

УДК 578.2+ 633.34

ВПЛИВ ВІРУСУ МОЗАЇКИ СОЇ НА УРОЖАЙНІСТЬ ТРАНСГЕННОЇ СОЇ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЙОГО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ**Л. Т. МІЩЕНКО**, доктор біологічних наук, професор*ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка**E-mail: lmishchenko@ukr.net, tarasuniv@ukr.net***А. А. ДУНІЧ**, кандидат біологічних наук*ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка***А. В. ДАЩЕНКО**, кандидат сільськогосподарських наук*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ***О. О. МОЛОДЧЕНКОВА**, доктор біологічних наук*Селекційно-генетичний Інститут – Національний центр насіннєзнавства і сортовивчення, м. Одеса***О. А. КОНДРАТЮК**, кандидат біологічних наук, доцент*ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка*

Анотація. Вперше в Україні показано, що трансгенні сорти сої уражуються вірусом мозаїки сої. Встановлено, що, не зважаючи на генетичні модифікації, урожайність ВМС-інфікованих рослин суттєво знижена. При ураженні вірусною інфекцією (ВМС) врожайність сої зменшувалась у обох господарствах Київської і Полтавської областей на 35,0 – 65,7 % відповідно. Більш значне зниження урожаю (в 2,6 рази) при вірусній інфекції відмічено у Полтавській обл. в умовах дуже посушливого клімату 2017 року (ГТК = 0,53) порівняно із 2016 (ГТК=0,99). Відмічено, що ВМС-інфекція негативно впливає на продуктивність і структуру урожаю рослин ГМ-сої. ВМС-інфекція зменшує на 21,9% кількість бобів і на 22,5% кількість зерен на одній рослині, масу зерен з однієї рослини – на 27,1% та масу 1000 зерен – на 29,7%

порівняно зі здоровими рослинами. Визначено, що досліджуваний ізолят ВМС SGP-17 має спільне походження з іранськими, американськими ізолятами, а також польським та українським. Аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей гену капсидного білка виявив високий рівень дивергенції нуклеотидів порівняно з ізолятами з інших країн та чотири унікальні амінокислотні заміни, що можуть бути залучені до здатності цього ізоляту інфікувати трансгенні рослини сої. Отримані результати свідчать на користь вироцуння вітчизняних сортів сої, створених класичними методами селекції та які містять детермінанти природної генетичної стійкості до ВМС.

Ключові слова: *Glucine max*, вірус мозаїки сої, урожайність, філогенетичний аналіз, молекулярно-генетичні властивості

Актуальність. Інфікування рослин сої вірусом мозаїки сої (ВМС) призводить до значних втрат урожаю – від 8% до 50% у природних умовах та навіть до 100% – у випадках епіфітотій [1]. ВМС-інфекція може викликати зміни у біохімічному складі

насіння, знижувати життєздатність сходів [2]. Зважаючи на шкодочинний вплив вірусу, інтенсивно розробляються та впроваджуються нові сорти сої, стійкі до фітопатогенів різної етіології. Проте, основна маса сортів мають комплексну

стійкість до абіотичних чинників та грибних та/або бактеріальних хвороб сої. На ринку країни з'являються сорти генетично модифікованої (ГМ) сої, яка має характеризуватися високою продуктивністю та стійкістю до хвороб. Хоча відомо, що в Україні трансгенна соя не дозволена для вирощування і не реєстрована. Та і Європа не бажає купувати ГМ-сою. Однак її вирощують – це сорти Грімо, Монро, Аполлон тощо. Тому актуальним є дослідити можливість інфікування ГМ-сої вірусом мозаїки сої та дослідити його вплив на продуктивність та урожайність рослин, а також встановити молекулярно-генетичні особливості ізоляту ВМС.

Аналіз останніх досліджень та публікацій.

Перше повідомлення про ВМС на Україні було у 1938 році. Пізніше цей вірус було виявлено на полях сої у східних і південних областях [3]. Більш детальні дослідження властивостей і походження українських ізолятів ВМС були проведені у 2011-2012 рр. виключно на Правобережній її частині. Так, у рослинах сої в Київській, Черкаській та Вінницькій областях детектовано змішану інфекцію ВМС із вірусом жовтої мозаїки квасолі [4] та вірусом мозаїки люцерни [5]. Наші дослідження у 2016-2017 рр. показали, що ВМС циркулює і в умовах Лівобережної України. Зважаючи на раніше представлені дані щодо циркуляції на території Правобережної частини країни змішаної інфекції цього вірусу із вірусом жовтої мозаїки квасолі та вірусом мозаїки люцерни, досліджувані зразки були нами перевірені на наявність і цих збудників. Результати аналізу показали відсутність антигенів ВЖМК і ВМЛ [6].

Мета дослідження. Дослідити вплив вірусу мозаїки сої на урожайність трансгенних рослин *Glycine max* та вивчити молекулярно-біологічні характеристики виявленого ізоляту вірусу.

Матеріали і методи дослідження.

Моніторинг рослин трансгенної сої у Полтавській області на уражуваність її вірусними хворобами проводили методом візуальної діагностики. Біометричні вимірювання, урожай і його структуру проводили загальноприйнятими методами по Доспехову [7].

Ідентифікацію вірусів здійснювали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (сендвіч-варіант) з використанням комерційних тест-систем до вірусу мозаїки сої, ВМС фірми Loewe (Німеччина). Результати реакції реєстрували на рідері Thermo Labsystems Opsi MR (США) із програмним забезпеченням Dypex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм. За достовірні приймали значення, що перевищували негативний контроль у три рази [8].

Виділення сумарної РНК проводили за стандартною методикою з використанням комерційного набору Genomic DNA purification kit (Thermo Scientific, USA) згідно рекомендацій виробника.

ЗТ-ПЛР проводили у два етапи. Зворотну транскрипцію проводили, застосовуючи RevertAid Reverse Transcriptase – генетично модифіковану MMuLV RT (Thermo Scientific, США). При проведенні ПЛР використовували специфічні олігонуклеотидні праймери SMV-CPf: 5'-CAAGCAGCAAAGATGTAATG-3') і SMV-CPr: 5'-GTCCATATCTAGGCATATACG-3', очікуваний розмір продукту ампліфікації ДНК – 469 п.н. [9]. Ампліфікацію ділянки гену капсидного білка ВМС здійснювали, використовуючи Dream Taq PCR Master Mix (2x) buffer (що містить Dream Taq DNA polymerase, 2X Dream Taq buffer, 0,4 mM кожного із dNTP та 4 mM of MgCl₂), 7,5 мкл стерильної води, 1 мкл кожного праймера (10 μM), та 3 мкл кДНК. Режим ампліфікації наступний: денатурація кДНК (3хв 95⁰C), наступні 30 циклів 30с за 95⁰C денатурація,

відпал праймерів (30 с за 55⁰C), синтез комплементарних ланцюгів ДНК (45 с за 72⁰C), елонгація – 72⁰C 10 хв.

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

Ідентифікацію та порівняння отриманих нуклеотидних послідовностей із послідовностями ізолятів ВМС із Генбанку проводили за допомогою BLAST-аналізу (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ізоляти ВМС, використані у даному дослідженні, представлені у табл.1. Філогенетичний аналіз здійснювали за допомогою програмного пакету MEGA 7. Вирівнювання послідовностей здійснювали за допомогою програми Clustal W, вбудованої у MEGA 7. Філогенетичні дерева конструювали методом максимальної правдоподібності (maximum likelihood, ML) [10] з використанням найбільш оптимальних моделей. Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп-тест з 1000 бутстреп реплікаціями. Багаторазове вирівнювання амінокислотних послідовностей ділянки гену CP ізолятів/штамів ВМС здійснено за допомогою програми BioEdit.

Відсоток подібності попарно нуклеотидних і амінокислотних послідовностей були представлені як

кольорові блоки використовуючи програмний пакет SDT v.1 (Sequence Demarcation Tool Version 1) [11].

Для вирахування показника dN/dS, нуклеотидні послідовності CP усіх ізолятів ВМС взятих у дослідження, були вирівняні. Показник рівня несинонімічних (dN) до рівня синонімічних (dS) мутацій був обрахований, використовуючи метод Nei-Gojoboogi у програмі SNAP [12].

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за параметричними критеріями нормального розподілу варіант, стандартне відхилення середніх значень – за загальноприйнятою методикою з використанням комп'ютерної програми управління базами даних MS EXCEL 2000. Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп-тест з 1000 бутстреп реплікаціями.

Результати дослідження та їх обговорення.

Попередні дослідження рослин сої 25-ти сортів в умовах Полтавської області показали наявність симптомів зморшкватості і мозаїки листкової пластинки. Результати ІФА і ЗТ-ПЛР показали, що рослини інфіковані вірусом мозаїки сої [6]. Серед протестованих сортів нашу увагу привернув той факт, що вірусом мозаїки сої була уражена трансгенна соя Монро, де спостерігали симптоми зморшкватості і пухирчастості листкової пластинки, насіння характеризувалося незначною плямистістю (рис. 1).



а



б

Рис. 1. Симптоми ВМС-інфекції на трансгенних рослинах сої сорту Монро: а – зморшкуватість листкової пластинки; б – плямистість насіння

Результати досліджень показали, що досліджуваний ізолят ВМС, названий SGP-17, проявляв шкодочинний вплив, а саме

суттєво знижував урожайність рослин ГМ-сої сорту Монро (табл. 1).

1. Вплив вірусу мозаїки сої на структуру урожаю та продуктивність ГМ-сої сорту Монро

Варіант	Гілкування, шт	Висота стебла до 1-го боба, см	Висота рослини, см	Кількість бобів на рослині, шт					Всього зерен, шт	Маса зерен з однієї рослини, г	Маса 1000 зерен, г
				всього	з 1-ю зерниною	з 2-ма зернинами	з 3-ма зернинами	з 4-ма зернинами			
Здорові рослини	5,5 ±0,5	9,5 ±1,7	88,3 ±1,8	64,0±4,0	9,0 ±1,0	31,0 ±2,0	21,0 ±2,0	2,0	142,0 ±6,0	17,65 ±2,13	165 ±12
Вірусні фіковані рослини	4,0 ±0,2	8,2 ±1,4	78,3 ±1,4	42,0±3,0	4,0±1,0	27±2,0	12,0±2,0	-	94,0 ±4,0	11,20 ±1,10	116 ±10

Виявлено, що у вірусніфікованих рослин гілкування було нижчим в 1,4 рази, порівняно зі здоровими. Крім того, ВМС-інфекція зменшує на одній рослині кількість бобів і кількість зерен у 1,5 рази. Маса зерен з однієї рослини зменшується на 37 %, маса 1000 зерен – на 30 %. У здорових рослин відмічено навіть невелику кількість бобів (два) з чотирма зернинами в бобі.

Урожай трансгенної сої Грімо у 2017 р., вирощеної в ФГ «Мир» Полтавської обл.,

становив 13,05 ц/га. У ФГ «Мрія» Київської обл., де було більше опадів, врожайність ГМ-сої Монро складала 21,8 ц/га. А от урожай 2016 року, більш вологозабезпеченого та сприятливого для вирощування сої становив 26,2 та 28,4 ц/га, відповідно. Рік 2016 у Полтавській обл. вважався як посушливий, оскільки гідротермічний коефіцієнт Селянинова (ГТК) становив 0,99, а в 2017 – 0,53, тобто рік був дуже посушливим. Тому в більшості

виробничих господарств області урожай сої був на рівні 13 ц /га, а то і нижче – 8-10 ц/га, а на окремих полях навіть близько 5 ц/га. При ураженні вірусною інфекцією (ВМС) врожайність зменшувалась у обох господарствах Київської і Полтавської обл. на 35 – 65,7 %. Більш значне зниження урожаю (в 2,6 рази) при вірусній інфекції відмічено у Полтавській обл. в умовах дуже посушливого клімату 2017 року (ГТК = 0,53).

Дослідження молекулярно-біологічних характеристик, і, зокрема, нуклеотидних послідовностей геному, надає можливість прослідкувати філогенетичні зв'язки даного вірусу з іншими, встановити його еволюційну історію та прослідкувати його географічне походження. Крім того, на основі таких даних можна прогнозувати можливі зміни і набуття нових властивостей циркулюючими в певному ареалі штамми або ізолятами.

Для встановлення штамової приналежності та спорідненості ізоляту ВМС SGP–17 (виділений із сорту сої Монро) його ДНК послідовність порівнювали із послідовностями 33-ох ізолятів і штамів ВМС із ГенБанку (табл. 2).

Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей ділянки (430 п.н.) гену капсидного білка (положення 8640-9069 н.) досліджуваного ізоляту SGP–17 показав, що найвищий відсоток гомології (97,9%) за нуклеотидною послідовністю ізолят SGP–17 має з іранськими ізолятами Ar33, Lo3, американським VA2 та українським UA1Gr. Також високий рівень гомології за нуклеотидами відмічено з китайськими ізолятами HB-S19, XFQ014, польським ізолятом M, іранським Go11 та американським Strain 1083 (96,7-97,6%) (табл. 2, рис. 2).

2. Відсоток подібності українського ізоляту ВМС SGP – 17 із відомими ізолятами/штамами цього вірусу за нуклеотидними та амінокислотними послідовностями ділянки гена капсидного білка, %

п/п	Ізолят/штам ВМС	Номер доступу в Генбанку	Країна	нуклеотиди	аміно кислоти
1.	SGP – 17	MG940987	Україна	-----	-----
2.	UA1Gr	JF431105	Україна	97,9	97,2
3.	HB-S19	KR065491	Китай	96,7	97,2
4.	XFQ014	KP710876	Китай	97,6	97,2
5.	SC7-N	KP710868	Китай	90,6	97,2
6.	A	KM886930	Польща	89,3	97,2
7.	M	KM886929	Польща	97,6	97,2
8.	Ar33	KF297335	Іран	97,9	97,2
9.	Go11	KF135491	Іран	97,4	97,2
10.	Lo3	KF135490	Іран	97,9	97,2
11.	G1	FJ640977	США	89,5	97,2
12.	G2	S42280	США	90,6	97,2
13.	G3	FJ640978	США	89,3	97,2
14.	G4	FJ640979	США	90,3	97,2
15.	G5	AY294044	Півд. Корея	91,4	97,2
16.	G5H	FJ807701	Півд. Корея	92,2	97,2
17.	G6	FJ640980	США	90,3	97,2
18.	G6H	FJ640981	Півд. Корея	89,3	96,5
19.	G7	AY216010	США	89,3	96,5

20	G7A	FJ640982	США	89,3	96,5
21	G7d	AY216987	США	89,0	95,8
22	G7H-clone	FJ807700	Півд. Корея	91,4	97,2
23	Strain 1083	AY216481	США	96,9	97,2
24	VA2	AF200584	США	97,9	97,2
25	L	EU871724	Канада	90,6	97,2
26	L-RB	EU871725	Канада	90,3	97,2
27	NP-C-L	HQ166265	Канада	90,1	97,2
28	NP-L	HQ166266	Канада	90,6	97,2
29	India	KM979229	Індія	90,6	97,2
30	strain A, isolate SV-10	AB100444	Японія	90,6	97,2
31	strain B, isolate SV-18	AB100445	Японія	90,6	97,2
32	strain C, isolate SV-15	AB100446	Японія	92,9	97,2
33	strain D, isolate SV-70	AB100447	Японія	90,6	97,2
34	strain E, isolate SV-127	AB100448	Японія	90,3	97,2

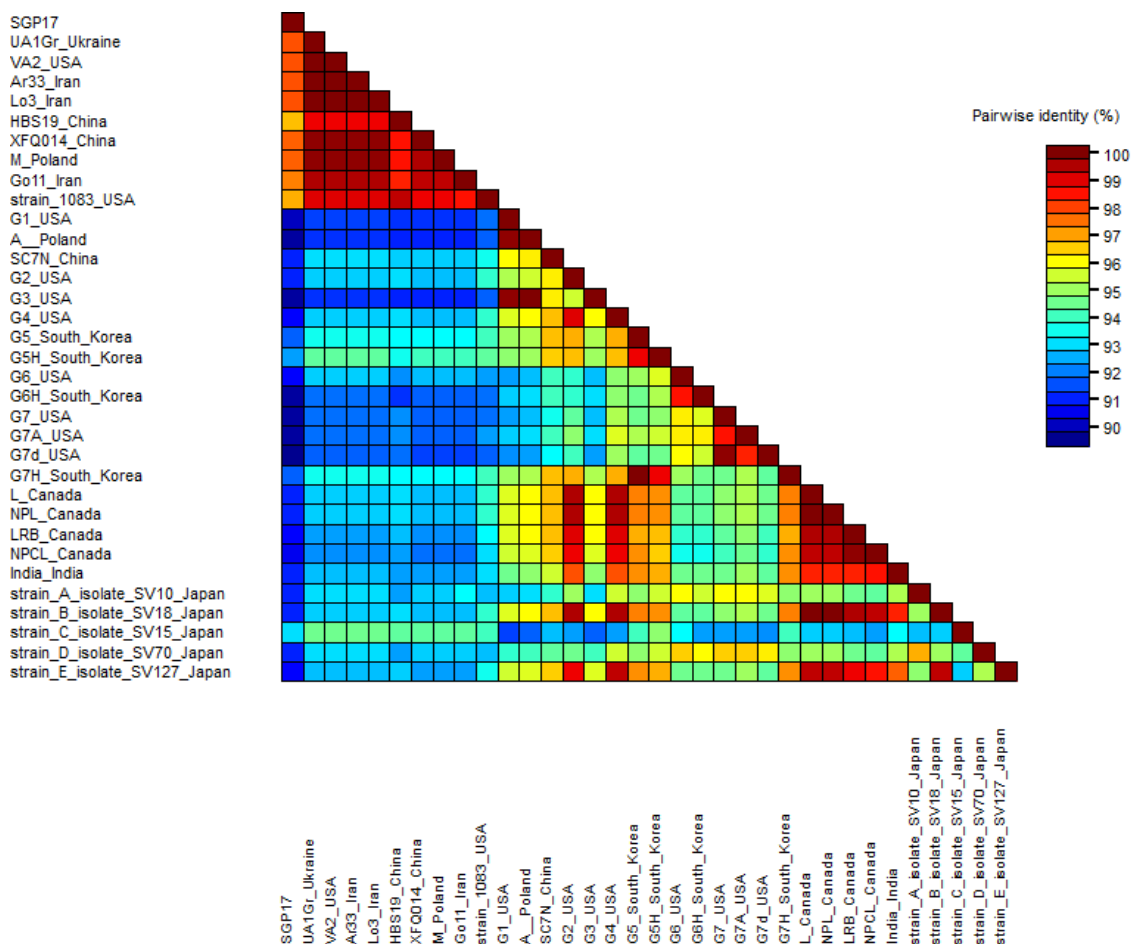


Рис. 2 Графічне зображення ідентичності ізоляту ВМС SGP-17 за нуклеотидними послідовностями (відсоток ідентичності представлено на шкалі)

SGP-17 разом із ізолятами UA1Gr, Ar33, Lo3, VA2, HB-S19, XFQ014, M, Go11 та Strain 1083 увійшов до однієї гілки, що

свідчить про їх спільне походження (рис. 3а). Класифікація штамів/ізолятів ВМС досить складна. В США Cho and Goodman

класифікували 98 ізолятів ВМС у сім штамів, а саме G1–G7 [13]. Така сама диференційна система була застосовано і у Кореї, в результаті чого було додатково ідентифіковано G5H, G6H і G7H штами ВМС. Проте, у Японії та Китаї були застосовані інші сорти сої, в результаті ізоляти з обох країн були класифіковані на 5 (A-E) та 21(SC1 to SC21) штам відповідно. Пізніше Shigemori та Kanematsu, Nakano зробили спробу уніфікувати класифікацію штамів з США і Японії [14, 15]. Дослідження показали, що японські штами розподіляються на три групи: 1). містить А і

В (співвідносяться до штаму G3); 2). Містить штами С і D; 3). містить тільки штам Е. Штами С, D і Е не співвідносяться до жодного з американських штамів [14]. Kanematsu, Nakano розподілили штами ВМС на три групи: 1) містить G1 і G4 (співвідносяться до штаму В); 2) містить G2, G3, G6 і G7 (співвідносяться до штаму А); 3) містить тільки G5 (співвідносяться до штаму С), тоді як штами D і Е не співвідносяться до жодного з американських штамів [15]. Ізолят SGP–17 розташований у одному кластері з японським штамом С (рис. 3а).

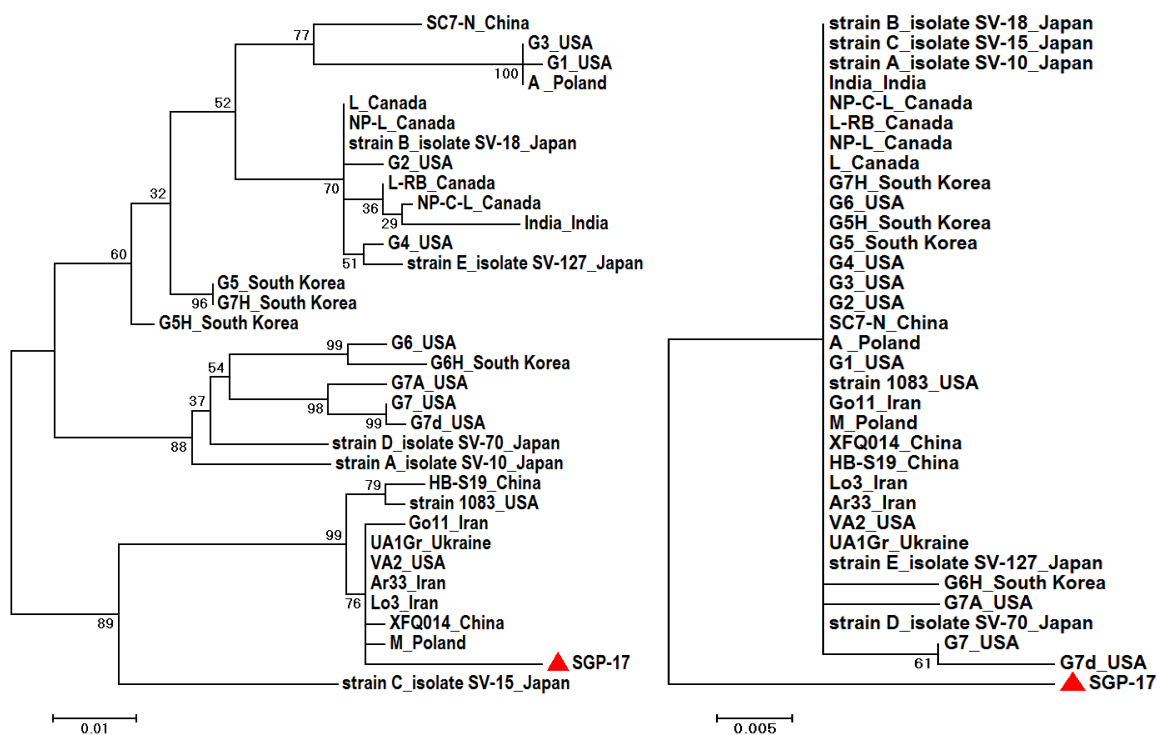


Рис. 3 Філогенетичне дерево, побудоване методом максимальної правдоподібності (ML) за послідовностями ділянки гену капсидного білка українського ізоляту ВМС SGP – 17 та ізолятів з інших країн (назви та номери Генбанку наведено у табл. 2): а – нуклеотиди, із застосуванням моделі Jukes-Cantor; б – амінокислоти, p-distance модель

За амінокислотною послідовністю ізолят SGP – 17 має ідентичність 95,8-97,2% (табл. 2, рис. 3б).

Багаторазове вирівнювання амінокислотних послідовностей ділянки гену CP ізолятів\штамів ВМС виявило чотири

амінокислотні заміни у ізоляті SGP–17 у положеннях 1-4 (Ser→Trp; Lys→Cys; Gly→Met; Lys→Glu) (рис. 4).

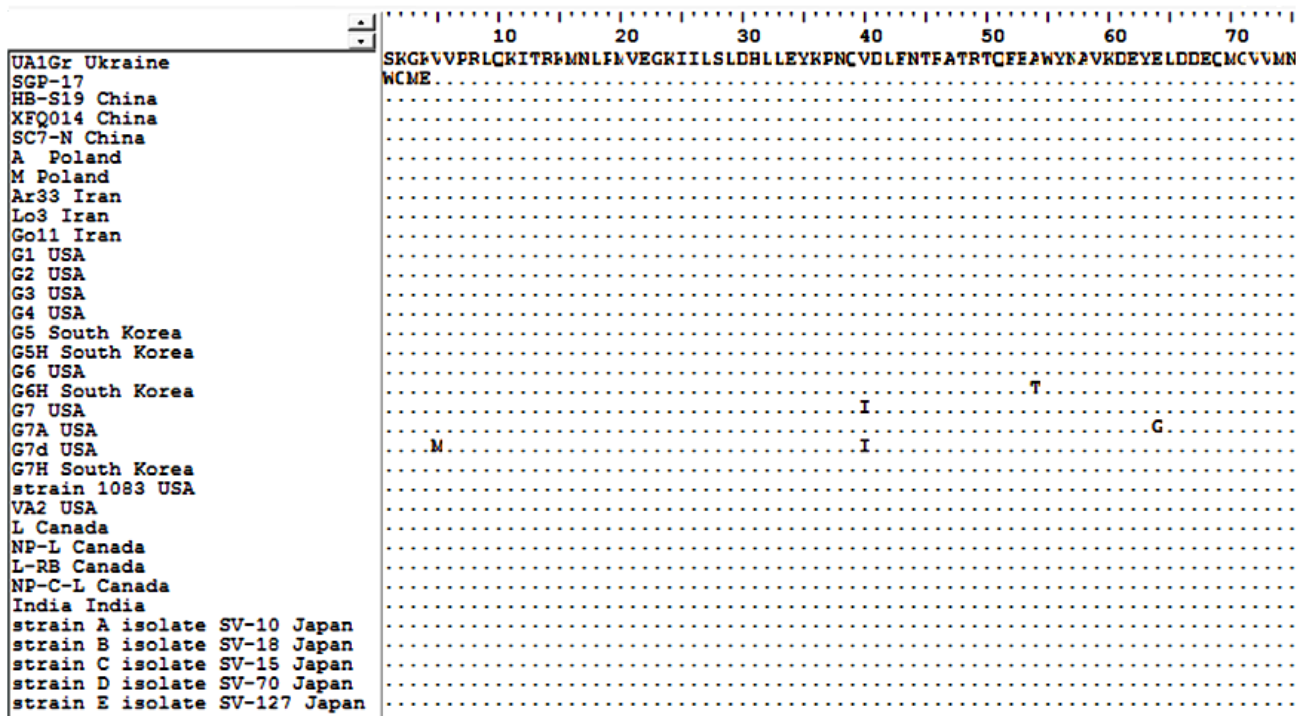


Рис. 4 Багаторазове вирівнювання амінокислотних послідовностей ділянки гену CP ізолятів/штамів ВМС. Числа вгорі представляють позиції амінокислот. Показані тільки відмінності

На рисунку представлено 71 амінокислота із 143-х, так як у позиціях 72-143 амінокислоти для усіх ізолятів ВМС ідентичні. Амінокислотні заміни виявлено також у ізолятів G6H, G7, G7A G7d. Встановлено, що порівняно з усіма взятими для аналізу послідовностями ізолятів ВМС, виявлені заміни у досліджуваному ізоляті є унікальними.

Відомо, що ген CP ВМС перебуває під впливом негативного відбору, тобто підтримання сталості геному [16]. Для дослідження еволюційних сил, що діють на ген CP ВМС, вираховували значення dN/dS для всіх послідовностей CP ВМС, взятих до дослідження (табл. 2). Цей показник показує співвідношення несинонімічних мутацій до синонімічних. Аналіз показав, що показник dN / dS для усіх послідовностей становив 0,0386 ($p < 0,01$). Для ізоляту SGP-17 цей показник становив 0,0651, тоді як для усіх інших ізолятів він становив від 0,0149 до 0,0578. Тобто, порівняно із усіма іншими

взятими до дослідження ізолятами ВМС, український ізолят SGP-17 має вищу дивергенцію нуклеотидів, а, отже, і вищу потенційну здатність до мінливості.

Висновки і перспективи. Таким чином, вперше показано, що трансгенні сорти сої Монро і Грімо уражується вірусом мозаїки сої. Виявлено, що ВМС суттєво знижує урожайність рослин сої. Встановлено, що, не зважаючи на генетичні модифікації, урожайність ВМС-інфікованих рослин суттєво знижена. Визначено, що досліджуваний ізолят ВМС має спільне походження з іранськими, американськими ізолятами, а також польським та українським. Аналіз послідовностей гену капсидного білка виявив високий рівень дивергенції нуклеотидів порівняно з ізолятами з інших країн та чотири унікальні амінокислотні заміни, що можуть бути залучені до здатності цього ізоляту інфікувати трансгенні рослини сої. Отримані результати свідчать на користь вирощування

вітчизняних сортів сої, створених класичними методами селекції та які містять

детермінанти природної генетичної стійкості до ВМС.

Список використаних джерел

1. Liao L., Chen P., Buss G.R., Yang Q., Tolin S.A. Inheritance and allelism of resistance to Soybean mosaic virus in Zao18 soybean from China. *Journal of Heredity*. 2002. Vol. 93, No. 6. P. 447-452.

2. El-Amretz A. A., El-Said H.M., Salem D.E. Effect of Soybean mosaic virus infection on quality of soybean seed. *Agricultural Research Review*. 1987. Vol. 63. P.155-164.

3. Билык Л.Г. Мозаика сои на Украине: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.11 / Киев, 1967. 19 с.

4. Kyrychenko A.M., Kraeva G.V., Kovalenko O.G. Biological characteristic and identification of soybean virus isolated from different Ukraine regions. *Мікробіологічний журнал*. 2012. Т.74, № 1. С. 46-50.

5. Шерепітко Д., Бойко А., Шерепітко В. Прояв інфекції та ідентифікація вірусу мозаїки люцерни на рослинах сої (*Glycine max* (L.) Marril) за ґрунтово-кліматичних умов Вінниччини. *Вісник КНУ Серія Біологія*. 2011. № 58. С. 9–12.

6. Mishchenko L.T., Dunich A.A., Shevchenko T.P., Budzanivska I.G., Polischuk V.P., Andriyuchuk O.M., Molchanets O.V., Antipov I.O. Detection of Soybean mosaic virus in some left-bank forest-steppe regions of Ukraine. *Мікробіологічний журнал*. 2017. Т.79, № 3. С.125-36.

7. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.

8. Crowther J.R. ELISA. Theory and practice. New York: Hamana Press, 1995. 223 p.

References

1. Liao, L., Chen, P., Buss, G.R., Yang, Q., Tolin, S.A. (2002). Inheritance and allelism of resistance to Soybean mosaic virus in Zao18 soybean from China. *Journal of Heredity*, 93(6), 447-452. doi: 10.1093/jhered/93.6.447

2. El-Amretz, A. A., El-Said, H.M., Salem, D.E. (1987). Effect of Soybean mosaic

9. Sherepitko D.V., Budzanivska I.G., Polischuk V.P., Boyko A.L. Sequencing and phylogenetic analysis of Soybean mosaic virus isolated in Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2011. Vol. 27, No. 6. P. 472–479.

10. Huelsenbeck J.P., Rannala B. Maximum likelihood estimation of phylogeny using stratigraphic data. *Paleobiology*. 1997. Vol. 23, No. 2. P. 174-180.

11. Muhire B.M., Varsani A., Martin D.P. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, Is.9. P. e108277.

12. Korber B. HIV signature and sequence variation analysis. In: Computational analysis of HIV molecular sequences / Rodrigo A.G., Learn G.H. eds. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 55–72.

13. Cho E.K., Goodman R.M. Strains of Soybean mosaic virus classification based on virulence in resistant soybean cultivars. *Phytopathology*. 1979. Vol.69. P. 467–470.

14. Shigemori I. Studies on the breeding on soybeans for the resistance to soybean mosaic virus (SMV). *Bull. Nagano Chushin Agr. Ex. Station*. 1991. Vol. 10. P. 1–61.

15. Kanematsu S., Nakano M. Comparison between Japanese and US strain of soybean mosaic virus using differential soybean cultivars. *Bull. Tohoku Agric. Res. Cent*. 2015. Vol. 117. P. 59–62.

16. Zhou G.-C., Shao Z.-Q., Ma F.-F., Wu P., Wu X.-Y., Xie Z.-Y., et al. The evolution of soybean mosaic virus: An updated analysis by obtaining 18 new genomic sequences of Chinese strains/isolates. *Virus Research*. 2015. Vol. 208. P. 189-98.

virus infection on quality of soybean seed. *Agricultural Research Review*, 63,155-164.

3. Bilyk, L.G. (1967). Mozaika soi na Ukraine [Soybean mosaic in Ukraine]. Kyiv.

4. Kyrychenko, A.M., Kraeva, G.V., Kovalenko, O.G. (2012). Biological characteristic and identification of soybean virus isolated from different Ukraine regions. *Mikrobiolohichnyi zhurnal*, 74(1), 46-50.

5. Sherepitko, D., Boyko, A., Sherepitko, V. (2011). Proiav infektsii ta identyfikatsiia virusu mozaiky liutserny na roslynakh soi (*Glycine max* (L.) Marril) za hruntovo-klimatychnykh umov Vinnychyny [Manifestation of infection and identification of the Alfalfa mosaic virus on soybean plants (*Glycine max* (L.) Marril) under the soil and climatic conditions of Vinnytsya region]. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology, 58, 9-12.
6. Mishchenko, L.T., Dunich, A.A., Shevchenko, T.P., Budzanivska, I.G., Polischuk, V.P., Andriychuk, O.M., Molchanets, O.V., Antipov, I.O. (2017). Detection of Soybean mosaic virus in some left-bank forest-steppe regions of Ukraine. Mikrobiol Zhurnal, 79(3), 125-36. doi: 10.15407/microbiolj79.03.125
7. Dospekhov, B. A. (1985). Metodyka polevoho opyta (s osnovamy statystycheskoi obrabotky rezultatov issledovaniy [Methodology of field experience (with the basics of statistical processing of research results)]. Moscow: Agropromizdat, 351.
8. Crowther, J.R. (1995). ELISA. Theory and practice. New York: Hamana Press, 223.
9. 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
10. Huelsenbeck, J.P., Rannala, B. (1997). Maximum likelihood estimation of phylogeny using stratigraphic data. Paleobiology, 23(2), 174-180. doi: <https://doi.org/10.1017/S0094837300016778>
11. Muhire, B.M., Varsani, A., Martin, D.P. (2014). SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. PLoS ONE, 9, N.9, e108277. doi: 10.1371/journal.pone.0108277
12. Korber, B. (2000). HIV signature and sequence variation analysis. In: Computational analysis of HIV molecular sequences, Rodrigo A.G., Learn G.H. eds. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 55-72.
13. Cho, E.K., Goodman, R.M. (1979). Strains of Soybean mosaic virus classification based on virulence in resistant soybean cultivars. Phytopathology, 69, 467-470. doi: 10.1094/Phyto-69-467.
14. Shigemori, I. (1991). Studies on the breeding on soybeans for the resistance to soybean mosaic virus (SMV). Bull. Nagano Chushin Agr. Ex. Station, 10, 1-61.
15. Kanematsu, S., Nakano, M. (2015). Comparison between Japanese and US strain of soybean mosaic virus using differential soybean cultivars. Bull. Tohoku Agric. Res. Cent, 117, 59-62.
16. Zhou, G.-C., Shao, Z.-Q., Ma, F.-F., Wu, P., Wu, X.-Y., Xie, Z.-Y., et al. (2015). The evolution of soybean mosaic virus: An updated analysis by obtaining 18 new genomic sequences of Chinese strains/isolates. Virus Res, 208, 189-98. doi: 10.1016/j.virusres.2015.06.011.

ВЛИЯНИЕ ВИРУСА МОЗАИКИ СОИ НА УРОЖАЙНОСТЬ ТРАНСГЕННОЙ СОИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Л. Т. Мищенко, А. А. Дуніч, А. В. Дащенко, О. О. Молодченкова

Аннотация. Впервые в Украине показано, что трансгенные сорта сои поражаются вирусом мозаики сои. Установлено, что, несмотря на генетические модификации, урожайность ВМС-инфицированных растений существенно снижена. При поражении ВМС-инфекцией урожайность сои уменьшалась в обоих хозяйствах Киевской и Полтавской областей на 35,0 - 65,7% соответственно. Более значительное

снижение урожая (в 2,6 раза) при вирусной инфекции отмечено в Полтавской области в условиях очень засушливого климата 2017 года (ГТК = 0,53) по сравнению с 2016 (ГТК=0,99). Отмечено, что ВМС-инфекция негативно влияет на продуктивность и структуру урожая растений ГМ-сое. ВМС-инфекция уменьшает на 21,9% количество бобов и на 22,5% количество зерен на одном растении, массу зерен с одного растения - на 27,1% и массу 1000 зерен - на 29,7% в

сравнении со здоровыми растениями. Определено, что исследуемый изолят ВМС SGP-17 имеет общее происхождение с иранскими, американскими изолятами, а также польским и украинским. Анализ нуклеотидных и аминокислотных быть задействованы в способности этого изолята инфицировать трансгенные растения сои. Полученные результаты свидетельствуют в пользу выращивания отечественных сортов сои, созданных классическими методами селекции и

последовательностей гена капсидного белка обнаружил высокий уровень дивергенции нуклеотидов по сравнению с изолятами из других стран и четыре уникальные аминокислотные замены, которые могут содержать детерминанты природной генетической стойкости к ВМС.

Ключевые слова: *Glycine max*, вирус мозаики сои, урожайность, филогенетический анализ, молекулярно-генетические свойства

THE INFLUENCE OF SOYBEAN MOSAIC VIRUS ON THE YIELD OF TRANSGENIC SOYBEAN AND STUDYING OF ITS MOLECULAR GENETIC PROPERTIES

L.T. Mishchenko, A.A. Dunich, A.V. Dashchenko, O.O. Molodchenkova

Abstract. For the first time in Ukraine, it has been shown that transgenic soybean is affected with Soybean mosaic virus. It is established that, despite genetic modifications, the yield of SMV-infected GM-soybean plants is significantly reduced. The yield of SMV-infected soybean decreased in both investigated farms in Kyiv and Poltava regions by 35.0-65.7% respectively. A more significant decline in the yield (2.6 times) of SMV-infected soybean was noted in the Poltava region in conditions of very arid climate in 2017 (HTC = 0.53) comparing with 2016 (HTC=0.99). It was noted that the SMV infection has a negative effect on the productivity and structure of the yield of GM-soybean plants. SMV infection reduces the number of beans by 21.9% and the number of grains per plant by 22.5%, the weight of grain from one plant - by 27.1% and the weight of 1000 grains - by 29.7% in comparison with healthy plants. It is determined that the investigated SMV isolate SGP-17 has a common origin with Iranian, American isolates, as well as with Polish and Ukrainian. Analysis of the nucleotide and amino acid sequences of the capsid protein gene (CP) of the studied isolate SGP-17 revealed the high level of nucleotide divergence in comparison with the SMV isolates from other countries and four unique amino acid substitutions that can be implicated in the ability of this isolate to infect transgenic soybean plants. The obtained results testify in favor of growing of domestic soybean varieties, created by classical selection methods and containing determinants of natural genetic resistance to the SMV.

Keywords: *Glycine max*, Soybean mosaic virus, yield, phylogenetic analysis, molecular and genetic properties