

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри д.б.н., проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____ 2024 р.

**ВИДОВИЙ СКЛАД ВІРУСІВ СОЇ РОДИНИ *POTYVIRIDAE*
В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання
за спеціальністю біологія
Чабан Марії Дмитрівни
Науковий керівник від кафедри
к.б.н., ас. Дуніч А. А.

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

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Характеристика вірусу мозаїки сої, звичайної та жовтої мозаїки квасолі.....	5
1.1 Загальні відомості	5
1.2. Морфологія вірусів та фізико-хімічні властивості	7
1.3. Організація геному	8
1.4. Способи передачі вірусів.....	11
1.5. Симптоматика на рослинах сої.....	15
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	19
3.1 Метод візуальної діагностики.....	19
2.2. Метод трансмісійної електронної мікроскопії.....	20
2.3. ІФА в модифікації подвійний сендвіч (DAS-ELISA).....	21
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією....	22
2.5. Філогенетичний аналіз.....	25
2.6. Статистичні методи обробки даних.....	26
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	27
3.1. Дослідження симптомів на рослинах сої.....	27
3.2. Вивчення морфології вірусних частинок.....	30
3.3. Діагностика вірусів методом ІФА.....	32
3.4. Діагностика вірусів методом ЗТ-ПЛР.....	34
3.5. Філогенетичний аналіз ізолятів вірусу мозаїки сої.....	35
ВИСНОВКИ	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	43

ВСТУП

Соя є важливим джерелом білка та олії і найчастіше використовується в раціоні як людей, так і тварин. Проте врожайність зерна сої порівняно менша за її потенціал. Основні фактори включають нерівномірність клімату, низький відсоток схожості, невідповідний час вирощування, непридатне місце для посадки, недостатню якість поливу насіння, бур'яни та хвороби. Соя важлива харчова та кормова культура, яка уражується багатьма вірусами, але лише деякі з них мають економічне значення для виробництва сої. Ці економічно важливі віруси включають: вірус мозаїки сої, soybean mosaic virus (SMV), вірус плямистості стручків квасолі (BPMV), вірус некрозу жилок сої, вірус кільцевої плямистості тютюну, вірус карликовості сої та вірус мозаїки люцерни (AMV). Також повідомлялося, що зараження сої кількома вірусами, такими як SMV і BPMV або AMV, спричиняє більшу шкоду, ніж моноінфекція (Murphy, Bowen 2006).

Серед потівірусів, які є найбільш поширеними та шкодочинними на рослинах сої є вірус мозаїки сої (SMV), вірус мозаїки жовтої квасолі (bean yellow mosaic virus, BYMV) та вірус звичайної мозаїки квасолі (bean yellow mosaic virus, BCMV) (Lim, 2018). Ці віруси є серйозною загрозою для вирощування сої та квасолі, які важливі для світового виробництва продуктів харчування та сої.

Вірус мозаїки сої, належить до групи *Potyvirus*, і спричиняє хворобу, яка проявляється у вигляді специфічної мозаїчної забарвленості листя, зменшення врожайності та загрози знищення посівів. Цей вірус може бути переданий через різні шляхи, включаючи комах та насіння.

Вірус мозаїки жовтої квасолі призводить до мозаїчного ураження листя, зменшення врожайності та загрози для вирощування квасолі. Цей вірус може передаватися комахами, а також через насіння.

Загальними заходами контролю над цими вірусами є використання здорового насіння, застосування різних методів біологічного та хімічного захисту, а також селекція стійких сортів рослин. Боротьба з цими вірусами є

важливою складовою у забезпеченні стабільного вирощування сої та збереженні їхньої продуктивності. Одним із дієвих напрямків профілактики цих вірусів є їх діагностика.

Зважаючи на це, метою роботи було скринінг потівірусів - вірусу мозаїки сої, звичайної мозаїки квасолі, жовтої мозаїки квасолі на рослинах сої та дослідити їх біологічні та молекулярно-генетичні властивості ізолятів.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ МОЗАЇКИ СОЇ, ЗВИЧАЙНОЇ ТА ЖОВТОЇ МОЗАЇКИ КВАСОЛІ

1.1. Загальні відомості

Вірус мозаїки сої (SMV) належить до роду *Potyvirus* та родини *Potyviridae*. Його основними хазяями, в основному є рослини, що належать до родини *Fabaceae*. Він також може уражувати інші економічно важливі культури. SMV зустрічається у всіх районах вирощування сої у світі. Соя є одним із найважливіших джерел харчової олії та білків, а патогенні інфекції призводять до щорічної втрати врожаю на мільярди доларів. Таким чином, SMV є найбільш важливим та поширеним патогеном у виробництві сої у всьому світі. Геном SMV представлений одноланцюговою +РНК та становить близько 9,5 т.п.н і кодує щонайменше 11 білків. Віріони SMV простої будови, ниткоподібної форми довжиною близько 720-750 нм і діаметром 12-15 нм (Choi, Lee, 2019).

SMV викликає величезні втрати врожаю сої та якості насіння (Dolja et al., 1995). Характерні симптоми SMV на сої (рис.1.1).



А

Б

Рис. 1.1. Симптоми ураження SMV: А - на листках сої; Б – плямистість насіння (Domier, 2007)

Вірус звичайної мозаїки квасолі (ВСМV) передається попелицею, який також можуть передаватися насінням звичайної квасолі з ефективністю до 80%, залежно від сорту квасолі та штаму вірусу. Зараження фітопатогенами, в тому числі вірусами рослин, може завдати квасолі звичайної значних втрат як врожаю, так і якості. ВСМV і близькоспоріднений ВСМNV є найбільш руйнівними вірусами квасолі звичайної, які викликають мозаїчну хворобу квасолі і так звану хворобу «чорного кореня». З моменту відкриття в 1917 році ВСМV і був зареєстрований в 57 країнах і регіонах і найважливішим біологічним фактором, що впливає на виробництво звичайної квасолі. ВСМV належать до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae*, найбільшої родини відомих РНК-вірусів рослин, які класифікуються на 12 родів (*Arenavirus*, *Bevetovirus*, *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Celavirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Roymovirus*, *Rymovirus* і *Tritimovirus*). Характерним симптомом є жовта мозаїка на листках (рис. 1.2).



Рис. 1.2. Симптоми ураження вірусом жовтої мозаїки квасолі на сої (Dr. Parthasarathy Seethapathy, 2018)

Розуміння молекулярної біології ВСМV і противірусного механізму рослин є необхідною умовою для розробки ефективних стратегій управління (Adams, 2009). За останні два десятиліття в цій галузі було досягнуто кілька успіхів. Наприклад, штамовий склад ВСМV був добре задокументований, інфекційна кДНК була успішно розроблена для аналізу патогенності ВСМV,

а кілька генів резистентності в звичайній квасолі були успішно ідентифіковані та використані в практиці селекції.

1.2. Морфологія вірусів та фізико-хімічні властивості

Діапазон розмірів вірусу мозаїки сої можна порівняти з розмірами представників родини *Potyviridae* з діапазоном 690-750 нм (рис. 1.3).

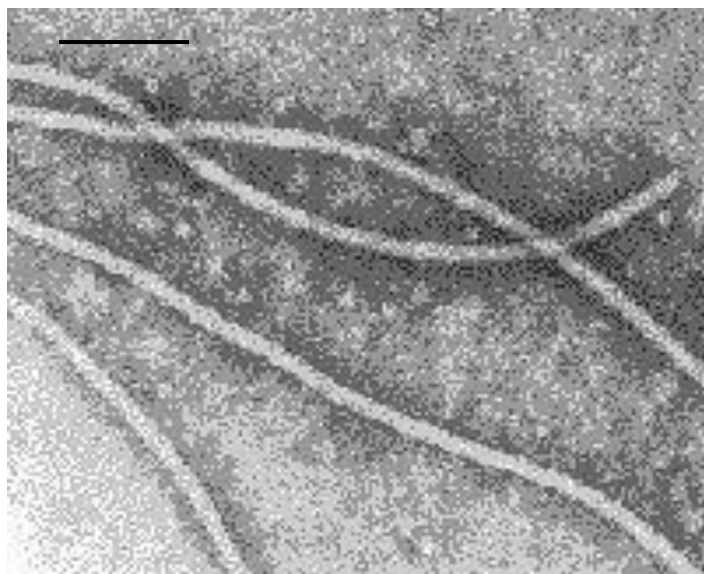


Рис. 1.3. Електронна мікрофотографія частинок SMV, очищених після негативного контрастування (Дж. П. Росс 2015)

Фізична стабільність вірусу.

Для вивчення фізичних властивостей вірусних ізолятів вірусу мозаїки сої можна проводити різноманітні тести. Зазначено, що вірус інактивується після прогрівання при 70°C протягом 10 хв як точку термічної інактивації (ТТІ) . Кінцева точка розведення (DEP) вірусу мозаїки сої становить 1:10 000, а тривалість життя *in vitro* (LIV) SMV становить 7 днів при 21 °C, тобто за кімнатної температури.

BSMV має характерну для потівірусів морфологію. Капсид - це білковий оболонковий матеріал, що оточує генетичний матеріал вірусу. У випадку BSMV капсид має ниткоподібну форму з довжиною близько 700 нм.

Капсид виконує захисну функцію та забезпечує вірусу здатність залишатися стабільним у зовнішньому середовищі та захищати РНК-геном від зовнішніх впливів. Генетичний матеріал вірусу ВСМV складається з трьох ниткоподібних молекул РНК (Reddy, 2015). Ці молекули кодують різні білки, необхідні для розмноження та інфекції рослинної клітини. Загалом, морфологія вірусу звичайної мозаїки квасолі визначається його капсидом.

Капсид ВУМV має нитковидну форму і складається з білкових одиниць, які утворюють оболонку, що оточує генетичний матеріал вірусу. Розміри капсиду становлять приблизно 750 нанометрів у довжину. Генетичний матеріал ВУМV складається з одноланцюгової РНК, яка містить інформацію, необхідну для розмноження та синтезу білків вірусу в клітині хазяїна. Капсид має внутрішню порожнину, яка містить РНК геному вірусу (Cheng, 2018). Зовнішня структура капсиду може мати різні візерунки та деталі, що визначаються властивостями білкових одиниць. Ці морфологічні особливості визначають зовнішній вигляд та структуру вірусу жовтої мозаїки квасолі, що дозволяє відрізнити його від інших вірусів та вивчати його вплив на рослини-хазяї.

1.3 Організація геному

Геном SMV складається з одноланцюгової позитивно-сміслової РНК довжиною приблизно 10 т.п.н., пов'язаної з геномним вірусним білком (VPg), пов'язаним з 5'-кінцем, і полі(А)-хвостом на 3'-кінці. вірусний геном. І РНК, і VPg інкапсульовані у паличкоподібний білок оболонки (CP). Геном кодує одну велику відкриту рамку зчитування (ORF), яка транслюється у великий поліпротеїн і потім піддається протеолітичній реакції з утворенням різних 10 функціональних білків. Зсув рамки зчитування в цистроні P3, геном SMV також виробляє невелику ORF, яка кодує 11 білок розміром 25 кДа (рис 1.4.).

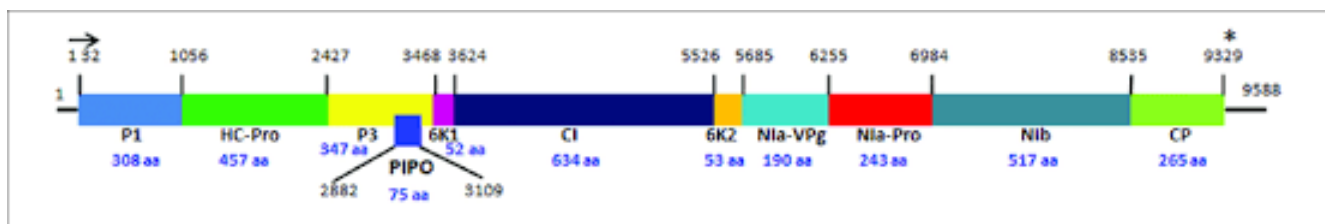


Рис. 1.4. Організація геному вірусу мозаїки сої. Діаграму було складено на основі нуклеотидної послідовності штаму SMV N. Кольорові рамки представляють 11 білків, кодованих геномом SMV. Чорні лінії на 5 і 3 кінцях представляють 5 і 3 нетрансльовану область (UTR). Горизонтальна стрілка та зірочка вказують на початковий і стоп-кодони поліпептиду SMV відповідно. Цифри над вертикальними лініями вказують початкові позиції білків SMV. Розміри білків SMV (кількість амінокислот) позначені синіми цифрами під назвами білків. PIPO, вбудований у P3, показаний темно-синім прямокутником, що перекривається, із позначками початкової та кінцевої позицій відповідно (Eggenberger, 1989).

Вірус мозаїки сої кодує кілька білків, необхідних для свого життєвого циклу та інфікування рослин. Основні білки, які кодуються вірусом мозаїки сої, включають:

Білок капсиду (Coat protein, CP): Цей білок є одним з найважливіших структурних компонентів вірусу мозаїки сої. Він формує зовнішню оболонку вірусної частинки, відому як капсид, яка захищає генетичний матеріал вірусу від зовнішнього середовища. Білок капсиду також має ключове значення у взаємодії з клітинами рослини-хазяїна та фасуванні вірусу для його передачі від однієї рослини до іншої, часто за допомогою векторних комах або механічних чинників.

Білки, пов'язані з реплікацією (Replication-associated proteins): Ці білки необхідні для реплікації генетичного матеріалу вірусу мозаїки сої в клітинах рослини-господаря. Вони включають білки, які забезпечують копіювання та розмноження вірусної РНК, а також білки, які взаємодіють з клітинними

компонентами рослини для створення сприятливих умов для реплікації вірусу.

Білки, що регулюють інфекцію (Pathogenesis-related proteins): Деякі білки, які синтезуються вірусом мозаїки сої, можуть бути пов'язані з розвитком захворювання в рослині-хазяїні. Вони можуть впливати на імунну відповідь рослини, що може зробити її більш вразливою перед іншими патогенами або стресовими умовами. Ці білки можуть також сприяти розвитку симптомів захворювання, таких як некротичні ураження, деформація тканин тощо.

Геном вірусу звичайної мозаїки квасолі складається з одноланцюгової РНК Він належить до родини *Potyviridae*, яка включає численні рослинні віруси. І BCMV має геном одноланцюгової РНК з позитивним змістом (+ssRNA) довжиною приблизно 9600 нуклеотидів (нт), який інкапсульований у безоболонкові, гнучкі та ниткоподібні віріони довжиною 750 нм та діаметром 11–13 нм. 3'-кінець геному поліаденільований, тоді як 5'-кінець ковалентно пов'язаний з білком, пов'язаним з вірусним геномом (*VPg*). Подібно до інших потівірусів, геном BCMV кодує велику відкриту рамку зчитування (*ORF*), яка транслюється в поліпептид масою приблизно 350 кДа. Геном позитивного напрямку (Наїморад, 2019). BCMV представляє собою одноланцюгову РНК. РНК геному BCMV має нелінійну структуру, а його кінці зазвичай мають некодуючі області, які важливі для розпізнавання та реплікації. Геном кодує поліпротеїн, який подальше розщеплюється на індивідуальні функціональні білки під впливом вірусних та клітинних протеаз. Геном включає різні функціональні елементи, такі як промотори, реплікаційні області та області для упаковки вірусу. Генетична мапа включає різні гени, такі як гени, що кодує структурні білки, а також гени, які регулюють реплікацію та інші вірусні процеси.

Геном вірусу жовтої мозаїки квасолі (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) складається з одноланцюгової РНК. Довжина РНК геному BYMV має значну довжину, яка може бути близько 10 тисяч нуклеотидних основ. Геном містить

інформацію, необхідну для розмноження та синтезу білків вірусу в клітині господаря. Ця інформація кодується послідовностями нуклеотидів, які утворюють гени вірусу (Luzuriaga-Loaiza 2019). Геном включає різні гени, які кодують білки, необхідні для вірусного життєвого циклу, такі як гени капсиду, гени для реплікації РНК та гени для збору вірусних частинок. Геном містить також регуляторні області, які відповідають за контроль експресії генів вірусу та інші аспекти його взаємодії з клітинами господаря.

1.4. Способи передачі вірусів

Втрата врожаю через SMV, як і у випадку з більшістю вірусів, залежить від того, коли відбувається зараження, але зазвичай не перевищує 8–25%, якщо рослина неінфікована разом із вірусом крапчастості стручків квасолі. Тоді втрати врожаю можуть становити від 66 до 86%. Існує велика варіабельність між штамами SMV щодо рівня викликаних симптомів і сортів, які вони можуть інфікувати. Принаймні вісім окремих генів стійкості розташовані в трьох алелях. П'ятнадцять штампів SMV ідентифіковано за допомогою набору з восьми диференціальних сортів.

Уражені вірусом рослини можуть формувати інфіковані насіння, покриті чорними або темно-коричневими цятками, у разі якщо рослини були заражені до свого цвітіння. Проте трапляється, що насіння може мати пігментацію, але при цьому не бути ураженим SMV, те ж саме і з інфікованим насінням, яке не обов'язково може мати плямистість. Уражені вірусом насіння втрачають здатність до нормального проростання, стають сприйнятливими до ураження грибковими захворюваннями, слабо виконані. Водночас цвітіння призупиняє дію вірусу, і хоча при цьому знижується врожайність, передачі вірусу через насіння новому потомству не відбувається. Вплив інфекції вірусу соєвої мозаїки може робити сою сприйнятною до таких захворювань як стеблова гниль,

фомопсис (Scofield 2009). Рівень зараження насіння та втрати врожаю є вищими, якщо рослина заражена до, а не після цвітіння. Інфіковане насіння може призвести до інфікованих рослин, які часто служать початковими точками інокулята в полі з пізнішими інфекціями в результаті живлення попелиць. Інфекція насіння може досягати 75% залежно від сорту сої та штаму вірусу, але зазвичай становить менше 5%. Зараження SMV може призвести до меншого, менш енергійного насіння з меншим вмістом олії, але підвищеним вмістом білка та амінокислот. Однак інші стреси можуть спричинити цей симптом, і інфекції SMV можуть протікати безсимптомно. Частота випадків передачі зараження через насіння може доходити до 30%, залежно від сорту, вірусного штаму і часу інфікування.

Передача комахами

Природним та одним з основних шляхів передачі вірусу мозаїки сої є передача комахами. У польових дослідженнях було продемонстровано, що він переноситься соєвою попелицею (*Aphis glycines*), Вона активізується вже на початку весни і за відсутності своєчасного реагування знищує молоді пагони та бутони, призводячи до уповільнення розвитку, захворювань та повної загибелі рослин (рис.1.5).



Рис. 1.5. Попелиці *Aphis glycines* на листках сої (Palukaitis et al., 2009)

Потівіруси разом демонструють широке коло хазяїв, проте їх коло окремих представників зазвичай обмежується кількома рослинами. Наприклад, коло хазяїв вірусу мозаїки сої (SMV), філогенетично спорідненого потівірусу, обмежене двома видами рослин одного роду: культурною соєю (*Glycine max*) і дикою соєю (*G. soja*).

BSMV може передаватися через насіння, пилок, попелицю та механічно. Швидкість передачі BSMV через насіння становить від 3% до 95%, залежно від штаму вірусу та різновиду хазяїна. Висока швидкість передачі через насіння є однією з основних причин глобальної епідемії BSMV та основним вірусним ресурсом у польових умовах. BSMV обмежений насіннєвою оболонкою сортів квасолі з низькою швидкістю передачі; проте він може проникати у насіння (зародки) сортів квасолі з високою швидкістю передачі. Зазвичай BSMV заражає насіння через ендосперм. Однак, він також може заразити насіння через пилок. BSMV може зберігатися більше 30 років у насінні, вирощеному у відповідних умовах (MacFarlane, 2010). Проте ген(и), що у передачі насіння, і молекулярні механізми передачі насіння залишаються невловимими. Повідомлялося, що 36 попелиць з 21 роду, включаючи *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae*, *Myzus persica* та *Aphis craccivora*, ефективно передають BSMV (Zhou, 2012). Дослідження показали, що рослини, інфіковані BSMV, більш привабливі для попелиці, ніж здорові рослини, що вказує на те, що BSMV може модулювати шлях жасмонової кислоти, знижуючи захист від комах і приносячи користь попелиці. BSMV також може передаватися новим рослинам за допомогою механічної інокуляції. Зміни можуть вплинути на живлення та перенесення комах-переносників на рослини-хазяї. Більшість вірусів можуть викликати пожовтіння чи світло-зелені симптоми на листі рослини. Комахи-переносники більш схильні до відбору жовтих і світло-зелених тканин рослин, які могли утворитися в результаті тривалої еволюції рослин-вірус-господарі. Однак, механічна інокуляція не може суттєво сприяти природному поширенню BSMV (рис.1.6).



Рис. 1.6. Некротичні плями на листках сої, уражених BCMV (Yu, 2013)

Вірус жовтої мозаїки квасолі (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) може передаватися різними способами:

Попелицями: Головним шляхом передачі BYMV є через попелиць. Ці комахи служать векторами вірусу, переносячи його з заражених рослин на здорові. Коли комахи живляться соком рослин, вони можуть переносити вірус з однієї рослини на іншу.

Механічно: BYMV також може передаватися механічно через контакт з зараженими рослинами або насінням. Наприклад, при обробці рослин або внаслідок використання забруднених інструментів вірус може передаватися на здорові рослини.

Через насіння: Вірус може передаватися через забруднені насіннєві матеріали (Lin, 2012). Якщо рослина, яка вирощується з такого насіння, заражена, то і нові рослини будуть заражені вірусом.

Через дотик до інфікованих рослин: Вірус може передаватися через фізичний контакт з інфікованими рослинами. Наприклад, при обрізці або розмноженні рослин, якщо інструменти не очищені від вірусу, він може передаватися на здорові рослини.

1.5. Симптоматика на рослинах сої

За характером симптомів і ступенем патогенності, що викликаються, далекосхідні штами SMV розділені на три групи: сильно-, слабо- і середньопатогенні.

Уражені вірусом рослини відстають у рості, стають чахлими, збільшується кількість бічних пагонів, починається процес деформації листя. Зростання останніх сповільнюється, а самі вони стають зморщеними і зігнутими, по ширині набагато вже звичайних, с загнутими до низу краями. Хворі листя можуть набувати жовтуватий відтінок, хоча зазвичай стають темно-зеленими, проявляються симптоми гофрування та пухирчатості біля жилок (рис.1.7).



Рис. 1.7. Деформація листків рослин сої, уражених SMV (Hull, 2014)

Молоді і швидко зростаючі рослини найбільше вразливі перед інфекцією. Бульби на корінні рослин, уражених вірусом соєвої мозаїки, дрібні, щуплі і важать набагато менше бульб здорових рослин. Уповільнення процесу утворення бульбочок, що несе за собою ослаблення процесу азотфіксації, деформація і зменшення площі листкової поверхні стають одними з головних причин утворення дрібних недорозвинених бобів на уражених інфекцією рослинах. Боби, як правило, приплюснуті, з опушені, з меншою кількістю насіння. Насіння рослин, уражених мозаїкою, можуть

мати на оболонці чорну або коричневу плямистість. Деякі насіння повністю чорні або коричневі, проте двоколірні насіння зустрічаються частіше. Колір рубчика насінини є визначальним в кольорі і яскравості насінної оболонки. Плямистість завжди пов'язана з поганим проростанням і хворобами насіння, проте не завжди тільки з вірусом. Харчуються насінням комахи та фізіологічні стреси можуть також бути однією з її причин. Боби з сильною плямистістю менш цінні, особливо в міжнародній торгівлі, при подальшому їх використанні на виготовлення продуктів харчування (Hill, Whitham, 2014). Розміщення уражених мозаїкою рослин на полі має випадковий характер.

Симптоматика зараження вірусом жовтої мозаїки квасолі може виявлятися на різних стадіях розвитку рослини і включає такі ознаки:

1. Пожовтіння листків: Одним з найвидиміших симптомів зараження є пожовтіння листя, яка може появлятися у вигляді загального пожовтіння листка або ж плями з жовтим кольором.
2. Мозаїка листя: Іншим характерним симптомом є поява мозаїчних плям на листі. Це може виявлятися у вигляді різнокольорових плям або смуг на листі.
3. Деформація листя та пагонів: Рослини, заражені вірусом, часто проявляють деформацію листя та пагонів. Це може включати скручування, згорблення, розширення або інші аномалії у формі та розмірі листя та пагонів.
4. Затримка росту: Заражені рослини можуть мати гальмування у зростанні та розвитку, що проявляється в меншому розмірі рослин, відстаючих від здорових рослин за розміром та розвитком.
5. Низька врожайність: Внаслідок пошкодження, яке викликає вірус, рослини можуть мати знижену врожайність або навіть повний відмов від плодоношення (Wang, 2013). Ці симптоми можуть варіюватися залежно від виду культурної рослини, ступеня зараження та умов середовища, але вони в цілому є характерними для зараження вірусом жовтої мозаїки квасолі (рис 1.8).



Рис. 1.8. Жовта плямистість на листках сої, ураженої ВУМВ (Niblett, 1987)

Тип викликаного симптому визначається штамом ВСМВ, температурою та генотипом хазяїна. ВСМВ може викликати три типи симптомів: мозаїку, системний некроз (чорний корінь) або місцеві ураження чи вади розвитку. Симптоми, пов'язані зі звичайною мозаїкою, включають згортання листя або утворення пухирів, світло- та темно-зелені плями на листі (зелена мозаїка), хлоротичні смуги жилок, жовту мозаїку та зниження росту (Smith, 2020). Крапчастість і деформація первинних листків є ознакою того, що первинне зараження відбулося через насіння. Сорти, які розвивають звичайну мозаїку, можуть мати чіткі хлоротичні або некротичні місцеві ураження, які не пов'язані з судинною системою. Системно заражені рослини можуть мати дедалі менше стручків, а інфіковані стручки іноді можуть бути вкриті маленькими темно-зеленими плямами та дозрівати пізніше, ніж незаражені стручки. Чорний корінь характеризується локальними некротичними ураженнями, які поширюються на вени, викликаючи системний некроз у судинній системі; цей симптом виникає лише у сортів, що мають домінуючий ген стійкості І. Цей некроз може поширюватися на коріння, стебло та меристему та може призвести до загибелі рослини, якщо рослина заражена на ранній стадії (Jovanovic, 2017). Деформація листя та утворення пухирів, карликовість, скручування країв листя донизу, некроз судин, світло- та темно-зелена мозаїка, кільцеподібні та точкові локальні ураження, спотворення квітів і бутонів (рис. 1.9).



Рис. 1.9. Пухирчатість на листках сої спричинена BSMV (Giesler, 2006)

Таким чином, BSMV, BYMV, SMV є найбільш поширені віруси на посівах сої в світі, належать до родини Potyviridae та спричиняють суттєві втрати врожаю та зниження його якості.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Метод візуальної діагностики

Метод візуальної діагностики фітовірусів - це спосіб виявлення наявності вірусів у рослинах шляхом огляду зовнішніх ознак ураження. Цей метод зазвичай використовується як швидкий спосіб оцінки стану рослин у полі або в саду. Основними ознаками ураження фітовірусами можуть бути зміни у кольорі листя, деформація листя та пагонів, присутність плям або смуг на листях, а також загальне відчуття в'янення та відсторонення росту. Важливо зазначити, що ці ознаки можуть бути специфічними для певних типів вірусів та рослин, тому точна ідентифікація вірусу може вимагати додаткових лабораторних тестів. При огляді рослин звертають увагу на різноманітні симптоми, що можуть бути зумовлені фітовірусами. Серед таких симптомів можуть бути зміни у формі, розмірі та кольорі листя та пагонів, відсторонення від нормального росту, в'янення та деформація. Окрім того, рослини можуть мати плями або смуги на листях, які можуть свідчити про ураження вірусами. Під час візуальної діагностики важливо проводити ретельний огляд кожної частини рослини, починаючи з листя та пагонів, і переходячи до стебла та кореневої системи. Також корисно проводити огляд сусідніх рослин, оскільки фітовіруси можуть поширюватися через контакт або за допомогою комах-переносників. Документування симптомів, таке як фотографування або записи, є важливим етапом в процесі візуальної діагностики. Це допомагає не лише у виявленні проблем, а й у відстеженні їхнього розвитку та у прийнятті рішень щодо подальшого управління рослинами. У разі сумнівів щодо діагнозу або необхідності підтвердження присутності фітовірусів, рекомендується звернутися до фахівця, наприклад агронома або ботаніка. Вони можуть надати додаткові поради та

рекомендації щодо діагностики та управління фітовірусними захворюваннями. Важливо зауважити, що візуальна діагностика є лише першим кроком у виявленні фітовірусів, і для підтвердження діагнозу часто потрібні додаткові лабораторні тести та аналізи.

Проводили візуальні обстеження рослин сої на наявність на них симптомів вірусного ураження. Зразки рослин відбирали у Полтавській, Сумській, Львівській, Вінницькій і Київській областях. При фітопатологічних обстеженнях використовували загальноприйняту методику (Пересипкін та ін., 2000).

2.2. Метод трансмісійної електронної мікроскопії

Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) є потужним інструментом у вірусології, в тому числі для дослідження фітовірусів. Цей метод дозволяє отримувати дуже високороздільні зображення структур в масштабі нанометрів, що дає можливість докладно вивчати морфологію, розмір та інші характеристики вірусів. Трансмісійна електронна мікроскопія дозволяє отримати високоякісні та детальні зображення вірусів, включаючи фітовіруси, їхню структуру та організацію, такі як капсид та нуклеїнові кислоти. Цей метод є важливим для подальшого розуміння молекулярної організації та функцій вірусів, їхньої патогенезу та еволюції, вірусної морфології та механізмів зараження рослин а також для розробки стратегій боротьби з рослинними захворюваннями, які спричиняються фітовірусами (Zhang, 2012).

Вивчення морфології вірусних часток у соці рослина сої проводили за допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії. Сік з листків, який попередньо гомогенізували у 0,1 М фосфатно-сольовому буфері та центрифугували у режимі 3 тис. об\хв 5 хв, наносили на мідні сітки з плівкою-підкладкою, виготовленою з 0,2% розчину формвара на

хлороформі. Негативне контрастування препаратів проводили 2% водним розчином фосфорно-вольфрамової кислоти рН 7,4 протягом 2 хв (Салига, Снітинський, 1999). Препарати досліджували за допомогою електронного мікроскопу JEM 1400 (JEOL, Японія).

2.3. ІФА у модифікації подвійний сендвіч DAS-ELISA

Імуноферментний аналіз (ELISA) є одним з найпоширеніших і найефективніших методів лабораторної діагностики, який використовується для виявлення та кількісної оцінки антигенів у біологічних зразках. Цей метод, також відомий як Double Antigen Sandwich ELISA (DAS-ELISA), здатний виявляти навіть дуже малі кількості антигену завдяки специфічному взаємодії між антитілами та антигенами.

У порівнянні з іншими методами діагностики, DAS-ELISA відрізняється високою чутливістю, специфічністю та можливістю автоматизації (Matthews, 1991). Принцип роботи DAS-ELISA полягає в специфічній взаємодії між антитілами та антигенами.

У роботі використовували комерційні набори антитіл фірми Loewe (Німеччина) до SMV, BYMV, BCMV. Аналіз ставили за протоколом виробника.

Основні етапи ELISA подвійного сендвічу включали:

1. Імобілізація першого антитіла: Специфічне антитіло, яке реагує з антигеном, фіксується на поверхні полістиролового планшету. Перші антитіла додавали по 200 мкл у лунку.
2. Додавання зразка: Зразок, що містить антиген, додається на поверхню, де він зв'язується з іммобілізованим першим антитілом. Рослинний матеріал розтирали в буфері зразку, центрифугували при 3,5 тис об/хв. протягом 20 хв, відбирали надосад і вносили його у співвідношенні 1:20 з буфером зразка у фінальному об'ємі 200 мкл у лунки планшету.

3. Додавання другого антитіла з міткою лужною фосфатазою: Після видалення неприв'язаного антигену, до комплексу антитіла-антиген додавали друге антитіло об'ємом 200 мкл у лунку.
4. Додавання субстрату: після промивання для видалення других антитіл, що не зв'язалися з антигеном, вносили розчин, що містив субстрат для лужної фосфатази. Реакція мітки з субстратом призводить до утворення продукту з інтенсивним жовтим кольором, інтенсивність якого реєстрували на рідері Termo Labsystems (США) при довжині хвилі 405 нм (Crowther J.R. ELISA. (1995). *Theory and practice*. N.Y.: Hamana Press.).

При постановці аналізу ставили контролю: негативний - сік здорових рослин сої та позитивний - комерційні препарати фірми Loewe.

2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

Розробка і застосування методів діагностики, таких як полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), відіграє ключову роль у вірусології, зокрема при вивченні фітовірусів. Фітовіруси є важливою групою вірусів, які інфікують рослини та можуть спричиняти значні втрати в сільському господарстві через захворювання рослин та втрату врожаю.

ЗТ-ПЛР зі зворотною транскрипцією - це метод, який поєднує два ключові процеси: зворотню транскрипцію та полімеразну ланцюгову реакцію (Mullis, Kary, 2010). Цей метод дозволяє досліджувати РНК, яка є генетичним матеріалом більшості фітовірусів, та виявляти їхню присутність у рослинних тканинах чи інших біологічних зразках.

Основні етапи ЗТ-ПЛР зі зворотною транскрипцією включають:

Екстракція РНК: Спочатку проводиться екстракція РНК з досліджуваного матеріалу, який може включати листя, стебло, корінь або інші рослинні тканини. Для цього застосовуються спеціалізовані методи, які дозволяють

виділити та очистити РНК зі зразків. Проводили виділення тотальної РНК зі зразків сої за допомогою набору RNeasy Mini kit, 74104 (Qiagen, США).

Основні етапи :

1. Наважка рослинного матеріалу 75 мг
2. Гомогенізація наважки у рідкому азоті
3. Додати до ступки буфер RLT 600мкл та 6 мкл бета-меркаптоетанолу, прогомогенізувати.
4. Перенести наважку у чистий 1,5 мл епендорф
5. Центрифугування 14 тис. об\хв 5 хв
6. Перенести надосад у чистий стерильний епендорф
7. Додати рівний об'єм етанолу, перенести все у колонку
8. Центрифугування 11 тис об\хв 1 хв
9. Виливаємо усе що пройшло через колонку.
10. Додати 700 мкл буферу RW1
11. Центрифугування 11 тис об\хв 1 хв
12. змінюємо низ колонки на чистий.
13. Додати 500 мкл буфера RPE
14. Центрифугування 11 тис об\хв 1 хв
15. Змінюємо низ колонки на чистий.
16. Знову додати 500 мкл буфера RPE
17. Центрифугування 11 тис об\хв 2 хв
18. Знову змінюємо низ колонки на чистий.
19. Відкрити кришки колонок та просушити їх 2-3 хвилини.
20. Додати 40 мкл стерильної води
21. Центрифугування 11 тис об\хв 1 хв
22. Воду, яка пройшла через колонку відібрати та знову додати до колонки
23. Центрифугування 11 тис об\хв 1 хв
24. перенести отриману НК у чистий стерильний 1,5 мл епендорф та зберігати при -20 С.

2. Зворотна транскрипція (ЗТ): Отримана РНК піддається зворотній транскрипції, під час якої фермент зворотньої транскриптази перетворює РНК у комплементарну ДНК (кДНК). Зворотню транскрипцію проводили, застосовуючи RevertAid Reverse Transcriptase – генетично модифіковану MMuLV RT (Thermo Scientific, США), інкубація 42⁰С 1 год.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР): Отримана кДНК використовується як матриця для синтезу нових молекул ДНК. Під час ПЛР проводяться низка циклів, кожен з яких включає розігрівання, денатурацію, аннеалінг праймерів та елонгацію, що дозволяє створювати копії конкретного фрагмента ДНК. При проведенні ПЛР використовували специфічні олігонуклеотидні праймери до гена капсидного білка SMV, а саме SMV-CPf: 5'-CAAGCAGCAAAGATGTAAATG-3') і SMV-CPr: 5'-GTCCATATCTAGGCATATACG-3', очікуваний розмір продукту ампліфікації ДНК 469 п.н. (Sherepitko et al., 2011). Ампліфікацію ділянки гену капсидного білка SMV здійснювали, використовуючи Dream Taq PCR Master Mix (2x) buffer (що містить Dream Taq DNA polymerase, 2X Dream Taq buffer, 0,4 mM кожного із dNTP та 4 mM of MgCl₂), 7,5 μl стерильної води, 1 μl кожного праймера (10 μM), та 3 μl of кДНК. Режим ампліфікації наступний: денатурація кДНК (3хв. 95⁰С), наступні 30 циклів 30с за 95⁰С денатурація, відпал праймерів (30 с за 55⁰С), синтез комплементарних ланцюгів ДНК (45 с за 72⁰С), елонгація – 72⁰С 10 хв.

3. Детекція продуктів ПЛР: проводили за допомогою електрофорезу в 1,5%-му розчині агарози з додаванням бромистого етидію в концентрації 0,5 мкг/мл, використовуючи маркер ДНК MassRuler DNA Ladder Mix ready-to-use (SM 0403, Thermo Scientific, США). Електрофорез проводили у камері для горизонтального електрофорезу в режимі 120V, 2A протягом 20 хв. Гелі фотографували при ультрафіолетовому випромінюванні.

Використання ЗТ-ПЛР у вірусології дозволяє точно та чутливо виявляти фітовіруси, їхні варіанти та штами, вивчати генетичний склад та структуру, а також визначати рівень інфекції у рослин (Hartman, 1999). Це

надає важливі дані для контролю та управління вірусними захворюваннями рослин, а також для розробки нових методів їхньої боротьби.

2.5. Філогенетичний аналіз

Продукти ампліфікації (кДНК) очищали за допомогою набору реактивів QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Велика Британія). Сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на аналізаторі 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Порівняння отриманих послідовностей із послідовностями ізолятів SMV із Генбанку проводили за допомогою BLAST-аналізу. Філогенетичний аналіз здійснювали за допомогою програмного пакету MEGA 11. Вирівнювання послідовностей здійснювали за допомогою програми Clustal W, вбудованої у MEGA. Філогенетичні дерева конструювали методом зв'язування найближчих сусідів з використанням найбільш оптимальних моделей (Saitou, 1987). Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп-тест з 1000 бутстреп реплікаціями.

Аналіз амінокислотних послідовностей проводили та візуалізували за допомогою програми BioEdit.

2.6. Статистичні методи обробки даних

Статистичні методи обробки даних в вірусології, зокрема при дослідженні фітовірусів, відіграють важливу роль у аналізі та інтерпретації результатів досліджень. Ці методи дозволяють вченим отримувати об'єктивні та надійні висновки з експериментальних даних, враховуючи різноманітність факторів, що впливають на вірусну динаміку та розповсюдження.

Середнє значення: Це просте показник, який представляє середнє арифметичне всіх значень у наборі даних. Наприклад, середнє вірусне навантаження у рослин може дати загальну ідею про рівень інфекції.

Аналіз проводився з використанням комп'ютерного програми MS EXCEL.

Бутстреп-тест: використовували при побудові філогенетичних дерев. Бутстреп-тест використовували з 1000 бутстреп реплікаціями, що є статистичної достовірністю побудованих дерев.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження симптомів на рослинах сої

Обстеження посівів сої в Київській і Полтавській областях показали наявність рослин із симптомами мозаїки на листках, зморшкуватості листової поверхні, чітко вираженої світло-зеленої пухирчатості між жилками

Таблиця .3.1

Перелік відібраних зразків сої

Номер зразка	Сорт	Область відбору
1	Грімо	Полтавська
2	Кофу	Полтавська
3	Монро	Полтавська
4	№ 4	Полтавська
5	№ 16	Полтавська
6	Сузір'я	Київська
7	№ 648	Київська
8	№ 15	Київська

У результаті обстежень посівів сої було виявлено рослини із симптомами мозаїки та деформації листових пластинок, зморшкуватості листків та плямистості (рис. 3.1-3.4).



Рис. 3.1. Симптоми мозаїки та деформації листкових пластинок на рослинах сорту Грімо, Полтавська область



Рис. 3.2. Симптоми зморшкватості листків на рослинах сорту Кофу, Полтавська область



Рис. 3.3. Симптоми мозаїки на рослинах сорту Монро, Полтавська область

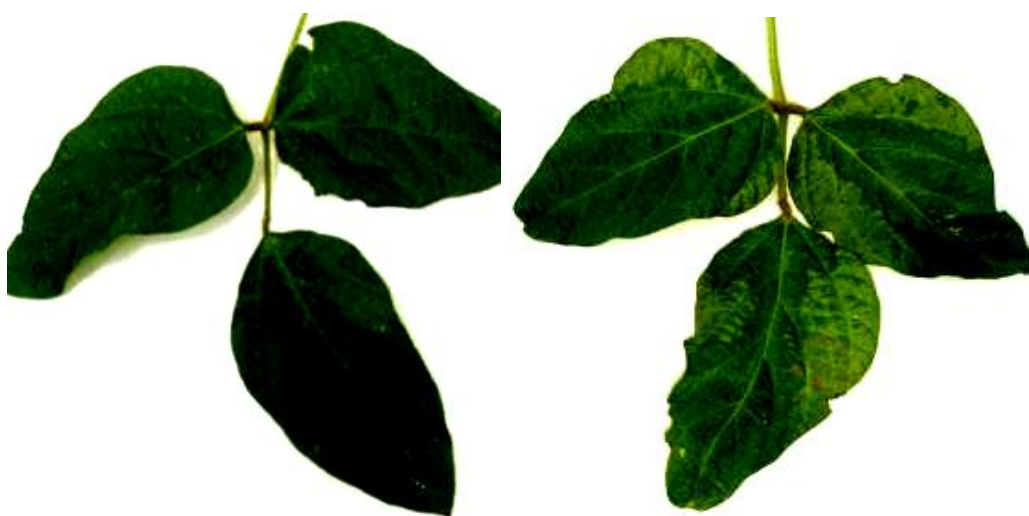


Рис. 3.4. Симптоми жовтої плямистості на рослинах сорту Сузір'я, Київська область

Рослини із вказаними симптомами були відібрані для подальших досліджень.

За даними наукової літератури симптоми на рослинах сої, схожі до виявлених нами, можуть викликати вірус мозаїки сої, вірус мозаїки люцерни та вірус жовтої мозаїки квасолі (<https://ictv.global/>).

Отже, нами виявлено рослини сої в Київській і Полтавській, областях з симптомами захворювання, що за своїм проявом є схожими до вірусного. Для підтвердження вірусної природи цієї хвороби необхідним є використання таких методів як електронна мікроскопія та імуноферментний аналіз.

3.2. Вивчення морфології вірусних частинок

Методом трансмісійної електронної мікроскопії встановлено, що досліджувані ізоляти вірусу мозаїки сої – це ниткоподібні вірусні частинки розмірами від 650 до $750 \pm 30 \times 13-15 \pm 1$ (рис. 3.5.).

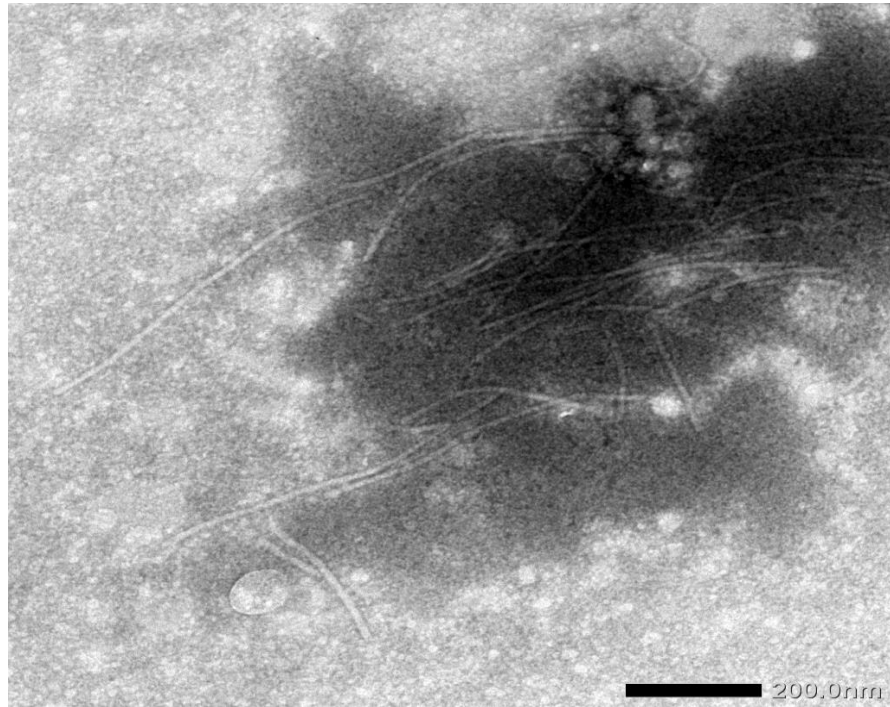


Рис. 3.5. Електронномікроскопічне зображення вірусних частинок, виявлених у соці з листків рослин сої сорту Монро

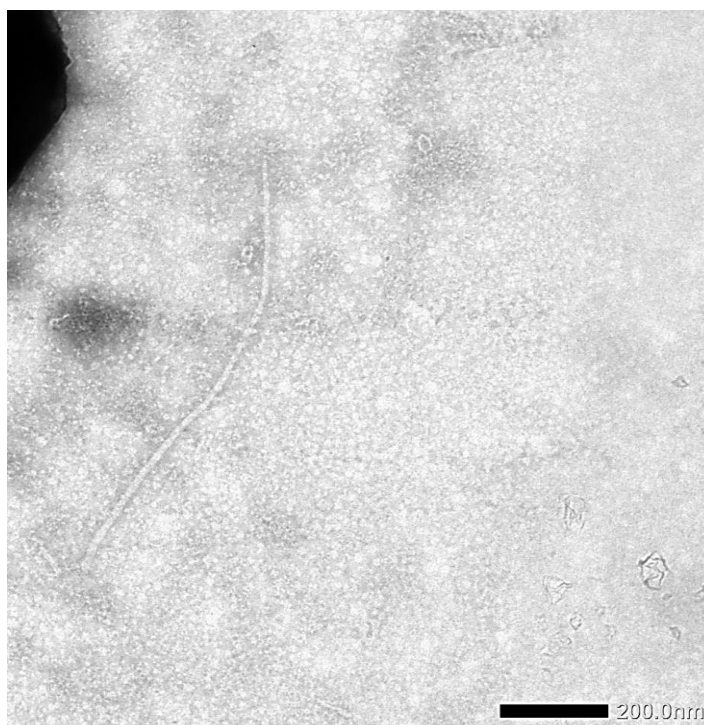


Рис. 3.6. Електронномікроскопічне зображення вірусних часток, виявлених у соці з листків рослин сої сорту Грімо

У рослинах сої № 648 із Київської області виявлено ниткоподібні віріони (рис.3.7).

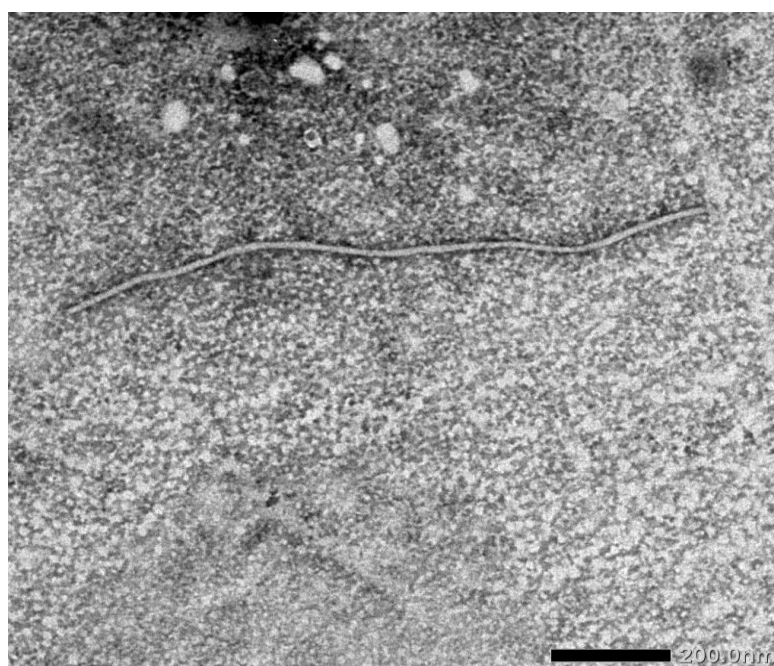


Рис. 3.7. Електронномікроскопічне зображення віріонів, виявлених у соці з листків рослин сої № 648, Київська область

За морфологією досліджувані віруси схожі до вірусів роду *Potyvirus*, *Potyviridae*, що являють собою нитковидні віріони розмірами 680-900 (11-13 нм (<https://ictv.global/>). За даними літератури, раніше виділені українські ізоляти SMV мають розміри 650-750×17-18 нм (Шерепітько, 2012).

Таким чином, за допомогою методу електронної мікроскопії вивчена морфологія та розміри вірусних частинок.

3.3. Діагностика вірусів методом ІФА

З метою ідентифікації виявлених у сої вірусів нами проведений ІФА з використанням антисироваток до вірусів, які подібні за морфологічними характеристиками та розповсюджені на цій культурі в світі та Україні, а саме: вірус мозаїки сої (soybean mosaic virus, SMV), вірус жовтої мозаїки квасолі (bean yellow mosaic virus, BYMV) та вірус звичайної мозаїки квасолі (bean common mosaic virus, BCMV).

Результати ІФА показали, що у всіх 8-ми сортах відсутні антигени BYMV та BCMV (рис. 3.8, 3,9).

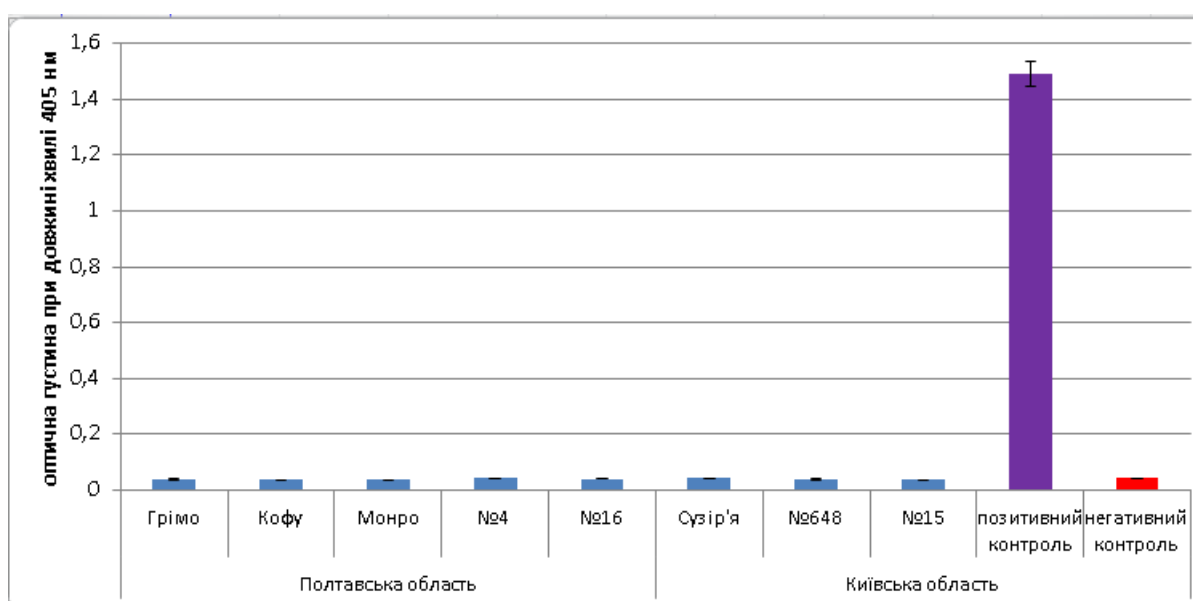


Рис.3.8. Вміст антигенів BCMV у зразках сої за результатами ІФА

У зразках сої сортів Грімо, Монро та Кофу (Полтавська область), а також сортах Сузір'я та № 648 із Київської області виявлено антигени SMV, що свідчить про ураження цих рослин вказаним вірусом (рис. 3.9).

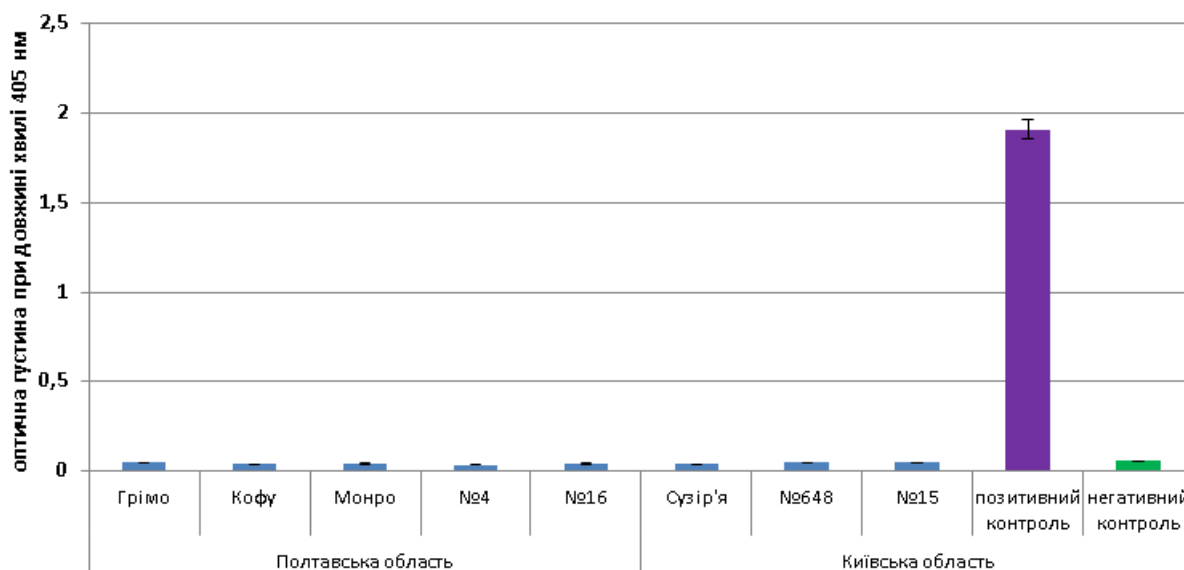


Рис. 3.9. Вміст антигенів BYMV у зразках сої за результатами ІФА

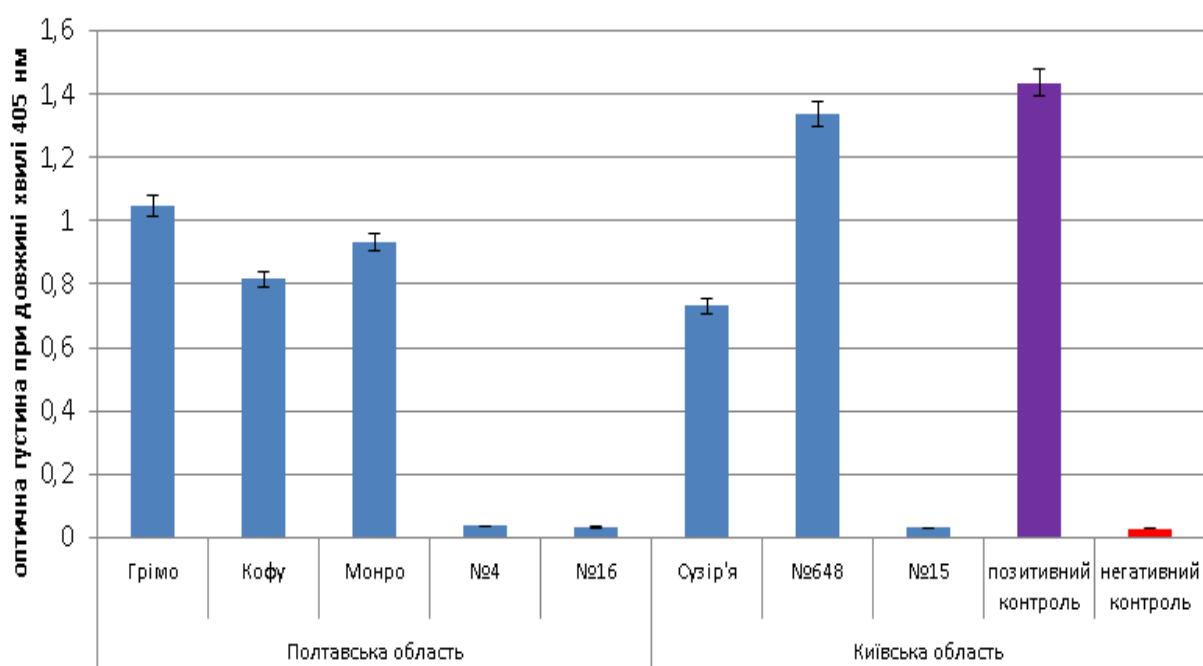


Рис. 3.10. Вміст антигенів SMV у зразках сої за результатами ІФА

Таким чином, у 5-ти із восьми досліджуваних зразків сої виявлено вірус мозаїки сої та в жоден із них не був уражений вірусами жовтої та звичайної мозаїки квасолі.

3.4. Діагностика вірусів методом ЗТ-ПЛР

Наступним етапом дослідження було провести ЗТ-ПЛР, який підтвердив результати ІФА, а саме у зразках Грімо, Монро та Кофу (Полтавська область), а також сортах Сузір'я та № 648 із Київської області виявлено були присутні ампліфікони розміром близько 469 п.н., що відповідають ділянці гена капсидного білка вірусу мозаїки сої (рис. 3.11, 3.12).

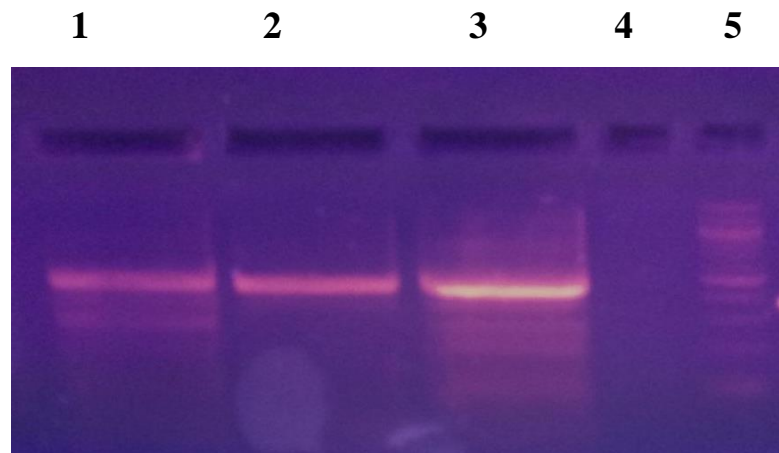


Рис. 3.11. Електрофореграма продуктів ПЛР із використанням праймерів до гена СР (469 п.н.): 1 – с. Грімо; 2 – с. Монро; 3 – позитивний контроль; 4 – негативний контроль; М – маркер ДНК MassRuler DNA Ladder Mix ready-to-use (Thermo Scientific, США)

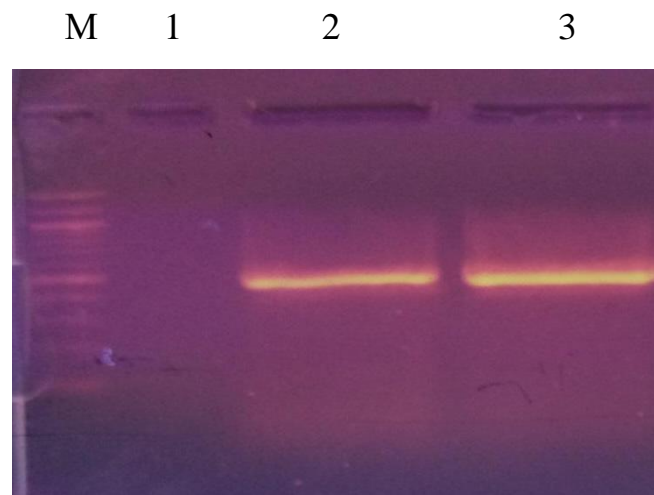


Рис. 3.12. Електрофореграма продуктів ПЛР із використанням праймерів до гена СР (469 п.н.): М - М – маркер ДНК MassRuler DNA Ladder Mix ready-to-use (Thermo Scientific, США); 1 – № 15; 2 – Сузір'я; 3 - № 648

Таким чином, методами ІФА та ЗТ-ПЛР було доведено ураженість п'яти сортів сої SMV.

3.5. Філогенетичний аналіз ізолятів вірусу мозаїки сої

Проведено порівнювальний аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей ділянки (430 н., положення 8655-9084 н.) гену CP двох українських ізолятів SMV, названих як SMV3 (с. Монро, Полтавська обл.) та SMV1 (сорт Грімо) з зарубіжними штамми та ізолятами SMV із Генбанку.

На філогенетичному дереві, побудованому методом зв'язування найближчих сусідів, досліджувані ізоляти локалізуються на одній гілці з ізолятами з найбільшою ідентичністю нуклеотидів: а саме: американським VA2, сербським DS-21, нідерландським Green Shell, іранськими Ar33 та Lo3, українським UA1Gr, китайським XFQ014 та польським M (рис. 3.13).

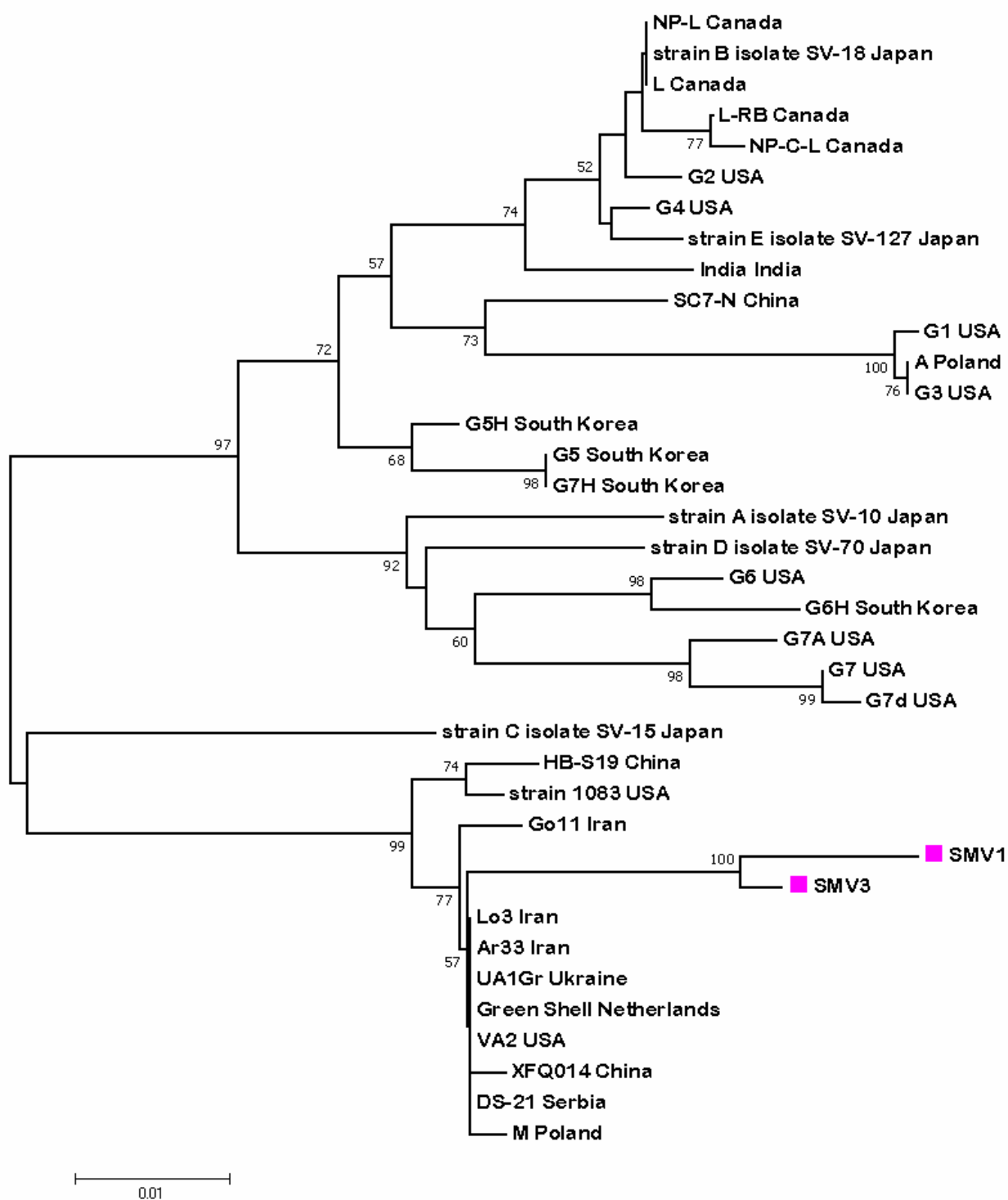


Рис.3.13. Філогенетичне дерево, побудоване методом Neighbor-Joining за нуклеотидними послідовностями ділянки гену капсидного білка українських ізолятів SMV1 та SMV3 (позначені рожевими квадратами) та ізолятів з інших країн із застосуванням моделі Jukes-Cantor.

Класифікація штамів/ізолятів SMV досить складна. В США Cho та Goodman (1979) класифікували 98 ізолятів SMV у сім штамів, а саме G1–G7. Окрім різної суворості симптомів, SMV штами також різнилися і за ефективності їх передачі. Така сама диференційна система була застосовано і у Кореї, в результаті чого було додатково ідентифіковано G5H, G6H і G7H штами SMV. Проте, у Японії та Китаї були застосовані інші сорти сої, в результаті ізоляти з обох країн були класифіковані на 5 (A - E) та 21(SC1 to SC21) штам відповідно. Пізніше Shigemori (1991) та Kanematsu, Nakano (2015) зробили спробу уніфікувати класифікацію штамів з США і Японії. Дослідження за допомогою штучної інокуляції диференційних американських сортів японськими штамами показали, що японські штами розподіляються на три групи: 1). містить A і B (співвідносяться до штаму G3); 2). Містить штами C і D; 3). містить тільки штам E. Штами C, D і E не співвідносяться до жодного з американських штамів (Eggenberger, Najimoran, 2008). Kanematsu, Nakano штучно інокулювали японські сорти-диференціатори американськими штамами SMV. Вони були також розподілені на три групи: 1) містить G1 і G4 (співвідносяться до штаму B); 2) містить G2, G3, G6 і G7 (співвідносяться до штаму A); 3) містить тільки G5 (співвідносяться до штаму C), тоді як штами D і E не співвідносяться до жодного з американських штамів.

З американським VA2, сербським DS-21, нідерландським Green Shell, іранськими Ar33 та Lo3, українським UA1Gr, китайським XFQ014 та польським M ізолятами SMV1 та SMV3 мають найвищий відсоток ідентичності за ділянкою гена CP – 97,2-97,9% за нуклеотидною послідовністю та 95,8 - 97,2% за амінокислотною, відповідно (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Відсоток ідентичності українських SMV1 та SMV3 з іншими ізолятами/штамами цього вірусу за нуклеотидними та амінокислотними послідовностями ділянки гена капсидного білка, %

п/п	Ізолят/штам SMV	Країна	SMV3		SMV1	
			nt	aa	nt	aa
1.	SMV3	Україна	----	----	98,6	97,9
2.	SMV1	Україна	98,6	97,9	----	----
3.	VA2	США	97,9	97,2	97,2	95,8
4.	DS-21	Сербія	97,9	97,2	97,2	95,8
5.	Green Shell	Нідерланди	97,9	97,2	97,2	95,8
6.	Ar33	Іран	97,9	97,2	97,2	95,8
7.	Lo3	Іран	97,9	97,2	97,2	95,8
8.	UA1Gr	Україна	97,9	97,2	97,2	95,8
9.	YA84	Китай	97,6	97,2	96,9	95,8
10.	HLJSB001	Китай	97,6	97,2	96,9	95,8
11.	452	США	97,6	97,2	96,9	95,8
12.	HB-S25	Китай	97,6	97,2	96,9	95,8
13.	XFQ014	Китай	97,6	97,2	96,9	95,8
14.	M	Польща	97,6	97,2	96,9	95,8
15.	Go38	Іран	97,6	97,2	96,9	95,8

16.	Go6	Іран	97,6	97,2	96,9	95,8
17.	Go11	Іран	97,4	97,2	96,7	95,8
18.	Strain 1083	США	96,9	97,2	96,2	95,8
19.	HB-S19	Китай	96,7	97,2	95,9	95,8
20.	L	Канада	90,6	97,2	89,5	95,8
21.	L-RB	Канада	90,3	97,2	89,3	95,8
22.	NP-C-L	Канада	90,1	97,2	89,0	95,8
23.	NP-L	Канада	90,6	89,5	95,8	89,5
24.	India	Індія	90,6	89,5	95,8	89,5
25.	strain A, isolate SV-10	Японія	90,6	90,1	95,8	90,1
26.	strain B, isolate SV-18	Японія	90,6	89,5	95,8	89,5
27.	strain C, isolate SV-15	Японія	92,9	91,9	95,8	91,9
28.	strain D, isolate SV-70	Японія	90,6	89,8	95,8	95,8
29.	strain E, isolate SV-127	Японія	90,3	89,3	95,8	95,8

Ізолят SMV3 у досліджуваній ділянці гена CP має амінокислотні заміщення у положеннях 1-4 (Ser→Trp; Lys→Cys; Gly→Met; Lys→Glu) (рис. 3.14).

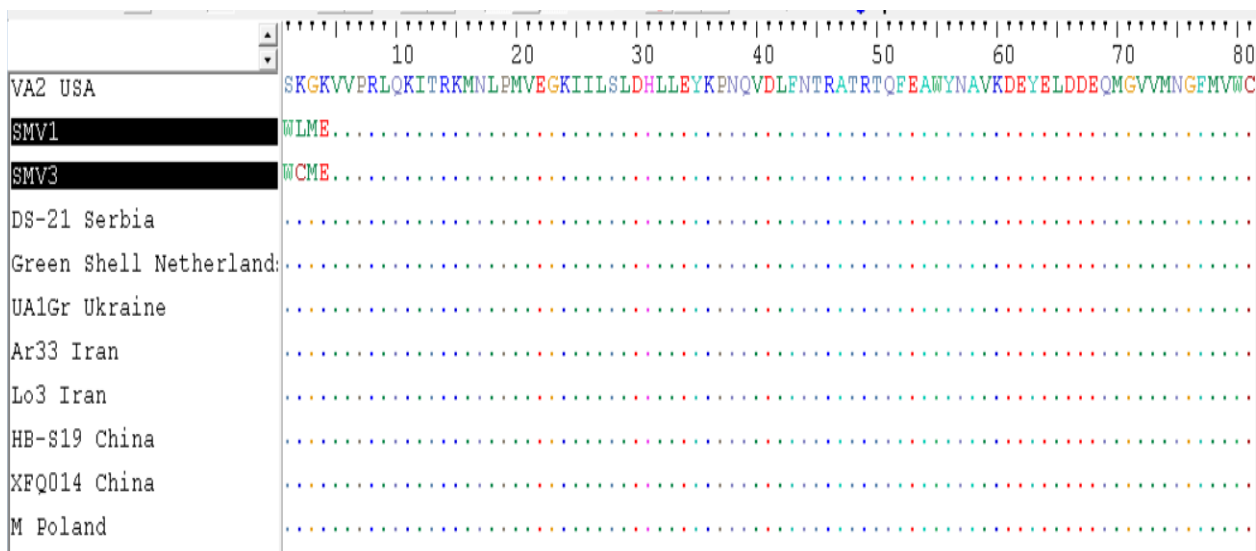


Рис.3.14. Порівняльний аналіз амінокислот (позиції 1-81) у досліджуваній ділянці гена CP досліджуваних ізолятів SMV та ізолятів, що мають найвищу ідентичність. Числа вгорі представляють позиції амінокислот. Показані тільки відмінності

Ізолят SMV1 має 6 аа замін: у положеннях 1-4 (Ser→Trp; Lys→Leu; Gly→Met; Lys→Glu), у положенні 140 (Ser→Cys) та у положенні 141 (Pro→Phe) (рис. 3.14, 3.15).

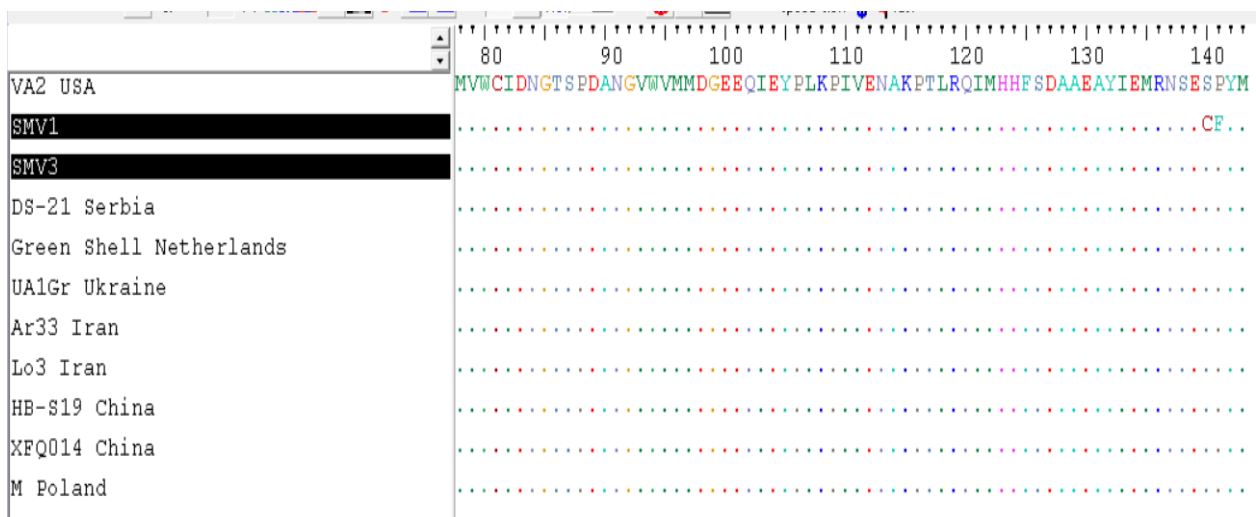


Рис.3.15. Порівняльний аналіз амінокислот (позиції 78-143) у досліджуваній ділянці гена CP досліджуваних ізолятів SMV та ізолятів, що мають найвищу ідентичність. Числа вгорі представляють позиції амінокислот. Показані тільки відмінності

Схожі дані отримано Jossey et al. (2013) було показано, що для деяких штамів SMV всього одна лише амінокислотна заміна на С-кінці гену CP призводила до неможливості передачі насінням. P1, CP і DAG- мотив були асоційовані з насінневою передачею та було зроблено припущення, що взаємодії CP з HC-Pro є важливими для багатьох функцій інфекційного циклу SMV.

Результати отримані Domeir et al. (2007), показали, що ізоляти G7 і G7F, які слабо передавалися попелицями і насінням, мають по дві мутації та ізолят G5 – одну мутацію у DAG- мотиві. Однак, ізолят G2 з низьким рівнем насінневої передачі не мав мутацій у цьому мотиву, а мав aa заміщення в іншій позиції (Q264 на P). Деякі потівіруси, наприклад, ізоляти PSbMV, взагалі не мають DAG- мотиву, однак ефективно передаються і насінням і попелицями. Не зважаючи на те, що HC-Pro та CP залучені і в передачі насінням, і попелицями (Jossey et al., 2013), різні області білків можуть бути задіяні в цих двох шляхах передачі.

ВИСНОВКИ

1. Електронномікроскопічними, серологічними та молекулярними методами проведено діагностику потівірусів (вірусу мозаїки сої, вірусу звичайної та жовтої мозаїки квасолі) у рослинах сої із Полтавської та Київської областей.
2. Встановлено, що у соці рослин сої п'яти зразків виявлено ниткоподібні вірусні частки розміром 650 до $750 \pm 30 \times 13-15 \pm 1$ нм, що є характерним для потівірусів.
3. Методом ІФА проведено ідентифікацію вірусів та встановлено, що рослини містили антигени вірусу мозаїки сої та не були уражені вірусами звичайної та жовтої мозаїки квасолі. Ураженість рослин SMV була також підтверджена за допомогою ЗТ-ПЛР.
4. Філогенетичний аналіз показав, що досліджувані ізоляти SMV1 та SMV3 мають найвищий відсоток ідентичності за ділянкою гена CP 3 американським VA2, сербським DS-21, нідерландським Green Shell, українським UA1Gr, а також деякими іранськими, китайським та польським ізолятами – 97,2-97,9% за нуклеотидною послідовністю та 95,8 - 97,2% за амінокислотною, відповідно. SMV1 у цій ділянці геному має 6 та SMV1 – 3 унікальні мутації (амінокислотних заміщень), які не виявлені у зарубіжних штамів вірусу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пересипкін В. Марков І. Шелестова В. (2000). *Практикум із основ наукових досліджень у захисті рослин*: Київ.
2. Салига Ю., Снітинський В. (1999). *Електронна мікроскопія біологічних об'єктів* Київ: Світ.
3. Шерепітко Д. В. Молекулярно-генетичні та біологічні властивості вірусів (soybean mosaic potyvirus, alfalfa mosaic alfamovirus), ідентифікованих на сої в умовах Правобережного Лісостепу України \\\ Автореф. дис. канд. біол. наук : 03.00.06 – вірусологія. – Київ. -, 2012. - 22 с.
4. Adams, M. J., Antoniw, J. F., & Kreuze, J. F. (Eds.). (2009). *Viruses of plants: description, diagnosis, and management*. CABI.
5. Chen, H., Chen, Q., Omongo, C. A., & Wangai, A. W. (2017). Genetic diversity and evolution of Soybean mosaic virus isolates. *Virology Journal*, 14(1), pp. 1-14.
6. Cheng, X., Chen, S., Chen, P., Liu, W., Sun, X., Jiang, X., & Wang, D. (2018). Multiple short inversions and deletion for improving the selection marker recycling system in soybean. *Plant Biotechnology Journal*, 16(8), pp. 1458-1467.
7. Cheng, Y. H., Chen, Y. J., Wu, Y. T., & Hsu, H. T. (2015). Identification of Soybean mosaic virus isolates infecting soybean cultivars in Taiwan. *Journal of Phytopathology*, 163(12), pp. 1017-1024.
8. Choi, S. K., & Lee, S. I. (2019). Soybean mosaic virus: classification, diversity, and strategies for detection and control. *Plant Pathology Journal*, 35(2), pp. 110-119.
9. Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandebosch, K. A., & Carrington, J. C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, 206(2), pp. 1007-1016.

10. Domier L., Steinlage T., Hobbs H., Wang Y., Herrera-Rodriguez G., Haudenschild J., McCoppin N., Hartman G. (2007). Similarities in seed and aphid transmission among Soybean mosaic virus isolates. *Plant Dis.* 91(5), pp. 546-550.
11. Domier, L. L. (2012). Soybean mosaic virus. *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*, pp. 142-147.
12. Domier, L. L. (2012). Soybean mosaic virus: a comprehensive review on current status and future perspectives. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), pp. 1011-1025.
13. Domier, L. L., McCoppin, N. K., & D'Arcy, C. J. (2003). Evidence of recombination and synergism between soybean mosaic virus strains in soybean. *Phytopathology*, 93(3), pp. 271-279.
14. Eggenberger, A. L., Stark, D. M., and Beachy, R. N. (1989). The nucleotide sequence of a Soybean mosaic virus coat protein-coding region and its expression in *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and tobacco callus. *J. Gen. Virol.* 70, pp. 1853–1860.
15. Giesler LJ, Ziems AD, 2006. Incidence of Alfalfa mosaic virus, Bean pod mottle virus, and Soybean mosaic virus in Nebraska soybean fields. *Plant Health Progress*, April, pp. 1-6.
16. Hajimorad, M. R., Domier, L. L., & Tolin, S. A. (2019). Genomic diversity of Soybean mosaic virus: implications for disease management. *Virus Research*, 269, pp. 197637.
17. Hartman, G. L., & Sinclair, J. B. (1999). *Compendium of soybean diseases (4th ed.)*. APS Press.
18. Hill, J. H., & Whitham, S. A. (2014). Control of virus diseases in soybeans. In: G. Stacey, N. Hayashi, eds. *Plant-Microbe Interactions*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 225-234.
19. <https://ictv.global/>
20. Hull, R. (2014). Soybean mosaic virus. *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*, pp. 344-349.

21. Jovanovic, M., Rasic, D., Prokic, A., & Stankovic, I. (2017). Recent Advances in Diagnosis of Bean Common Mosaic Virus. In *Current Research Topics in Plant Virology* (pp. 273–286). Springer.
22. Kanematsu, S., Nakano, M. (2015). Comparison between Japanese and US strain of soybean mosaic virus using differential soybean cultivars. *Bull. Tohoku Agric. Res. Cent*, 117, pp. 59–62.
23. Li, X., Zhang, X., Huang, J., Zhang, Z., Yuan, J., Li, W., Wang, X. (2020). Molecular characterization of Soybean mosaic virus in China: evolutionary pattern, population dynamics, and selection pressure. *Virology Journal*, 17(1), pp. 1-12.
24. Lim, W. S., & Yoo, R. H. (2018). Soybean Mosaic Virus: A Brief Review of Its Molecular Biology, Epidemiology, and Management. *Plant Pathology Journal*, 34(5), pp. 331-341.
25. Lin, S. S., & Yeh, S. D. (2012). Effects of temperature on the multiplication and movement of Soybean mosaic virus in soybean. *Plant Pathology Bulletin*, 21(4), pp. 223-234.
26. Lin, S. S., Wu, H. W., Jan, F. J., Hou, R. F., & Yeh, S. D. (2007). Modifications of the helper component-protease of Zucchini yellow mosaic virus for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. *Phytopathology*, 97(3), pp. 287-296.
27. Luzuriaga-Loaiza, C. R., & Salazar, L. F. (2019). Review of the Epidemiology and Management of Bean Common Mosaic Virus (BCMV) in *Common Bean. Agriculture*, 9(11), pp. 229.
28. MacFarlane, S. A. (2010). Molecular biology of the potyviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, 91(1), pp. 1-22.
29. Madden, L. V., & Nault, L. R. (1983). A spatial model for the dispersal of bean common mosaic virus by aphids. *Phytopathology*, 73(11), pp. 1505–1511.
30. Matthews, R. E. F. (1991). *Plant Virology (3rd ed.)*. Academic Press.

31. Murphy, J. F., & Bowen, C. R. (2006). Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus: Relationships, biology, and prospects for control. *Advances in Virus Research*, 67, pp. 1–45.
32. Niblett, C. L., & Domier, L. L. (1987). Resistance breaking strains of soybean mosaic virus: Biology and molecular basis for interaction with soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1(5), pp. 325-331.
33. Palukaitis, P., & García-Arenal, F. (2003). Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, 62, pp. 241-323.
34. Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G., & Francki, R. I. B. (Eds.). (2009). Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, 75, pp. 211-241.
35. Qu, F., & Morris, T. J. (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(3), pp. 193-202.
36. Reddy, D. V., & Ananthakrishnan, G. (1997). Soybean mosaic virus. *Compendium of Soybean Diseases, 3rd edition*, pp. 13-15.
37. Scofield, S. R., & Nelson, R. S. (2009). Resources for virus-induced gene silencing in the soybean. In: R. A. Meyers, eds. *RNA Interference*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 337-349.
38. Scofield, S. R., & Nelson, R. S. (2009). Resources for virus-induced gene silencing in the soybean. *Methods in molecular biology*, 486, pp. 57-71.
39. Shigemori, I. (1991). Studies on the breeding on soybeans for the resistance to soybean mosaic virus (SMV). *Bull. Nagano Chushin Agr. Ex. Station*, 10, pp. 1–61
40. Smith, J. K., Johnson, A. B., & Lee, C. D. (2020). Molecular characterization of Soybean mosaic virus isolates and their impact on soybean production. *Journal of Plant Pathology*, 25(3), pp. 123-135.

41. Wang, A. (2015). Dissecting the molecular network of virus-plant interactions: The complex roles of host factors. *Annual Review of Phytopathology*, 53, pp. 45-66.
42. Wang, J., Chen, P., Wang, D., & Sun, M. (2013). Soybean mosaic virus: newly emerged functions of a long-time familiar virus. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), pp. 432-441.
43. Wang, Y., Chen, X., Zhang, J., Li, L., & Liu, S. (2018). Epidemiology and management of Soybean mosaic virus in soybean crops. *Plant Disease*, 102(10), pp. 1892-1905.
44. Wong, S. M., Lee, K. C., Liu, C. W., & Yu, T. A. (2009). The coat protein of Soybean mosaic virus interacts with the glycine-rich protein in soybean. *Journal of General Virology*, 90(9), pp. 2315-2321.
45. Yu, J., & Carrington, J. C. (2013). Soybean mosaic virus: reasons for success. *Molecular Plant Pathology*, 14(8), pp. 810-816.
46. Zhang, C., Bradshaw, J. D., Whitham, S. A., & Hill, J. H. (2010). The development of an efficient multipurpose Bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. *Plant Physiology*, 153(1), pp. 52-65.
47. Zhang, C., Wu, Z., Li, Y., & Wu, J. (2020). Progress and Prospects in Soybean Mosaic Virus Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), pp. 8102.
48. Zhang, X., Wang, C., Zhang, Y., Sun, X., & Li, D. (2012). Interaction between Soybean mosaic virus silencing suppressor P3 and host GmAGO2 is required for efficient viral infectivity and is facilitated by Hsp90. *Scientific Reports*, 2(1), pp. 1-9.
49. Zhou, X., & Jackson, A. O. (2012). Viral diseases of soybean. In *Compendium of Soybean Diseases and Pests* (5th Edition) (pp. 37-42). American Phytopathological Society.