

**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 “ ____ ” _____ 2026 р.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ МОЗАЇКИ СОЇ
ТА ЇХ ВПЛИВ НА ЯКІСТЬ НАСІННЯ СОЇ**

Кваліфікаційна робота магістра
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 інституту імені Тараса Шевченка під керівництвом д.б.н., проф. Міщенко Л. Т.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДНК — дезоксирибонуклеїнова кислота

ЗТ-ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція

РНК — рибонуклеїнова кислота

bp — base pairs

CI — cylindrical inclusion protein

CP — coat protein

DAS-ELISA — double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

HC-Pro — helper component proteinase

K2P — Kimura 2-parameter

NJ — Neighbor-Joining

ORF — open reading frame

SMV — Soybean mosaic virus

UTR — untranslated region

VPg — viral protein genome-linked

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Властивості і шкодочинність вірусу мозаїки сої	6
1.1. Вірус мозаїки сої: біологічні та молекулярні характеристики.....	6
1.2. Шляхи поширення та фактори, що впливають на зараження ВМС.....	10
1.3. Філогенетичні зв'язки ізолятів вірусу мозаїки сої.....	13
1.4. Вплив вірусу мозаїки сої на якість зерна рослин сої.....	15
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження	19
2.1. Метод візуальної діагностики	19
2.2. ІФА у модифікації подвійний сендвіч DAS-ELISA.....	20
2.3 Виділення тотальної РНК.....	21
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією.....	23
2.5. Електрофорез нуклеїнових кислот.....	24
2.6. Філогенетичний аналіз.....	25
2.7. Визначення кількісного вмісту білка у насінні сої.....	26
2.8. Визначення вмісту жиру у насінні сої.....	27
2.9. Визначення активності інгібітора трипсину.....	39
2.10. Статистичні методи обробки даних.....	31
РОЗДІЛ 3. Результати та обговорення	33
3.1. Симптоматика захворювання.....	33
3.2. Серологічна та молекулярна діагностика вірусу мозаїки сої.....	36
3.3. Філогенетичний аналіз ізолятів вірусу мозаїки сої.....	44
3.4. Вплив вірусу мозаїки сої на кількісний вміст білка, жиру, інгібітора трипсину у насінні сої.....	53
ВИСНОВКИ	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	60

ВСТУП

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) є однією з провідних зернобобових культур світового землеробства, яка має важливе значення для забезпечення продовольчої та кормової безпеки. Вона широко використовується у харчовій, кормовій, фармацевтичній та технічній галузях завдяки високому вмісту білка, жирів, незамінних амінокислот і біологічно активних речовин. У сучасних умовах інтенсифікації сільського господарства та змін клімату значення сої постійно зростає, що обумовлює необхідність підвищення її продуктивності та якості продукції (Hartman et al., 2011). Водночас одним із ключових чинників, що обмежують ефективність вирощування сої, є біотичні стресові фактори, серед яких значну роль відіграють вірусні захворювання. Віруси рослин здатні викликати комплексні порушення фізіологічних процесів, що проявляються у зниженні врожайності, пригніченні росту та погіршенні якості насіння. Особливу небезпеку становить вірус мозаїки сої (soybean mosaic virus, SMV), який є одним із найбільш поширених і економічно значущих патогенів сої у світі та в Україні. Вірус мозаїки сої належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae* і характеризується значною генетичною мінливістю, що ускладнює його виявлення та контроль. Він здатний передаватися механічно, а також за допомогою комах-переносників, зокрема попелиць, що сприяє його швидкому поширенню в агроценозах (Wilson, 2008). Симптоматика ураження може варіювати від легкої мозаїчності до значних деформацій листків і пригнічення росту, що залежить від сорту рослин, штаму вірусу та умов навколишнього середовища. Окрім впливу на морфологічні та фізіологічні характеристики рослин, вірусна інфекція здатна змінювати біохімічний склад насіння. Зокрема, можуть відбуватися зміни у вмісті білка, жиру та антипоживних компонентів, таких як інгібітори трипсину, що безпосередньо впливають на харчову та кормову цінність продукції. Враховуючи зростаючі вимоги до якості сільськогосподарської продукції, дослідження таких змін є особливо актуальним. Сучасні підходи до вивчення фітовірусів ґрунтуються на поєднанні класичних і молекулярно-біологічних методів дослідження.

Використання імуноферментного аналізу (DAS-ELISA), полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), електрофоретичних методів та філогенетичного аналізу дозволяє не лише виявити вірус у рослинному матеріалі, але й дослідити його генетичні особливості, ступінь спорідненості ізолятів та можливі шляхи поширення. Комплексне застосування цих методів є необхідною умовою для отримання достовірних результатів у сучасних вірусологічних дослідженнях. Особливої уваги заслуговує аналіз філогенетичних зв'язків ізолятів вірусу мозаїки сої, який дає можливість оцінити їх генетичну різноманітність, встановити походження та простежити еволюційні взаємозв'язки (Hull, 2014). Такі дослідження мають важливе значення для розуміння адаптаційних можливостей вірусу та розробки ефективних стратегій контролю його поширення. У зв'язку з цим метою роботи було дослідити молекулярно-біологічні характеристики, філогенетичні зв'язки ізолятів вірусу мозаїки сої (ВМС) та їх вплив на якісні показники насіння сої.

РОЗДІЛ 1

ВЛАСТИВОСТІ І ШКОДОЧИННІСТЬ ВІРУСУ МОЗАЇКИ СОЇ

1.1. Вірус мозаїки сої: біологічні та молекулярні характеристики

Вірус мозаїки сої, ВМС (*Soybean mosaic virus, SMV*) належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae* і є одним із найбільш поширених та шкодочинних вірусних патогенів сої у світі. Ураження рослин цим вірусом призводить до істотного зниження врожайності, погіршення технологічних властивостей насіння та зменшення господарської цінності культури (Lequin, 2005).

Як і інші представники родини *Potyviridae*, SMV має широкий потенціал до поширення та високий рівень адаптивності до різних ґрунтово-кліматичних умов, що робить його важливим об'єктом сучасних фітовірусологічних досліджень.

Основними рослинами-хазяями вірусу є культурна соя (*Glycine max*) та дика соя (*Glycine soja*), однак окремі ізоляти можуть інфікувати й інші представники родини *Fabaceae*. Поширення SMV має глобальний характер: вірус виявляють у країнах Азії, Європи, Північної та Південної Америки, а також в інших регіонах інтенсивного вирощування сої. Саме тому його вважають одним з найнебезпечніших патогенів цієї культури (рис. 1.1).



А

Б

Рис 1.1. Симптоми ураження ВМС: А – на листках сої; Б – плямистість насіння (Domier, 2012)

За морфологією SMV є типовим потівірусом. Його віріони мають гнучку ниткоподібну форму, а їх довжина зазвичай коливається в межах 700–750 нм, хоча в літературі можуть наводитися дещо ширші діапазони. Такі особливості будови забезпечують ефективне упакування генетичного матеріалу та сприяють передачі вірусу механічним шляхом і переносниками (рис. 1.2).



Рис 1.2 Електронна мікрофотографія частинок ВМС, очищених після негативного фарбування, смуга відповідає 500 нм (Agrios, 2005)

Геном вірусу представлений одноланцюговою позитивно-смісловою РНК. На 5'-кінці геномної РНК ковалентно приєднаний вірусний білок VPg, а 3'-кінець містить полі(А)-хвіст. Це характерна риса потівірусів, яка має

принципове значення для реплікації, трансляції та стабільності геному в клітині-хазяїні. Геном SMV кодує один великий поліпротеїн, який у подальшому піддається протеолітичному розщепленню з утворенням окремих функціональних білків. Така організація геному є типовою для потівірусів і забезпечує компактність вірусної РНК при збереженні широкого набору функцій (Bustin, 2000). Він містить одну довгу відкриту рамку зчитування (*ORF*), яка кодує поліпротеїн, що далі розщеплюється на кілька функціональних білків (Ross J. 1969). Основні білки, що входять до складу вірусу, включають:

- Капсидний білок (CP) – відповідає за захист генетичного матеріалу та взаємодію з переносниками.
- Протеаза (Nia-Pro) – бере участь у розщепленні поліпротеїну.
- РНК-залежна РНК-полімераза (Nlb) – відповідає за реплікацію генетичного матеріалу вірусу.
- Помічний білок руху (HC-Pro) – відіграє роль у процесі поширення вірусу між клітинами та пригніченні захисних механізмів рослини.

Білок руху (CI) – забезпечує транспорт вірусних частинок через плазмодесми (рис. 1.3).

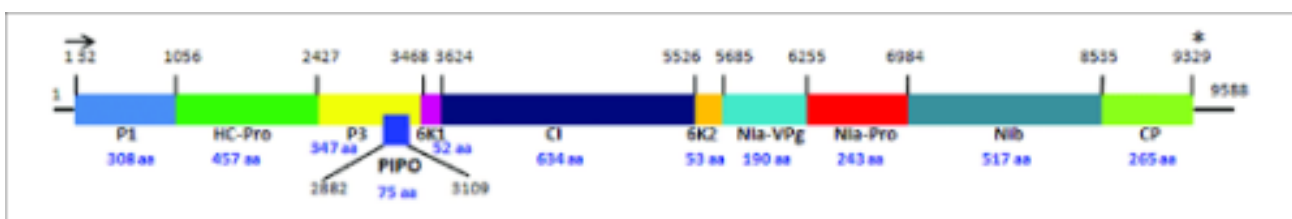


Рис. 1.3. Організація геному вірусу мозаїки сої. Діаграма була складена на основі нуклеотидної послідовності штаму SMV N. Кольорові рамки представляють 11 білків, кодованих геномом SMV. Чорні лінії на 5'- і 3'-кінцях представляють 5' і 3' нетрансльовану область (UTR). Горизонтальна стрілка та зірочка 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 (Matthews, 1991).

Серед білків, які утворюються в результаті розщеплення поліпротеїну, особливе значення мають білок оболонки (CP), білок HC-Pro, циліндричний інклюзійний білок (CI), білки NIa та NIb, а також P1 і P3. Капсидний білок виконує не лише структурну функцію, а й бере участь у передачі вірусу комахами та в переміщенні вірусних частинок у рослині. HC-Pro вважається одним із ключових білків патогенності, оскільки він пов'язаний із пригніченням РНК-інтерференції одного з основних механізмів противірусного захисту рослин. РНК-залежна РНК-полімераза, яку кодує білок NIb, забезпечує реплікацію геному, а NIa-Pro виконує функції вірусної протеази (Gibbs, Ohshima, 2010).

Окрему увагу привертає вбудована відкрита рамка зчитування РІРО, характерна для багатьох потівірусів. Цей елемент геному пов'язаний із міжклітинним переміщенням вірусу, а отже з його системним поширенням у рослині

Репродуктивний цикл SMV відбувається у цитоплазмі інфікованих клітин. Після проникнення вірусна РНК одразу може виконувати функцію матриці для синтезу поліпротеїну. Далі утворюється реплікативний комплекс, у межах якого синтезується комплементарна негативна РНК, що використовується як матриця для подальшого утворення нових позитивних копій геному. Утворені геномні молекули або інкапсулюються, або залучаються до подальшої трансляції і реплікації. Таке поєднання репродуктивної ефективності та пригнічення захисних реакцій рослини забезпечує SMV високу інфекційність.

Біологічні властивості вірусу значною мірою залежать від конкретного штаму. Різні ізоляти можуть відрізнятися за патогенністю, інтенсивністю симптомів, здатністю передаватися через насіння та комах, а також за

спектром сортів сої, які вони інфікують. Це має принципове значення як для фундаментальної вірусології, так і для практичної селекції стійких сортів.

Вірус мозаїки сої є складно організованим РНК-вмісним фітовірусом із характерною для потівірусів будовою, високою біологічною пластичністю та значним потенціалом до поширення. Його молекулярні особливості безпосередньо пов'язані з патогенністю, системним переміщенням у рослині та здатністю успішно уникати противірусного захисту хазяїна.

1.2. Шляхи поширення та фактори, що впливають на зараження ВМС

Поширення вірусу мозаїки сої в агроценозах здійснюється кількома основними шляхами, які забезпечують як первинне занесення інфекції в посів, так і її вторинне поширення протягом вегетаційного періоду. У бакалаврському дипломі вже було описано насіннєву, механічну та векторну передачу потівірусів, зокрема SMV, а також підкреслено роль попелиць як основних переносників (рис. 1.4).



Рис. 1.4. Попелиці *Aphis glycines* на листках сої (Palukaitis et al., 2009)

Одним із найважливіших шляхів поширення SMV є передача через заражене насіння. Насіннева передача забезпечує збереження вірусу між вегетаційними сезонами і формує початкові осередки інфекції у нових посівах. Частота передачі через насіння може істотно варіювати залежно від сорту сої, штаму вірусу та часу зараження материнської рослини. Особливо небезпечним є раннє інфікування, коли вірус встигає проникнути в репродуктивні органи та вплинути на формування насіння. Саме такі рослини стають джерелом первинного інокулюму на полі.

Уражене насіння не завжди має виражені зовнішні ознаки, хоча часто спостерігається плямистість насінної оболонки, нерівномірне забарвлення та зниження маси. Водночас наявність плямистості не є абсолютно специфічною ознакою вірусного ураження, оскільки подібні симптоми можуть зумовлюватися й іншими стресовими факторами.

Другим важливим шляхом є передача за участю комах-переносників, насамперед попелиць. Для SMV характерний неперсистентний тип передачі, коли вірус короткочасно утримується у стилеті комахи та може передаватися практично відразу після контакту з інфікованою рослиною. Це означає, що навіть короткочасне живлення переносника є достатнім для інфікування нової рослини. Найбільше значення серед переносників має *Aphis glycines*, однак інші види попелиць також можуть брати участь у циркуляції вірусу.

Епідеміологічна роль попелиць пов'язана не лише з їх здатністю переносити вірус, а й із високою швидкістю розселення в агроценозі. Масова поява переносників у період активного росту сої здатна різко підвищити рівень вторинного інфікування. Саме тому погодні умови, які сприяють розвитку популяцій попелиць, опосередковано впливають і на інтенсивність поширення SMV (Foster, Taylor, 1998).

Механічна передача також можлива, хоча в природних умовах її значення зазвичай нижче, ніж насінневої та векторної. Проте за інтенсивного ведення сільського господарства цей шлях не можна недооцінювати. Пошкодження рослин під час обробітку, контакту листків, роботи з

інструментами чи технікою може призводити до перенесення інфікованого соку на здорові рослини. Особливо це актуально за високої густоти посіву (Engvall, Perlmann, 1971).

На зараження рослин впливає сукупність факторів, серед яких ключову роль відіграють генотип рослини, властивості самого вірусу та умови середовища. Різні сорти сої мають неоднакову чутливість до SMV. Одні сорти характеризуються відносною стійкістю або обмежують системне поширення вірусу, тоді як інші є високосприйнятливими і демонструють виражені симптоми та значні втрати врожаю.

Важливе значення має й штамova специфічність вірусу. Окремі штами здатні долати генетичну стійкість рослин, що ускладнює селекцію універсально стійких сортів. Саме тому оцінка взаємодії конкретних ізолятів із конкретними сортами має не лише теоретичне, а й практичне значення.

Серед абіотичних факторів особливе місце посідають температура та вологість. Температурний режим впливає як на інтенсивність реплікації вірусу в рослині, так і на прояв симптомів. За певних умов симптоми можуть послаблюватися або, навпаки, ставати більш вираженими. Вологість, режим опадів, густина посіву й агротехнічні заходи також здатні змінювати швидкість поширення інфекції.

Не менш важливим є фаза розвитку рослини на момент зараження. Інфікування молодих рослин, як правило, призводить до більш серйозних наслідків, ніж зараження в пізніші фази органогенезу. Це пов'язано з тим, що рання інфекція встигає вплинути як на вегетативний ріст, так і на формування генеративних органів.

Симптоми, спричинені вірусом мозаїки сої, можуть варіювати залежно від штаму вірусу, віку рослини, погодних умов та генетичних особливостей сорту. Основні ознаки зараження включають:

- мозаїчне або хлоротичне забарвлення листків,
- деформацію та зморшкуватість листової пластинки,
- уповільнення росту рослин,

- стерильність квіток та зниження кількості стручків,
- некротичні плями (при зараженні агресивними штамми).

Важливо зазначити, що симптоматика вірусного ураження може змінюватися під впливом зовнішніх факторів, що іноді ускладнює діагностику за візуальними ознаками (рис. 1.5).



Рис. 1.5. Деформація листків рослин сої, уражених SMV (Hull, 2014)

Поширення SMV у посівах сої визначається комплексною взаємодією насінневої передачі, векторного перенесення, механічного зараження та індивідуальних особливостей системи «вірус - рослина - середовище». Саме сукупність цих чинників формує рівень епідемічної небезпеки вірусу у конкретному агроценозі.

1.3. Філогенетичні зв'язки ізолятів вірусу мозаїки сої

ВМС, як і більшість РНК-вмісних вірусів, характеризується значною генетичною мінливістю. Це зумовлено відсутністю ефективних механізмів виправлення помилок під час реплікації РНК, що сприяє накопиченню мутацій. Окрім того, у популяціях вірусу можуть відбуватися рекомбінаційні

події, які ще більше підвищують генетичне різноманіття ізолятів (Friedman, Brandon, 2001).

Філогенетичний аналіз дозволяє оцінити ступінь спорідненості між ізолятами, простежити їх можливе походження та виявити еволюційні зв'язки між популяціями вірусу з різних географічних регіонів. Для цього найчастіше використовують порівняння нуклеотидних послідовностей ділянки гена капсидного білка, оскільки саме цей регіон поєднує достатній рівень консервативності з наявністю інформативних варіабельних сайтів.

У практиці молекулярної фітовірусології філогенетичні дерева будують із застосуванням таких методів, як Neighbor-Joining, Maximum Likelihood або Maximum Parsimony.

Порівняльне вивчення ізолятів SMV показало, що вони можуть формувати окремі групи, пов'язані з географічним походженням, господарем або штамовими особливостями. Відомо, що в США традиційно використовували систему диференціації ізолятів SMV на штами G1–G7, тоді як у країнах Азії були запропоновані власні схеми класифікації. У бакалаврському дипломі вже зазначалося, що класифікація штамів SMV є складною та не повністю уніфікованою, а окремі американські, японські, китайські та корейські штами не завжди прямо співвідносяться між собою.

Філогенетичні дослідження показують, що деякі європейські ізоляти можуть бути близькими до американських або азійських варіантів, що може свідчити про їх спільне походження або занесення через міжнародний обіг насінневого матеріалу. Це особливо важливо для України, де активна торгівля насінням і впровадження сортів іноземної селекції потенційно створюють умови для занесення нових генетичних варіантів вірусу.

Побудова філогенетичних дерев також дозволяє виявляти близькоспоріднені ізоляти, оцінювати відсоток ідентичності між ними та визначати їх положення відносно інших потівірусів. Включення до аналізу аутгрупи є важливим для правильного укорінення дерева та коректної інтерпретації напрямку еволюційних змін. Саме тому сучасні роботи з

філогенії SMV орієнтуються не лише на наявність великої кількості ізолятів у дереві, а й на грамотний добір порівняльного матеріалу.

Аналіз амінокислотних послідовностей капсидного білка має додаткове значення, оскільки білковий рівень часто виявляється більш консервативним, ніж нуклеотидний. Це дозволяє оцінити, наскільки нуклеотидні заміни впливають на структуру та функціональні властивості вірусного білка. У бакалаврському дипломі амінокислотні послідовності аналізували окремо, що відповідає сучасним підходам у молекулярній вірусології.

Філогенетичний аналіз ізолятів вірусу мозаїки сої є необхідним елементом сучасного вивчення SMV. Він дає змогу не лише описати генетичну подібність або відмінність окремих ізолятів, а й зрозуміти їх місце в загальній системі варіабельності вірусу, що має велике значення для молекулярної діагностики, фітосанітарного моніторингу та селекції стійких сортів сої.

1.4. Вплив вірусу мозаїки сої на якість зерна рослин сої

SMV спричиняє не лише зниження врожайності культури, а й суттєві зміни біохімічного складу насіння, що безпосередньо впливають на його харчову, кормову та технологічну цінність. Основними показниками якості зерна сої є вміст білка, жиру, вуглеводів та антипоживних речовин, зокрема інгібіторів трипсину. Під впливом вірусної інфекції ці параметри можуть змінюватися як у бік зниження, так і в бік підвищення, залежно від генотипу рослини, штаму вірусу та умов вирощування (рис. 1.6).



Рис. 1.6. Симптоми ураження ВМС: плямистість насіння (Domier, 2007).

Одним із найважливіших компонентів насіння сої є білок, частка якого може становити понад 35–40 % сухої маси. Інфікування ВМС призводить до порушення азотного обміну рослини, змін у синтезі запасних білків та перерозподілу продуктів фотосинтезу між органами. У багатьох випадках у заражених рослин спостерігається відносно підвищення вмісту білка в насінні. Однак таке підвищення часто є наслідком загального зменшення маси зерна або зниження накопичення ліпідів і вуглеводів, а не реального посилення білкового синтезу. Крім того, змінюється амінокислотний склад білків, що може впливати на їхню біологічну цінність (Carr, Loebenstein, 2002).

Другим ключовим показником є вміст жиру, який визначає соєві боби як важливу олійну культуру. ВМС негативно впливає на процеси фотосинтезу, транспорту асимілянтів і синтезу жирних кислот у клітинах насіння. У результаті часто спостерігається зниження накопичення олії та зміна її якісного складу. Порушення метаболізму ліпідів може бути пов'язане зі зменшенням активності ферментів біосинтезу жирних кислот або з конкуренцією між синтезом білків і ліпідів за доступні ресурси клітини.

Важливим компонентом насіння є також вуглеводи, які представлені переважно крохмалем, олігосахаридами та розчинними цукрами. Вірусна інфекція здатна змінювати вуглеводний обмін рослини, що проявляється у порушенні синтезу та транспорту сахарози, накопиченні крохмалю та інших

резервних сполук. Ураження ВМС часто супроводжується зменшенням маси насіння, що пов'язано з недостатнім надходженням асимілянтів до генеративних органів. У деяких випадках може спостерігатися зміна співвідношення між різними фракціями вуглеводів, що впливає на енергетичну цінність зерна та його технологічні властивості.

Особливе значення для кормової і харчової цінності сої має вміст антипоживних речовин, зокрема інгібіторів трипсину. Ці білкові сполуки пригнічують активність протеолітичних ферментів у травному тракті тварин і людини, знижуючи засвоюваність білка. Вірусне ураження може активувати захисні механізми рослини, що супроводжується зміною рівня синтезу інгібіторів трипсину. У деяких сортів спостерігається підвищення їх активності як реакція на стрес, тоді як в інших — незначні зміни або навіть зниження. Така різноспрямованість свідчить про значну роль генотипу рослини у формуванні відповіді на інфекцію.

Окрім біохімічних змін, ВМС впливає і на морфологічні характеристики зерна. Уражене насіння часто має меншу масу, нерівномірне забарвлення оболонки, плямистість та знижену схожість. Плямистість насінної оболонки пов'язана з порушенням процесів формування пігментів і структурних компонентів покривних тканин. Таке зерно має нижчу товарну цінність і може гірше зберігатися.

Ступінь впливу вірусу значною мірою залежить від часу зараження рослини. Раннє інфікування, коли рослина перебуває у фазі активного росту, призводить до найбільш виражених змін у складі зерна, оскільки вірус впливає на всі етапи формування репродуктивних органів. Пізніше зараження може мати менш помітні наслідки, однак також здатне змінювати окремі показники якості.

Вірус мозаїки сої спричиняє комплексні зміни біохімічного складу насіння, впливаючи на вміст білка, жиру, вуглеводів та інгібіторів трипсину. Ці зміни знижують харчову, кормову та технологічну цінність зерна і є важливим фактором економічних втрат при вирощуванні сої. Вивчення

впливу ВМС на якісні показники насіння має велике значення для селекції стійких сортів і розробки ефективних заходів захисту культури.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Метод візуальної діагностики

Первинну оцінку фітосанітарного стану рослин сої здійснювали шляхом візуальної діагностики, що дозволяє оперативно виявити рослини з підозрою на вірусне ураження. Даний метод є важливим початковим етапом комплексного дослідження вірусних хвороб, оскільки він забезпечує відбір репрезентативного матеріалу для подальших серологічних та молекулярних аналізів.

Обстеження проводили протягом вегетаційного періоду, починаючи з ранніх фаз розвитку рослин сої в Одеській області. Оцінювали як загальний стан рослин, так і специфічні симптоми ураження. Основними ознаками інфекції вірусу мозаїки сої вважали:

- мозаїчність листкової пластинки,
- світло-зелені або жовтуваті ділянки між жилками,
- зморшкуватість і пухирчастість листків,
- асиметрію та деформацію листкових пластинок,
- зменшення розмірів листків,
- карликовість рослин,
- пригнічення росту,
- нерівномірність розвитку генеративних органів.

У деяких випадках симптоми проявлялися слабо або були відсутні, що характерно для латентного перебігу інфекції або для відносно стійких сортів. Тому візуальна діагностика розглядалася лише як орієнтовний метод і обов'язково доповнювалася лабораторними дослідженнями.

Важливо враховувати, що прояв симптомів залежить від віку рослини на момент зараження, температурних умов, освітленості та генотипу рослини.

Раннє інфікування зазвичай призводить до більш виражених симптомів і сильнішого пригнічення росту. Пізніше зараження може супроводжуватися лише локальними змінами листків.

Особливу увагу приділяли відбору контрольних рослин без видимих ознак ураження. Такі рослини використовували як негативні зразки у подальших дослідженнях.

2.2. ІФА у модифікації подвійний сендвіч (DAS-ELISA)

Для серологічної діагностики вірусів у рослинах сої використовували імуноферментний аналіз у модифікації подвійного сендвічу (DAS-ELISA). Метод базується на специфічному зв'язуванні вірусного антигену з антитілами та є одним із найбільш чутливих і специфічних способів виявлення вірусних інфекцій у рослинному матеріалі. Перевагою DAS-ELISA є можливість одночасного аналізу великої кількості зразків і кількісної оцінки вмісту антигену за інтенсивністю кольорової реакції (Crowther, 1995).

У роботі використовували комерційні набори антитіл фірми Loewe (Німеччина) до вірусу мозаїки сої (SMV), вірусу жовтої мозаїки кvasолі (BYMV) та вірусу м'якої плямистості вігни (CPMMV). Аналіз проводили відповідно до протокола виробника.

Основні етапи проведення DAS-ELISA:

1. Імобілізація першого антитіла. Віруссpezifічні антитіла, що взаємодіють з вірусним антигеном, наносили на поверхню полістиролового планшета. У кожену лунку вносили по 200 мкл антитіл.
2. Внесення дослідних зразків. Рослинний матеріал розтирали в буфері зразка. Отримані екстракти центрифугували при 3,5 тис. об/хв протягом 20 хв. Після цього відбирали надосад і вносили його у лунки планшета у співвідношенні 1:20 з буфером зразка у фінальному об'ємі 200 мкл.

3. Додавання другого антитіла, міченого лужною фосфатазою. Після видалення незв'язаного антигену до комплексу «антитіло–антиген» вносили друге антитіло, кон'юговане з лужною фосфатазою, у кількості 200 мкл у лунку.
4. Промивання планшета. На кожному етапі після інкубації проводили промивання для видалення незв'язаних компонентів реакційної суміші.
5. Додавання субстрату. Після завершального промивання вносили субстрат для лужної фосфатази. У разі позитивної реакції формувався продукт жовтого кольору, інтенсивність якого залежала від кількості вірусного антигену в зразку.
6. Реєстрація результатів. Інтенсивність забарвлення оцінювали за допомогою рідера Thermo Labsystems (США) при довжині хвилі 405 нм.

При постановці реакції використовували:

- негативний контроль - сік здорових рослин сої;
- позитивний контроль - комерційні препарати фірми Loewe.

2.3. Виділення тотальної РНК.

Для подальшого молекулярного аналізу проводили виділення тотальної РНК із листкової тканини рослин сої. Оскільки геном SMV представлений одноланцюговою РНК позитивної полярності, отримання якісної та не деградованої РНК є необхідною умовою успішного проведення реакції зворотної транскрипції та ПЛР.

Виділення тотальної РНК здійснювали за допомогою набору RNeasy Mini kit, 74104 (Qiagen, США).

Основні етапи виділення тотальної РНК:

1. Відбирали 75 мг рослинного матеріалу.
2. Проводили гомогенізацію наважки у рідкому азоті.

3. До ступки додавали 600 мкл буфера RLT та 6 мкл β -меркаптоетанолу, після чого повторно гомогенізували.
4. Отриману суспензію переносили у чистий стерильний 1,5 мл епандорф.
5. Центрифугували при 14 тис. об/хв протягом 5 хв.
6. Надосад переносили у новий стерильний епандорф.
7. Додавали рівний об'єм етанолу та переносили суміш у колонку.
8. Проводили центрифугування при 11 тис. об/хв протягом 1 хв.
9. Видаляли рідину, що пройшла через колонку.
10. Додавали 700 мкл буфера RW1.
11. Центрифугували при 11 тис. об/хв протягом 1 хв.
12. Замінювали нижню частину колонки на чисту.
13. Додавали 500 мкл буфера RPE.
14. Центрифугували при 11 тис. об/хв протягом 1 хв.
15. Знову змінювали нижню частину колонки на чисту.
16. Повторно додавали 500 мкл буфера RPE.
17. Центрифугували при 11 тис. об/хв протягом 2 хв.
18. Знову змінювали нижню частину колонки.
19. Відкривали кришки колонок і просушували їх 2–3 хв.
20. Додавали 40 мкл стерильної води.
21. Центрифугували при 11 тис. об/хв протягом 1 хв.
22. Воду, що пройшла через колонку, повторно наносили на колонку.
23. Повторно центрифугували при 11 тис. об/хв протягом 1 хв.
24. Отриману нуклеїнову кислоту переносили у чистий стерильний 1,5 мл епандорф і зберігали при -20°C .

Таким чином, одержували очищену тотальну РНК, придатну для проведення зворотної транскрипції. Отриману РНК використовували для подальшого проведення зворотної транскрипції та ПЛР-аналізу.

2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

Зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР) є високочутливим методом молекулярної діагностики РНК-вмісних вірусів рослин. Метод поєднує синтез комплементарної ДНК на матриці вірусної РНК та подальшу ампліфікацію специфічної ділянки геному.

У дослідженні ЗТ-ПЛР використовували для підтвердження наявності вірусу мозаїки сої в рослинному матеріалі та отримання ампліконів для подальшого секвенування.

Основні етапи ЗТ-ПЛР:

1. Зворотна транскрипція

На першому етапі виділену РНК піддавали зворотній транскрипції, внаслідок чого синтезувалася комплементарна ДНК (кДНК). Для цього використовували фермент RevertAid Reverse Transcriptase — генетично модифіковану MMuLV RT (Thermo Scientific, США). Реакцію проводили при температурі 42 °C протягом 1 години.

2. Полімеразна ланцюгова реакція

Отриману кДНК використовували як матрицю для ампліфікації ділянки гена капсидного білка SMV. Для реакції використовували специфічні олігонуклеотидні праймери:

- SMV-CPf: 5'-CAAGCAGCAAAGATGTAAATG-3'
- SMV-CPr: 5'-GTCCATATCTAGGCATATACG-3'

Очікуваний розмір продукту ампліфікації становив 469 п.н. (Sherepitko et al., 2011).

Ампліфікацію здійснювали з використанням DreamTaq PCR Master Mix (2×) buffer, що містив:

- DreamTaq DNA polymerase,
- 2× DreamTaq buffer,
- 0,4 mM кожного dNTP,
- 4 mM MgCl₂.

До реакційної суміші додавали:

- 7,5 μ l стерильної води,
- 1 μ l кожного праймера (10 μ M),
- 3 μ l кДНК.

Температурний режим ампліфікації:

- початкова денатурація: 3 хв при 95 °С;
- далі 30 циклів, кожен з яких включав:
 - денатурацію — 30 с при 95 °С,
 - відпал праймерів — 30 с при 55 °С,
 - синтез комплементарних ланцюгів ДНК — 45 с при 72 °С;
- кінцева елонгація — 10 хв при 72 °С.

3. Детекція продуктів ПЛР

Продукти ампліфікації аналізували методом електрофорезу в агарозному гелі. Детекція проводилася шляхом візуалізації смуг ДНК після фарбування гелю бромистим етидієм.

Використання ПЛР зі зворотною транскрипцією у вірусології дозволяє точно та чутливо виявляти фітовіруси, їхні варіанти та штами, вивчати генетичний склад та структуру, а також визначати рівень інфекції у рослин (Carr J 2002). Це надає важливі дані для контролю та управління вірусними захворюваннями рослин, а також для розробки нових методів їхньої боротьби та отримання ампліфікованих фрагментів для подальших молекулярно-генетичних досліджень.

2.5. Електрофорез нуклеїнових кислот

Для аналізу продуктів ПЛР проводили електрофоретичне розділення ампліфікованих фрагментів у агарозному гелі. Метод дає можливість визначити наявність продукту ампліфікації, оцінити його приблизний розмір та підтвердити специфічність реакції.

Електрофорез проводили в 1,5 % розчині агарози з додаванням бромистого етидію у концентрації 0,5 мкг/мл. Як маркер молекулярної маси використовували MassRuler DNA Ladder Mix ready-to-use (SM0403, Thermo Scientific, США).

Електрофоретичне розділення здійснювали у камері для горизонтального електрофорезу в режимі 120 V, 2 A протягом 20 хв. Після завершення електрофорезу гелі аналізували та фотографували при ультрафіолетовому випромінюванні.

Наявність ампліфікованого фрагмента довжиною близько 469 п.н. вказувала на присутність вірусу мозаїки сої у зразку.

2.6. Філогенетичний аналіз

Для визначення ступеня генетичної спорідненості досліджуваних ізолятів SMV проводили філогенетичний аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей.

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

Отримані нуклеотидні послідовності порівнювали з послідовностями ізолятів SMV із бази даних GenBank за допомогою BLAST-аналізу.

Філогенетичний аналіз проводили у програмному пакеті MEGA 11. Вирівнювання послідовностей здійснювали за допомогою програми Clustal W, інтегрованої в MEGA. Побудову філогенетичних дерев виконували методом зв'язування найближчих сусідів (Neighbor-Joining) із застосуванням найбільш оптимальних моделей (Saitou, Nei, 1987).

Для оцінки достовірності побудованих дерев використовували бутстреп-тест із 1000 бутстреп-реплікаціями.

Аналіз амінокислотних послідовностей проводили та візуалізували за допомогою програми BioEdit.

2.7. Визначення кількісного вмісту білка у насінні сої

Визначення вмісту білка проводили методом К'ельдаля на Kjeltec Auto-1030 («FOSS»). Суть методу полягає в мінералізації органічної речовини концентрованою сірчаною кислотою в присутності каталізатора з утворенням сульфату амонію, руйнуванні сульфату амонію гідроксидом натрію з виділенням аміаку, відгонки аміаку водяною парою в розчин борної кислоти з наступним титруванням соляною кислотою.

Обладнання:

1. Аналітичні ваги;
2. Аналізатор визначення білка/азоту «Kjeltec Auto-1030 Analyzer» (фірми «Tecator», Швеція).
3. Дігестор.

Реактиви:

1. H_2SO_4 ($d=1,84$), хч, чда;
2. 0,1 М HCl ;
3. Каталізатор (1 таблетка містить 1,5 г K_2SO_4 та 0,0075 г Se).

Наважку (0,100 г). рівномірно здрібненого матеріалу поміщали в пробірку. Аналіз проводили у трьох повторностях. До наважки в пробірку додавали одну таблетку каталізатора (1 таблетка містить 1,5 г K_2SO_4 та 0,0075 г Se, Kjel tabs Auto Tecator). Потім до вмісту пробірки додавали 3 мл концентрованої сірчаної кислоти. Штатив з пробірками поміщали в попередньо прогрітий блок для спалення (температура – 410 °С, термін – 1 година). Необхідно звернути увагу, що для повної мінералізації органічних речовин після просвітлення розчину в пробірках їх витримували в блоці ще 20–30 хвилин (Kjeldahl, 1883). Після закінчення спалення пробірку

охолоджували та приступали до відгонки аміаку на приладі “Kjeltec Auto 1030” (за інструкцією до нього).

Обрахунок результатів:

1. Визначали полярність соляної кислоти

$M=21,20 \times m/1,401 \times ml$, де:

21,20 – % азоту в сульфаті амонію;

m – наважка для аналізу;

ml – кількість 0,1 М НСІ для титрування.

2. Вирахувували калібрувальний коефіцієнт за формулою:

$V(N \times 6,25) = 14,01 \times M \times 6,25$

Значення, отримані на приладі, відповідають процентному вмісту сирого протеїну в дослідному матеріалі. Розрахунок здійснювали за формулою:

$\% \text{ білка} = 14,01 \times M \times 6,25 \times ml \times 100/n$, де

ml – показники приладу;

n – наважка;

6,25 – коефіцієнт переведення загального азоту в кількість загального білка.

Результати визначення загального азоту доповнювали обов'язковим визначенням відсотка вологи в дослідженому матеріалі для вираження даних у % на абсолютну суху речовину.

2.8. Визначення вмісту жиру у насінні сої

Визначення жиру в насінні сої проводили екстракційним методом з використанням паро-рідинного екстрактору. У цьому апараті екстракція проводиться пароподібною та рідинною фазами розчинника за температури кипіння, що значно прискорює процес виділення жиру.

Обладнання:

1. Паро-рідинний екстрактор;

2. Сушильна шафа;

3. Аналітичні ваги.

Реактиви:

1. Фільтрувальний папір;

3. Хлороформ, х.ч.

4. Хід визначення:

Насіння в кількості 5–6 г насипали в металеві пронумеровані бюкси та, не закриваючи кришками, поміщали в сушильну шафу. Витримують 6–7 годин за температури 105 °С (+ 2 °С). Після висушування бюкси накривають кришками та поміщають в ексикатор під свіжопрокаленим CaCl₂. Після того, як насіння досягне кімнатної температури (через 0,5–1 годину), його розмелювали у мліні (протягом 1 хвилини) та швидко заповнювали паперовий пакет, який має розміри 5 × 5 см та середню масу 0,5–0,6 г. Зазвичай на один пакет припадає 0,8–1,3 г подрібненого насіння. На аналітичних вагах визначали точну масу пакета з насінням (m₁). Після зважування пакети розміщували в екстракційну камеру екстрактора та після її заповнення завантажували в апарат, заливали 5–6 л хлороформу, закривали внутрішнім холодильником, що приєднаний до водопровідної мережі, та вмикали в електромережу через автоматичне реле, яке відключає екстрактор за зниження тиску води у водопровідній мережі (Beema et al., 2023). Екстрагування проводили протягом не менше 12 годин. Після відключення екстрактора залишали його на 1–1,5 години для охолодження. При цьому подачу води в нього не припиняли. Виймали холодильник, камеру зі зразками піднімали наверх та, не виймаючи повністю із екстрактора, давали можливість позбутися хлороформу. Після цього пакети розміщували у витяжній шафі для випаровування основної маси хлороформу, а потім висушували у витяжній шафі 6 годин за 105 °С. Після висушування їх поміщали в екстрактор над CaCl₂ та зважували на аналітичних вагах (m₂).

Обрахунок результатів:

Вміст жиру розраховують за наступною формулою:

$$Ж = [(m_1 - p_1) - (m_2 - p_2)] \times 100 / m_1 - p_1, \text{ де}$$

Ж – % жиру;

м1 – вага зразка з пакетом до екстракції, у г;

м2 – вага зразка з пакетом після екстракції, у г;

р1 – вага 1 пакету до сушки, у г;

р2 – вага 1 пакету після сушки, у г;

Зазвичай розраховують шляхом множення ваги 1 пакета до сушки на коефіцієнт 0,95, який визначають дослідним шляхом.

2.9. Визначення активності інгібітора трипсину

Казеїновий метод визначення активності інгібітора трипсину в насінні зернобобових культур, заснований на гальмуванні гідролізу казеїну кристалічним трипсином.

Обладнання:

1. Ультратермостат;
2. Центрифуга;
3. Фотоелектроколориметр, спектрофотометр.

Реактиви:

1. Субстрат – 2%-ний розчин казеїну на 0,1М фосфатному буфері рН 7,6;
2. Розчин трипсину з концентрацією 0,2мг/мл;
3. 10%-ний розчин трихлороцтової кислоти (ТХО);
4. Реактив А (0,1 н розчин NaOH на 2%-ному розчині вуглекислого натрію);
5. Реактив Фоліна: 100 г вольфрамівового натрію ($\text{NaWO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) та 25 г молібденокислого натрію ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) розчиняли в 700 мл дистильованої води, потім додали 50 мл 85% ортофосфорної кислоти (H_3PO_4) та 100 мл концентрованої HCl. Нагрівали в колбі ємністю 1,5 л із зворотним холодильником протягом 10 годин. Охолоджували, додали 150 г сульфату літію, 50 мл дистильованої води і поступово, краплями, додали бром. Залишок бромову відганяли, нагріваючи колбу без холодильника. Після охолодження об'єм доводили до 1 л і профільтровували. Розчин має бути золотисто-жовтого

кольору без зеленого відтінку. Для визначення використовували реактив, розведений дистильованою водою в 2 рази.

Хід визначення:

До 50 мг борошна додати 1 мл 0,1 н HCl та перемішувати протягом 40 хвилин, відцентрифугувати за 10000g. Надосадову рідину використовували для визначення активності інгібітора трипсину. У пробірці змішували рівні об'єми (0,3–0,5 мл) розчину трипсину і досліджуваного зразка (Liu, 2019). Витримували 10 хвилин за кімнатної температури, відібрали 0,2 мл суміші та переносили в центрифужну пробірку. В цю пробірку додавали 0,4 мл розчину казеїну, перемішати 5 секунд та помістити у водяний ультратермостат при 30°C точно на 30 хвилин. Зупиняли реакцію, додаючи 0,6 мл 10% ТХО, акуратно перемішували та центрифугували за 3000 g протягом 15 хвилин. Відібрали 0,2 мл надосадової рідини, додавали 2 мл реактиву А та 0,2 мл реактиву Фоліна, розведеного водою в 2 рази. Через 30 хвилин виміряти екстинкцію на фотоелектроколориметрі, спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм проти контролю на реактиви (0,2 мл 5% ТХО + 2 мл реактиву А + 0,2 мл реактиву Фоліна у розведенні 1:2).

Одночасно ставили пробу на активність трипсину. Для цього в пробірці змішували рівні об'єми трипсину та того розчинника, на якому готували розчин трипсину. Витримували 10 хвилин за кімнатної температури, відібрали 0,2 мл суміші та далі робили так, як описано вище стосовно суміші трипсину з інгібітором.

Крім того, ставили 2 контролю в нульовий час. У контролі К1 до 0,2 мл суміші трипсину з інгібітором додавали 0,6 мл 10% ТХО та потім 0,4 мл розчину казеїну. Центрифугували, відібрали 0,2 мл надосадової рідини та проводили реакцію з реактивом Фоліна. В контролі К2 до 0,2 мл трипсину з розчинником для інгібітору додавали 0,6 мл 10% ТХО, потім 0,4 мл розчину казеїну та далі обробляли як К1.

Обрахунок результатів:

Вміст інгібітора трипсину розраховують за наступною формулою:

$IT = 200 \times (E_T - E_{Op} - E_{K2} + E_{K1}) \times n / E_T - E_{K2}$, де

IT – вміст інгібітора трипсину в одиницях на 1 мл. 1 одиниця інгібітора відповідає 1 мкг кристалічного трипсину;

200 – концентрація трипсину в мкг/мл;

E_T – екстинкція проби з трипсином;

E_{Op} – екстинкція проби з сумішшю трипсин+інгібітор;

E_{K1} – екстинкція контролю в нульовий час з сумішшю трипсин+інгібітор;

E_{K2} – екстинкція контролю в нульовий час з сумішшю трипсин+розчинник;

n – розведення розчину інгібітора.

2.10. Статистичні методи обробки даних

Статистичні методи обробки даних застосовували для об'єктивної оцінки отриманих результатів і перевірки їх достовірності. Використання статистичного аналізу у вірусологічних дослідженнях є необхідним для коректної інтерпретації експериментальних даних та порівняння дослідних варіантів.

Одним із базових статистичних показників є середнє значення, яке відображає середній рівень досліджуваного параметра у вибірці. Зокрема, середнє значення оптичної густини або іншого кількісного показника дозволяє оцінити загальний рівень вірусного навантаження чи інтенсивності прояву реакції.

Аналіз даних проводили з використанням програми MS Excel.

При побудові філогенетичних дерев для перевірки їх достовірності застосовували бутстреп-тест із 1000 бутстреп-реплікаціями, що дозволяло оцінити статистичну підтримку окремих гілок дерева.

Усі дослідження проводили з дотриманням стандартних методик та рекомендацій виробників реактивів. Отримані результати обробляли із застосуванням статистичних методів, що забезпечувало їх достовірність та відтворюваність.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Симптоматика захворювання

Обстеження посівів сої в Одеській області показали наявність рослин із симптомами мозаїки на листках, зморшкуватості листкової поверхні, «бронзової засмаги», чітко вираженої світло-зеленої пухирчатості між жилками

Таблиця .3.1

Перелік відібраних зразків сої

Номер зразка	Сорт	Область відбору
1	Аврора	Одеська
2	Аріадна	Одеська
3	Васильківська	Одеська
4	Зміна	Одеська
5	Еврідика	Одеська
6	Серенада	Одеська
7	Сяйво	Одеська
8	Одеситка	Одеська
9	Таверна	Одеська
10	Фенікс	Одеська

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

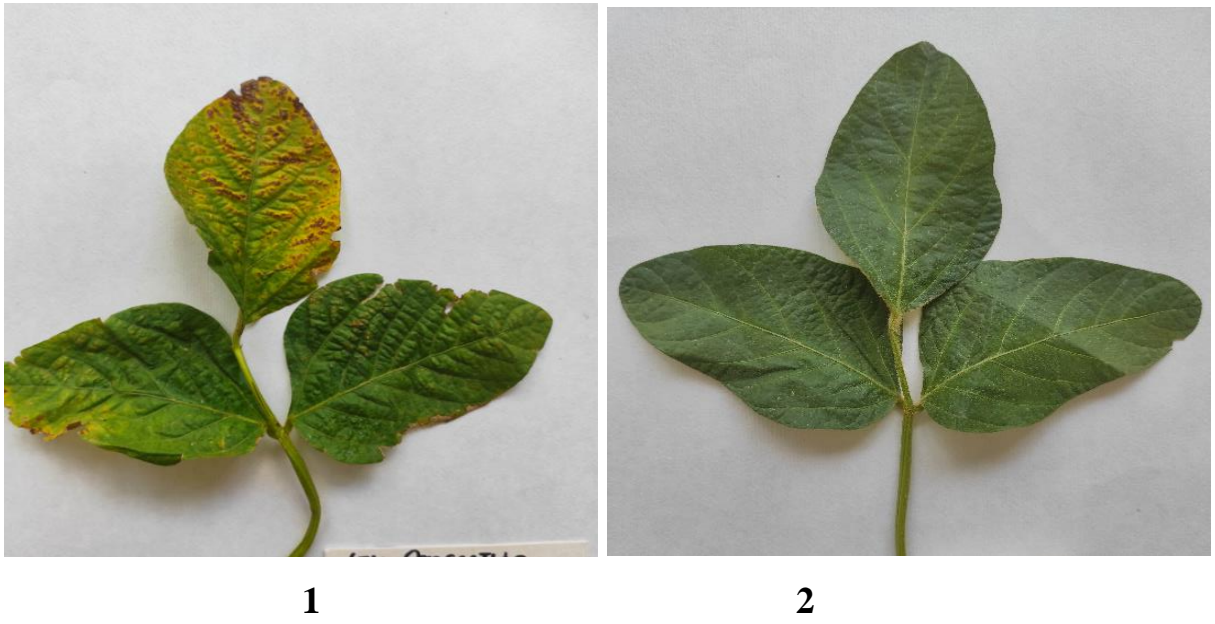


Рис. 3.1. Рослини сої сорту Одеситка з симптомами вірусного ураження
1 – рослина уражена вірусом; 2 – рослина здорова



Рис. 3.2. Симптоми мозаїки на рослинах сої сорту Еврідіка 1 – здорова рослина; 2 – хворі рослини

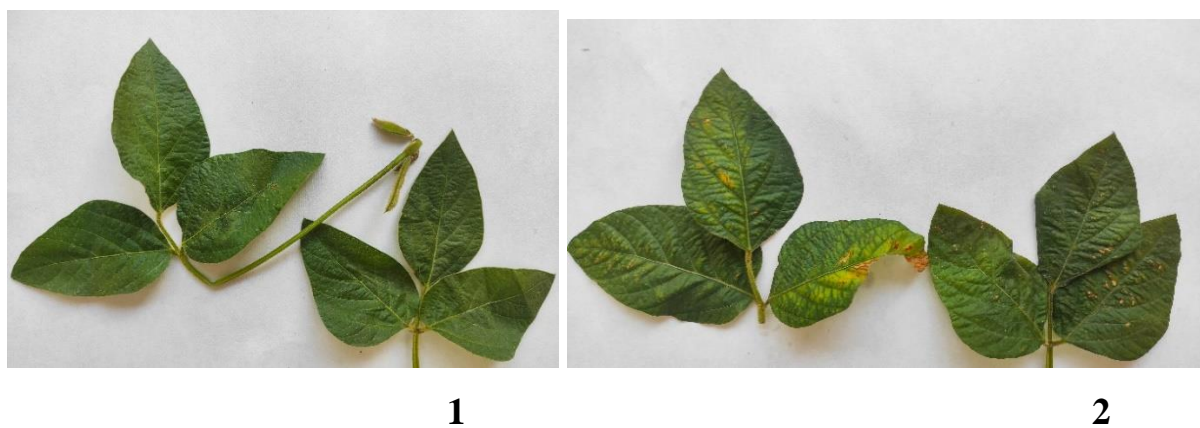


Рис. 3.3. Ураження рослин сої сорту Фенікс вірусом мозаїки сої 1 – рослина здорова; 2 – рослина хвора



Рис. 3.4. Рослини сої сорту сої Васильківська: 1 – інфіковані ВМС; 2,3 – здорові

У результаті польових досліджень встановлено наявність типових симптомів вірусу мозаїки сої у рослин різних сортів, що вирощувалися в Одеській області. Виявлені ознаки (мозаїка, деформація листків, зморшкуватість та пухирчастість) свідчать про високу ймовірність інфікування SMV. Це стало підставою для проведення подальшої серологічної та молекулярної діагностики.

Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників, які відзначають варіабельність симптомів ураження SMV залежно від сорту рослин та умов середовища (Hill et al., 2007; Hull, 2014). Подібні прояви симптоматики також описані Domier (2012), що підтверджує типовий характер виявлених змін.

3.2. Серологічна та молекулярна діагностика вірусу мозаїки сої

Діагностику вірусів проводили у 20 зразках сої (всього 10 сортів, до кожної відібрані симптоматичні рослини та візуально здорові) (табл.3.1).

Табл.3.1.

Перелік зразків рослин сої, відібраних для дослідження

№ зразку	Назва сорту	Симптоматика на листках
33	Сорт Одеситка	без симптомів
34	Сорт Одеситка	мозаїка
35	Сорт Еввідіка	без симптомів
36	Сорт Еввідіка	плямистість
37	Сорт Васильківська	без симптомів
38	Сорт Васильківська	деформація листкої пластинки

39	Сорт Зміна	без симптомів
40	Сорт Зміна	плямистість
41	Сорт Серенада	мозаїка, зморшкуватість
42	Сорт Серенада	без симптомів
43	Сорт Аврора	плямистість
44	Сорт Аврора	без симптомів
45	Сорт Сяйво	без симптомів
46	Сорт Сяйво	мозаїка, зморшкуватість
47	Сорт Фенікс	без симптомів
48	Сорт Фенікс	плямистість
49	Сорт Аріадна	без симптомів
50	Сорт Аріадна	деформація листкових пластинок
51	Сорт Таверна	плямистість
52	Сорт Таверна	без симптомів

Методом ІФА було протестовано відібрані зразки на наявність вірусів. Так, антигени ВМС виявлено у у всіх 10-ти сортах, а саме у зразках з візуальними ознаками інфекції (рис.3.5, табл.3.2).

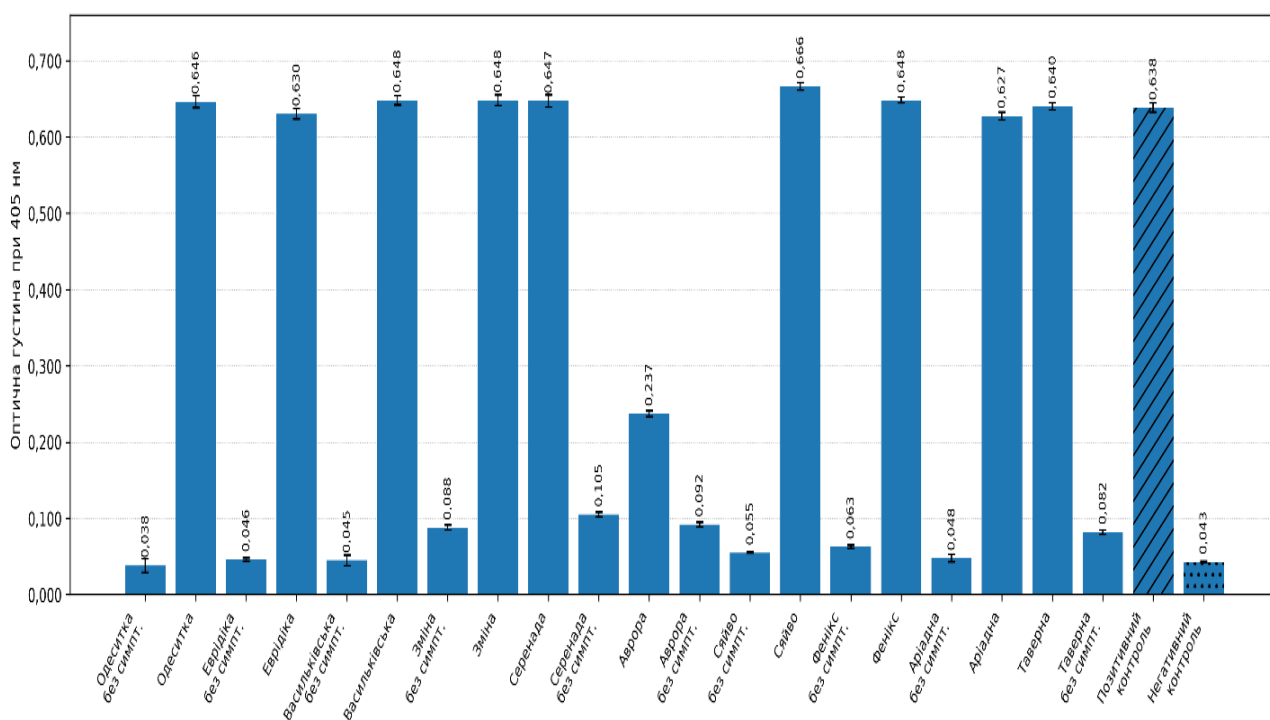


Рис. 3.5. Результати ІФА (DAS-ELISA) на наявність вірусу мозаїки сої (SMV) у зразках рослин сої з Одеської області

Табл.3.2.

Результати ІФА на наявність SMV у рослинах сої із Одеської області

№ зразка	Назва сорту	Наявність/відсутність антигенів вірусу
33	Сорт Одеситка, без симптомів	-
34	Сорт Одеситка	+
35	Сорт Еврідика, без симптомів	-
36	Сорт Еврідика	+
37	Сорт Васильківська, без симптомів	-
38	Сорт Васильківська	+
39	Сорт Зміна, без симптомів	-
40	Сорт Зміна	+
41	Сорт Серенада	+

42	Сорт Серенада, без симптомів	-
43	Сорт Аврора	+
44	Сорт Аврора, без симптомів	-
45	Сорт Сяйво, без симптомів	-
46	Сорт Сяйво	+
47	Сорт Фенікс, без симптомів	-
48	Сорт Фенікс	+
49	Сорт Аріадна, без симптомів	-
50	Сорт Аріадна	+
51	Сорт Таверна	+
52	Сорт Таверна, без симптомів	-

Антигенів ВУМV у досліджуваних зразках сої виявлено не було (табл. 3.3, рис. 3.6).

Табл.3.3.

Результати ІФА на наявність ВУМV у рослинах сої із Одеської області

Зразок	Наявність/відсутність антигенів вірусу
Сорт Одеситка	-
Сорт Одеситка	-
Сорт Еввідіка	-
Сорт Еввідіка	-
Сорт Васильківська	-
Сорт Васильківська	-
Сорт Зміна	-
Сорт Зміна	-
Сорт Серенада	-

Сорт Серенада	-
Сорт Аврора	-
Сорт Аврора	-
Сорт Сяйво	-
Сорт Сяйво	-
Сорт Фенікс	-
Сорт Фенікс	-
Сорт Аріадна	-
Сорт Аріадна	-
Сорт Таврія	-
Сорт Таверна	-

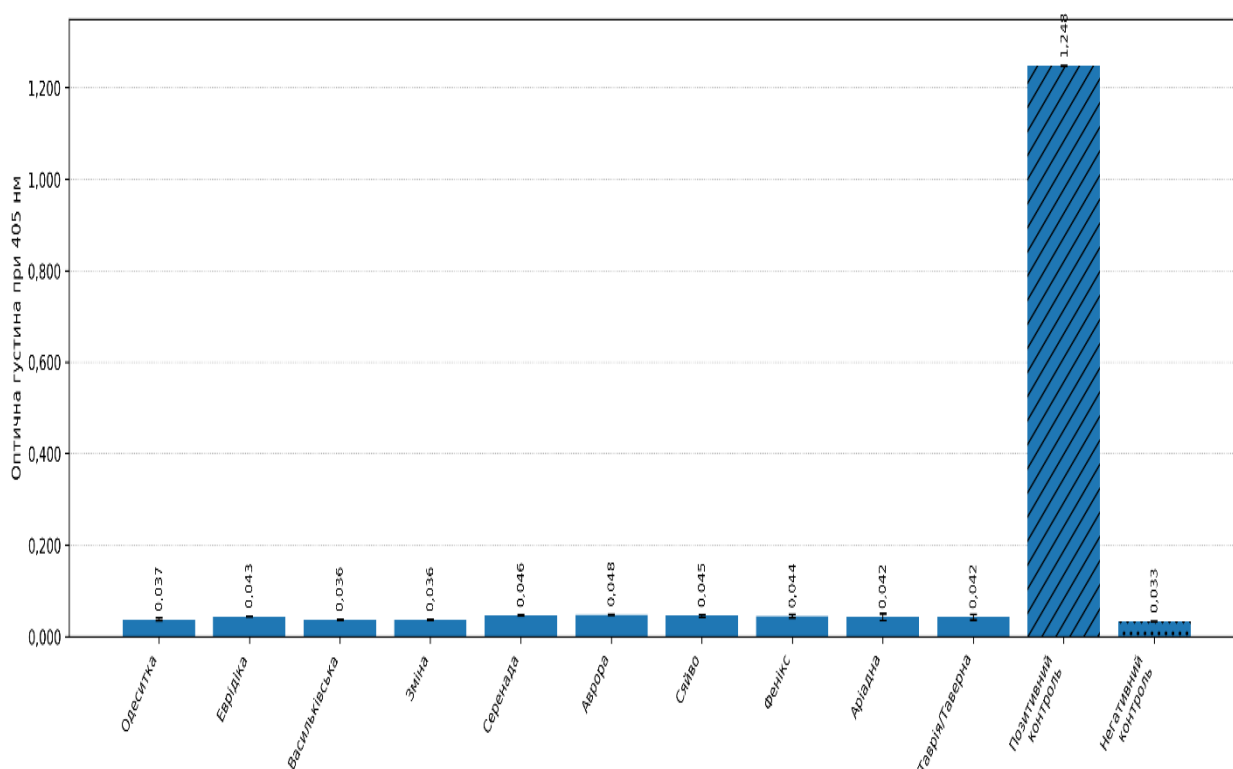


Рис. 3.6. Результати ІФА (DAS-ELISA) на наявність BYMV у зразках рослин сої з Одеської області

Антигенів СРММV у досліджуваних зразках сої виявлено не було (табл. 3.4, рис. 3.7).

Табл.3.4.

Результати ІФА на наявність СРММV у рослинах сої із Одеської області

Зразок	Наявність/відсутність антигенів вірусу
33 Сорт Одеситка	-
34 Сорт Одеситка	-
35 Сорт Еввідіка	-
36 Сорт Еввідіка	-
37 Сорт Васильківська	-
38 Сорт Васильківська	-
39 Сорт Зміна	-
40 Сорт Зміна	-
41 Сорт Серенада	-
42 Сорт Серенада	-
43 Сорт Аврора	-
44 Сорт Аврора	-
45 Сорт Сяйво	-
46 Сорт Сяйво	-
47 Сорт Фенікс	-
48 Сорт Фенікс	-
49 Сорт Аріадна	-
50 Сорт Аріадна	-
51 Сорт Таврія	-
52 Сорт Таверна	-

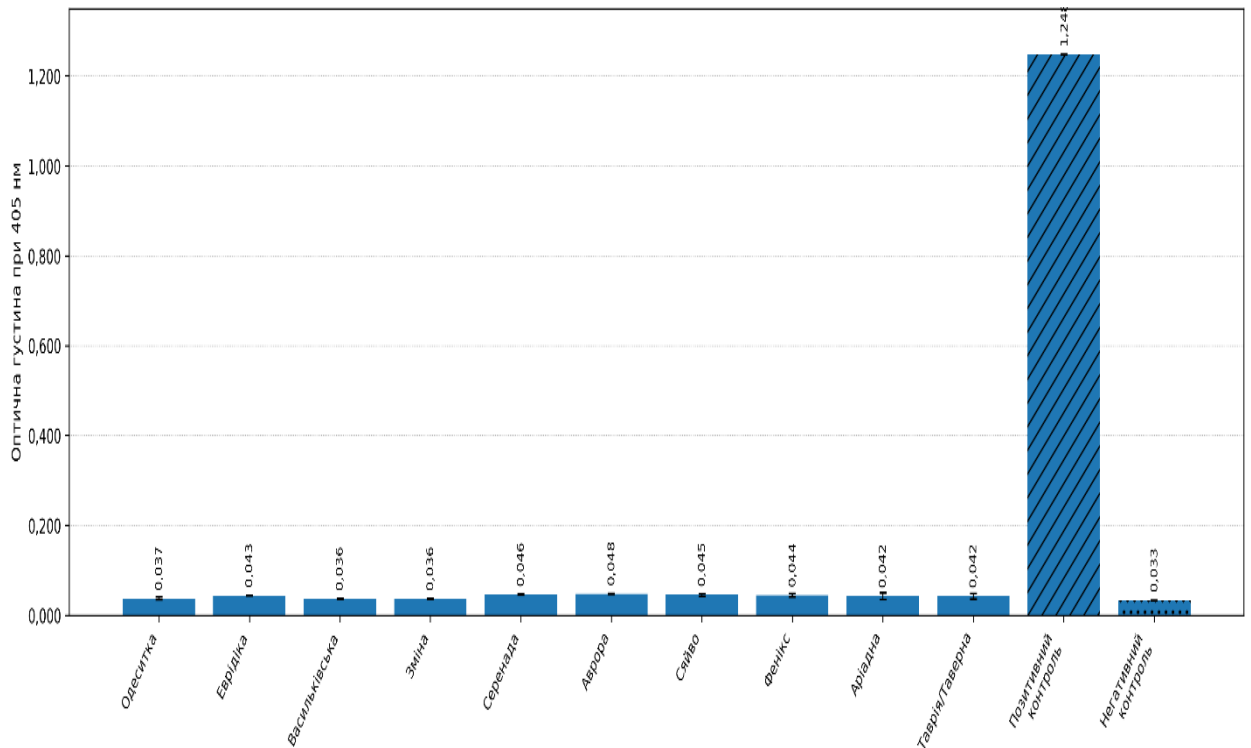


Рис. 3.7. Результати ІФА (DAS-ELISA) на наявність CPMMV у зразках рослин сої з Одеської області

У дослідженні було проаналізовано 20 зразків сої різних сортів, відібраних з Одеської області. Обстежувані рослини характеризувалися типовими симптомами вірусного ураження, зокрема мозаїчністю листків, деформацією листкової пластинки, зморшкуватістю, хлорозом та плямистістю.

За результатами серологічного аналізу методом DAS-ELISA у частини досліджуваних зразків було виявлено наявність вірусу мозаїки сої, що підтверджується підвищеними значеннями оптичної щільності порівняно з негативним контролем.

Присутність SMV у досліджуваних зразках була підтверджена методом ЗТ-ПЛР, який виявив наявність продукту розміром близько 469 п.н., що відповідає ділянці гена капсидного білка цього вірусу (рис. 3.8).

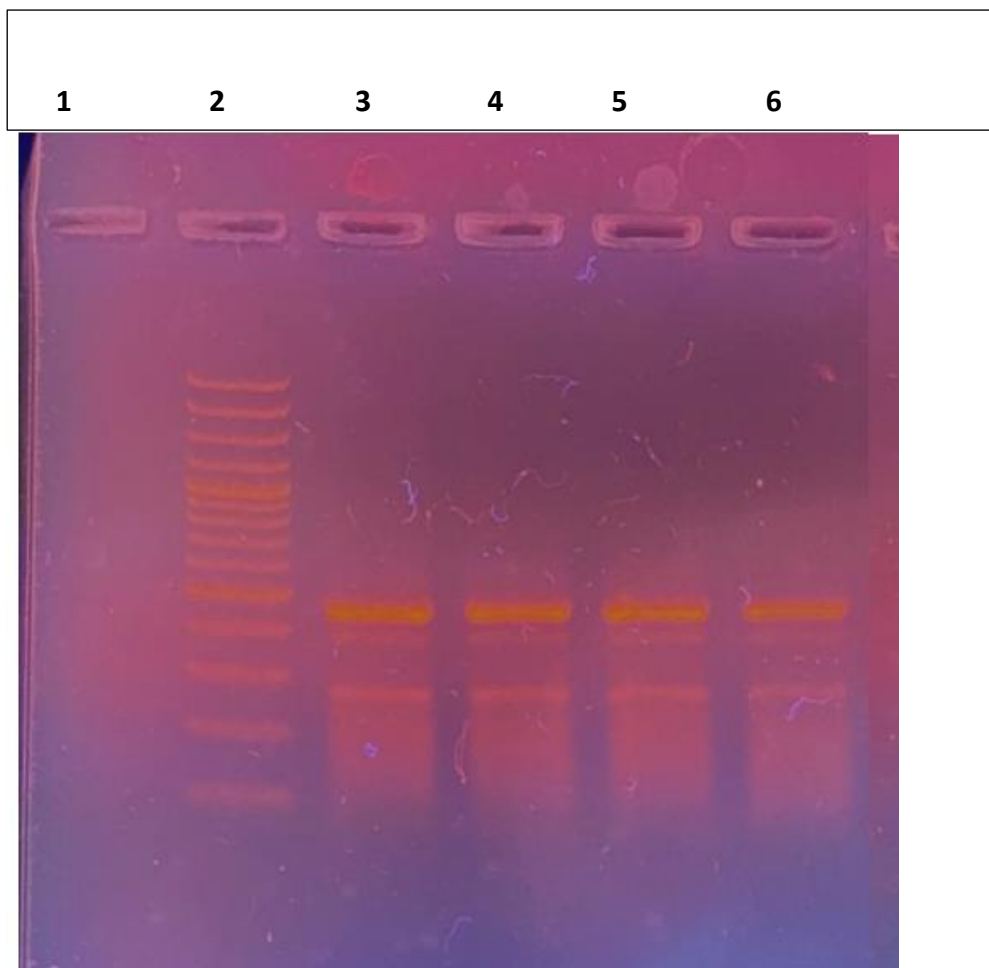


Рис. 3.8. Електрофореграма продуктів ДНК із застосуванням праймерів до ділянки гена капсидного білка SMV (очікуваний продукт 469 п.н.): 1 – негативний контроль; 2 – маркер ДНК MassRuler DNA Ladder Mix ready-to-use (Thermo Scientific, США); 3 – позитивний контроль; 4 – сорт Васильківська; 5 – сорт Одеситка; 6 – сорт Сяйво

Таким чином, за результатами серологічного аналізу методом DAS-ELISA встановлено наявність антигенів вірусу мозаїки сої (SMV) у більшості досліджуваних зразків із симптомами ураження. Значення оптичної густини для інфікованих рослин суттєво перевищували показники здорових зразків та негативного контролю, що підтверджує специфічність реакції. Для підтвердження результатів ІФА було проведено зворотно-транскрипційну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ-ПЛР).

У результаті аналізу було отримано специфічні амплікони розміром близько 469 пар нуклеотидів, що відповідає ділянці гена капсидного білка вірусу мозаїки сої та підтверджує наявність SMV у досліджуваних зразках.

Отримані нуклеотидні послідовності було депоновано до міжнародної бази даних GenBank. Досліджувані ізоляти отримали назви: Odesytka-24-Ukr (GenBank: PV646567) та Vasytkivska-24-Ukr (GenBank: PV646568). Водночас результати ІФА для вірусів BYMV та CPMMV показали відсутність їх накопичення у досліджуваних зразках, оскільки значення оптичної густини знаходилися на рівні негативного контролю. Додаткове підтвердження наявності SMV було отримано методом зворотньо-транскрипційної ПЛР. Таким чином, поєднання серологічних і молекулярних методів дозволило достовірно підтвердити інфікування рослин сої вірусом мозаїки сої.

Отримані результати серологічної та молекулярної діагностики відповідають сучасним підходам до виявлення фітовірусів (Crowther, 1995; Wan, 2017). Поєднання DAS-ELISA та ЗТ-ПЛР дозволяє підвищити точність діагностики, що підтверджується результатами інших досліджень (Bustin, 2000; Sherepitko et al., 2011).

3.3. Філогенетичний аналіз ізолятів вірусу мозаїки сої

Проведено порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей ділянки гена капсидного білка (CP) українських ізолятів вірусу мозаїки сої Odesytka-24-Ukr та Vasytkivska-24-Ukr із ізолятами SMV з різних країн світу.

На побудованому філогенетичному дереві досліджувані ізоляти локалізуються в одній кластерній групі з ізолятами, що мають найвищий відсоток ідентичності за нуклеотидною послідовністю, зокрема з ізолятами VA2 (США), DS-21 (Сербія), Green Shell (Нідерланди), Ar33 та Lo3 (Іран), UA1Gr (Україна), а також ізолятами з Китаю та Польщі (рис. 3.9).

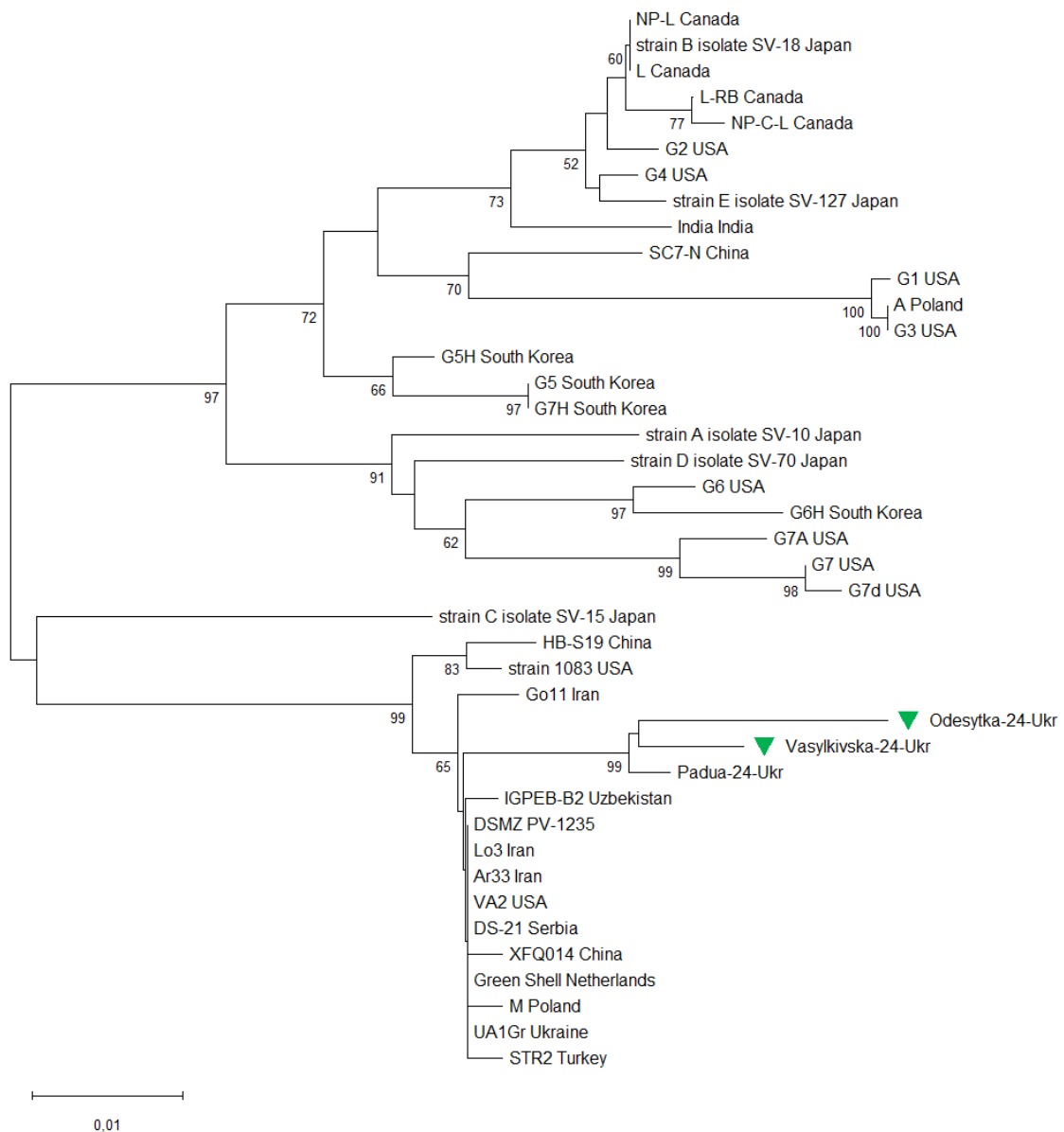


Рис. 3.9. Філогенетичне дерево, побудоване методом Neighbor-Joining за нуклеотидними послідовностями ділянки гена капсидного білка ізолятів ВМС Odesytko-24-Ukr (PV646567) та Vasylykivska-24-Ukr (PV646568) і референтних ізолятів SMV з бази GenBank

Для оцінки ступеня генетичної спорідненості між ізолятами було проведено аналіз відсотка ідентичності нуклеотидних та амінокислотних послідовностей досліджуваної ділянки гена *CP*. Досліджувані українські ізоляти характеризуються високим рівнем нуклеотидної ідентичності з

іншими ізолятами SMV. Встановлено, що відсоток ідентичності за нуклеотидною послідовністю українських ізолятів Odesytka-24-Ukr та Vasytkivska-24-Ukr із більшістю ізолятів вірусу мозаїки сої становить 97,6–98,6%. Найвищі значення ідентичності за нуклеотидною послідовністю (до 97,9–98,6%) спостерігаються для ізолятів: VA2 (США), DS-21 (Сербія), Green Shell (Нідерланди), Ar33 та Lo3 (Іран), UA1Gr (Україна), XFO014 (Китай) та M (Польща). Найнижчі значення (близько 89–92%) відмічені для ізолятів з Канади та Японії, що свідчить про їх більшу генетичну віддаленість (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Відсоток ідентичності ізолятів вірусу мозаїки сої за нуклеотидними (nt) послідовностями гена CP, %

Ізолят	Odesytka-24-Ukr	Vasytkivska-24-Ukr
VA2_USA	97.15	98.11
DS-21_Serbia	97.15	98.11
Green_Shell_Netherlands	97.15	98.11
UA1Gr_Ukraine	97.15	98.11
Ar33_Iran	97.15	98.11
Lo3_Iran	97.15	98.11
HB-S19_China	95.93	96.91
XFQ014_China	96.91	97.87
M_Poland	96.91	97.87
Go11_Iran	96.66	97.63
strain_1083_USA	96.17	97.15
G1_USA	88.43	89.51
A_Poland	88.16	89.24
SC7-N_China	89.78	90.84
G2_USA	89.78	90.84
G3_USA	88.16	89.24

G4_USA	89.51	90.57
G5_South_Korea	90.57	91.62
G5H_South_Korea	91.36	92.4
G6_USA	89.51	90.57
G6H_South_Korea	88.43	89.51
G7_USA	88.43	89.51
G7A_USA	88.43	89.51
G7d_USA	88.16	89.24
G7H_South_Korea	90.57	91.62
L_Canada	89.78	90.84
NP-L_Canada	89.78	90.84
L-RB_Canada	89.51	90.57
NP-C-L_Canada	89.24	90.31
India_India	89.78	90.84
strain_A_isolate_SV-10_Japan	89.78	90.84
strain_B_isolate_SV-18_Japan	89.78	90.84
strain_C_isolate_SV-15_Japan	92.14	93.17
strain_D_isolate_SV-70_Japan	89.78	90.84
strain_E_isolate_SV-127_Japan	89.51	90.57
Odesytka-24-Ukr	-----	97.63
Vasylkivska-24-Ukr	97.63	-----
Padua-24-Ukr	98.12	98.83
DSMZ_PV-1235	97.15	98.12
STR2_Turkey	96.91	97.88
IGPEB-B2_Uzbekistan	96.91	97.88

Відсоток ідентичності за амінокислотою послідовністю є дещо нижчим порівняно з нуклеотидною, що вказує на наявність амінокислотних заміщень (табл. 3.5).

Таблиця 3.5.

Відсоток ідентичності ізолятів вірусу мозаїки сої за амінокислотними послідовностями гена CP, %

Ізолят	Odesytka-24-Ukr	Vasylkivska-24-Ukr
VA2_USA	94.98	97.16
DS-21_Serbia	94.98	97.16
Green_Shell_Netherlands	94.98	97.16
UA1Gr_Ukraine	94.98	97.16
Ar33_Iran	94.98	97.16
Lo3_Iran	94.98	97.16
HB-S19_China	94.98	97.16
XFQ014_China	94.98	97.16
M_Poland	94.98	97.16
Go11_Iran	94.98	97.16
strain_1083_USA	94.98	97.16
G1_USA	94.98	97.16
A_Poland	94.98	97.16
SC7-N_China	94.98	97.16
G2_USA	94.98	97.16
G3_USA	94.98	97.16
G4_USA	94.98	97.16
G5_South_Korea	94.98	97.16
G5H_South_Korea	94.98	97.16
G6_USA	94.98	97.16
G6H_South_Korea	94.24	96.44
G7_USA	94.24	96.44
G7A_USA	94.24	96.44
G7d_USA	93.5	95.71
G7H_South_Korea	94.98	97.16

L_Canada	94.98	97.16
NP-L_Canada	94.98	97.16
L-RB_Canada	94.98	97.16
NP-C-L_Canada	94.98	97.16
India_India	94.98	97.16
strain_A_isolate_SV-10_Japan	94.98	97.16
strain_B_isolate_SV-18_Japan	94.98	97.16
strain_C_isolate_SV-15_Japan	94.98	97.16
strain_D_isolate_SV-70_Japan	94.98	97.16
strain_E_isolate_SV-127_Japan	94.98	97.16
Odesytka-24-Ukr	-----	95.71
Vasylkivska-24-Ukr	95.71	-----
Padua-24-Ukr	96.45	97.88
DSMZ_PV-1235	94.99	97.
STR2_Turkey	94.99	97.17
IGPEB-B2_Uzbekistan	94.99	97.17

Аналіз амінокислотних послідовностей показав наявність окремих заміщень у досліджуваній ділянці гена CP. Зокрема, для ізолята Odesytka-24-Ukr встановлено амінокислотні заміни у позиціях 1–4 (Ser→Trp; Lys→Cys; Gly→Met; Lys→Glu), що свідчить про певні відмінності у структурі білка порівняно з іншими ізолятами. Показано, що амінокислотна ідентичність українських ізолятів із більшістю ізолятів SMV знаходиться в межах 95,8–97,9%, що дещо нижче порівняно з нуклеотидною ідентичністю. Найвищі значення амінокислотної ідентичності (до 97,2–97,9%) характерні для тих самих ізолятів: VA2 (США), DS-21 (Сербія), Green Shell (Нідерланди), Ar33 та Lo3 (Іран), UA1Gr (Україна), XFO014 (Китай) та M (Польща). Найнижчі значення амінокислотної ідентичності (близько 89–91%) спостерігаються для віддалених ізолятів, зокрема з Канади та Японії. Зниження рівня ідентичності

на амінокислотному рівні свідчить про наявність замін у білковій послідовності. Більшість амінокислотних позицій залишається консервативними, а виявлені заміни мають точковий характер.

Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей показав, що досліджувані українські ізоляти Odesytka-24-Ukr та Vasylykivska-24-Ukr характеризуються високим рівнем консервативності білка CP. Більшість амінокислотних позицій є ідентичною для всіх проаналізованих ізолятів, що підтверджує високий рівень їх генетичної спорідненості. Водночас виявлено окремі амінокислотні заміни, які мають точковий характер. Зокрема, для ізолята Odesytka-24-Ukr встановлено заміни у початкових позиціях білка (1–4): Ser→Trp; Lys→Cys; Gly→Met; Lys→Glu. Ці заміни не є масовими та не призводять до суттєвих змін у структурі білка, що узгоджується з високими значеннями амінокислотної ідентичності, отриманими під час порівняльного аналізу.

Отримані результати свідчать про те, що досліджувана ділянка гена CP є високо консервативною серед ізолятів вірусу мозаїки сої, а виявлені амінокислотні відмінності мають обмежений характер (рис. 3.10).

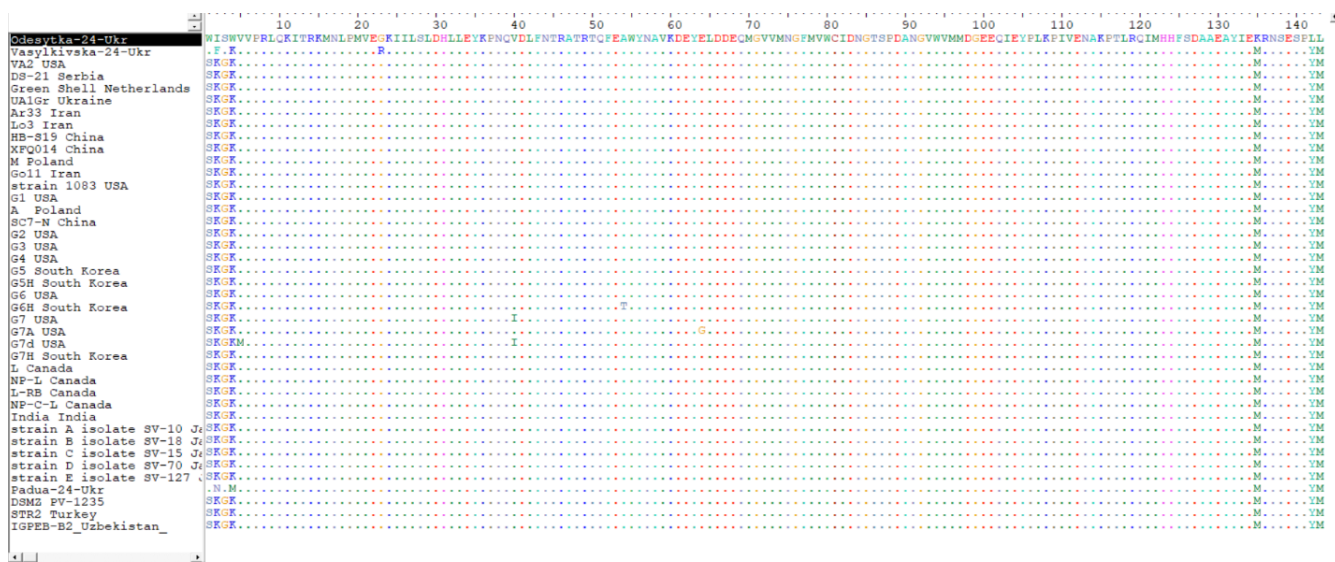


Рис 3.10. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей досліджуваної ділянки гена капсидного білка (CP) ізолятів вірусу мозаїки сої. Числа у верхній частині відповідають позиціям амінокислот. Показані лише відмінності

Для наочного відображення рівня генетичної спорідненості між досліджуваними ізолятами було побудовано матрицю попарної нуклеотидної ідентичності.

Аналіз теплової карти показав, що досліджувані українські ізоляти Odesytka-24-Ukr та Vasytkivska-24-Ukr характеризуються високим рівнем ідентичності з більшістю ізолятів SMV, що відображено теплими кольорами (червоні та помаранчеві відтінки), які відповідають значенням 97–100%. Найбільш високий рівень подібності спостерігається між українськими ізолятами та ізолятами VA2 (США), DS-21 (Сербія), Green Shell (Нідерланди), Ar33 та Lo3 (Іран), UA1Gr (Україна), а також ізолятами з Китаю та Польщі. Водночас для ізолятів з Канади, Японії та частини інших регіонів характерні нижчі значення ідентичності (блакитні та зелені відтінки), що відповідають приблизно 90–95%, що свідчить про їх більшу генетичну віддаленість. Також на матриці чітко простежується кластеризація ізолятів у групи, що відповідають їх географічному походженню та філогенетичним зв'язкам. Отримані результати узгоджуються з даними філогенетичного аналізу та підтверджують належність українських ізолятів до поширених генетичних груп вірусу мозаїки сої (рис. 3.11).

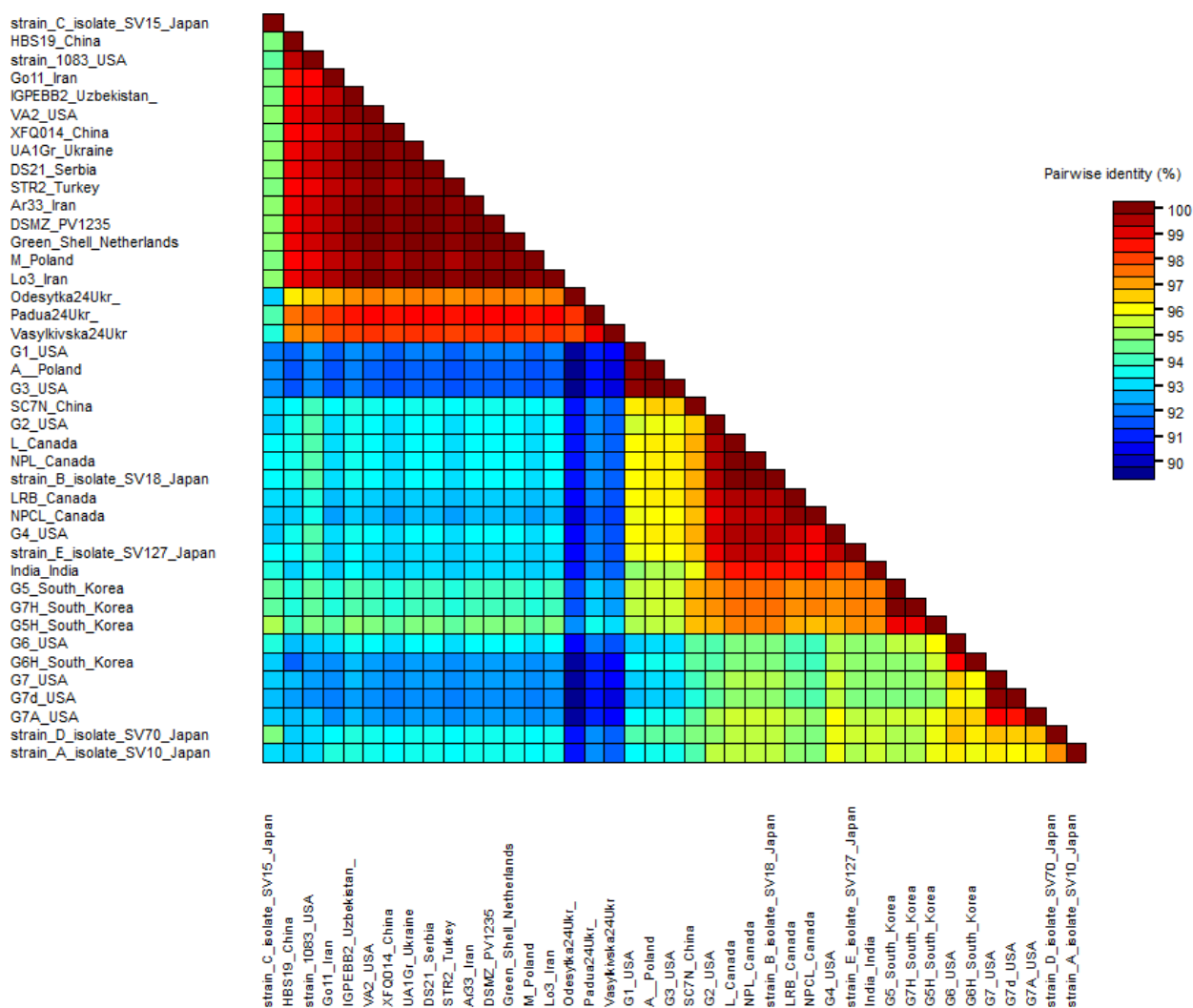


Рис 3.11. Теплова мапа попарної нуклеотидної ідентичності ізолятів вірусу мозаїки сої, побудована на основі аналізу ділянки гена капсидного білка (СР). Кольорова шкала відображає рівень ідентичності (%)

Аналіз амінокислотних послідовностей Для підтвердження отриманих результатів було проведено трансляцію нуклеотидних послідовностей у відповідні амінокислотні послідовності капсидного білка та виконано їх порівняльний аналіз. Досліджувані ізоляти демонструють високий ступінь консервативності амінокислотної послідовності, що характерно для структурних білків вірусів роду *Potyvirus*. Виявлені незначні заміни амінокислот не призводять до суттєвих змін функціональних властивостей білка.

Проведений філогенетичний аналіз показав, що ізоляти Odesytka-24-Ukr (PV646567) та Vasytkivska-24-Ukr (PV646568) характеризуються високим ступенем генетичної подібності до інших ізолятів цього вірусу, представлених у базі GenBank. Досліджувані ізоляти формують окрему кладу на філогенетичному дереві, що свідчить про їх тісну спорідненість між собою та можливе регіональне походження.

Отримані результати підтверджують консервативність гена капсидного білка SMV та можуть бути використані для подальших досліджень молекулярної епідеміології вірусу.

Отримані філогенетичні зв'язки узгоджуються з результатами попередніх досліджень, які демонструють значну генетичну варіабельність ізолятів SMV (Friedman, Brandon, 2001; Gibbs, Ohshima, 2010). Подібність досліджуваних ізолятів до ізолятів з інших регіонів може свідчити про їх можливе поширення через насінневий матеріал.

3.4. Вплив вірусу мозаїки сої на кількісний вміст білка та жиру у насінні сої

За результатами дослідження встановлено, що інфікування рослин сої вірусом мозаїки сої (ВМС) супроводжується зміною основних біохімічних показників насіння. Аналіз вмісту білка, жиру та активності інгібітора трипсину показав, що вплив вірусної інфекції має сортоспецифічний характер, проте загальні тенденції простежуються досить чітко (табл. 3.6).

Табл 3.6.

Визначення якості насіння рослин сої

№ з/п	Сорт сої	Вміст білка, %	Вміст жиру, %	Активність інгібітора трипсину, г/кг
1	Аріадна, здорова	44,6±0,05	20,5±0,03	41,3±0,5
2	Аріадна, ВМС+	47,0±0,07*	16,9±0,05*	46,3±0,7*
3	Сяйво, здорова	41,8±0,04	21,6±0,03	53,9±0,5
4	Сяйво, ВМС+	44,9±0,06*	19,5±0,04*	38,4±0,6*
5	Фенікс, здорова	42,4±0,06	20,4±0,04	52,4±0,6
6	Фенікс, ВМС+	46,3±0,08*	17,9±0,08*	43,2±0,3*
7	Аврора, здорова	41,7±0,06	22,7±0,04	27,5±0,1
8	Аврора, ВМС+	41,6±0,05	21,1±0,03*	19,4±0,2*
9	Одеситка, здорова	44,3±0,05	17,4±0,02	15,5±0,1
10	Одеситка, ВМС+	44,0±0,07	17,6±0,03	15,3±0,2
11	Серенада, здорова	45,1±0,08	18,5±0,05	22,2±0,3
12	Серенада, ВМС+	44,0±0,04*	18,2±0,04	16,8±0,1*
13	Таверна, здорова	43,8±0,04	19,2±0,05	22,2±0,1
14	Таверна, ВМС+	43,9±0,05	19,7±0,04	16,8±0,2*
15	Зміна, здорова	44,5±0,07	19,6±0,05	44,5±0,7
16	Зміна, ВМС+	43,6±0,05*	18,1±0,03*	43,65±0,6*
17	Еврідіка, здорова	44,6±0,06	19,3±0,03	44,57±0,5
18	Еврідіка, ВМС+	45,6±0,07*	19,8±0,04	45,56±0,7*
19	Васильківська, здорова	44,2±0,04	22,1±0,06	44,18±0,5
20	Васильківська, ВМС+	46,3±0,06*	21,7±0,05*	46,34±0,6*

Візуально ці зміни відображені на рис. 3.12–3.14, де здорові рослини подано одним кольором, а інфіковані іншим; вертикальні лінії на стовпчиках відповідають статистичному відхиленню.

У більшості досліджених сортів вміст білка в насінні інфікованих рослин підвищувався. Найбільш виражене зростання спостерігалось у сорті Фенікс: з 42,4% до 46,3%. У сорті Аріадна вміст білка зріс з 44,6% до 47,0%, що становить +2,4 п.п. або +5,4%. У сорті Сяйво показник збільшився з 41,8% до 44,9% (+7,4%), у сорті Васильківська — з 44,2% до 46,3% (+4,8%), у сорті Еввідіка — з 44,6% до 45,6% (+2,2%). Водночас у деяких сортів вміст білка або майже не змінювався, або дещо знижувався: у сорті Аврора — з 41,7% до 41,6% (близько $-0,2\%$), у сорті Одеситка — з 44,3% до 44,0% ($-0,7\%$), у сорті Серенада — з 45,1% до 44,0% ($-2,4\%$), у сорті Зміна — з 44,5% до 43,6% ($-2,0\%$). Таким чином, для білка переважає тенденція до підвищення, однак вона не є універсальною для всіх генотипів. Це узгоджується з літературними даними про те, що вірусна інфекція може змінювати азотний обмін і викликати перерозподіл азотистих сполук у рослині (рис. 3.12).

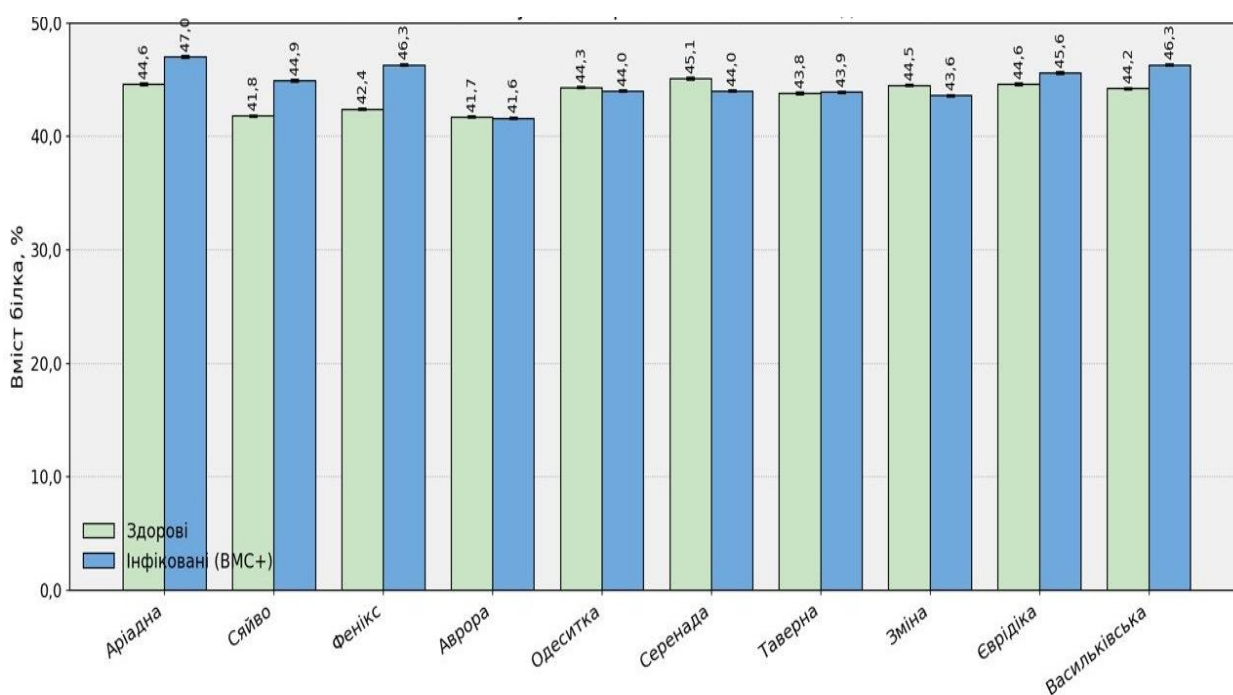


Рис. 3.12. Вміст білка у насінні рослин сої різних сортів залежно від наявності вірусу мозаїки сої (ВМС). Вертикальні лінії відповідають статистичному відхиленню.

Для жиру спостерігається більш однорідна тенденція: у більшості сортів за ураження ВМС його вміст знижувався. Найбільше зменшення виявлено у сорті Аріадна — з 20,5% до 16,9%, тобто на 3,6 п.п. або приблизно на 17,6%. У сорті Фенікс вміст жиру знизився з 20,4% до 17,9% (−12,3%), у сорті Сяйво — з 21,6% до 19,5% (−9,7%), у сорті Зміна — з 19,6% до 18,1% (−7,7%), у сорті Аврора — з 22,7% до 21,1% (−7,0%), у сорті Васильківська — з 22,1% до 21,7% (−1,8%), у сорті Серенада — з 18,5% до 18,2% (−1,6%). Водночас у окремих сортів спостерігалось незначне підвищення показника: у сорті Одеситка — з 17,4% до 17,6% (+1,1%), у сорті Таверна — з 19,2% до 19,7% (+2,6%), у сорті Еввідіка — з 19,3% до 19,8% (+2,6%). У цілому, отримані результати свідчать, що ВМС переважно пригнічує накопичення жиру в насінні, що може бути пов'язано з порушенням ліпідного обміну в інфікованих рослинах. Подібна тенденція описана і в літературі, де відзначається, що вірусні інфекції здатні знижувати синтез та накопичення ліпідів у насінні сої (рис. 3.13).

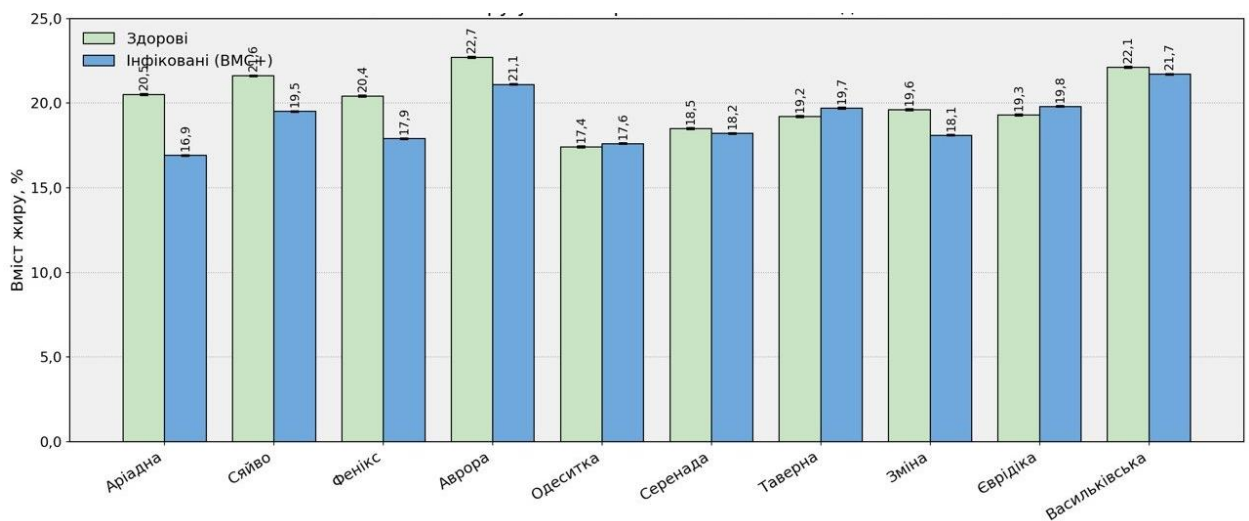


Рис. 3.13. Вміст жиру у насінні рослин сої різних сортів залежно від наявності вірусу мозаїки сої (ВМС). Вертикальні лінії відповідають статистичному відхиленню

Активність інгібітора трипсину змінюється неоднорідно: у частини сортів спостерігається підвищення (Аріадна, $\approx +12\%$), тоді як у інших — суттєве зниження на 17–30% (Сяйво, Фенікс, Аврора) (рис. 3.14.).

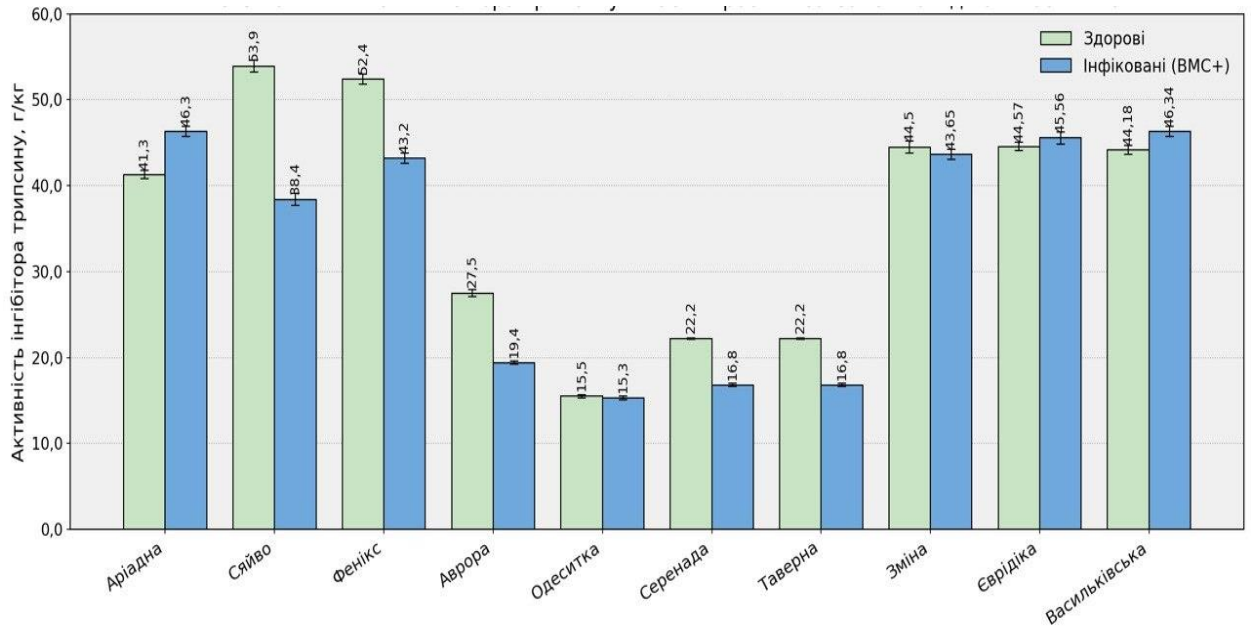


Рис. 3.14. Активність інгібітора трипсину в насінні рослин сої різних сортів залежно від наявності вірусу мозаїки сої (BMC). Вертикальні лінії відповідають статистичному відхиленню

Таким чином, встановлено, що інфікування рослин сої вірусом мозаїки сої призводить до змін основних біохімічних показників насіння. У більшості досліджуваних сортів спостерігається підвищення вмісту білка на 2–9%, зокрема для сортів Аріадна (+5,4%), Сяйво (+7,4%) та Фенікс (+9,2%). Водночас у окремих випадках відмічено незначне зниження (сорт Зміна, близько –2%). Вміст жиру, навпаки, у більшості сортів знижується на 5–18%, найбільш виражено у сортах Аріадна (–17,6%) та Фенікс (–12,3%), тоді як у деяких сортів зміни є незначними (Одеситка). Активність інгібітора трипсину змінюється неоднорідно: у частини сортів спостерігається підвищення (Аріадна, \approx +12%), тоді як у інших — суттєве зниження на 17–30% (Сяйво, Фенікс, Аврора). Отже, вірус мозаїки сої викликає комплексні зміни біохімічного складу насіння, що проявляються у тенденції до підвищення вмісту білка, зниження вмісту жиру та варіабельності активності інгібітора трипсину, що має сортоспецифічний характер. Отримані результати підтверджують, що BMC впливає не лише на врожайність сої, але й на її

біохімічні та технологічні характеристики, що має важливе практичне значення для оцінки якості зерна та селекції стійких сортів.

Отримані результати щодо змін біохімічного складу насіння узгоджуються з даними інших авторів, які показують вплив SMV на вміст білка та жиру (Carr, Loebenstein, 2002; Domier, 2007). Подібні зміни пов'язують із порушенням метаболічних процесів у заражених рослинах.

ВИСНОВКИ

1. Серологічними та молекулярно-біологічними методами проведено діагностику вірусу мозаїки сої (SMV) у рослинах сої, відібраних в Одеській області. Методом ІФА встановлено наявність антигенів вірусу мозаїки сої у 10-ти сортах. Результати ІФА підтверджені методом ЗТ-ПЛР, у ході якого отримано специфічні продукти розміром близько 469 п.н., що відповідає ділянці гена капсидного білка SMV.
2. Нуклеотидні послідовності двох досліджуваних ізолятів SMV Odesytka-24-Ukr і Vasykivska-24-Ukr депоновано до.ncbi GenBank під номерами PV646567 та PV646568, відповідно. Філогенетичний аналіз показав, що вони локалізуються на одній гілці з ізолятами з США, Сербії, Нідерландів, Ірану, України, Китаю та Польщі. Найвищий відсоток ідентичності за нуклеотидною послідовністю ділянки гена капсидного білка досліджувані ізоляти мають з українським ізолятом Padua-24-Ukr та становить 98,2–98,2 %.
3. Встановлено, що ізолят Odesytka-24-Ukr має 7 амінокислотних заміщень у ділянці гена капсидного білка, 5 із яких унікальні та не виявлені у жодному із взятих для дослідження вітчизняних та зарубіжних ізолятів цього вірусу. Ізолят Vasykivska-24-Ukr має 5 амінокислотних заміщень у позиціях 1,2, 3 та 23.
4. Встановлено, що SMV-інфекція рослин супроводжується змінами біохімічних показників насіння, які визначають його якість. Зниження вмісту білка відмічено у сортів Серенада і Зміна на 2,0–2,4%, у решти сортів відмічено його збільшення. Вміст жиру був зменшений у насінні більшості SMV-інфікованих сортів (від 1,6 до 17,6%). Суттєве зниження активності інгібітора трипсину відмічено у сортів Аврора на 29,5%, Сяйво на 28,8%, Серенада та Таверна на 24,3%, а також Фенікс на 17,6%, що свідчить про негативний вплив ВМС-інфекції на якість насіння.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adams M.J. et al. Potyviridae family: classification and nomenclature // Archives of Virology. — 2011.
2. Adams M.J., Antoniw J.F. Classification of potyviruses // Archives of Virology. — 2005.
3. Agrios G.N. Plant Pathology. 5th ed. — Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
4. Bartlett J.M.S., Stirling D. A short history of PCR // Methods in Molecular Biology. 2003.
5. Beema N, Mukkamula N, Mothuku S, Thumu R, Azmeera T, Biman KK. Comparative analysis of physico-chemical properties and fatty acid composition of linseed (*Linum usitatissimum* L.) oils of Indian accessions. J App Biol Biotech. 2023 Jan; 11(1):80-87.DOI: 10.7324/JABB.2023.110112
6. Birk Y. Protein protease inhibitors in legumes // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2003.
7. Bos L. Plant Viruses: Unique and Intriguing Pathogens. — Dordrecht: Springer, 1999.
8. Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time PCR // Journal of Molecular Endocrinology. — 2000.
9. Carr J.P., Loebenstein G. Natural resistance mechanisms of plants to viruses // Advances in Virus Research. — 2002.
10. Cho E.K., Goodman R.M. Strains of Soybean mosaic virus // Phytopathology. — 1979.
11. Clark M.F., Adams A.N. ELISA for plant viruses // Journal of General Virology. — 1977.
12. Crowther J.R. ELISA: Theory and Practice. — Humana Press, 1995.
13. Dieffenbach C.W., Dveksler G.S. PCR Primer. — Cold Spring Harbor, 2003.
14. Dijkstra J., de Jager C.P. Practical Plant Virology. — Springer, 1998.

15. Domier L.L. Potyviruses of legumes // *Advances in Virus Research*. — 2012.
16. Engvall E., Perlmann P. ELISA // *Immunochemistry*. — 1971.
17. Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method // *American Naturalist*. — 1985.
18. Foster G.D., Taylor S.C. *Plant Virology Protocols*. — Humana Press, 1998.
19. Friedman M., Brandon D.L. Nutritional factors in soybeans // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2001.
20. Gibbs A., Ohshima K. Potyviruses evolution // *Annual Review of Phytopathology*. — 2010.
21. Gibson L.R., Mullen R.E. Soybean seed composition // *Crop Science*. — 1996.
22. Hall T.A. BioEdit software // *Nucleic Acids Symposium Series*. — 1999.
23. Hartman G.L. *Compendium of Soybean Diseases*. — APS Press, 1999.
24. Hill J.H. Soybean mosaic virus // *Plant Health Progress*. — 2008.
25. Hull R. *Plant Virology*. — Academic Press, 2014.
26. ICTV. *Virus Taxonomy*. — Elsevier, 2012.
27. Innis M.A. *PCR Protocols*. — Academic Press, 1990.
28. Ivanov K.I. Potyvirus proteins // *Molecular Plant Pathology*. — 2014.
29. Karr-Lilienthal L.K. Soybean composition // *J. Agric. Food Chem.* — 2005.
30. Kemeny D.M. *ELISA methods*. — Wiley, 1989.
31. Kjeldahl J. "Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern" (New method for the determination of nitrogen in organic substances). *Zeitschrift für analytische Chemie*. 1883 Dec; 22(1):366–383.
32. Laskowski M., Kato I. Protein inhibitors // *Annual Review of Biochemistry*. — 1980.
33. Lequin R.M. *ELISA // Clinical Chemistry*. — 2005.
34. Liener I.E. Antinutritional factors // *Critical Reviews in Food Science*. — 1994.
35. Liu K. *Soybeans: Chemistry and Utilization*. — Springer, 1997.

- 36.Liu K. Soybean trypsin inhibitor assay: further improvement of the standard method approved and reapproved by American Oil Chemists Society and American Association of Cereal Chemists International. *J Am Oil Chem Soc.* 2019 March; 96: 635-645.
- 37.Lucas W.J. Plant viral movement // *Annual Review of Plant Physiology.* — 2006.
- 38.Mackay I.M. Real-time PCR // *Nucleic Acids Research.* — 2002.
- 39.Mandahar C.L. *Plant Viruses.* — Springer India, 2006.
- 40.Matthews R.E.F. *Plant Virology.* — Academic Press, 1991.
- 41.Medic J. Soybean composition // *JAOCs.* — 2014.
- 42.Metzker M.L. DNA sequencing // *Nature Reviews Genetics.* — 2010.
- 43.Mullis K. PCR // *Scientific American.* — 1990.
- 44.NCBI Resource Coordinators. Database resources // *Nucleic Acids Research.* — 2018.
- 45.Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution.* — Oxford, 2000.
- 46.Nelson R.S., Citovsky V. Plant virus movement // *Annual Review.* — 2005.
- 47.Nolan T. RT-PCR // *Nature Protocols.* — 2006.
- 48.Palukaitis P. Cucumoviruses // *Advances in Virus Research.* — 2003.
- 49.Revers F., García J.A. Potyvirus molecular biology // *Virus Research.* — 2015.
- 50.Ross J.P. Soybean mosaic virus effect // *Phytopathology.* — 1969.
- 51.Ryan C.A. Protease inhibitors // *Annual Review.* — 1990.
- 52.Saitou N., Nei M. Neighbor-joining method // *Mol. Biol. Evol.* — 1987.
- 53.Sambrook J. *Molecular Cloning.* — Cold Spring Harbor, 2001.
- 54.Scholthof K.B.G. Plant virus transport // *Trends in Plant Science.* — 2005.
- 55.Seo J.K. SMV infection // *Mol. Plant Pathology.* — 2009.
- 56.Sherepitko D.V. SMV variability // *Archives of Virology.* — 2011.
- 57.Shukla D.D. *The Potyviridae.* — CAB International, 1994.
- 58.Tamura K.
- 59.MEGA11 // *Molecular Biology and Evolution.* — 2021.

60. Thompson J.D. CLUSTAL W // *Nucleic Acids Research*. — 1994.
61. Urcuqui-Inchima S. Potyvirus proteins // *Virus Research*. — 2001.
62. Wang Y. SMV-host interaction // *Virus Research*. — 2002.
63. Wen R.H. SMV genome analysis // *Virology*. — 2010.
64. Wilson R.F. Soybean research // 2008.
65. Yang Z. *Molecular evolution*. — Oxford, 2006.
66. Zhang Y. Electron microscopy // *Journal of Virological Methods*. — 2012.
67. Атанасов А.І. Вірусні хвороби рослин. — Київ, 1985.
68. Баби́ч А.О. Соя в Україні. — Київ, 2008.
69. Будзанівська І.Г., Поліщук В.П. Віруси рослин. — Київ, 2009.
70. Гончаренко В.М. Фітовірусологія. — Київ, 2010.
71. Діденко Л.В. Методи дослідження вірусів рослин. — Львів, 2013.
72. Каленська С.М. Технології вирощування сої. — Київ, 2016.
73. Коваленко О.Г. Вірусні хвороби культур. — Харків, 2008.
74. Лапа О.М. Основи агрономії. — Київ, 2011.
75. Мельник С.І. Насінництво сої. — Харків, 2012.
76. Моргун В.В. Генетика рослин. — Київ, 2010. Мусієнко М.М. Фітопатологія. — Київ, 2005.
77. Пересипкін В.Ф. Хвороби рослин. — Київ, 2000.
78. Поліщук В.П. Основи фітовірусології. — Київ, 2012.
79. Поліщук В.П., Будзанівська І.Г. Молекулярна діагностика фітовірусів. — Київ, 2015.
80. Салига Ю.Т., Снітинський В.В. Електронна мікроскопія. — Львів, 1999.
81. Ситник К.М. Біологія рослин. — Київ, 2003.