УДК 633.34:632.3:578

© 2011

Д. В. Шерепітко, В. В. Шерепітко,
академік НААН України **А. Л. Бойко**

Оцінка локусу *Rsv1* як детермінанти стійкості до місцевих штамів вірусу мозаїки сої

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

Досліджено генотипну диференціацію рослин сої (Glycine max (L.) Merr.; Glycine soja Sieb. and Zucc.) за стійкістю до вірусу мозаїки сої (ВМС) в грунтово-кліматичних умовах Вінниччини. Серед сортів, що містили генспецифічний фрагмент Rsv1-f/r (ген 3gG2) у локусі Rsv1 (група зчеплення F), знайдено як стійкі, так і сприйнятливі до ураження місцевими штамами ВМС. Виявлено перспективні з позицій широкого впровадження у виробництво та використання в селекційному процесі як геноносіїв стійкості до ВМС сорти сої (Горлиця, Подільська 1, Сула, Срібна Рута, Ірина, Ки-Він, Галіна, Антошка, Колбі). Показано доцільність впровадження генспецифічних молекулярних маркерів у вітчизняний селекційний процес, спрямований на створення вірусостійких сортів сої.

Серед бобових культур соя (*Glycine max* (L.) Merr.) займає виняткову позицію, що в першу чергу обумовлено особливістю біохімічного складу її насіння: разом з високим вмістом білка — від 30 до 45% — включає до 24% олії [1]. Внаслідок сприятливого поєднання таких цінних ознак соя широко застосовується в харчових, кормових і технічних цілях. Крім того, ця культура є одним з кращих попередників у сівозмінах, зважаючи на її високу здатність до симбіотичної азотфіксації. Вірус мозаїки сої (ВМС; рід Potyvirus, родина Potyviridae) є збудником однієї з основних та найбільш шкодочинних вірусних хвороб, що широко поширена в агроценозах усіх соєсіючих регіонів світу. Втрати врожаю, спричинені ВМС, при інфікуванні рослин у період репродуктивного розвитку коливаються в межах від 10 до 50% [2]. Уражене ВМС насіння має погіршений біохімічний склад та характеризується специфічною плямистістю. Даний РНК-вмісний вірус здатний до передачі як попелицями (неперсистентним способом), так і з насінням (від 1 до 68%) [2, 3]. Важливо відзначити той факт, що у випадку змішаної інфекції ВМС з іншими вірусними патогенами спостерігається їх синергічна взаємодія, яка виявляється в посиленні симптомів хвороби та максимальному зниженні зернової продуктивності рослин [2]. З огляду на значущість даної проблеми патогенна мінливість серед ізолятів ВМС інтенсивно досліджується. Зокрема, описано 21 штам (SC1–SC21) в Китаї та 5 штамів (A–E) в Японії [2, 4]. У США велике різноманіття ізолятів ВМС класифіковано за сімома штамовими групами (G1–G7) на основі фенотипної реакції рослин різних генотипів сої на вірусне інфікування [5]. Є дані щодо появи в Кореї нових ізолятів ВМС, здатних долати всі відомі гени стійкості [6].

Використання генетично контрольованої (природної) стійкості є найбільш ефективним, практичним та економічно вигідним способом протистояння вірусним хворобам сої [7, 8]. Генетичні дослідження показали, що в більшості випадків вірусостійкість має олігогенний характер. На сьогодні відомо три окремі локуси *Rsv1*, *Rsv3* та *Rsv4*, що контролюють стійкість до ВМС [9]. У локусі *Rsv1* (молекулярна група зчеплення F) ідентифіковано дев'ять алелей, які неоднаково забезпечують стійкість до різних штамів цього вірусу (штамові групи

а *б*

Рис. 1. Симптоми, викликані ВМС на рослинах сої сорту Луна (*а*), у порівнянні з неураженими (стійкими) рослинами сої сорту Горлиця (*б*)

G1–G7). Три алелі локусу *Rsv3* (молекулярна група зчеплення B2) визначають стійкість до ізолятів з штамових груп G5–G7. Ген *Rsv4* на ранніх стадіях онтогенезу рослин визначає стійкість до всіх штамів ВМС [3, 10].

A. J. Hayes та ін. (2004) клонували кластер генів NBS-LRR, близькозчеплених з локусом *Rsv1*, що визначає стійкість до ВМС. При цьому один з отриманих субклонів (3gG2) знаходився в межах локусу *Rsv1* (відстань 0 сМ). Відкрита рамка зчитування, виявлена в даному субклоні, дозволила встановити розмір гена 3gG2 (3390 п. н). З'ясовано, що амінокислотна послідовність, яку кодує ген 3gG2, має найбільшу спорідненість до родини високогомологічних non-TIR-NBS-LRR генів стійкості рослин. Також виділено мРНК та просеквеновано продукт зворотної транскрипції (кДНК) гена 3gG2, що експресується в листкових тканинах рослин сої [11]. На основі аналізу нуклеотидної послідовності 3gG2 підібрана пара праймерів (*Rsv1-f/-r*), які ампліфікують генспецифічний фрагмент розміром 362 п. н. [12]. Отриманий молекулярний маркер було запропоновано використовувати як інструмент для селекції сої на стійкість до ВМС.

З метою виявлення гена 3gG2 (локус *Rsv1*) та оцінки його ефективності, як детермінанти стійкості до місцевих ізолятів ВМС, ми провели скринінг сортів сої, що за польових умов характеризувалися різною фенотипною реакцією рослин на інфікування даним вірусом. Крім того, спробували обгрунтувати можливість використання генспецифічних молекулярних маркерів у селекційному процесі, спрямованому на створення сортів сої, стійких до вірусних хвороб.

Польові досліди проводили на базі Вінницького національного аграрного університету. Територія дослідного поля за характером природних умов (клімату, рельєфу місцевості, поширених грунтів) належить до центральної підзони Правобережного Лісостепу. Оцінювали сприйнятливість до ураження ВМС 18 придатних до поширення на території України сортів сої (*Glycine max* (L.) Merr.) та одного колекційного зразка дикої усурійської сої (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) в умовах високого природного інфекційного фону, враховуючи симптоми насіннєвої вірусної інфекції. Залежно від генотипу прояв інфекції коливався від максимально виражених системних симптомів мозаїки та зморшкуватості до їх повної відсутності (рис. 1).

Молекулярно-біологічні дослідження виконували на кафедрі вірусології Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Детекцію ВМС у трійчастих листках се-

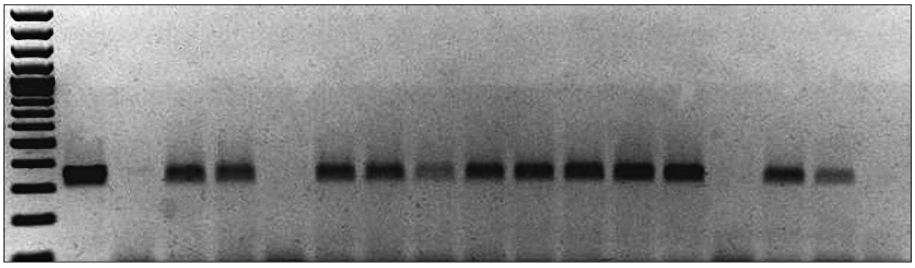

Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *3gG2* (локус *Rsv1*) з парою праймерів *Rsv1*-f/-r. *1* — маркер 100 п. н.; *2* — Marshall; *3* — Фарватер; *4* — Луна; *5* — Полтава; *6* — Антошка; *7* — Поема; 8 — Ірина; *9* — Смуглянка; *10* — Предатор; *11* — Антарес; *12* — Сула; *13* — Срібна; *14* — Ентерпрайз; *15* — Колбі; *16* — Ки-Він; *17* — Галіна; *18* — V94–5152

реднього ярусу дослідних рослин, відібраних на стадії "цвітіння–бобоутворення", проводили методом прямого імуноферментного аналізу в модифікації "сендвіч", використовуючи специфічні до даного вірусу IgG ("Loewe", Німеччина) [13]. ДНК виділяли з семидобових проростків сої стандартним CTAB-методом [14]. Полімеразну ланцюгову реакцію здійснювали за стандартною методикою з парою генспецифічних (3gG2) праймерів *Rsv1-f* (TCC TAC AAA TTC TTT CAC GCT C) та *Rsv1-r* (GGC ACT ATA AAT TGT TTA ACT A) при температурі обпалення 50 °C [12]. Отримані продукти ампліфікації розділяли в 2% агарозному гелі та візуалізували за допомогою бромистого етидію. За результатами електрофорезу визначали наявність чи відсутність амплікону (*Rsv1-f/r*) розміром 362 п. н. (рис. 2). Як контроль використовували такі марковані сорти сої іноземної селекції, як Masshall (*Rsv1m*) та V94–5152 (*Rsv4*).

Базуючись на отриманих даних щодо реакції рослин різних сортів на інфікування ВМС, наявності антигену ВМС та результатах молекулярно-генетичного скринінгу (табл. 1), ми виділили такі чотири групи генотипів: перша — сприйнятлива реакція рослин на ураження ВМС та наявність генспецифічного фрагмента *Rsv1-f/r* (сорти Луна, Поема, Таврія, Ентерпрайз, Антарес, Предатор, Полтава); друга — сприйнятлива реакція рослин на ураження ВМС та відсутність фрагмента *Rsv1-f/r* (сорт Фарватер, *Glycine soja* № 67/08); третя — нечутливість рослин до ураження ВМС та наявність фрагмента *Rsv1-f/r* (сорти Горлиця, Подільська 1, Сула, Срібна Рута, Смуглянка, Ірина, Ки-Він, Галіна); четверта — нечутливість рослин до ураження ВМС та відсутність фрагмента *Rsv1-f/r* (сорти Антошка, Колбі).

Отже, серед досліджуваних сортів сої, що містять специфічний фрагмент *Rsv1-f/r* в локусі *Rsv1* (перша та третя генотипні групи), виявилися як стійкі, так і сприйнятливі до ураження місцевими штамами ВМС. Такі результати свідчать на користь того, що локус *Rsv1* (ген 3gG2), незважаючи на наявність фрагмента *Rsv1*-f/r, може мати структурну (ендогенну) мінливість, тобто виявляти алельний поліморфізм за стійкістю до ВМС. Неоднозначний прояв реакції на ураження певним визначеним штамом ВМС серед сортів сої, що містили фрагмент *Rsv1*-f/r, відмітили й американські науковці [12]. Сорти другої генотипної групи не мають жодного ефективного генетичного фактора стійкості до місцевих штамів ВМС і, відповідно, не несуть специфічний маркер *Rsv1-f/r*, що не заперечує наявності рецесивного алеля *Rsv1.* Натомість, сорти третьої генотипної групи можуть нести як відмінні від першої групи генотипів алелі локусу *Rsv1*, так і додаткові генетичні детермінанти стійкості в інших локусах (*Rsv3, Rsv4*), що забезпечує надійний множинний захист рослин від вірусної

Таблиця 1. Тестування реакції рослин різних генотипів сої на природне інфікування ВМС

Генотип	Країна походження	Симптоми	ІФА, $E_{405нм}$	Плямистість насіння	*Rsv1-f/r*
Полтава	Україна	СС	$1,398 \pm 0,087$	1	+
Предатор	Сербія	СС	$1,568 \pm 0,012$	3	+
Смуглянка	Україна	БС	$0,055 \pm 0,004$	3	+
Антарес	Україна	СС	$1,249 \pm 0,131$	1	+
Ентерпрайз	Канада	БС	$1,152 \pm 0,087$	3	+
Луна	Сербія	СС	$1,346 \pm 0,099$	3	+
Поема	Сербія	СС	$1,386 \pm 0,080$	2	+
Таврія	Сербія	СС	$1,626 \pm 0,149$	2	+
Подільська 1	Україна	БС	$0,054 \pm 0,002$	0	+
Горлиця	Україна	БС	$0,058 \pm 0,003$	0	+
Сула	Сербія	БС	$0,058 \pm 0,001$	0	+
Срібна Рута	Україна	БС	$0,055 \pm 0,002$	0	+
Ірина	Сербія	БС	$0,064 \pm 0,039$	0	+
Ки-Він	Україна	БС	$0,049 \pm 0,003$	0	+
Галіна	Сербія	БС	$0,050 \pm 0,005$	0	+
Фарватер	Україна	БС	$0,811 \pm 0,244$	3	—
Антошка	Україна	БС	$0,050 \pm 0,005$	0	—
Колбі	Канада	БС	$0,052 \pm 0,001$	1	—
Glycine soja №67/08	Росія	СС	$1,667 \pm 0,083$	чорне	—

Примітка. Позначення симптомів: БС — безсимптомна реакція; СС — системні симптоми. Значення $E_{405нм}$ в контрольних зразках: негативний — $0,049 \pm 0,001$; позитивний — $1,889 \pm 0,100$. Плямистість насіннєвої шкірки: 0 — без плямистості; 1, 2, 3 — різні рівні плямистості, у міру зростання. Наявність чи відсутність фрагмента *Rsv1-f/r*: + або – відповідно.

інфекції. Очевидно, генотипи четвертої групи є носіями алелей вірусостійкості локусів *Rsv3, Rsv4* або нових алелей (генів) локусу *Rsv1*, які не виявляються даною молекулярно-маркерною системою, зокрема, *Rsv1-y* та *Rsv1-k*$^{-}$ [12]. Ширше розкриття цих питань є завданням наших подальших генетико-вірусологічних досліджень.

Таким чином, реалізований у наших дослідженнях молекулярно-маркерний підхід генотипної оцінки та добору за вірусостійкістю сої значно доповнює та підвищує ефективність класичних фітовірусологічних підходів. Виявлені нами стійкі сорти сої (Горлиця, Подільська 1, Сула, Срібна Рута, Ірина, Ки-Він, Галіна, Антошка, Колбі), що належать до третьої і четвертої генотипних груп, є перспективними з позицій як впровадження їх у сучасне прогресивне виробництво, так і використання в селекційному процесі як геноносіїв стійкості до ВМС.

1. *Лещенко А. К., Сичкарь В. И., Михайлов В. Г., Марьюшкин В. Ф.* Ботаническая и биологическая характеристика культурной сои и ее диких сородичей // Соя. – Київ: Наук. думка, 1987. – С. 17–32.
2. *Chen P., Choi C. W.* Soybean mosaic virus // Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses. – Texas: Studium Press, 2006. – P. 389–422.
3. *Московець С. М., Краєв В. Г., Порембська Н. Б., Білик Л. Г.* Віруси і вірусні хвороби бобових культур на Україні. – Київ: Наук. думка, 1971. – 136 с.
4. *Li K., Yang Q. H., Zhi H. J., Gai J. Y.* Identification and distribution of Soybean mosaic virus strains in Southern China // Plant Dis. – 2010. – **94**, No 4. – P. 351–357.
5. *Cho E. K., Goodman R. M.* Strains of soybean mosaic virus: classification based on virulence in resistant soybean cultivars // Phytopathology. – 1979. – **69**, No 5. – P. 467–470.
6. *Choi B. K., Koo J. M., Ahn H. J.* Emergence of Rsv-resistance breaking soybeanmosaic virus isolates from Korean soybean cultivars // Virus Res. – 2005. – **112**. – P. 42–51.

7. *Шерепітко Д. В., Злацька А. В.* Дослідження поліморфізму сортів сої (*Glycine max* (L.) Marril), придатних до поширення в Україні, за SSR-маркерами зчепленими з локусом *Rsv4*, що зумовлює стійкість до вірусу мозаїки сої // Зб. наук. праць "Фактори експериментальної еволюції організмів". – Київ: Логос, 2009. – С. 246–251.
8. *Бойко А. Л., Шерепітко Д. В., Шерепітко В. В.* Генотипні відмінності за вірусостійкістю сої // Вісн. аграр. науки. – 2005. – № 12. – С. 46–49.
9. *Shi A., Chen P., Li D. et al.* Pyramiding multiple genes for resistance to soybean mosaic virus in soybean using molecular markers // Mol. Breed. – 2009. – **23**, No 1. – P. 113–124.
10. *Hwang T. Y., Yu S., Yang K. et al.* Application of comparative genomics in developing molecular markers tightly linked to the virus resistance gene *Rsv4* in soybean // Genome. – 2006. – **49**, No 4. – P. 380–388.
11. *Hayes A. J., Jeong S. C., Gore M. A. et al.* Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to soybean mosaic virus in soybeans // Genetics. – 2004. – **166**. – P. 493–503.
12. *Shi A., Chen P., Zheng C. et al.* A PCR-based Marker for the *Rsv1* Locus Conferring Resistance to Soybean Mosaic Virus // Crop Sci. – 2008. – **48**, No 1. – P. 262–268.
13. *Гнутова Р. В.* Серология и иммунохимия вирусов растений. – Москва: Наука, 1999. – 138 с.
14. *Keim P., Olson T. C., Shoemaker R. C.* A rapid protocol for isolating soybean DNA // Soybean Genet. Newsl. – 1988. – **15**. – P. 150–152.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Вінницький національний аграрний університет

Надійшло до редакції 10.02.2011

D. V. Sherepitko, V. V. Sherepitko,
Academician of the NAAS of Ukraine **A. L. Boyko**

Evaluation of the *Rsv1* locus as a determinant of the resistance of soybean mosaic virus to local strains

Genotypic differentiation by the resistance to SMV (soybean mosaic virus) under environmental conditions of the Vinnytsya region has been investigated in soybean (Glycine max (L.) Merr.; Glycine soja Sieb. and Zucc.). Among cultivars that contain Rsv1-f/r fragment (3gG2 gene) at Rsv1 locus, those resistant and susceptible to the local strains of SMV are found. Virus-resistant soybeans (Gorlytsia, Podilska1, Sula, Irina, Galina, Antoshka, and Colbi) perspective for the commercial use and as a breeding material are revealed. Suitability of the gene-specific molecular marker application in national breeding programs for the making soybean resistant to virus is shown.