

УДК 780.1

## ДЕТЕКЦІЯ ФІТОВІРУСІВ В МОХАХ ТА РОСЛИНАХ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* В РАЙОНІ АРГЕНТИНСЬКИХ ОСТРОВІВ

І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко, Є.С. Шитіков, С.В. Олійник, В.П. Поліщук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Володимирська, 64,  
e-mail: virus@bioc.unic.kiev.ua

Реферат. Зважаючи на актуальність вивчення вірусів рослин в Антарктиді, метою даної роботи було дослідити різноманітність та розповсюдженість фітовірусів серед вищих та нижчих рослин, які є ендемічними для району Аргентинських островів. Було досліджено зразки рослин з антарктичної станції Академік Вернадський та найближчих островів архіпелагу (Петерманн, Ялур, Скуа, В'єнке, Вінтер, Барселот) та мису Расмунсен, за допомогою імуноферментного аналізу на наявність антигенів фітовірусів, таких як вірус картопляної мозаїки, вірус зелені крапчатої мозаїки огірка, X-вірус картоплі, вірус огіркової мозаїки, вірус мозаїки люцерни та вірус плямистого зів'янення томатів. В зразках рослин *Deschampsia antarctica* та мохах родів *Barbilophozia* та *Polytrichum* нами були детектовані антигени вірусів, які належать до різних таксономічних груп, а саме вірус картопляної мозаїки (*Tobamovirus*), вірус зелені крапчатої мозаїки огірка (*Tobamovirus*), вірус огіркової мозаїки (*Bromoviridae*, *Cucumovirus*) та вірус плямистого зів'янення томатів (*Bunyaviridae*, *Tospovirus*). Отримані результати свідчать про досить високу різноманітність антигенних детермінант вірусів рослин, які детектуються в Антарктиді.

Детектирование фитовирусов во мхах и растениях *Deschampsia antarctica* в районе Аргентинских островов. И.Г. Будзанивская, Т.П. Шевченко, Е.С. Шитиков, С.В. Олійник, В.П. Полищук

Реферат. В связи с актуальностью изучения вирусов растений в Антарктиде, целью данной работы было исследование разнообразия и распространения фитовирусов среди высших и низших растений, которые являются эндемичными для района Аргентинских островов. С помощью иммуноферментного анализа были исследованы образцы растений с антарктической станции Академик Вернадский и ближайших островов архипелага (Петерманн, Ялур, Скуа, В'єнке, Вінтер, Барселот) и мыса Расмунсен на наличие антигенов фитовирусов, таких как вирус табачной мозаики, вирус зеленой крапчатой мозаики огурца, X-вирус картофеля, вирус огуречной мозаики, вирус мозаики люцерны, вирус пятнистого увядания томатов. В растениях *Deschampsia antarctica* и мхах родов *Barbilophozia* и *Polytrichum* нами были детектированы антигены вирусов, которые относятся к разным таксономическим группам, а именно: вирус табачной мозаики (*Tobamovirus*), вирус зеленой крапчатой мозаики огурца (*Tobamovirus*), вирус огуречной мозаики (*Bromoviridae*, *Cucumovirus*) и вирус пятнистого увядания томатов (*Bunyaviridae*, *Tospovirus*). Полученные результаты показывают достаточно большое разнообразие антигенов вирусов растений, обнаруживаемых в Антарктиде.

Detection of Plant Viruses in Mosses and Higher plants *Deschampsia antarctica* in the Region of Argentina Islands in Antarctica by I.G. Budzanivska, T.P. Shevchenko, E.S. Shytikov, S.V. Olijnyk, V.P. Polishchuk

Abstract. Due to the importance of the plant virus research in Antarctica, the aim of this work was to investigate the diversity and spreading of phytoviruses among higher and elementary plants which are endemic to the region of Argentina Islands. Deploying indirect and sandwich ELISA, we analyzed plant samples from Academician Vernadskiy and the biggest islands of archipelago including Petermann, Jalour, Skua, Wienke, Winter, Berthelot, and cape Rasmussen, for the presence of phytoviruses' antigens. Among the viruses tested were Tobacco mosaic virus, Cucumber green mottle mosaic virus, Potato virus X, Cucumber mosaic virus, Alfalfa mosaic virus, and Tomato spotted wilt virus. Our study revealed antigens of viruses belonging to various taxonomic groups in *Deschampsia antarctica* plants and mosses from *Barbilophozia* and *Polytrichum* genera. Tobacco mosaic virus and Cucumber green mottle mosaic virus (*Tobamovirus*), Cucumber mosaic virus (*Bromoviridae*, *Cucumovirus*), and Tomato spotted wilt virus (*Bunyaviridae*, *Tospovirus*) have been detected in the samples. The obtained data allow to state a comparative diversity of plant viruses found in Antarctica.

Key words: plant virus, *Deschampsia antarctica*, Argentina Islands.

### 1. Вступ

Віруси та вірусні захворювання розповсюджені по всій земній кулі. Неважко припустити, що і на Антарктичному континенті ці патогени можуть бути представлені досить різноманітно.

Останнім часом в Антарктиді ведуться дослідження розповсюдженості вірусних захворювань серед тварин, основним місцем життя яких є субантарктичний регіон та прибережна зона. Досліджуються вірусні захворювання птахів Антарктиди, в тому числі пінгвінів та чайок, захворювання тюленів тощо. На Антарктичних станціях ведуться дослідження, які демонструють розповсюдженість респіраторних захворювань у робітників станцій (віруси грипу та парагрипу). Проте поширеність вірусів серед представників рослинного світу Антарктичного континенту та субантарктичної зони майже не досліджена.

Оскільки Антарктида являє собою малозаселений континент та в різний час знаходилась в різних широтах, вона може розглядатися як модельна система при вивченні еволюційних процесів, у тому числі еволюції мікроорганізмів та вірусів, і являє собою, фактично, плацдарм для різноманітних досліджень. Виходячи з цього актуальними є детальні дослідження різноманітності вірусів рослин в екстремальних умовах.

В той же час, Антарктида все частіше розглядається як об'єкт туристичної активності. Туристичні маршрути проходять все ближче до субантарктичних вод, прибережної та берегової зони. Підвищений інтерес до Антарктиди як до туристичного об'єкту може мати певний зв'язок з розповсюдженістю інфекційних захворювань. І хоча на сьогоднішній день цей вплив є невеликим, подальша активізація туризму може суттєво вплинути на природні процеси в Антарктиді, що, в свою чергу, вимагає моніторингу в тому числі і фітовірусних інфекцій, які можуть бути занесені людиною.

На субантарктичному острові Маккуарі був виявлений новий вірус рослин. Цей вірус уражує рослини *Stilbocarpa polaris* і являє собою бациловидний вірус роду *Badnavirus*. Це був перший вірус, знайдений на найбільш південних островах, який уражує судинні рослини. Вірус викликає жовту мозаїку з суворими та помірними симптомами. Вектором для цього вірусу може бути попелиця (Skotnicki et al., 2002).

При дослідженні льоду з глибоких шарів вічної мерзлоти за допомогою полімеразної ланцюгової реакції дослідники із Сполучених Штатів виявили наявність генетичного матеріалу вірусу з тобамогрупи, а саме вірусу мозаїки томатів (ToMV). При дослідженні зразків також були виявлені гени, які належать окремим мікроскопічним грибам та бактеріям (Moss et al., 1988; Short and Suttle, 2002; Rogers et al., 2004).

Спільні дослідження вчених з університету з Британської Колумбії та Канади показали наявність у зразках води, яка була відібрана з Тихого океану біля берегів Антарктиди, вірусу водоростей, що належить до родини *Phycodnaviridae*. Також за допомогою полімеразної ланцюгової реакції були виявлені послідовності генів, які споріднені з генами вірусів родин *Baculo-* та *Herpesviridae*, та роду *Prymnesiovirus* (Smith et al., 1992; Bird et al., 1993; Castello et al., 1999).

Зважаючи на актуальність вивчення вірусів рослин в Антарктиді, метою даної роботи було дослідити різноманітність та розповсюдженість фітовірусів серед вищих та нижчих рослин, які є ендемічними для району Аргентинських островів.

## 2. Матеріали та методи досліджень

Нами було досліджено зразки вищих та нижчих рослин з антарктичної станції Академія Вернадський та найближчих островів архіпелагу, таких як Петерманн, Ялур, Скуа, В'єнке Вінтер, Барселот, та мису Расмунсен. Зразки відбиралися в трьох повторностях з кожної точки.

Детекція антигенів вірусів проводилась за допомогою непрямого імуоферментного аналізу та сендвіч-ELISA за загальноприйнятими методиками (Hill, 1984; Методы, 1991; ELISA, 1995). В дослідях використовувались поліклональні кролячі антитіла до вірусу попонової мозаїки (ВТМ) та до вірусу зеленої крапчатої мозаїки огірка, отриманої на кафедрі вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка, та тест-системи до Х-вірусу картоплі (ХВК), вірусу огіркової мозаїки (ВОМ), вірусу мозаїки люцерни (ВМЛ) вірусу плямистого зв'язання томатів (ВПЗТ) (Ashersleben, Німеччина).

Для статистичної достовірності аналіз кожної проби проводився у 3-х повторях. Статистична обробка даних, отриманих при проведенні імуноферментного аналізу, проводилася з урахуванням стандартного відхилення (Лакин, 1980):

$$E = \bar{E} \pm \sigma$$

$$\bar{E} = (E_1 + E_2 + \dots + E_i) / i$$

$$\Sigma = |\bar{E}_{\max} - E| = |\bar{E}_{\min} - \bar{E}|,$$

де  $E$  – достовірне значення екстинкції;  $\bar{E}$  – середнє арифметичне виміряних значень екстинкції  $E_1 \dots E_i$ ;  $\sigma$  – стандартне відхилення.

### 3. Результати та обговорення

Першим етапом нашої роботи було визначення ВТМ у зразках моху, привезених з Антарктиди у 2004 році за допомогою імуноферментного аналізу.

Для цього було відібрано тринадцять зразків моху родів *Polytrichum*, *Plagiategium*, *Sanionia*, *Barbilophozia*. Зразки були відібрані у межах станцій 34–41, островів Скуа, В'єнке, В'інтер та з території Барханів 1 та 2.

Для проведення дослідження була відібрана наважка 1 г кожного із зразків. Зразки гомогенізувались у ступці з 2 мл фосфатно – сольового буферу рН 7,4 (PBS). Після гомогенізації зразки центрифугувались при 5000 обертах за хвилину 20 хв. Зразки аналізувались з використанням поліклональної сироватки до ВТМ, отриманої на кафедрі вірусології КНУ на ІФА-рідері фірми Dynatech. Результати аналізів представлені на рис. 1.

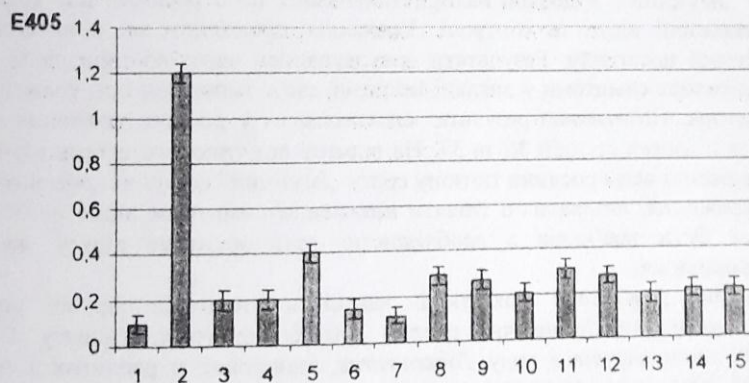


Рис 1. Результати визначення ВТМ у зразках мохів за допомогою імуноферментного аналізу: 1 – негативний контроль; 2 – позитивний контроль; 3 – о. Бархани 1; 4 – о. Бархани 2; 5 – о. В'інтер; 6 – о. В'єнке; 7 – о. Скуа; 8 – станція 34; 9 – станція 35; 10 – станція 36; 11 – станція 37; 12 – станція 38; 13 – станція 39; 14 – станція 40; 15 – станція 41.

Як видно з рисунку, антиген вірусу потпонової мозаїки виявлено у зразках моху, відібраного в точці Бархани 2 та у зразках із станції 36 та 37 (оптичне поглинання більше ніж втричі перевищує негативний контроль). У всіх інших зразках позитивний результат не спостерігався. Отримані результати можуть свідчити про те, що рослини родів *Polytrichum* (Бархани 2, станція 37) та *Barbilophozia* (станція 36) містять антиген вірусу потпонової мозаїки або серологічно спорідненого з ним вірусу.

Також ми проводили визначення вірусу зеленої крапчатої мозаїки огірка. Для проведення дослідів були використані зразки, аналогічні до аналізів на ВТМ. З рис. 2 зрозуміло, що позитивний результат спостерігається у зразку моху *Polytrichum* із Барханів 2,

який більше ніж втричі перевищує негативний контроль. У всіх інших зразках антигенні детермінанти ВЗКМО не детектувалися. Отже ВЗКМО, або споріднений з ним вірус виявляється в рослинах роду *Polytrichum* з Антарктичного континенту.

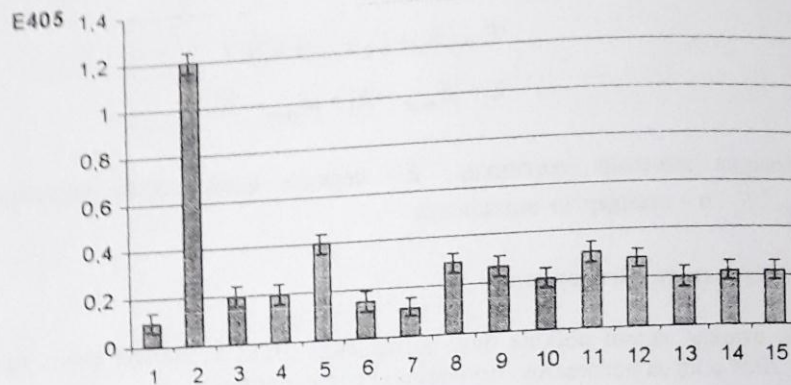


Рис 2. Результати визначення ВЗКМО у зразках мохів за допомогою імуноферментного аналізу: 1 – негативний контроль; 2 – позитивний контроль; 3 – о. Вінтер; 4 – о. Бархани 1; 5 – о. Бархани 2; 6 – о. В'єнке; 7 – о. Скуа; 8 – станція 34; 9 – станція 35; 10 – станція 36; 11 – станція 37; 12 – станція 38; 13 – станція 39; 14 – станція 40; 15 – станція 41.

Для перевірки інфекційності вірусу тютюнової мозаїки, який був виявлений за допомогою імуноферментного аналізу, нами був використаний метод рослин-індикаторів. Для постановки цього досліду як рослина-індикатора нами був використаний тютюн *Nicotiana tabacum* сорту „Імунний”. У досліді використовувалися по 3 рослини для кожного зразку в якому був виявлений вірус та контролі. Ураження проводили за допомогою механічної інокуляції листової пластинки. Результати враховувались через 45 днів після зараження. У рослин спостерігались симптоми у вигляді некрозів, що є типовими при ураженні ВТМ даної рослини-індикатора. Позитивний результат спостерігався у рослин, уражених інокуломом з мохів, які росли в межах станцій 36 та 37. На відміну від типового штаму вірусу тютюнової мозаїки, при ураженні яким рослини тютюну сорту „Імунний” дають некротичну реакцію на 5-7 день після ураження, антарктичні ізоляти викликали симптоми лише на 30-й день. Така затримка може бути пов'язана з необхідністю пристосування вірусу до нових умов оточуючого середовища.

Представлені результати показують наявність антигенів вірусів рослин з роду *Tobamovirus* у представників нижчих рослин Антарктичного континенту. В літературних джерелах даних щодо вірусів з роду *Tobamovirus*, виявлених в рослинах з Антарктиди, не зустрічались. У 2005 році після 10-ї Української Антарктичної експедиції були привезені рослини *Deschampsia antarctica* з островів Ялур, Петерманн, Барселот, Галіндез та мис Расмунсен. У цих зразках визначалися ВТМ, ВЗКМО, ХВК, ВОМ, ВМЛ, ВПЗТ.

Отримані результати можуть свідчити про те, що у рослинах *Deschampsia antarctica* острова Барселот виявляється вірус зеленої крапчатої мозаїки огірка або споріднений з ним вірус (рис 3).

Найбільш цікавими виявилися результати тестування рослин *Deschampsia antarctica* на наявність антигенів вірусу огіркової мозаїки, вірусу мозаїки люцерни та вірусу плямистої мозаїки томатів. З рис. 4 можна побачити, що позитивна реакція на ВОМ спостерігається у зразках з островів Ялур, Галіндез та Барселот. У визначених зразках позитивний результат більше ніж втричі перевищує негативний контроль.

Також позитивний результат ІФА спостерігався у всіх досліджуваних зразках при детекції ВПЗТ. Вірус мозаїки люцерни в рослинах *Deschampsia antarctica* не виявлено.

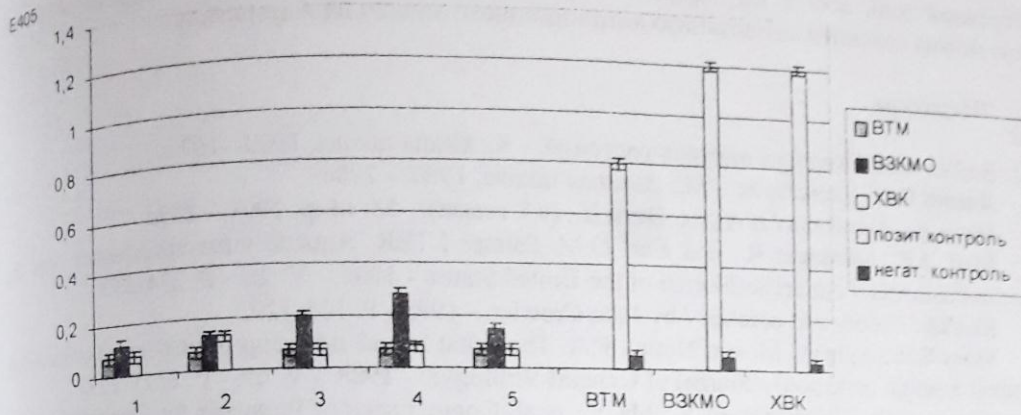


Рис 3. Детекція BTM, ВЗКМО та ХВК у зразках рослин *Deschampsia antarctica* за допомогою імуноферментного аналізу. 1 – о. Ялур №4; 2 – о. Петермани; 3 – о. Расмунсен; 4 – о. Барселот; 5 – о. Галіндез.

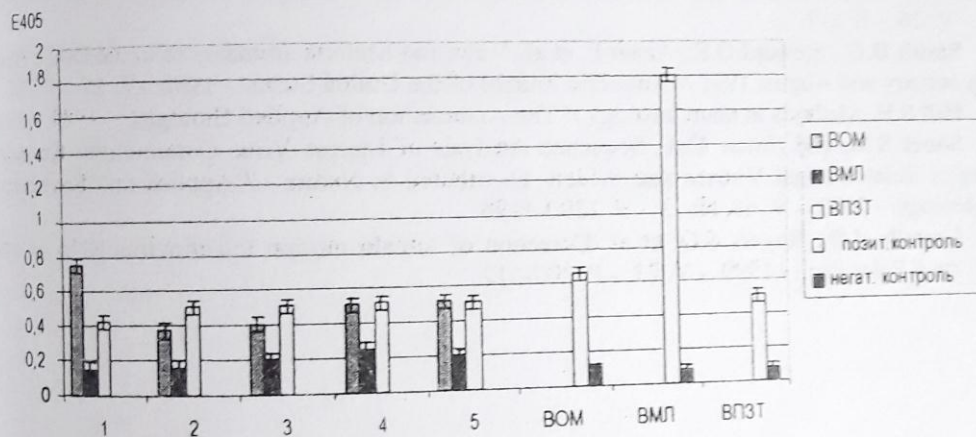


Рис 4. Детекція ВОМ, ВМЛ, та ВПЗТ у зразках рослин *Deschampsia antarctica* за допомогою імуноферментного аналізу. 1 – о. Ялур №4; 2 – о. Петерманн; 3 – о. Расмунсен; 4 – о. Барселот; 5 – о. Галіндез.

Отримані результати свідчать про наявність у рослинах *Deschampsia antarctica* з островів Ялур, Галіндез та Барселот антигенних детермінант вірусу огіркової мозаїки (або серологічно спорідненого з ним) та вірусу плямистого зів'янення томатів у зразках з островів Ялур, Петерманн, Рамунсен, Барселот, Галіндез.

В подальшому ми плануємо перевірити інфекційність вірусів, детектованих у зразках *Deschampsia antarctica*, на модельних рослинах.

Таким чином, в зразках рослин *Deschampsia antarctica* та мохах родів *Barbilophozia* та *Polytrichum* нами були детектовані антигени вірусів, які належать до різних таксономічних груп, а саме вірус тютюнової мозаїки (*Tobamovirus*), вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка (*Tobamovirus*), вірус огіркової мозаїки (*Bromoviridae, Cucumovirus*) та вірус плямистого зів'янення томатів (*Bunyaviridae, Tospovirus*). Отримані результати свідчать про несподівано високу різноманітність антигенних детермінант вірусів рослин, які детектуються в Антарктиді. Проте, шляхи потрапляння цих вірусів можуть відрізнятися. Віруси могли потрапити в рослинні та періодично циркулювати серед рослин. Також ці віруси могли потрапити в рослинні популяції з глибоких шарів вічної мерзлоти, в яких вони довгий час зберігались (Бойко, 1990; Castello et al., 1999). Віруси могли бути занесені тваринами чи птахами, які живуть у

прибережній зоні, або ж мігруючими тваринами та птахами. З іншого боку, потрапляння вірусів можна пояснити активізацією антропогенного впливу на Антарктиду.

#### Література

- Бойко А.Л. Екологія вірусів рослин. - К.: Вища школа, 1990. - 167 с.
- Лакін Г.Ф. Біометрія. - М.: Вища школа, 1980. - 293 с.
- Методи. Антитела / под ред. Этти Д., (в 2 томах). - М: Мир, 1991. - 235 с.
- Bird D.F., Maranger R., and Karl D.M. Palmer LTER: Aquatic virus abundances near the Antarctic Peninsula // *Antarctic Journal of the United States*. - 1993. - V. 28. - P. 234-235.
- ELISA: Theory and practice / by John Crowler. - 1995 - P. 115-120.
- Moss S.R., Ayres C.M. and Nuttall P.A. The Great Island subgroup of tick-borne orbiviruses represents a single gene pool // *Journal of General Virology* - 1988. - V. 69. - P. 2721-2727.
- Rogers S.O., Theraisnathan V., Ma Y. et al. Comparisons of Protocols for Decontamination of Environmental Ice Samples for Biological and Molecular Examinations // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2004. - V. 70, No. 4. - P. 2540-2544.
- Skotnicki M.L., Selkirk, P.M., McBride, T.P. et al. The first subantarctic plant virus report: *Stilbocarpa* mosaic bacilliform badnavirus (SMBV) from Macquarie Island. // *Polar Biology*. - 2002. - V. 26. - P. 1-7.
- Smith D.C., Steward G.F., Azam F. et al. Virus and bacteria abundances in the Drake Passage during January and August 1991 // *Antarctic Journal of the United States*. - 1992. - V. 27. - P. 125-127.
- Hill S.H. Methods in plant virology // *The Association of Applied Biologists*. - 1984. - 235 p.
- Short S.M. and Suttle C.A. Sequence Analysis of Marine Virus Communities Reveals that Groups of Related Algal Viruses Are Widely Distributed in Nature // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2002. - V. 68, No. 3. - P. 1290-1296.
- Castello J.D., Rogers S.O. et al. Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice // *Polar Biol.* - 1999. - V. 22. - P. 207-212.