; 3 – isolate VolWD-1; 4 – isolate VolWD-2; 5 – isolate VolWD-15; 6 – isolate VolWD-19; 7 – isolate VolWD-20; 8 – isolate VolWD-22; 9 – healthy wheat plant; 10 – negative control (water); 11 – isolate WDV PV-0840 DSMZ. Specific product – 746 b.p.

Sequencing of the obtained amplification products made it possible to establish that the KrWD-1 isolate belongs to the WDV-B strain, and the other studied isolates belong to the WDV-W strain.

In an experiment with these primers and the 5x Mas<sup>DD</sup>TaqMIX-2025 reagent kit (Dialat), it was found that detection of the target object was possible up to a dilution of 10<sup>-6</sup> inclusive with 100% repeatability (results not shown).

The analytical specificity of the WDV 40-F/WDV 806-R primers was determined in experiments with two PCR reagent kits. In both experiments, a nonspecific reaction of the studied primers with BMV and BrSMV isolates was observed. The amplification products of these samples were sequenced. The amplification product of BrSMV PC-1052 matched 66.93-68.09% of the barley cytokinin oxidase/dehydrogenase gene region. Analysis of the amplification product of BMV PV-0194 did not reveal significant identity with the genome region of any organism. Thus, it was established that the WDV 40-F/WDV 806-R primers do not interact with the genome of non-target viruses BMV and BrSMV, but can react with a region of the barley genome, as a result of which these oligonucleotides should be used only for testing wheat plants.

Subsequently, three pairs of primers developed in France were tested to detect and differentiate isolates of the WDV-B and WDV-W strains. According to the specifications of the developers, the WDV-1F/WDV-WRb primers amplify the Rep gene region of WDV-W isolates, the WDV-WFb/WDV-4R primers amplify the coat protein (CP) gene region of WDV-B isolates, while the WDV-WFb/WDV-WRb primer combination amplifies the CP gene region and the adjacent intergenic region (SIR) of isolates of both strains (Abt et al., 2020).

The experiments confirmed the specification of these primers. Primers WDV-WFb/WDV-WRb reacted with the KrWD-1 isolate, belonging to the WDV-B strain, and with 19 isolates of the WDV-W strain. Primers WDV-1F/WDV-WRb reacted selectively with isolates of the WDV-W strain (Fig. 7). Primers WDV-WFb/WDV-4R reacted only with the KrWD-1 isolate of the WDV-B strain (results not shown). The correspondence of the obtained amplification products to the declared regions of the WDV-B and WDV-W genomes was confirmed by sequencing.

Samples: 1 – isolate KrWD-24; 2 – isolate KrWD-37; 3 – isolate KrWD-45; 5 – isolate KrWD-55; 6 – isolate KrWD-57; 7 – isolate KrWD-66/5; 8 – KrWD-68; 9 – isolate KrWD-77; 16 – isolate VolWD-1; 17 – isolate

8 – KrWD-68; 9 – изолят KrWD-77; 16 – изолят VolWD-1; 17 – изолят VolWD-2; 18 – изолят VolWD-15; 19 – изолят VolWD-19; 20 – изолят VolWD-20; 21 – изолят VolWD-22; 22 – изолят VorWD-8; 27 – изолят KrWD-1; 28 – KrWD-2; 30 – изолят AlWD-1; 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 26, 29, 31, 32, 33 – здоровые растения пшеницы, кукурузы, тритикале и ячменя; -K (вода); +K (изолят WDV PV-0840 DSMZ); +K (изолят WDV +K Loewe)

В последующих экспериментах было установлено, что праймеры WDV-1F/WDV-WRb и WDV-WFb/WDV-WRb характеризуются очень высокой специфичностью к целевому объекту. Не наблюдалось неспецифичной реакции этих праймеров с изолятами 12 нецелевых вирусов, которые заражают зерновые культуры и могут встречаться в смешанной инфекции с WDV. Установлено также, что при использовании набора реагентов 5x Genta PCR PRIZM (ГенТерра) праймеры WDV-1F/WDV-WRb позволяют диагностировать целевой объект (изолят WDV PV-0840 DSMZ) вплоть до разведения в  $10^{-5}$  включительно со 100%-й повторяемостью результатов. Чувствительность тестов с праймерами WDV-WFb/WDV-WRb является несколько менее высокой и составляет  $10^{-4}$ , что, вероятно, обусловлено очень большой величиной продукта, амплифицируемого этими праймерами.

Разработанные в Китае праймеры WDV-F/WDV-R (Zhang et al., 2017) позволяют амплифицировать практически полную последовательность нуклеотидов гена белка оболочки целевого объекта за исключением 14 5'-концевых нуклеотидов и 11 3'-концевых нуклеотидов. По результатам испытаний было установлено, что эти праймеры характеризуются 100%-й специфичностью к целевому объекту и позволяют диагностировать все выявленные изоляты штаммов WDV-B и WDV-W с чувствительностью до  $10^{-5}$  включительно со 100%-й повторяемостью результатов. Данные праймеры наиболее целесообразно использовать с набором реагентов 5x Genta PCR PRIZM фирмы ГенТерра.

Проведено также испытание праймеров WDV-H-F/WDV-H-R и WDV-T-F/WDV-T-R (Trzmiel, Klejdysz, 2018), разработанных, соответственно, к межгенному участку (SIR) изолятов штамма WDV-B и участку гена RepA у изолятов штамма WDV-W. По результатам проведенных экспериментов констатировано, что праймеры WDV-T-F/WDV-T-R могут быть рекомендованы для проведения дополнительных подтверждающих тестов на наличие WDV с целью изучения генетических особенностей у выявляемых изолятов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили разработать методические рекомендации по выявлению и идентификации вируса карликовости пшеницы (WDV), в которых для проведения отборочных (скрининговых) тестов рекомендуется использовать один из следующих тестов: метод ИФА с тест-системой к WDV фирмы Loewe (Германия) или метод ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016). Для проведения подтверждающих тестов на наличие WDV рекомендуется использовать

VolWD-2; 18 – isolate VolWD-15; 19 – isolate VolWD-19; 20 – isolate VolWD-20; 21 – isolate VolWD-22; 22 – isolate VorWD-8; 27 – isolate KrWD-1; 28 – KrWD-2; 30 – isolate AlWD-1; 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 26, 29, 31, 32, 33 – healthy plants of wheat, corn, triticale and barley; -K (water); +K (isolate WDV PV-0840 DSMZ); +K (isolate WDV +K Loewe)

Subsequent experiments revealed that the WDV-1F/WDV-WRb and WDV-WFb/WDV-WRb primers exhibited very high target specificity. No nonspecific reaction was observed between these primers and isolates of 12 non-target viruses that infect grain crops and can occur in mixed infections with WDV. It was also found that, when used with the Genta PCR PRIZM 5x reagent kit (GenTerra), the WDV-1F/WDV-WRb primers enabled detection of the target isolate (WDV isolate PV-0840 DSMZ) down to a dilution of  $10^{-5}$  with 100% repeatability. The sensitivity of tests with WDV-WFb/WDV-WRb primers is somewhat less high and amounts to  $10^{-4}$ , which is probably due to the very large size of the product amplified by these primers.

The WDV-F/WDV-R primers developed in China (Zhang et al., 2017) amplify almost the entire nucleotide sequence of the target virus coat protein gene, excluding 14 5-terminal nucleotides and 11 3-terminal nucleotides. Testing showed that these primers are 100% specific for the target virus and enable the diagnosis of all identified isolates of WDV-B and WDV-W strains with a sensitivity of up to  $10^{-5}$  and 100% repeatability. These primers are best used with the GenTerra 5x Genta PCR PRIZM reagent kit.

The WDV-H-F/WDV-H-R and WDV-T-F/WDV-T-R primers (Trzmiel, Klejdysz, 2018), developed respectively for the intergenic region (SIR) of WDV-B isolates and the RepA gene region in WDV-W isolates, were also tested. Based on the results of the experiments, it was concluded that the WDV-T-F/WDV-T-R primers can be recommended for additional confirmatory tests for the presence of WDV in order to study the genetic characteristics of the detected isolates.

## CONCLUSION

The conducted studies allowed the development of methodological recommendations for the detection and identification of wheat dwarf virus (WDV), which recommend using one of the following tests for screening tests: the ELISA method with the Loewe (Germany) WDV test system, or the real-time PCR method with primers and probe RTIC-F/RTIC-R/RTIC-Probe (Wang et al., 2016). For confirmatory tests for the presence of WDV, it is recommended to use the classical PCR method with WDV-WFb/WDV-WRb primers (Abt et al., 2020) or WDV-F/WDV-R primers (Zhang et al., 2017), developed for the target object coat protein gene. To conduct additional confirmatory tests and study the genetic characteristics of the identified isolates, it is advisable to use the primers WDV-T-F/WDV-T-R (Trzmiel, T.Klejdysz, 2018), WDV-1F/WDV-WRb (Abt et al., 2020) and WDV-40F/WDV-806R (Wu et al., 2008), complementary to the regions of the RepA, Rep genes and the transport protein of the WDV genomic DNA, respectively.

метод классической ПЦР с праймерами WDV-WFb/WDV-WRb (Abt et al., 2020) или праймерами WDV-F/WDV-R (Zhang et al., 2017), разработанными к гену белка оболочки целевого объекта. Для проведения дополнительных подтверждающих тестов и изучения генетических особенностей у выявленных изолятов целесообразно использовать праймеры WDV-T-F/WDV-T-R (Trzmiel, T.Klejdysz, 2018), WDV-1F/WDV-WRb (Abt et al., 2020) и WDV-40F/WDV-806R (Wu et al., 2008), комплементарные соответственно участкам генов RepA, Rep и транспортного белка геномной ДНК WDV.

Исследования выполнены в рамках Государственного задания (Рег. № НИОКТР 123022100120-4).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бей-Биенко Т.Я. Насекомые и клещи – вредители сельскохозяйственных культур. Том 1. Насекомые с неполным превращением // Л.: Наука. – 1972. – 214 с.
2. Живаева Т.С., Приходько Ю.Н., Лозовая Е.Н., Шнейдер Ю.А., Башкирова И.Г., Каримова Е.В. Разработка и валидация методов диагностики вируса полосатой мозаики пшеницы (WSMV). Фитосанитария. Карантин растений. 2025. № 2 (23). С. 62–77. DOI: 10.69536/FKR.2025.52.35.004
3. Кулакова Ю.Ю., Орлова Ю.В., Омеляненко Т.З., Комаров Д.А., Кулаков В.Г. Горчак ползучий: история расселения вида в Крыму и Поволжье // Фитосанитария. Карантин растений. – 2022. – № 4 (12). – С. 2–15. – DOI 10.69536/n8968-0127-4785-m.
4. Орлов В.Н. Вредители зерновых колосовых культур // М.: Печатный Город. – 2006. – 104 с.
5. Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Лозовая Е.Н., Селявкин С.Н., Шнейдер Ю.А., Пручкина М.А., Каримова Е.В. Серомониторинг вирусов пшеницы (2021-2023 гг.) Фитосанитария. Карантин растений. 2024. № S2-1 (18). С. 44.
6. Хорина Н.А., Лопаткин А.А., Живаева Т.С., Приходько Ю.Н., Шнейдер Ю.А. Вирус штриховатой мозаики ячменя – опасный патоген, влияющий на экспортный потенциал Российской Федерации Фитосанитария. Карантин растений. 2023. № 1 (13). С. 32-46. DOI: 10.69536/x7079-1718-0013-z
7. Abt I., Souquet M., Gersende Angot G., Romain Mabon R., Dallot S., Gaël Thébaud G., Jacquot E. Functional transcomplementation between Wheat dwarf virus strains in wheat and barley// Viruses. – 2020, 12, 34. – <http://dx.doi.org/10.3390/v12010034>.
8. Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. Zurcher E.J. (eds.) Wheat dwarf monogeminivirus// Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. – URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
9. CABI, 2025. Wheat dwarf virus// CABI Crop Protection Compendium. – <https://doi.org/10.1079/cabicompendium>.
10. Hao Y., Wang Y., Chen Z., Bland D., Li S., Brown-Guedira G., et al. A conserved locus conditioning Soil-borne wheat mosaic virus resistance on the long arm of chromosome 5D in common wheat// Mol. Breed. – 2012. – Vol.30. – P. 1453–1464.
11. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis

The research was carried out within the framework of the State assignment (Reg. No. NIOKTR 123022100120-4).

### REFERENCES

1. Bey-Bienko T. Ya. Insects and mites – pests of agricultural crops [Nasekomye i kleshchi – vrediteli selskokhozyaystvennykh kultur]. Volume 1. Insects with incomplete metamorphosis// L.: Science. – 1972. – 214 p. (In Russ.)
2. Zhivaeva T.S., Prikhodko Yu.N., Lozovaya E.N., Shneyder Yu.A., Bashkirova I.G., Karimova E.V. Development and validation of methods for diagnosing wheat streak mosaic virus (WSMV). Plant Health and Quarantine. 2025; 2(23): 62-77. DOI: 10.69536/FKR.2025.52.35.004
3. Kulakova Yu.Yu., Orlova Yu.V., Omelyanenko T.Z., Komarov D.A., Kulakov V.G. Acroptilon repens (L.) DC.: the history of the species spreading in the Crimea and the Volga region// Plant Health and Quarantine. 2022; 4(12): 2-15. – DOI 10.69536/n8968-0127-4785-m.
4. Orlov V.N. Pests of cereal crops [Vrediteli zernovykh kolosovykh kultur] // M.: Pechatny Gorod. 2006. 104 p. (In Russ.)
5. Prikhodko Yu.N., Zhivaeva T.S., Lozovaya E.N., Selyavkin S.N., Shneyder Yu.A., Pruchkina M.A., Karimova E.V. Seromonitoring of wheat viruses (2021-2023) Plant Health and Quarantine. 2024; S2-1 (18): 44.
6. Khorina N.A., Lopatkin A.A., Zhivaeva T.S., Prikhodko Yu.N., Schneider Yu.A. Barley stripe mosaic virus – a serious pathogen affecting the export potential of the Russian Federation. Plant Health and Quarantine. 2023; 1(13): 32-46. DOI: 10.69536/x7079-1718-0013-z
7. Abt I., Souquet M., Gersende Angot G., Romain Mabon R., Dallot S., Gaël Thébaud G., Jacquot E. Functional transcomplementation between Wheat dwarf virus strains in wheat and barley// Viruses. – 2020, 12, 34. – <http://dx.doi.org/10.3390/v12010034>.
8. Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. Zurcher E.J. (eds.) Wheat dwarf monogeminivirus// Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. – URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
9. CABI, 2025. Wheat dwarf virus// CABI Crop Protection Compendium. – <https://doi.org/10.1079/cabicompendium>.
10. Hao Y., Wang Y., Chen Z., Bland D., Li S., Brown-Guedira G., et al. A conserved locus conditioning Soil-borne wheat mosaic virus resistance on the long arm of chromosome 5D in common wheat// Mol. Breed. – 2012. – Vol.30. – P. 1453–1464.
11. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.41: 95–98.
12. Kundu J., Gadiou S., Červená G. Discrimination and genetic diversity of Wheat dwarf virus in the Czech Republic// Virus genes. – 2009. – Vol.38. – P. 468–474.

program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.41:95–98.

12. Kundu J., Gadiou S., Červená G. Discrimination and genetic diversity of Wheat dwarf virus in the Czech Republic// *Virus genes.* – 2009. – Vol.38. – P. 468–474.

13. Lemmetty A., Huusela-Veistola E. First report of Wheat dwarf virus in winter wheat in Finland// *Plant Disease.* – 2005. – Vol.89. – P. 912–912.

14. Lindblad M., Waern P. Correlation of wheat dwarf incidence to winter wheat cultivation practices// *Agriculture, Ecosystems & Environment.* – 2002. – Vol.92. – P.115–122.

15. Manurung B., Witsack W., Mehner S., Grüntzig M., Fuchs E. The epidemiology of Wheat dwarf virus in relation to occurrence of the leafhopper *Psammotettix alienus* in Middle-Germany// *Virus Research.* – 2004. – Vol.100. – P.109–113.

16. Mishchenko L., Dunich A., Mishchenko I., Dashchenko A., Boyko O., Skufinskyi O., Kyrychenko A., Kozub N., Mukha T. Wheat dwarf virus and its impact on the 2020 harvest in some regions of Ukraine// *Karantin i zahist roslin.* – 2021. – №1 (264). – С.3–9.

17. Mishchenko L.T., Dunich A.A., Mishchenko I.A., Dashchenko A.V., Kozub N.O., Kyslykh T.M., Molodchenkova O.O. Wheat dwarf virus in Ukraine: occurrence, molecular characterization and impact on the yield// *Journal of Plant Diseases and Protection.* – 2022. – Vol.129 (1). – P.107–116.

18. Nygren J.N., Shad N., Kvarnheden A., Westerbergh A. Variation in susceptibility to Wheat dwarf virus among wild and domesticated wheat// *PLoS One.* – 2014. – 10, e0121580-e0121580.

19. Pfrieme A.-K., Will T., Pillen K., Stahi A. The past, present, and future of Wheat dwarf virus management-A review// *Plants.* 2023, 12(20), 3633; <https://doi.org/10.3390/plants12203633>.

20. Širlová L., Vacke J., Chaloupkova M. Reaction of selected winter wheat varieties to autumnal infection with Wheat dwarf virus// *Plant Protection Science.* – 2005. – Vol.41. – P.1-7.

21. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027.

22. Tobias I., Shevchenko O., Kiss B., Bysov A., Snihur H., Polischuk V., Salanki K., Palkovics L. Comparison of the nucleotide sequences of Wheat dwarf virus (WDV) isolates from Hungary and Ukraine// *Polish Soc Microbiologists.* – 2011. – Vol.60. – P.125–131.

23. Trzmiel K., Klejdysz T. Detection of barley- and wheat-specific forms of Wheat dwarf virus in its vector *Psammotettix alienus* by duplex PCR assay// *Journal of Plant Protection Research.* – 2018. – Vol.58 (1). – P.54–57.

24. Wang L., Liu Y., Wang X.-F. Detection of Wheat dwarf virus by TaqMan LNA probe real-time PCR// *Acta Phytopathologica Sinica.* – 2016. – Vol. 46 (3). – P. 313–319.

25. Wei S., Liu L., Chen G., Yang H., Huang L., Gong G., Luo P., Zhang M. Molecular evolution and phylogeographic analysis of Wheat dwarf virus// *Front. Microbiology.* – 2024. – 15:1314526/ doi: 10.3389/fmicb.2024.1314526.

26. Wu B., Melcher U., Guo X., Wang X., Fan L., Zhou G. Assessment of codivergence of Mastreviruses with their plant hosts// *BMC Evolutionary Biology.* – 2008, 8, 335.

13. Lemmetty A., Huusela-Veistola E. First report of Wheat dwarf virus in winter wheat in Finland// *Plant Disease.* – 2005. – Vol.89. – P. 912–912.

14. Lindblad M., Waern P. Correlation of wheat dwarf incidence to winter wheat cultivation practices// *Agriculture, Ecosystems & Environment.* – 2002. – Vol.92. – P.115–122.

15. Manurung B., Witsack W., Mehner S., Grüntzig M., Fuchs E. The epidemiology of Wheat dwarf virus in relation to occurrence of the leafhopper *Psammotettix alienus* in Middle-Germany// *Virus Research.* – 2004. – Vol.100. – P.109–113.

16. Mishchenko L., Dunich A., Mishchenko I., Dashchenko A., Boyko O., Skufinskyi O., Kyrychenko A., Kozub N., Mukha T. Wheat dwarf virus and its impact on the 2020 harvest in some regions of Ukraine// *Karantin i zahist roslin.* – 2021. – №1 (264). – С.3-9.

17. Mishchenko L.T., Dunich A.A., Mishchenko I.A., Dashchenko A.V., Kozub N.O., Kyslykh T.M., Molodchenkova O.O. Wheat dwarf virus in Ukraine: occurrence, molecular characterization and impact on the yield// *Journal of Plant Diseases and Protection.* – 2022. – Vol.129 (1). – P.107–116.

18. Nygren J.N., Shad N., Kvarnheden A., Westerbergh A. Variation in susceptibility to Wheat dwarf virus among wild and domesticated wheat// *PLoS One.* – 2014. – 10, e0121580-e0121580.

19. Pfrieme A.-K., Will T., Pillen K., Stahi A. The past, present, and future of Wheat dwarf virus management-A review// *Plants.* 2023, 12(20), 3633; <https://doi.org/10.3390/plants12203633>.

20. Širlová L., Vacke J., Chaloupkova M. Reaction of selected winter wheat varieties to autumnal infection with Wheat dwarf virus// *Plant Protection Science.* – 2005. – Vol.41. – P.1–7.

21. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027.

22. Tobias I., Shevchenko O., Kiss B., Bysov A., Snihur H., Polischuk V., Salanki K., Palkovics L. Comparison of the nucleotide sequences of Wheat dwarf virus (WDV) isolates from Hungary and Ukraine// *Polish Soc Microbiologists.* – 2011. – Vol.60. – P.125–131.

23. Trzmiel K., Klejdysz T. Detection of barley- and wheat-specific forms of Wheat dwarf virus in its vector *Psammotettix alienus* by duplex PCR assay// *Journal of Plant Protection Research.* – 2018. – Vol.58 (1). – P. 54–57.

24. Wang L., Liu Y., Wang X.-F. Detection of Wheat dwarf virus by TaqMan LNA probe real-time PCR// *Acta Phytopathologica Sinica.* – 2016. – Vol. 46 (3). – P. 313–319.

25. Wei S., Liu L., Chen G., Yang H., Huang L., Gong G., Luo P., Zhang M. Molecular evolution and phylogeographic analysis of Wheat dwarf virus// *Front. Microbiology.* – 2024. – 15:1314526/ doi: 10.3389/fmicb.2024.1314526.

26. Wu B., Melcher U., Guo X., Wang X., Fan L., Zhou G. Assessment of codivergence of Mastreviruses

27. Zhang P., Liu Y., Liu W., Massart S., Wang X. Simultaneous detection of Wheat dwarf virus, Northern cereal mosaic virus, Barley yellow striate mosaic virus and Rice black-streaked dwarf virus in wheat by multiplex RT-PCR// Journal of Virological Methods. – 2017. – Vol. 249. – P.170–174.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Лозовая Евгения Николаевна**, научный сотрудник отдела аспирантуры ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150;

*ORCID: 0000-0001-8612-5127,*

*e-mail: evgeniyaf@mail.ru*

**Живаева Татьяна Степановна**, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150;

*ORCID: 0009-0008-8312-2666,*

*e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru*

**Приходько Юрий Николаевич**, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР, пгт Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия;

*ORCID: 0009-0004-9176-407X,*

*e-mail: prihodko\_yuri59@mail.ru*

**Башкирова Ида Геннадьевна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150;

*ORCID: 0000-0001-9014-4179,*

*e-mail: bashkirovaaid@mail.ru*

**Емельянова Анастасия Александровна**, младший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150;

*e-mail: 6ibsh505505@gmail.com.*

**Шнейдер Юрий Андреевич**, кандидат биологических наук, начальник научно-методического отдела вирусологии, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150; доцент кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»;

*ORCID 0000-0002-7565-1241,*

*e-mail: yury.shneyder@mail.ru.*

with their plant hosts// BMC Evolutionary Biology. – 2008, 8, 335.

27. Zhang P., Liu Y., Liu W., Massart S., Wang X. Simultaneous detection of Wheat dwarf virus, Northern cereal mosaic virus, Barley yellow striate mosaic virus and Rice black-streaked dwarf virus in wheat by multiplex RT-PCR// Journal of Virological Methods. – 2017. – Vol. 249. – P.170–174.

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Evgenia Lozovaya**, Researcher, Postgraduate Department, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150;

*ORCID: 0000-0001-8612-5127,*

*e-mail: evgeniyaf@mail.ru*

**Tatiana Zhivaeva**, Researcher, Research and Methodology Department of Virology, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150;

*ORCID: 0009-0008-8312-2666,*

*e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru*

**Yuri Prihodko**, PhD in Agriculture, Leading Researcher, Research and Methodology Department of Virology, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;

*ORCID: 0009-0004-9176-407X,*

*e-mail: prihodko\_yuri59@mail.ru*

**Ida Bashkirova**, PhD in Biology, Researcher, Research and Methodology Department of Virology, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150;

*ORCID: 0000-0001-9014-4179,*

*e-mail: bashkirovaaid@mail.ru*

**Anastasia Emelyanova**, Junior Researcher, Research and Methodology Department of Virology, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150;

*e-mail: 6ibsh505505@gmail.com.*

**Yuri Shneyder**, PhD in Biology, Head of Research and Methodology Department of Virology, Leading Researcher, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150; Associate Professor of the Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;

*ORCID 0000-0002-7565-1241,*

*e-mail: yury.shneyder@mail.ru.*