

**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.

НАСІННЄВА ПЕРЕДАЧА ІЗОЛЯТИВ ВІРУСУ МОЗАЇКИ СОЇ

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання
за спеціальністю біологія
Котікова Всеволода Вадимовича
Науковий керівник від кафедри
к.б.н., асистент Дуніч А.А.

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

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТ – антитіла

ІФА – імуноферментний аналіз

НК – нуклеїнова кислота

СР – coat protein (білок оболонки)

DAS-ELISA – double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
(подвійний сандвіч імуноферментний аналіз)

ORF – open reading frame (відкрита рамка зчитування)

RdRp – RNA-dependent RNA polymerase (РНК залежна РНК полімераза)

SMV – soybean mosaic virus (вірус мозаїки сої)

VPg – viral protein genome-linked (вірусний білок пов'язаний з геномом)

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Насіннева передача вірусу мозаїки сої.....	6
1.1. Загальна характеристика вірусу мозаїки сої	6
1.2. Загальна характеристика насінневої передачі.....	17
1.3. Насіннева передача вірусів сої.....	19
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи.....	22
2.1. Візуальна діагностика.....	22
2.2. Імуноферментний аналіз.....	23
2.3. Виділення тотальної РНК.....	24
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією.....	25
2.5. Електрофорез нуклеїнових кислот.....	26
2.6. Визначення насінневої інфекції.....	27
2.7. Статистичний аналіз.....	28
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	29
3.1. Візуальна діагностика насіння.....	29
3.2. Діагностика SMV у проростках сої методом ІФА.....	31
3.3. Візуальна діагностика рослин, вирощених із SMV-інфікованого насіння.....	35
3.4. Діагностика SMV у рослинах, вирощених із SMV-інфікованого насіння.....	38
ВИСНОВКИ	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

ВСТУП

Соя — однорічна трав'яниста рослина з родини Бобових, що вирощується в багатьох країнах світу. За обсягами виробництва насіння вона займає четверте місце у світі після кукурудзи, пшениці й рису, а за обсягами виробництва олії — перше. Україна за обсягами вирощування сої займає перше місце в Європі і восьме — у світі.

Однією з важливих характеристик сої є її поживність. Як і більшість бобових, вона має високий вміст білку як для рослини. Окрім цього, насіння сої є багатим на жири, у тому числі й поліненасичені. Насіння містить білок (35–52%), олію (17–27%), низку вітамінів, вуглеводів, ферментів, мінеральних речовин тощо (Шовкова та ін., 2014). Також соя відіграє й інші важливі ролі у сільському господарстві. Як й інші бобові, соя має важливу роль у сівозмінах, оскільки вона здатна позитивно впливати на показники ґрунтів завдяки своєму симбіозу з азотфіксуючими бактеріями. Певний вплив вона має на доступність і деяких інших елементів таких, як фосфор, натрій та органічний карбон. Ця рослина є важливою кормовою культурою. Вивчаються можливості використання сої для створення біопалива (Singh, 2010).

Як і будь-який організм, соя піддається негативним впливам із боку шкідників — комах, нематод, бактерій та паразитів — вірусів (Rupe, Luttrell, 2008; Langham et al., 2013). Одним з головних економічно важливих вірусів сої є вірус мозаїки сої. Він здатен значно впливати на фізіологічний стан сої, а отже і змінювати її продуктивність.

Передача вірусу мозаїки сої може здійснюватися кількома шляхами. Найбільш ефективним шляхом є передача векторами-переносниками. Цим способом вірус здатен передаватися на відносно великі відстані до рослин, якими харчується комаха. Іншим способом передачі є насіннева передача. Вона відбувається, коли, рухаючись по організму рослини, вірус досягає її насіння. До

глобалізації, цей спосіб розповсюдження мав менший вплив на поширеність вірусу, але зараз він здатен переміщуватись у насінні на надзвичайні відстані й уражувати рослини, які раніше були недоступні для нього.

Метою цієї роботи є дослідження ефективності насінневої передачі ізолятів вірусу мозаїки сої, що уражували рослини сої на території України у 2023 році.

РОЗДІЛ 1

НАСІННЄВА ПЕРЕДАЧА ВІРУСУ МОЗАЇКИ СОЇ

1.1. Загальна характеристика вірусу мозаїки сої

Вірус мозаїки сої (*Soybean mosaic virus*, SMV) належить до родини *Potyviridae*, роду *Potyvirus* (ICTV). Як і всі представники родини *Potyviridae*, віріони SMV являють собою ниткоподібні вірусні частки завдовжки 720–800 нм і завширшки 12-15 нм, побудовані за спіральним типом симетрії (Viralzone) (рис 1.1.1).

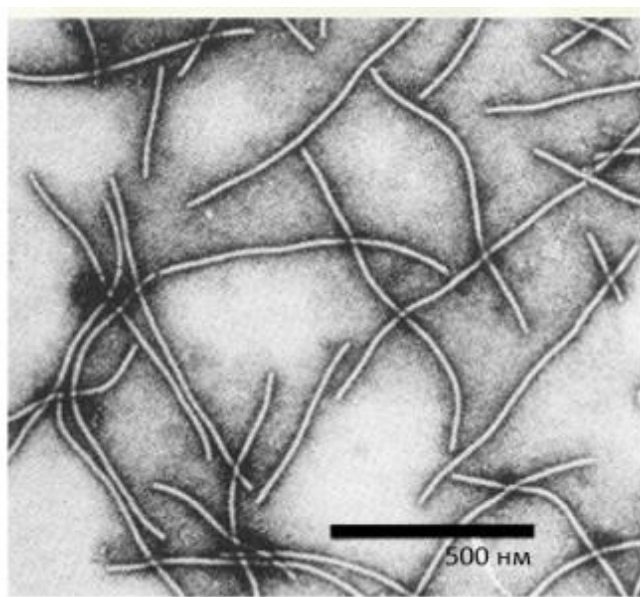


Рис. 1.1.1. Електронна мікрофотографія SMV (Dr J. P. Ross.)

Вірус широко розповсюджений у Північній та Південній Америках, Євразії, Австралії та деяких країнах Африки та наявний в агроценозах усіх регіонів світу, де вирощують сою (*Soybean mosaic virus* (soybean mosaic), 2022).

Генетична інформація цього вірусу представлена несеgmentованою одноланцюговою позитивною РНК. Її довжина складає приблизно 9,6 т.о. На 5'-

кінці наявний білок VPg (viral protein genome-linked), який ковалентно приєднується до вірусної РНК. 3'-кінець закінчується поліА-хвостом. Вона має одну відкриту рамку зчитування, з якої синтезується поліпептиди, який потім розрізається вірусними протеїназами на 10 білків (рис.1.1.2).

Окрім цього, наявна накладна відкрита рамка зчитування (overlapping open reading frame), яка забезпечує синтез поліпептиду, який на далі буде розщеплений з утворенням білка РЗN-PIPO (Viralzone).

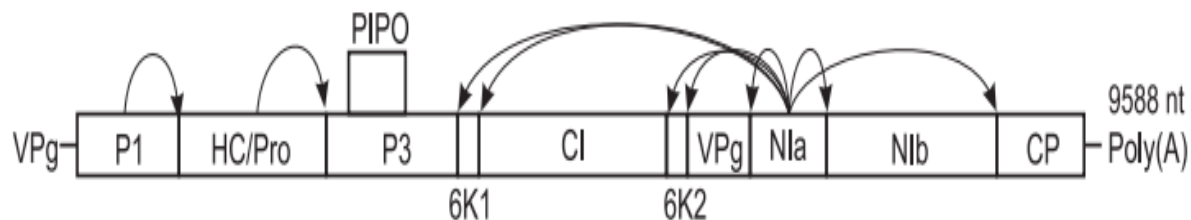


Рис. 1.1.2. Організація геному SMV (Hajimorad et al., 2018)

Як зазначалося вище, на генетичній матриці SMV утворюється 2 поліпротеїна. Один із них надалі розщеплюється на P1 протеїназу, Helper component proteinase (HC-Pro), P3 білок, Cytoplasmic inclusion protein (CI), 6 kDa protein 1 (6K1), 6 kDa protein 2 (6K2), VPg, Nuclear inclusion protein A (NIa), Nuclear inclusion protein B (NIb) та coat protein (CP) (Viralzone).

P1 протеїназа – має протеолітичну активність, що забезпечує власне відщеплення від вірусного поліпротеїну. Також, може позитивно впливати на якість інгібування сайленсінгу протеїном HC-Pro. Можливо, контролює адаптацію вірусу до хазяїна (Salvador et al., 2007). Окрім цього, він може бути відповідальним за прояви симптомів вірусу, оскільки здатен взаємодіяти з білком Ріске, що входить до складу цитохром b6/f комплексу, який є частиною електрон-транспортного ланцюга в хлоропластах (Shi et al., 2007). Порушення активності цього комплексу може призвести до змін синтетичного та енергетичного балансів у клітині господаря.

HC-Pro – має протеолітичну активність, що забезпечує відщеплення його C-кінця від поліпротеїну. Головною функцією є інгібування посттрансляційного сайленсингу, що є механізмом захисту рослин від вірусів. Необхідний для передачі віруса до векторів (Seo et al., 2010). Грає певну роль у міжклітинному транспорті. Є авірулентним фактором для активації екстремальної реакції (extreme resistance, ER) або , що забезпечується білком, який кодується геном *Rsv1* (Liu et al., 2016).

P3 білок – взаємодіє з фактором деполяризації актину 2, тому може впливати рух вірусу всередині клітини (Lu et al., 2014). Разом з P3N-PIPO здатен зв'язуватися з RubisCO і тим самим впливати на фотосинтетичну активність рослини (Lin et al., 2011). Є авірулентним фактором для активації екстремальної реакції, що забезпечується білками, які кодуються генами *Rsv1*, *Rsv3*, *Rsv4* (Liu et al., 2016). Грає важливу роль в процесі утворення вірусних фабрик (Ivanov et al., 2014).

СІ – має хеліказну активність і залучений у процес реплікації. Окрім того, формує циліндричні включення в заражених клітинах, забезпечує внутрішньо- та міжклітинний транспорт (Uniprot, b). Є авірулентним фактором для активації екстремальної реакції, що забезпечується білками, які кодуються генами *Rsv1* та *Rsv3* (Liu et al., 2016).

6K1, 6K2 – беруть участь у формуванні вірусних фабрик, де відбувається реплікація вірусної РНК. Беруть участь у переміщенні вірусних фабрик всередині клітини (Uniprot, b).

VPg – ковалентно приєднаний до вірусної РНК. Захищає її від деградації з 5'-кінця. Бере участь у реплікації та трансляції (Uniprot, b).

NIa – протеїназа, що відщеплює майже всі вірусні білки (окрім P1 та HC-Pro) один від одного (Uniprot, a). Формує включення всередині ядра. Можливо, здатен регулювати експресію генів господаря (Ivanov et al., 2014).

NIb – РНК залежна РНК полімераза. Необхідний для синтезу нової вірусної РНК, що потім буде надалі залучена в процесі трасляції чи реплікації (Uniprot, b). Формує включення всередині ядра. Можливо, може регулювати експресію генів господаря (Ivanov et al., 2014).

CP – білок капсиду, захищає вірусну РНК від негативних впливів зовнішнього середовища, бере участь у міжклітинному транспорті та ураження векторів (Jossey et al., 2013; Seo et al., 2010; Seo et al., 2013).

Другий поліпротеїн розщеплюється на P1, HC-Pro, які були згадані вище, та P3N-PIPO (Viralzone). Цей білок відповідальний за міжклітинний транспорт (Uniprot, a). Він взаємодіє з деякими білками хазяїна і вірусним СІ в ділянці плазмодесм, створюючи умови для руху вірусу між клітинами (Kumar, Dasgupta, 2017).

Цей вірус уражує рослини, що належать до родини бобові (*Fabaceae*). Головним хазяїном цього виду є соя (*Glycine max*). Окрім цього *SMV* може паразитувати у рослинах, що належать до родин *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Passifloraceae*, *Schrophulariaceae* та *Solanaceae* (Widyasari et al., 2020).

Векторами для цього вірусу слугують попелиці (рис.1.1.3). Найбільш поширеними векторами цього вірусу є соєва попелиця (*Aphis glycines*) (Hill et al., 2001). Також, переносити цей вірус здатні арахісова попелиця (*Aphis craccivora*), велика картопляна попелиця (*Macrosiphum euphorbiae*), кукурудзяна попелиця (*Rhopalosiphum maidis*), попелиця черемхова (*Rhopalosiphum padi*) (Halbert et al., 1981), персикова попелиця (*Myzus persicae*), попелиця баштанна (*Aphis gossypii*) (Banziger, Hengsawad, 1985).

Передача відбувається неперсистентно, тобто попелиці залишаються заразними лише деякий час після харчування хворою рослиною та реплікації вірусу в тілі комахи не відбувається. Є данні, що уражені рослини є більш привабливими для попелиці *A.glycines*. Водночас ефективність збільшення популяції попелиць у районі, де поширена соя уражена *SMV*, є нижчою. І

привабливість попелиць до уражених рослин, і повільніший ріст популяції попелиць, можуть бути викликані змінами біохімічних характеристик у тканинах рослини (Peñaflor et al., 2016).

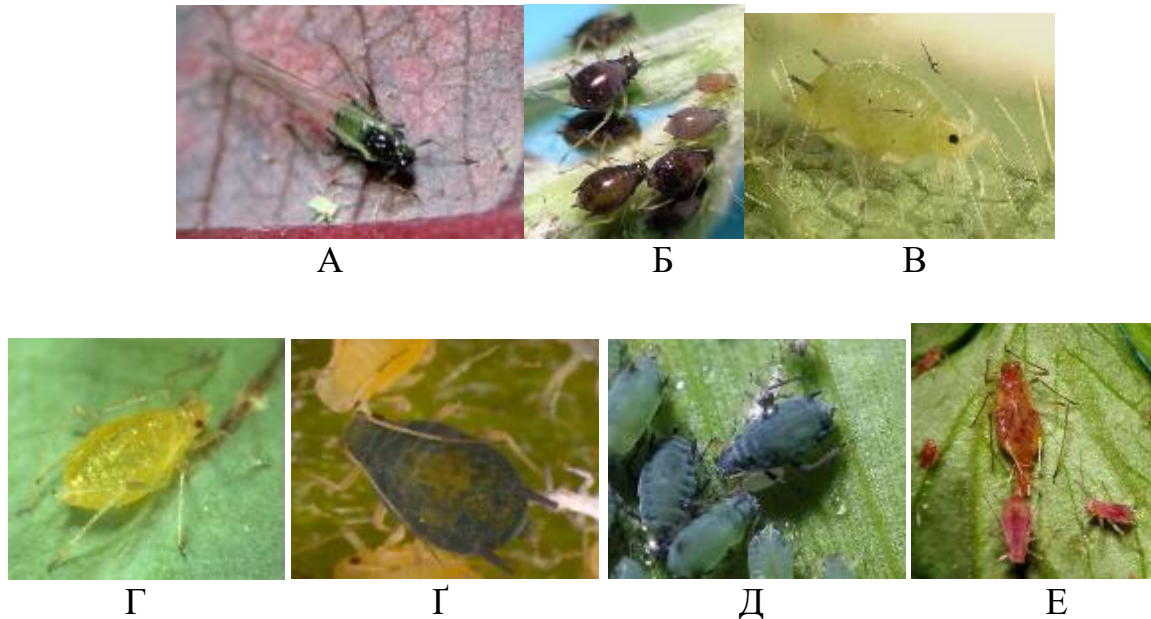


Рис. 1.1.3. Комахи-вектори SMV: А - попелиця черемхова (Andrew Jensen 2011); Б – арахісова попелиця (Andrew Jensen, 2011); В – соєва попелиця (Ho Jung Yoo, Purdue University); Г - персикова попелиця (J. Poorani, 2007); Г - попелиця баштанна (J. Poorani, 2007); Д - кукурудзяна попелиця (Mihajlo Tomić); Е - велика картопляна попелиця (Andrew Jensen, 2011)

Після проникнення вірусу в клітину відбувається звільнення РНК від капсидної оболонки. Далі відбувається процес трансляції, результатом якого є синтез поліпротеїну на основі вірусної РНК, який потім буде нарізаний на окремі білки. Трансляція вірусної РНК відбувається кеп незалежно за участі IRES на 5'-кінці РНК. Вона взаємодіє з факторами трансляції eIF4E, eIF4G, eIF4A та eIF4B. Після синтезу, поліпротеїн не одразу нарізається на окремі білки, а певний час перебуває у вигляді недорозчеплених продуктів. Один із них, а саме СІ-6К2, залучений до початку формування вірусних фабрик на мембранах ЕПР. Окрім

цього, всередину вірусних фабрик залучаються білки P3, Нс-Pro, NIa, Vpg NIb. Вірусні фабрики, сформувавшись на мембранах ЕПР, використовують клітинні механізми для транспорту везикул, щоб дістатися хлоропластів та злитися з ними. На пізніших стадіях інфекції, вірусні фабрики можуть утворювати перинуклеарні структури. Також, вірусні фабрики транспортуються до плазмодесм для забезпечення міжклітинного транспорту вірусу (Ivanov et al., 2014) (рис.1.1.4).

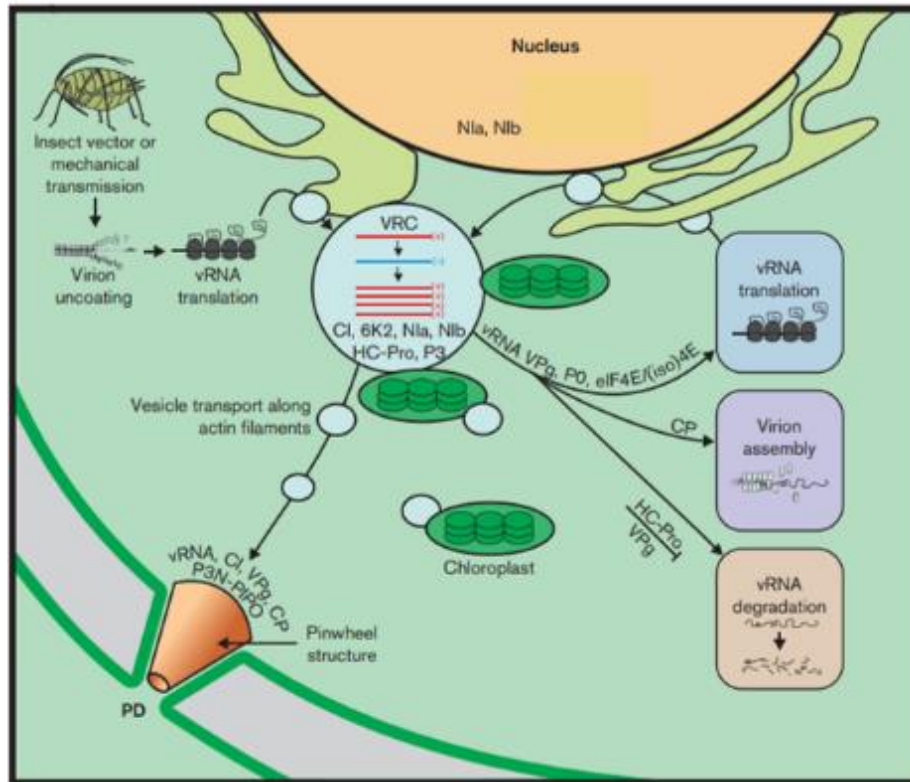


Рис. 1.1.4. Схема життєвого циклу SMV (Ivanov et al., 2014)

Білок P3 утримує NIa, NIb, CI під час формування вірусних фабрик. Білок NIb синтезує нову вірусну РНК. Затравкою для початку синтезу є уридильований за залишком тирозину білок VPg. CI розділяє ланцюги новосинтезованої дРНК один від одного. Окрім цього до процесу реплікації залучені й білки клітини eIF4E, PABP, eEF1A та RH8. Новосинтезована -РНК використовується як матриця для синтезу +РНК, що потім може піти трьома шляхами: стати матрицею для синтезу нових -РНК, стати мРНК, інкапсидуватися в CP (Ivanov et al., 2014).

Після виходу з вірусних фабрик РНК, що була огорнута в капсид, може транспортуватися через плазмодесми. До цього залучені вірусні білки РЗ, РЗN-PIPO, CP та CI. Також до цього процесу можуть бути залучені деякі білки клітини хазяїна (Kumar, Dasgupta, 2017) (рис.1.1.5).

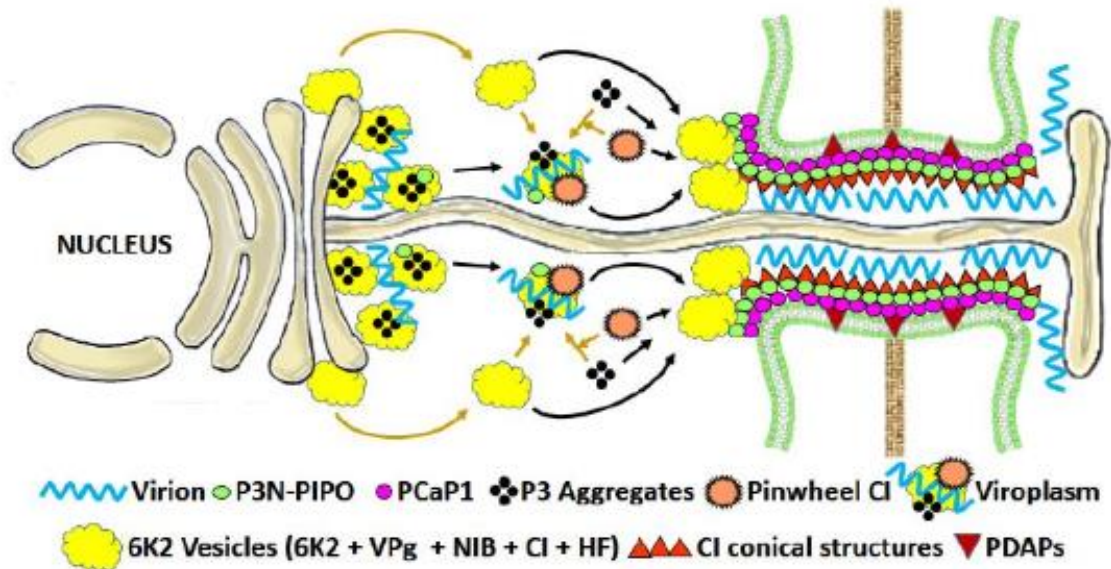


Рис. 1.1.5. Схема міжклітинного руху (Kumar, Dasgupta, 2017)

Іншим шляхом для вірусної часточки є проникнення всередину вектора, коли той харчується на ураженій рослині. У цьому процесі беруть участь вірусні білки CP та HC-Pro (Domier et al., 2007).

Симптоматика, яку викликає SMV у рослин, може варіювати від відсутності будь-яких зовнішніх симптомів до серйозних деформацій листків, крапчастості, мозаїчних проявів і некрозів. Також може з'являтися коричнева пігментація насіння. Мозаїчність, на честь якої було названо цей вірус, проявляється в появі більш та менш яскраво забарвлених ділянок у межах листкової пластинки (Tennant, Fermin, 2015)(рис.1.1.6).

Найбільш серйозно симптоми проявляються на проростках та молодих листках. Окрім усього вище зазначеного, SMV негативно впливає на темпи росту

сої, кількість стручків та кількість насіння у стручках зараженої сої (Mishchenko et al., 2018).



А



Б

Рис. 1.1.6. Симптоми ураженням SMV сої: А – на листках; Б – на насінні (Steve Koenning)

Поява симптомів, як зазначалося вище, може бути пов'язана з негативним впливом вірусних білків на фотосинтетичний апарат (Shi et al., 2007; Lin et al., 2011), що може призводити до появи мозаїк та хлорозів. Інгібування посттрансляційного сайленсингу генів, яке викликається білком HC-Pro, може впливати на морфологію рослини (скручення листків, зменшення пігментації насінневої шкірки), оскільки він залучений не тільки до захисту від патогенів, а й до регуляції експресії генів самої рослини (Lim et al., 2007).

Окрім цього, розвиток симптомів, коли вірус інфікує рослину, спричинюється і самим господарем. Прикладом є утворення некрозів на листках у місцях проникнення вірусу через активацію гіперчутливої реакції (hypersensitive response, HR) (Hajimorad et al., 2005). Під час цієї реакції, індукується запрограмована загибель клітини, що має зупинити поширення вірусу. Було показано, що захисна дія деяких фітогормонів пов'язана з зниженням вегетативних функцій. Так, саліцилова кислота є одним з тих гормонів залучених до захисту від SMV. Однак, цей фітогормон у високій концентрації негативно впливає на активність генів хлоропластів (Nomura et al.,

2012), що пригнічує їхню продуктивність. Окрім цього, висока концентрація саліцилової кислоти негативно впливає на ріст рослин.

Важкість проявів симптомів і поширеність *SMV* в певній місцевості також залежить від кліматичних умов, оскільки вони мають певний на взаємодію вірусу й хазяїна, можуть чинити додатковий тиск на організм рослини і впливати на комах, що є векторами для перенесення даного захворювання (Mishchenko et al., 2018). Так, було показано, що при температурі вищій за 30°C спостерігалось пом'якшення симптомів, яке супроводжувалося зниженням вірусного навантаження (Li et al., 2009). Важливу роль грає і освітлення. За більш інтенсивного освітлення спостерігається зниження накопичення вірусу в рослині (Shang et al., 2023).

Симптоматику, що спричиняє *SMV* на рослинахсї, використовують для класифікації вірусу за штамми. Перша класифікація була створена Cho і Goodman у 1979 р. Вони поділили 98 ізолятів *SMV* за симптомами, які вони спричинили на сортах сої Clark, Rampage, Davis, York, Marshall, Ogden, Kwanggyo, Buffalo (Cho, Goodman, 1979) (табл 1.1).

Таким чином, вони виокремили 7 штамів у порядку зростання від G1, який уражував найменш стійкі сорти сої, до G7, що спричинив появу симптомів навіть у найстійкіших сортів. Однак, ця класифікація розширюється, оскільки через взаємодію вірусу з господарем, нестабільність вірусного генетичного матеріалу та впливу факторів зовнішнього середовища ізоляти *SMV* деяких штамів набувають можливості інфікувати сорти сої, що були стійкими до вихідного штаму *SMV*. Ця класифікація поширена в США та деяких інших країнах. Є японська класифікації штамів *SMV*, де штамми позначаються літерами А-Е, та китайська, де виділяється 22 штамми SC1-SC22, в яких використовують інші сорти сої для поділу на штамми (Gao et al., 2022).

Таблиця 1.1

**Симптоми спричинені різними штамами SMV на різних сортах сої
(Cho, Goodman, 1979)**

Soybean cultivars	Symptoms caused by SMV strains ^b						
	SMV-G7	SMV-G6	SMV-G5	SMV-G4	SMV-G3	SMV-G2	SMV-G1
Clark	-/M ^a	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M
Rampage	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M	-/M
Davis	-/M	-/M	-/M	-/N/M,N	-/-	-/-	-/-
York	-/M	-/M	-/M	-/N/M,N	-/-	-/-	-/-
Marshall	N/N	N/N	-/-	N/N	N/N	N/N	-/-
Ogden	N/N	-/-	-/-	N/N	N/N	-/-	-/-
Kwanggyo	N/N	N/N	N/N	-/-	-/-	-/-	-/-
Buffalo	N/N	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

- - симптомів немає;

N – некрози;

M – мозаїчні симптоми в місці первинного ураження/на неуразених справжніх листках

Упродовж довгого часу співіснування у сої почали з'являтися механізми захисту від SMV. До них відносять HR, ER та РНК сайленсинг. Перші два види захисту забезпечуються продуктами генів стійкості, що є рецепторами для вірусних білків, та сигнальними мережами, які активуються цими рецепторними білками. Найбільш дослідженими генами стійкості розташовані в локусах *Rsv1*, *Rsv3*, *Rsv4* (Widyasari et al., 2020).

Локус *Rsv1* забезпечує стійкість до штамів G1-G6 завдяки активації захисних механізмів після взаємодії з вірусним білком Р3, СІ та Нс-Pro (Liu et al., 2016). Відомо кілька алелей цього локусу. Конкретний ген у межах локусу *Rsv1*, що сприяє захисту сої, невизначений. Однак, є кілька генів 3gG2, 5gG3, та 6gG9, що кодують NBS-LRR рецептори, які можливо здатні взаємодіяти з деякими вірусними білками, і потенційно можуть забезпечувати захист від SMV. Серед них 3gG2 є найбільш вірогідним кандидатом на роль гена стійкості (Hayes et al., 2004). Продукт цього гена взаємодіє з Р3 білком SMV. Білок, який синтезується

іншим геном в цьому локусі, активує захисні реакції при зв'язуванні з Hc-Pro. Після впізнавання захисними білками кодованими в *Rsv1* вірусних білків, відбувається взаємодія з білками, що є частиною шляхів саліцилової та жасмонової кислоти, які активують захисні реакції. У разі ураження сої, що містить домінуючу алель гену у локусі *Rsv1*, вірусом мозаїки сої штаму G7 виникає летальна НРд, що проявляється у вигляді загибелі ураженої рослини (Ross et al., 2021).

У локусі *Rsv3* міститься родина генів, що кодують CC-NBS-LRR білки. Їхніми ефекторами є вірусні білки СІ та РЗ (Liu et al., 2016). У результаті їх взаємодії індукуються деякі гени, які залучені до шляху абсцизової кислоти. У результаті цього відбувається індукція відкладання каллози в районах плазмодесм, підсилення РНК сайленсингу та аутофагії. Це призводить до обмеження руху вірусу від клітини до клітини та його знищення. *Rsv3* забезпечує ефективний захист від штамів G5-G7, та призводить до появи мозаїчних та некротичних симптомів у разі ураженням штамми G1-G4 (Widyasari et al., 2020).

Rsv4 на відміну від *Rsv1* і *Rsv3* не кодує рецепторного білку. Продуктом цього гену є РНКаза-Н, яка здатна розрізати длРНК. Ця РНКаза має здатність взаємодіяти з вірусним білком РЗ завдяки чому проникає у вірусні фабрики, де відбувається реплікація, і знищує длРНК всередині них. Цей ген забезпечує резистентність від штамів G1-G7. Однак, резистентність забезпечена цим геном також залежить від інших генів, які має конкретний сорт сої (Widyasari et al., 2020).

Окрім цих генів стійкості відомі й інші, однак вони є менш дослідженими, ніж описанні вище (Mariola et al, 2022).

1.2. Загальна характеристика насіннєвої передачі

Насіннєва трансмісія є одним зі способів розповсюдження вірусів. У той час, як перенесення через вектори чи механічні ушкодження забезпечують швидке поширення на невеликій площі й утворення якомога більшої кількості вірусних нащадків у короткі терміни, перенесення насінням є ключовим для розповсюдження вірусів на далекі дистанції та створенням умов для захоплення більшої кількості хазяїв.

Для забезпечення насіннєвої передачі вірус має проникнути в насіння. Це може відбутися кількома шляхами або через ураження гамет, або проникненням в ембріон через тканини матері. В обох випадках вірус має обмежений час для проникнення: до утворення гамет у першому випадку й до зникнення суспензора в другому. Ще одним рідкісним варіантом є проникнення вірусу через уражену насіннєву шкірку. Він можливий лише в разі, якщо вірус має високу стійкість до чинників зовнішнього середовища і має здатність передаватися через механічні пошкодження (рис.2.1.1).

Головними чинниками, які впливають на перенесення вірусу насінням, є генетична інформація конкретного сорту рослини і штаму вірусу, продукти яких взаємодіють один з одним. З боку рослини чинниками, що впливають на насіннєву трансмісію, є білки, які беруть участь у боротьбі з вірусами (Liu et al., 2019). З боку вірусу, на можливість трансмісії впливають супресори РНК, білки капсиду та білки руху (Bradamante et al., 2021).

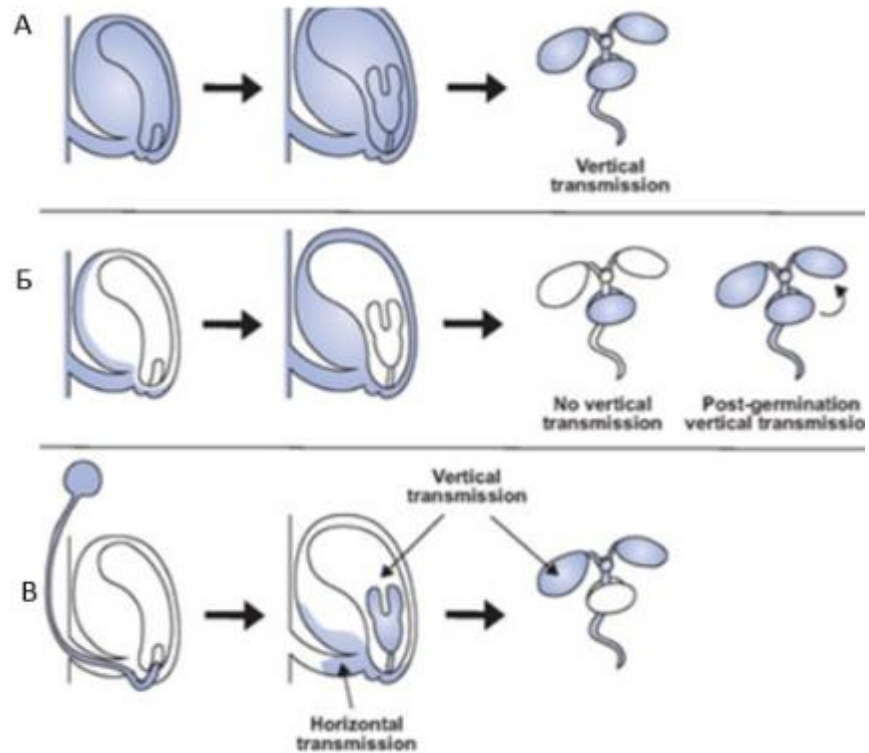


Рис. 1.2.1. Форми передачі вірусів насінням: А – проникнення через материнські тканини; Б – передача через насіннєву оболонку; В – проникнення з пилком (Bradamante et al., 2021)

На насіннєву трансмісію також впливають абіотичні чинники зовнішнього середовища такі як: світло, температура, вологість (Montes et al., 2019; Simmons et al., 2014). Скоріш за все, вплив на насіннєву трансмісію цих чинників виникає через їхній вплив на стан рослин хазяїв. Ці чинники впливають неоднаково на перенесення різних вірусів.

Частіше всього, насіннєва трансмісія супроводжується толерантною реакцією рослин на інфекцію і зменшеною швидкістю відтворення вірусу. Це можна пояснити тим, що за толерантної реакції рослина слабше регулює розповсюдження вірусу в середині себе (Bradamante et al., 2021).

1.3. Насіннева трансмісія вірусу мозаїки сої

Вірус мозаїки сої є одним із найбільш досліджених у плані механізмів насінневої передачі поміж вірусів сої. На те чи відбудеться насіннева трансмісія з боку рослини можуть впливати білки, які синтезуються генами RDR6 та DCL3, які беруть участь у процесі РНК інтерференції (Domier et al., 2011). Також наявні невідомі механізми, що контролюють наявність певних штамів вірусу в насінні під час дозрівання. Білками, які впливають на ймовірність насінневої трансмісії є білки CP, P1, та HC-Pro, що беруть участь у переміщенні вірусу між рослинними клітинами (CP) та інгібуванні РНК сайленсінгу (P1, HC-Pro) (Jossey et al., 2013).

SMV накопичується, як у насінневій шкірці, так і в ембріоні, але інфекція спостерігається нечасто, якщо уражена була лише шкірка насінини, з якої виросла рослина (Bowers et al., 1979). Цей рівень також сильно варіюється в залежності від штаму *SMV* та сорту сої. Найбільший рівень трансмісії має штам G1, а найнижчі – G5 і G7 (Bowers et al., 1991). Окрім цього, на нього впливає температура. Найбільший рівень насінневої передачі, вірус має за температури 20 °C, а при знижені чи підвищенні температури він різко падав (9,7% за 25°C та 7% за 15°C) (Simmons et al., 2014). На рослинах, вирощених з *SMV*-інфікованого насіння, відмічено специфічні симптоми вірусу мозаїки сої у фазі сходів та на перших етапах розвитку рослин: легкої мозаїки листової поверхні, відставання в рості (рис. 1.3.1).



А



Б



В



Г

Рис. 1.3.1 Симптоми SMV на рослинах сої, вирощених із SMV -інфікованого насіння в умовах теплиці: А – сорт Кордоба, 2 репрод., 25 днів після посіву; Б – сорт Кубань, 15 днів після посіву; В – сорт Кано, 47 днів після посіву; Г – контроль (Міщенко та ін., 2018)

SMV-інфіковане насіння стає первинним джерелом інфекції на нових для вірусу територіях. Уражені вірусом рослини можуть формувати інфіковані насіння, покриті чорними або темно коричневими плямами у разі, якщо рослини були заражені до свого цвітіння. Однак трапляється, що насіння може мати пігментацію, але не бути носієм SMV. Іноді, трапляється зворотня ситуація –

інфіковане насіння не має плямистості (Koning et al., 2003). Уражені вірусом насіння втрачають здатність до нормального проростання, стають вразливими до інших інфекцій, наприклад фомопсисису (Koning et al., 2003).

Відомо, що передача SMV насінням залежить від здатності вірусу вижити в зародку впродовж дозрівання насінини. Вважають, що передача насінням вдала, коли вірус має здатність до руху й реплікації в репродуктивних тканинах (Domier et al., 2007). Нещодавні дослідження показали, що передача SMV насінням відбувається через зараження ембріону. Однак, було також встановлено, що SMV присутній у всіх частинах насінини – насіннєвій шкірці, зародковому корінці та сім'ядолях – 23%, 18% і 33% відповідно. Для того, щоб вірус передався насінням, він має заразити ембріон та вижити впродовж розвитку насінини (Bashar, 2015).

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Візуальна діагностика

Для аналізу ефективності насіннєвої передачі SMV було відібрано насіння сої, що мала симптоми ураження SMV. Зразки були зібрані на території Київської, Полтавської, Львівської областей у 2023 році (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Сорти насіння сої, що було досліджено у роботі

Номер зразка	Сорт	Область
1	Аріка	Вінницька
2	Віола	Вінницька
3	Вольта	Вінницька
4	Кано	Полтавська
5	КЕА	Вінницька
6	Кордоба	Вінницька
7	Кордоба 2 репродукція	Полтавська
8	Кофу-1	Полтавська
9	Медок	Вінницька
10	Нептун П 23	Полтавська
11	Ніагара П 35	Полтавська
12	Танаїс	Львівська

2.2. Імуноферментний аналіз

Для аналізу насіння на наявність SMV було проведено DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) з використанням комерційних антитіл Loewe проти CP SMV. Для аналізу використовувалися триденні проростки, що пророщували за температури 24°C, та листки рослин, що були вирощені в теплиці. Негативним зразком слугували раніше протестовані листя сої, що не містили антигени SMV. Позитивними контролями були раніше протестовані листя сої, що містили антигени SMV.

Спочатку, зразки були перетерті товкачиком у ступці з додаванням рідкого азоту. Після випаровування рідкого азоту, було додано фосфатний буфер (в пропорції 1 мг зразку/ 2 мл 0.1 М PBS) і перетирання було продовжено. Далі, отриманий гомогенат був відфільтрований через марлеву тканину. Наступним етапом було центрифугування впродовж 5 хв на 3500 об./хв.

АТ1 були розведені в карбонатному буфері в співвідношенні 1:200 і внесені по 100 мкл в лунки. Їх інкубація відбувалася в термостаті за 37°C впродовж 4-х годин. Далі було проведено відмивку неадсорбованих АТ1 за допомогою буферу відмивки впродовж 15 хв. Було проведено 3 акти відмивки.

Наступним етапом було внесення надосадової рідини після центрифугування зразків, позитивних та негативних контролів (по 50 мкл) з буфером зразку (50 мкл). Інкубація надосадової рідини та контролів відбувалася за 4°C впродовж ночі. Далі, плашку було відмито так само, як і від АТ1.

Після цього було внесено по 100 мкл АТ2, які попередньо були розведені вбуфері зразку, до кожної лунки. Інкубація АТ2 відбувалася в термостаті за 37°C впродовж 4-х годин. Далі, плашку було відмито так само, як і від АТ1. Після цього відбувся додатковий акт промивки 0.1 М PBS впродовж 5 хв.

Наступним етапом було приготування субстратного розчину та його внесення по 100 мкл у лунку. Далі, відбувалася інкубація в термостаті за 37°C впродовж 1,5 год.

Результати DAS-ELISA реєструвалися на довжині хвилі 405 нм спектрофотометром Thermo Labsystems Opsi MR (USA) reader з програмним устаткуванням Dynex Revelation Quicklink. Позитивним вважався результат, що був у 3 рази більшим за негативний контроль (Crowther, 1995).

2.3. Виділення тотальної РНК

Для виділення РНК із досліджуваних зразків був використаний комерційний набір GeneJet PlantRNA Purification K 0801 (Thermo Scientific, США). Спочатку були зроблені наважки рослинного матеріалу по 100 мг, які потім були перетерті в ступці з додаванням рідкого азоту. Далі, наважку перенесли в мікропробірку ємністю 1,5 мл і додали 500 мкл лізуючого буферу. Після ретельного перемішування на вортексі впродовж 15 секунд, мікропробірку з наважкою та лізуючим буфером перенесли на водяну баню температурою 56°C на 3 хв.

Наступним кроком було проведено низькошвидкісне центрифугування (14 тис. об./хв). 500 мкл отриманого в результаті центрифугування супернатанту було відібрано в чисту мікропробірку. До супернатанту було додано 250 мкл етанолу (96%), отримана суміш була ретельно перемішана й перенесена у collection tube з колонкою для очищення.

Розчин у collection tube було піддано процесу низькошвидкісного центрифугування (11 тис. об./хв). Колонку було вийнято, розчин з collection tube злито, після чого колонка була повернена назад. До колонки було додано 700 мкл Wash Buffer 1 і проведено низькошвидкісне центрифугування (11 тис. об./хв).

Далі колонку було перенесено в чисту collection tube об'ємом 2 мл. До колонки було додано 500 мкл Wash Buffer 2 і проведено низькошвидкісне центрифугування при 11 тис. об./хв. Розчин з collection tube було вилито. Повторно було проведено додавання Wash Buffer 2 і низькошвидкісне центрифугування.

Наступним кроком було перенесення колонки в чисту мікропробірку об'ємом 1,5 мл і додавання 50 мкл стерильної води. Після цього було проведено низькошвидкісне центрифугування (11 тис. об./хв). Колонка була вийнята з мікропробірки, в якій була очищена РНК.

2.4. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

Для отримання клонованої ДНК (кДНК) було використано набір RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, США, EP0441). Спочатку до мікропробірки об'ємом 500 мкл було додано 8,5 мкл стерильної води, 3 мкл очищеної РНК і по 1 мкл праймеру 1 та праймеру 2 (μM). Праймер 1 – SMV-CPf: (5'-CAAGCAGCAAAGATGTAAATG-3'), праймер 2 – SMVCPr: (5'-GTCCATATCTAGGCATATACG-3') (Sherepitko et al., 2011). Далі цю суміш було інкубовано в термоциклері за 65°C впродовж 5 хв. Після цього мікропробірку було перенесено на лід та додано до неї 4 мкл 5 кратного RT-буфера, 2 мкл dNTP та 1 мкл зворотної транскриптази. Останнім етапом було інкубування в термоциклері при 42°C впродовж години.

Для ампліфікації необхідного фрагменту ДНК було використано набір DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США). Спочатку до мікропробірки об'ємом 500 мкл було додано 12,5 мкл 2 кратного буфера Dream Taq Green PCR Master Mix, 7,5 мкл води стерильної, 3 мкл кДНК та по 1 мкл праймеру 1 та праймеру 2 (10 μM). Праймер 1 (5'-

CAAGCAGCAAAGATGTAAATG-3'), праймер 2 (5'-GTCCATATCTAGGCATATACG-3'). Далі мікропробірку було поміщено в термоциклер із режимом ампліфікації:

95°C – 3 хв

95°C – 30 с (30 циклів)

55°C – 30 с (30 циклів)

72°C – 1 хв (30 циклів)

72°C – 10 хв

Наявність продуктів ампліфікації перевіряли за допомогою горизонтального електрофорузу в агарозному гелі.

2.5 Електрофорез нуклеїнових кислот

Для проведення електрофорузу нуклеїнових кислот було виготовлено 1,5% агарозний гель із лунками. Для цього до 20 мл 0,089М TBE-буферу було додано 300 мг агарози, після чого суміш була розігріта в мікрохвильовій пічці впродовж 1-2 хв для розплавлення агарози. Далі суміш було охолоджено й до неї було додано 15 мкл розчину бромистого етидію (0,5 мг/мл). Після цього суміш була залита у форму, попередньо помістивши в неї гребінкку на відстані 0,5-1 мм від дна лунки. У лунках мікропланшету було змішано 5 мкл досліджуваної НК та 2 мкл буфера зразка (DNA Gel Loading Dye (6X), R0611, Thermo Fisher Scientific).

Гель, що застиг, було вийнято з форми та перенесено в камеру для електрофорузу. Далі до камери було налито TBE-буфер так, щоби буфер покривав гель шаром в 1 см. Після цього в лунки гелю було внесено зразки НК. Електрофорез був проведений у режимі 15В/см впродовж 20 хв. Результати були зафіксовані за опромінення гелю ультрафіолетом.

2.6. Визначення насінневої інфекції

Рівень насінневої передачі SMV був визначений за допомогою тестування пророщених насіння сої та листків двотижневих рослин сої (Міщенко та ін., 2018).

Спочатку насіння сої пророщували 3 дні. Після цього ці проростки тестували на наявність вірусу мозаїки сої. Далі це насіння було висіяне в ґрунт у лабораторних умовах. Упродовж вегетаційного періоду проводилися спостереження за кількістю та симптомами на вирощуваних рослинах. Наступним кроком було тестування методом ІФА листків двотижневих рослин, вирощених з інфікованого насіння.

Розрахунок відсотку насінневої передачі відбувався за формулою:

$$ST=(n*100)/N, \quad (2.1)$$

де ST – відсоток насінневої передачі вірусу, %;

n – рослини, що уражені вірусом і були вирощені з вірусінфікованого насіння, шт;

N – загальна кількість рослин вирощених із вірусінфікованого насіння, шт;

2.7. Статистичний аналіз

Під час дослідження методом ІФА було проведено 1 біологічний повтор та по 3 технічні повтори. Отримані данні аналізували за параметричними критеріями нормального розподілу та стандартного відхилення:

$$\mathbf{X} = \bar{X} \pm \sigma \quad (2.2)$$

$$\bar{X} = (X_1 + X_2 + \dots + X_i) / i \quad (2.3)$$

де \mathbf{X} – достовірне значення вимірюваної величини;

\bar{X} – середнє арифметичне виміряних значень;

$X_1 \dots X_i$ – вимірянні значення;

σ – стандартне відхилення.

Аналіз проводився з використанням комп'ютерного програми MS EXCEL.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Візуальна діагностика насіння

Одним із відомих симптомів SMV (Tennant, Fermin, 2015). Частина з піддослідного насіння мало коричневу плямистість на поверхні шкірки (рис.3.1).



Рис. 3.1. Насіння різних сортів сої: 1 – сорт КЕА, Вінницька обл.; 2 – сорт Медок, Вінницька обл.; 3 – сорт Танаїс, Львівська обл.; 4 – сорт Ніагара П35, Полтавська обл.; 5 – сорт Кано, Полтавська обл.; 6 – сорт Віола, Вінницька обл.

Плямистість насінневої шкірки може бути сортовою ознакою чи проявом ураження іншими патогенами або холодовим стресом (Morrison et al., 1998).

3.2. Діагностика SMV у проростках сої методом ІФА

Тестування наявності SMV у проростках було здійснене методом ІФА. Результати аналізу показали, що антигени SMV виявлені у 3-добових проростках сортів Нептун П23, Ніагара П 35, Кано з Полтавської області, а також у сортах Вольта й КЕА з Вінницької області та в проростках сорту Танаїс, Львівська область (рис. 3.2).

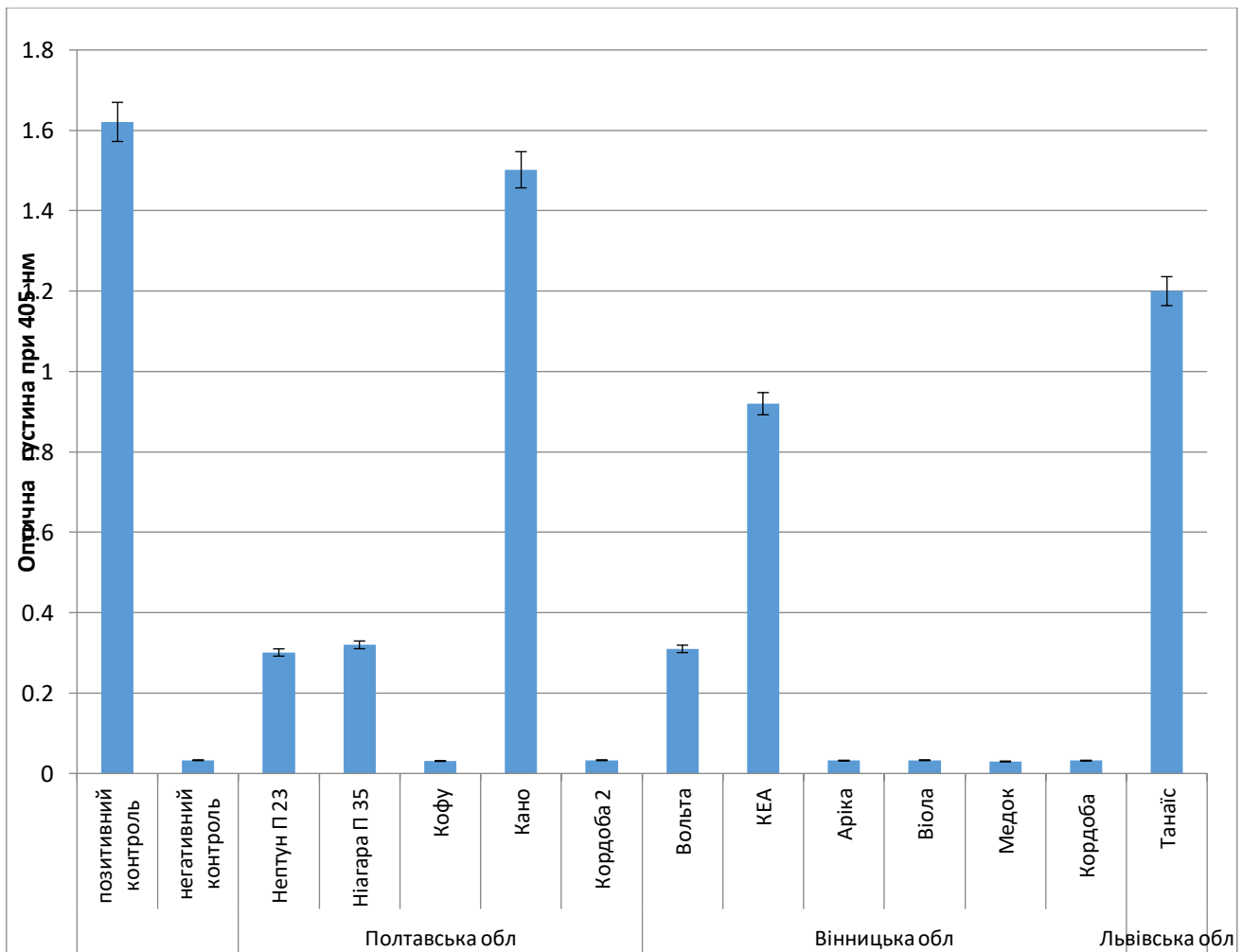


Рис. 3.2. Вміст антигенів SMV у 3-добових проростках сої

Отже, не зважаючи на плямистість насіння, яке одною з характерних ознак ураження SMV, в деяких з досліджуваних сортів не виявлено. Зворотня ситуація

спостерігається з сортом Нептун – плямистість відсутня, а вірус наявний (табл.3.2, рис.3.3, 3.4).

Таблиця 3.2

Результати візуальної діагностики і тестування 3-добових проростків насіння сої на SMV

п\п	Сорт	Наявність SMV в насінні	Наявність плямистості насіннєвої шкірки
1	Нептун П 23	+	-
2	Ніагара П 35	+	+
3	Кофу-1	-	+
4	Кордоба	-	-
5	Медок	-	+
6	Віола	-	+
7	Аріка	-	-
8	Кано	+	+
9	Танаїс	+	+
10	КЕА	+	+
11	Вольта	+	+
12	Кордоба 2 репродукція	-	-

+ – SMV/плямистість наявний/а

- – SMV/плямистість відсутній/я

Аналогічні дані було отримано в США, де було показано, що лише 3% або й менше плямистого насіння було уражено SMV (Domier et al., 2007).

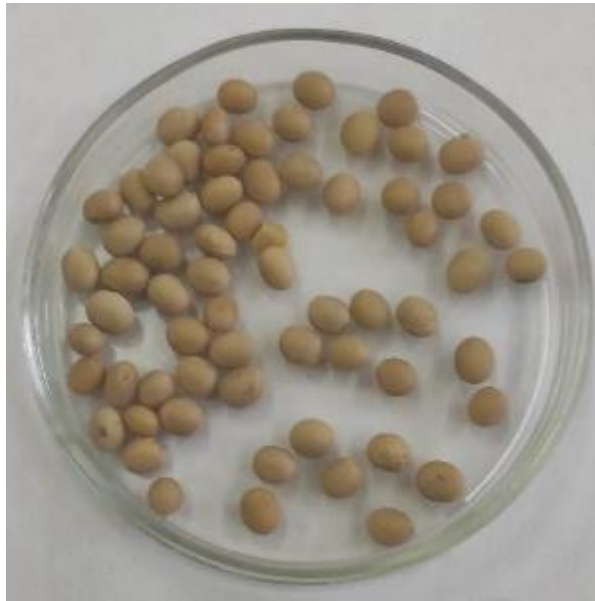


Рис. 3.3. Насіння сорту Нептун П23



Рис. 3.4. Пророщене насіння (3 доби) сої сорту Нептун П23

Для інших штамів SMV було показано значно вищий відсоток насіння з симптомами плямистості – від 15 до 95%, що свідчить про те, що здатність SMV до індукції симптомів плямистості на насінні залежить від штаму/ ізоляту вірусу (Domier et al., 2007).

У насінні сорту Кофу антигенів ВМС невиявлено, хоча плямистість була присутня на насінні (рис. 3.5, 3.6).



Рис. 3.5. Насіння сорту Кофу



Рис. 3.6. Пророщене насіння Кофу (3 доби)

Отримані нами дані можуть свідчити, що плямистість деяких сортів досліджуваного насіння має не вірусну етіологію. Воно може бути наслідком ураження іншими патогенами, холодовим стресом або сортовою ознакою.

3.3 Візуальна діагностика рослин, вирощених із SMV-інфікованого насіння

Далі пророщене насіння для 6-ти сортів, у чиїх проростках було детектовано SMV, було висаджено в ґрунт у лабораторній теплиці та проведені спостереження за ростом і розвитком рослин та появою симптомів SMV (рис. 3.7).



Рис. 3.7. Загальний вигляд вирощування рослин сої в лабораторній теплиці

У результаті вирощування рослин симптоми, характерні для SMV виявлено на рослинах сої сорту Кано та КЕА (рис. 3.8, 3.9).



1



2



3

Рис. 3.8. Симптоми SMV на рослинах сої сорту КЕА, вирощених із SMV - інфікованого насіння в умовах теплиці: 1 – рослина; 2 – окремі листки з симптомами; 3 – контроль (рослини сорту Кофу)

Симптоми проявлялися у вигляді пухирчатості, деформації та темно-зеленого здуття між листковими жилками, що є характерними для рослин ураженим SMV (Tennant, Fermin, 2015).



Рис. 3.9. Симптоми SMV на рослинах сої сорту Кано, вирощених із SMV - інфікованого насіння в умовах теплиці

На рослинах решти сортів, а саме Нептун П23, Ніагара П 35, Вольта й Танаїс симптомів SMV-інфекції виявлено не було (рис. 3.10).



Рис. 3.10. візуально здорові рослини сорту: 1 — Віола; 2 – Нептун П23

Встановити присутність вірусу в рослині виключно візуальними методами не є надійним рішенням. Для перевірки наявності SMV у вирощених рослинах і

встановлення типу передачі вірусу насінням, необхідне додаткове діагностування серологічним та молекулярним методами.

3.4. Діагностика SMV у рослинах, вирощених із SMV-інфікованого насіння

Наявність SMV у рослинах проводили методом ІФА та ПЛР. За результатами ІФА антигени SMV виявлені й рослинах сортів КЕА та Кано (рис. 3.11).

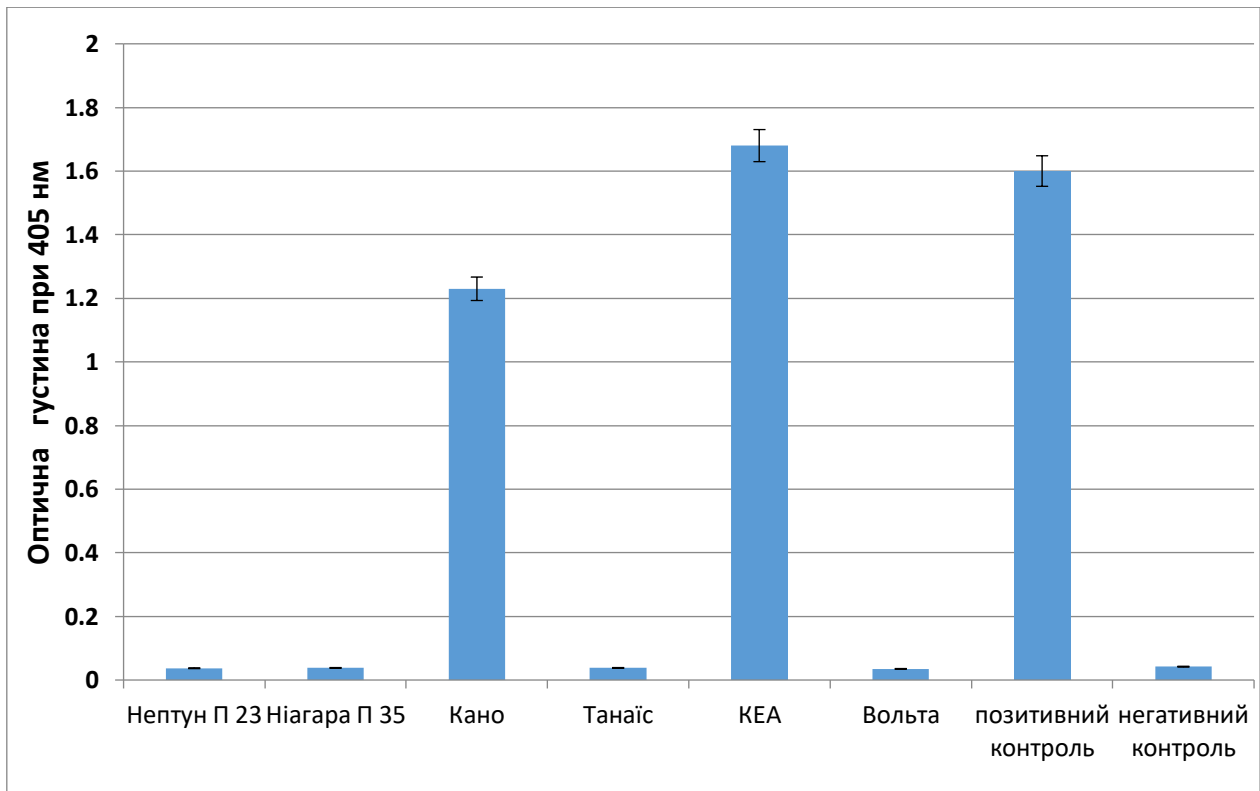


Рис. 3.11. Вміст антигенів SMV у рослинах сої, вирощених із SMV - інфікованого насіння

Результати ІФА були підтверджені методом ЗТ-ПЛР, за результатами якого продукти ампліфікації розміром приблизно 469 п.н., що відповідають ділянці гена капсидного білка SMV, виявлено в зразках сортів Кано та КЕА (рис. 3.12).

Зважаючи на отримані результати, було встановлено, що в польових умовах мали змогу передатися насінням ізоляти SMV, що уражували 6 сортів сої. При цьому, передатися від насіння до наступного покоління рослин змогли лише 2 з них (табл.3.2).

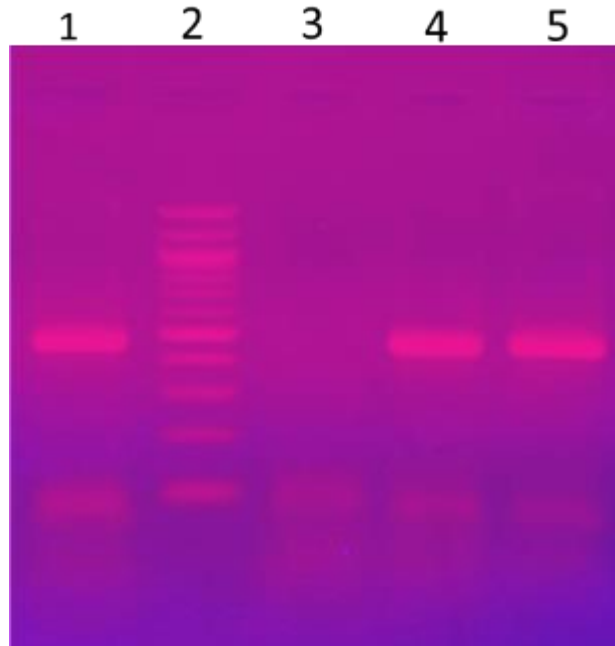


Рис. 3.12. Електрофореграма продуктів ДНК із застосуванням праймерів до ділянки гена капсидного білка (очікуваний продукт 469 п.н.): 1 – позитивний контроль; 2 - маркер ДНК MassRuler DNA Ladder Mix ready-to-use (Thermo Scientific, США); 3– негативний контроль; 4 – Кано; 5 – КЕА

З 71 рослини сорту Кано вирощених з інфікованого насіння, 2 з них були уражені SMV. 1 рослина з 52 вирощених рослин сорту КЕА були ураженні SMV. Відсоток передачі вірусу від батьківської рослини до нащадків через насіння становили 2,8% для сорту Кано та 1,9% для сорту КЕА. Рівень трансмісії коливається в межах від 0% до 43% (Domier et al., 2007), але іноді буває і вищим. Дані щодо суттєво різного ступеню насінневої передачі ізолятів SMV показано і у інших країнах: 0-2,78% – у Польщі (Jezewska et al., 2015), 0-64% – у Бразилії (Porto et al., 1975).

Таблиця 3.2

Відсоток та тип насіннєвої передачі ізолятів SMV

п\п	Сорт	Тип передачі	% передачі від насіння до рослини
1	Нептун П 23	Seed-borne	0
2	Ніагара П 35	Seed-borne	0
8	Кано	Seed-transmitted	2,8
9	Танаїс	Seed-borne	0
10	КЕА	Seed-transmitted	1,9
11	Вольта	Seed-borne	0

Отож, досліджено здатність ізолятів SMV до насіннєвої передачі. Проведено візуальну діагностику насіння і тестування методом ІФА на наявність ВМС у тридобових проростках сої різних сортів. Встановлено, що плямистість насіння не завжди є наслідком ураження ВМС. Встановлено, що серед 12 ізолятів, 6 з них не передаються насінням, 4 мають SMV у насінні, але не передаються до вирощеної рослини і 2 ізоляти мають здатність передаватися наступному поколінню рослин.

ВИСНОВКИ

1. Методом ІФА на наявність SMV у тридобових проростках сої різних сортів, встановлено, що шість ізолятів вірусу мозаїки сої із сортів Кофу, Кордоба (Полтавська область) та сортів Медок, Віола, Аріка та Кордоба з Вінницької, не передаються насінням, про що свідчила відсутність антигенів SMV у проростках.
2. Серед досліджуваних ізолятів 4 ізоляти SMV із сортів Нептун П23, Ніагара П 35, а також Танаїс та Вольга (із Полтавської, Львівської та Вінницької областей, відповідно) були присутні в насінні, але не мають здатності до переміщення від насінини до рослини, відсоток насінневої передачі для них становить 0%.
3. Методами ІФА та ЗТ-ПЛР визначено, що два ізоляти SMV, які були присутні в сортах Кано (Полтавська область) та КЕА (Вінницька область), передаються від насіння до рослини. Відсоток насінневої передачі для них становить 2,8% та 1,9%, відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Міщенко, Л. Т., Дуніч, А. А., Кандаурова, К. Ф. та Кондратюк, О. А. (2018). Насіннєва передача вірусів рослин: основи, принципи та методика її визначення. *Карантин і захист рослин*, (1-2), сс. 9-14.
2. Шовкова, О. В. (2014). Стан виробництва сої в Україні та в Полтавській області. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*, (4), сс. 106-110. doi:<https://doi.org/10.31210/visnyk2014.04.19>.
3. Banziger, H. and Hengsawad, V. (1985). Species spectrum, abundance, and potential importance of aphids caught by yellow pan traps in experimental soybean plots in northern Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*, 18(2), pp. 123-135.
4. Bashar, T. (2015). Characterization of Seed Transmission of Soybean Mosaic Virus in Soybean. Electronic Thesis and Dissertation Repository. [online] Available at: <https://ir.lib.uwo.ca/etd/2791/> [Accessed 11 Mar. 2024].
5. Bowers, G.R. and Goodman, R.H. (1991). Strain Specificity of Soybean Mosaic Virus Seed Transmission in Soybean. *Crop Science*, 31(5), pp.1171–1174. doi:<https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183x003100050019x>.
6. Bowers, Jr., G.R. and Goodman, R.M. (1979). Soybean Mosaic Virus: Infection of Soybean Seed Parts and Seed Transmission. *Phytopathology*, 69(6), p.569. doi:<https://doi.org/10.1094/phyto-69-569>.
7. Bradamante, G., Mittelsten Scheid, O. and Incarbone, M. (2021). Under siege: virus control in plant meristems and progeny. *The Plant Cell*, 33(8), pp.2523–2537. doi:<https://doi.org/10.1093/plcell/koab140>.
8. Cho EK, Goodman RM. (1979) Strains of soybean mosaic virus: classification based on virulence in resistant soybean cultivars. *Phytopathology*, 69 (5), p.467. doi:<https://doi.org/10.1094/phyto-69-467>.

9. Crowther, J.R. (1995). ELISA. Theory and practice. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 42, pp.1–218. doi:<https://doi.org/10.1385/0-89603-279-5:1>.
10. Domier, L. L., Steinlage, T. A., Hobbs, H. A., Wang, Y., Herrera-Rodriguez, G., Haudenschild, J. S., McCoppin, N. K., & Hartman, G. L. (2007). Similarities in Seed and Aphid Transmission Among Soybean mosaic virus Isolates. *Plant disease*, 91(5), pp. 546–550. doi:<https://doi.org/10.1094/pdis-91-5-0546>.
11. Domier, L.L., Hobbs, H.A., McCoppin, N.K., Bowen, C.A., Steinlage, T.A., Chang, S., Wang, Y. and Hartman, G.L. (2011). Multiple Loci Condition Seed Transmission of Soybean mosaic virus (SMV) and SMV-Induced Seed Coat Mottling in Soybean. *Phytopathology*, 101(6), pp.750–756. doi:<https://doi.org/10.1094/phyto-09-10-0239>.
12. Gao, L., Wu, Y., An, J., Huang, W., Liu, X., Xue, Y., Xin L, Lin, F. and Sun, L. (2022). Pathogenicity and genome-wide sequence analysis reveals relationships between soybean mosaic virus strains. *Archives of Virology*, 167(2), pp.517–529. doi:<https://doi.org/10.1007/s00705-021-05271-z>.
13. Hajimorad, M. R., Eggenberger, A. L. and Hill, J. H. (2005). Loss and gain of elicitor function of Soybean mosaic virus G7 provoking Rsv1-mediated lethal systemic hypersensitive response maps to P3. *Journal of virology*, 79(2), pp. 1215-1222. doi:<https://doi.org/10.1128/jvi.79.2.1215-1222.2005>.
14. Hajimorad, M.R., Domier, L.L., Tolin, S.A., Whitham, S.A. and Saghai Maroof, M.A. (2018). Soybean mosaic virus: a successful potyvirus with a wide distribution but restricted natural host range. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), pp.1563–1579. doi:<https://doi.org/10.1111/mpp.12644>.
15. Halbert, S.E., Irwin, M.E. and Goodman, R.M. (1981). Alate aphid (Homoptera: Aphididae) species and their relative importance as field vectors of soybean mosaic virus. *Annals of Applied Biology*, 97, pp. 1-9. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1981.tb02988.x>.

16. Hayes, A.J., Jeong, S.C., Gore, M.A., Yu, Y.G., Buss, G.R., Tolin, S.A. and Maroof, M.A.S. (2004). Recombination Within a Nucleotide-Binding-Site/Leucine-Rich-Repeat Gene Cluster Produces New Variants Conditioning Resistance to Soybean Mosaic Virus in Soybeans. *Genetics*, 166(1), pp.493–503. doi:<https://doi.org/10.1534/genetics.166.1.493>.
17. Hill, J.H., Alleman, R., Hogg, D.B. and Grau, C.R. (2001). First Report of Transmission of Soybean mosaic virus and Alfalfa mosaic virus by *Aphis glycines* in the New World. *Plant Disease*, 85(5), pp.561–561. doi:<https://doi.org/10.1094/pdis.2001.85.5.561c>.
18. ICTV. (n.d.). Genus: Potyvirus | ICTV. [online] Available at: <https://ictv.global/report/chapter/potyviridae/potyviridae/potyvirus> [Accessed 12 Mar. 2024].
19. Ivanov, K.I., Eskelin, K., Lohmus, A. and Makinen, K. (2014). Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *Journal of General Virology*, 95(Pt_7), pp.1415–1429. doi:<https://doi.org/10.1099/vir.0.064220-0>.
20. Jezewska, M., Trzmiel, K., Zarzynska-Nowak, A. and Lewandowska, M. (2015). Identification of Soybean mosaic virus in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 97(2), pp. 357-362. doi:<https://doi.org/10.4454/jpp.v97i2.006>.
21. Jossey, S., Hobbs, H.A. and Domier, L.L. (2013). Role of Soybean mosaic virus–Encoded Proteins in Seed and Aphid Transmission in Soybean. *Phytopathology*, 103(9), pp.941–948. doi:<https://doi.org/10.1094/phyto-09-12-0248-r>.
22. Koning, G., TeKrony, D.M. and Ghabrial, S.A. (2003). Soybean Seedcoat Mottling: Association with Soybean mosaic virus and *Phomopsis* spp. Seed Infection. *Plant disease*, 87(4), pp.413–417. doi:<https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.4.413>.
23. Kumar, G. and Dasgupta, I. (2021). Variability, Functions and Interactions of Plant Virus Movement Proteins: What Do We Know So Far? *Microorganisms*, 9(4), p.695. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040695>.

24. Langham M.A.C., and Strunk, C.L. (2013). *Viral diseases in soybeans*. In Clay, D.E., C.G. Carlson, S.A. Clay, L. Wagner, D. Deneke, and C. Hay (eds). *iGrow Soybeans: Best Management Practices for Soybean Production*. South Dakota State University, SDSU Extension, Brookings, SD.
25. Li, D., Chen, P., Shi, A., E. Shakiba, R. Gergerich and Chen, Y. (2009). Temperature Affects Expression of Symptoms Induced by Soybean Mosaic Virus in Homozygous and Heterozygous Plants. *Journal of Heredity*, 100(3), pp.348–354. doi:<https://doi.org/10.1093/jhered/esn109>.
26. Lim, H.-S., Tae Kuk Ko, Hobbs, H.A., Lambert, K.N., Yu, J., McCoppin, N.K., Korban, S.S., Hartman, G.L. and Domier, L.L. (2007). Soybean mosaic virus Helper Component-Protease Alters Leaf Morphology and Reduces Seed Production in Transgenic Soybean Plants. *Phytopathology*, 97(3), pp.366–372. doi:<https://doi.org/10.1094/phyto-97-3-0366>.
27. Lin, L., Luo, Z., Yan, F., Lu, Y., Zheng, H. and Chen, J. (2011). Interaction between potyvirus P3 and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) of host plants. *Virus genes*, 43(1), pp.90–92. doi:<https://doi.org/10.1007/s11262-011-0596-6>.
28. Liu, J. Z., Fang, Y. and Pang, H. (2016). Liu, J.-Z., Fang, Y. and Pang, H. (2016). The Current Status of the Soybean-Soybean Mosaic Virus (SMV) Pathosystem. *Frontiers in Microbiology*, 7, pp. 1906. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01906>.
29. Liu, Q., Hobbs, H.A. and Domier, L.L. (2019). Genome-wide association study of the seed transmission rate of soybean mosaic virus and associated traits using two diverse population panels. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(12), pp.3413–3424. doi:<https://doi.org/10.1007/s00122-019-03434-w>.
30. Lu, L., Wu, G., Xu, X., Luan, H., Zhi, H., Cui, J., Cui, X. and Chen, X. (2014). Soybean actin-depolymerizing factor 2 interacts with Soybean mosaic virus-

- encoded P3 protein. *Virus Genes*, 50(2), pp.333–339. doi:<https://doi.org/10.1007/s11262-014-1150-0>.
31. M. Porto, M.D. and Hagedorn, D. J. (1975). Seed Transmission of a Brazilian Isolate of Soybean Mosaic Virus. *Phytopathology*, 65(6), p.713-716. doi:<https://doi.org/10.1094/phyto-65-713>.
 32. Mariola Usovsky, Chen, P., Li, D., Wang, A., Shi, A., Zheng, C., Ehsan Shakiba, Lee, D., Caio Canella Vieira, Yi Chen Lee, Wu, C., Cervantez, I. and Dong, D. (2022). Decades of Genetic Research on Soybean mosaic virus Resistance in Soybean. *Viruses*, 14(6), pp.1122–1122. doi:<https://doi.org/10.3390/v14061122>.
 33. Mishchenko, L., Dunich, A., Mishchenko, I. and Molodchenkova, O. (2018). Molecular and biological properties of Soybean mosaic virus and its influence on the yield and quality of soybean under climate change conditions. *Poljoprivreda i Sumarstvo*, 64(4), pp. 39. doi:<https://doi.org/10.17707/AgricultForest.64.4.05>
 34. Montes, N. and Pagán, I. (2019). Light Intensity Modulates the Efficiency of Virus Seed Transmission through Modifications of Plant Tolerance. *Plants*, 8(9), p.304. doi:<https://doi.org/10.3390/plants8090304>.
 35. Morrison, M.J., Pietrzak, L.N. and Voldeng, H.D. (1998). Soybean Seed Coat Discoloration in Cool-Season Climates. *Agronomy Journal*, 90(4), pp.471–474. doi:<https://doi.org/10.2134/agronj1998.00021962009000040005x>.
 36. Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., Furuichi, T., Takebayashi, K., Sugimoto, T., Sano, S., Suwastika, I.N., Fukusaki, E., Yoshioka, H., Nakahira, Y. and Shiina, T. (2012). Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in Arabidopsis. *Nature Communications*, 3(1). doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms1926>.
 37. Peñafior, M.F.G.V., Mauck, K.E., Alves, K.J., De Moraes, C.M. and Mescher, M.C. (2016). Effects of single and mixed infections of Bean pod mottle virus and Soybean mosaic virus on host-plant chemistry and host–vector interactions.

- Functional Ecology*, 30(10), pp.1648–1659. doi:<https://doi.org/10.1111/1365-2435.12649>.
38. Ross, B.T., Zidack, N.K. and Flenniken, M.L. (2021). Extreme Resistance to Viruses in Potato and Soybean. *Frontiers in Plant Science*, 12, p.658981. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.658981>.
 39. Rupe, J.C. and Luttrell, R. (2008). Effect of Pests and Diseases on Soybean Quality. Elsevier eBooks, 5, pp.93–116. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-1-893997-64-6.50007-x>.
 40. Salvador, B., Saénz, P., Yangüez, E., Jean Bernard Quiot, Quiot, L., María Otilia Delgadillo, Juan Antonio García and Simón-Mateo, C. (2007). Host-specific effect of P1 exchange between two potyviruses. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), pp.147–155. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00450.x>.
 41. Seo, J.-K., Kang, S.-H., Seo, B.Y., Jung, J.K. and Kim, K.-H. (2010). Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), pp.265–276. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00603.x>.
 42. Seo, J.-K., Vo Phan, M.S., Kang, S.-H., Choi, H.-S. and Kim, K.-H. (2013). The charged residues in the surface-exposed C-terminus of the Soybean mosaic virus coat protein are critical for cell-to-cell movement. *Virology*, 446(1), pp.95–101. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.033>.
 43. Shang, J., Zhao, L., Yang, X.-M., Qi, X., Yu, J., Du, J., Li, K., He, C.-S., Wang, W. and Yang, W. (2023). Soybean balanced the growth and defense in response to SMV infection under different light intensities. *Frontiers in Plant Science*, 14. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1150870>.
 44. Sherepitko, D.V., Budzanivska, I.G., Polischuk, V.P., Boyko, A.L. (2011). Sequencing and phylogenetic analysis of Soybean mosaic virus isolated in Ukraine. *Biopolymers and Cell*, 27(6), 472–479. doi: 10.7124/bc.00011A

45. Shi, Y., Chen, J., Hong, X., Chen, J., and Adams, M. J. (2007). A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Molecular plant pathology*, 8(6), pp. 785–790. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00426.x>.
46. Simmons, H. E. and Munkvold, G. P. (2014). Seed transmission in the Potyviridae. In: Gullino, M. L. and Munkvold, G. ed. 2014. Global perspectives on the health of seeds and plant propagation material. Dordrecht: Springer. Ch.2, pp. 3-15.
47. Singh, G. (2010). *The soybean: botany, production and uses*. Wallingford: CABI.
48. Soybean mosaic virus (soybean mosaic). (2022). PlantwisePlus Knowledge Bank, [online] Species Pages. doi:<https://doi.org/10.1079/pwkb.species.48750>. Available at: <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/PWKB.Species.48750> [Accessed 11 Mar. 2024].
49. Tennant, P. and Fermin, G. (2015). *Virus diseases of tropical and subtropical crops*. [online] Wallingford, Oxfordshire ; Boston, Ma: Cabi. Available at: https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=f84_CwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA108&dq=soybean+mosaic+virus++seed+transmission&ots=Lu72NkUIKp&sig=7pnn_YACRRMAOh1VCZ6bgYfYC70&redir_esc=y#v=onepage&q=soybean%20mosaic%20virus%20%20seed%20transmission&f=false [Accessed 10 Mar. 2024].
50. Uniprot. (n.d.a). P0CK08 · MVP_SBMVN. [online] Available at: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0CK08/entry> [Accessed 11 Mar. 2024].
51. Uniprot. (n.d.b). Q90069 · POLG_SBMVG. [online] Available at: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q90069/entry> [Accessed 11 Mar. 2024].
52. Viralzone. (n.d.). Potyvirus ~ ViralZone. [online] Available at: https://viralzone.expasy.org/50?outline=all_by_species [Accessed 11 Mar. 2024].
53. Widyasari, K., Alazem, M. and Kim, K.-H. (2020). Soybean Resistance to Soybean Mosaic Virus. *Plants*, 9(2), p.219. doi:<https://doi.org/10.3390/plants9020219>.