

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

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@biocc.univ.kiev.ua](mailto:virus@biocc.univ.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 УАС «академік Вернадський» та найближчих островів архіпелагу, таких як Піттерман, Ялур, Скуа, В'єнке, Вінтер, Барселот та мис Расмунсен за допомогою непрямого та сендвич імуноферментного аналізу на наявність антигенів фітовірусів, таких як вірус тютюнової мозаїки, вірус зеленої крапчатої мозаїки огірка, Х-вірус картоплі, вірус огіркової мозаїки, вірус мозаїки люцерни, 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 тютюнової мозаїки (*Tobamovirus*), вірус зеленої крапчатої мозаїки огірка (*Tobamovirus*), вірус огіркової мозаїки (*Bromoviridae*, *Cucumovirus*), вірус плямистого зів'янення томатів (*Bunyaviridae*, *Tospovirus*). Дані, отримані в результаті наших досліджень, свідчать про досить високу різноманітність антигенних детермінант вірусів рослин, які детектуються в Антарктиді.

**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. Были исследованы образцы растений с УАС «академик Вернадский» и наибольших островов архипелага, таких как Питтерман, Ялур, Скуа, Вьенке, Винтер, Барселот и мыс Расмунсен с помощью непрямого и сендвич иммуноферментного анализа на наличие антигенов фитовирусов, таких как вирус табачной мозаики, вирус зеленой крапчатой мозаики огурца, Х-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*), вирус пятнистого увядания томатов (*Bunyaviridae*, *Tospovirus*). Данные, полученные в результате наших исследований, показывают достаточно большое разнообразие антигенов вирусов растений, которые обнаруживаются в Антарктиде.

### DETECTION OF PLANT VIRUSES IN MOSSES AND HIGHER PLANTS *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* IN THE REGION OF ARGENTINA ISLANDS IN ANTARCTICA

**Abstract.** Counting on the importance of plant virus research in Antarctica, the purpose 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 UAS "Academician Vernadskiy" and the biggest islands of archipelago including Pitterman, Yalur, Skua, Wienke, Winter, Barselot, and cape Rassmunsen, 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:

#### Вступ

Віруси та вірусні захворювання розповсюджені по всій земній кулі. Неважко припустити, що і на Антарктичному континенті різноманітні віруси можуть бути досить розповсюджені.

Останнім часом в Антарктиді ведуться дослідження розповсюдженості певних 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, досліджуються захворювання тюленів тощо. На Антарктичних станціях ведуться дослідження, які показують розповсюдженість респіраторних захворювань людей, які працюють на цих станціях (віруси грипу та парагрипу).

Проте розповсюдженість вірусів серед рослинного світу Антарктичного континенту та субантарктичної зони малодосліджена.

Оскільки Антарктида являє собою малозаселений континент, та в різний час знаходилась в різних широтах, вона розглядається як модельна система при дослідженні еволюційних поцесів, у тому числі еволюції мікроорганізмів та вірусів і являє собою, фактично, плацдарм для різноманітних досліджень, тому різноманітність вірусів рослин в екстремальних умовах потребує детальних досліджень.

Антарктида все частіше розглядається як об'єкт туристичної активності. Туристичні маршрути проходять все ближче до суб-Антарктичних вод, прибережної та берегової зони. Підвищений інтерес до Антарктиди як до туристичного об'єкту накладає певний відбиток на розповсюдженість інфекційних захворювань. І хоча на сьогоднішній день цей вплив є невеликим, проте 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* (SMBV). Це був перший вірус, знайдений на найбільш південних островах, який уражує судинні рослини. Вірус викликає жовту мозаїку з тяжкими та помірними симптомами. Вектором для цього вірусу може бути попелиця [7].

При дослідженні льоду з глибоких шарів вічної мерзлоти за допомогою полімеразної 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 ідентифікувались як гени деяких мікроскопічних грибів та бактерій [5,6,10].

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*. Дослідження проводились за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Також при проведенні цих досліджень були виявлені послідовності генів, які схожі на гени вірусів родин *Baculo-* та *Herpesviridae*, та роду *Prymnesiovirus* [3,8,11].

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

### **Матеріали та методи досліджень**

Нами було досліджено зразки вищих та нижчих рослин з УАС «академік Вернадський» та найближчих островів архіпелагу, таких як Піттерман, Ялур, мис Расмунсен, Скуа, В'енке, Вінтер та Барселот.

Детекція антигенів вірусів проводилась за допомогою непрямого та сендвіч-імуноферментного аналізу за загальноприйнятими методиками [2,4,9]. В досліджах використовувались поліклональні кролячі антитіла до вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) та до вірусу зеленої крапчатої мозаїки огірка, отриманої на кафедрі вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка, та тест-системи проти Х вірусу картоплі

(ХВК), вірусу огіркової мозаїки (ВОМ), вірусу мозаїки люцерни (ВМЛ), вірусу плямистого зів'янення томатів (ВПЗТ) (Assersleben, Німеччина).

Для статистичної достовірності аналіз кожної проби проводився у 3 – х повторях.

Статистична обробка даних, отриманих при проведенні імуноферментного аналізу, проводилася з врахуванням стандартного відхилення [ 1]:

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

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

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

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

### Результати та обговорення

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

Для постановки цього дослідження ми відібрали тринадцять зразків моху родів *Politrichum*, *Plagiatecium*, *Sanionia*, *Barbilophozia*, привезених з Антарктиди. Зразки були відібрані у межах станцій 34 – 41, островів Скуа, В'єнке, Вінтер та з території Барханів 1 та 2.

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

Результати аналізів представлені на рисунку 1.

Як видно з рисунку, антиген вірусу тютюнової 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 у зразках моху роду *Poyitrichum* (Бархани 2), родів *Barbilophozia* (станція 36) та *Polytrichum* (станція 37) виявляється вірус тютюнової мозаїки або серологічно споріднений з ним вірус.

Також ми проводили визначення вірусу зеленої крапчатої мозаїки огірка. Для проведення дослідження були використані зразки, аналогічні до аналізів на ВТМ.

Е 405

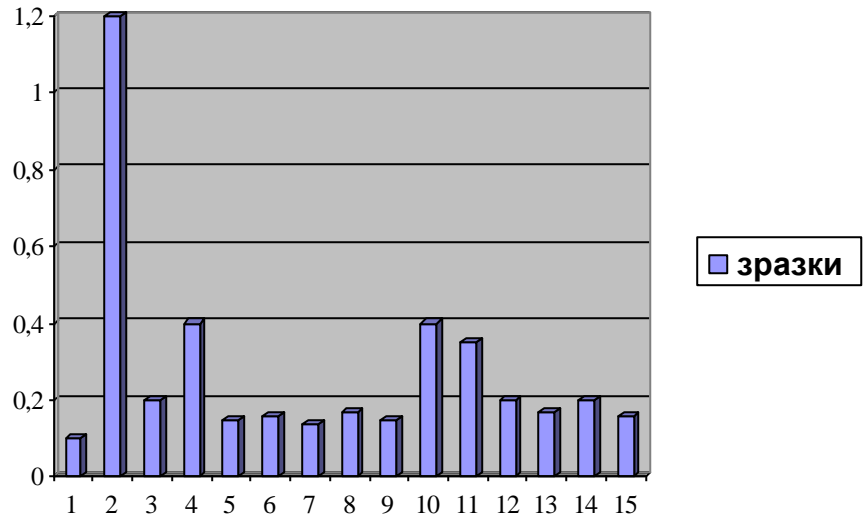


Рис 1. Результати визначення вірусу тютюнової мозаїки у зразках моху за допомогою імуноферментного аналізу.

1 – негативний контроль; 2 – позитивний контроль; 3 – Бархани 1; 4 – Бархани 2; 5 – о. Вінтер; 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.

Е 405

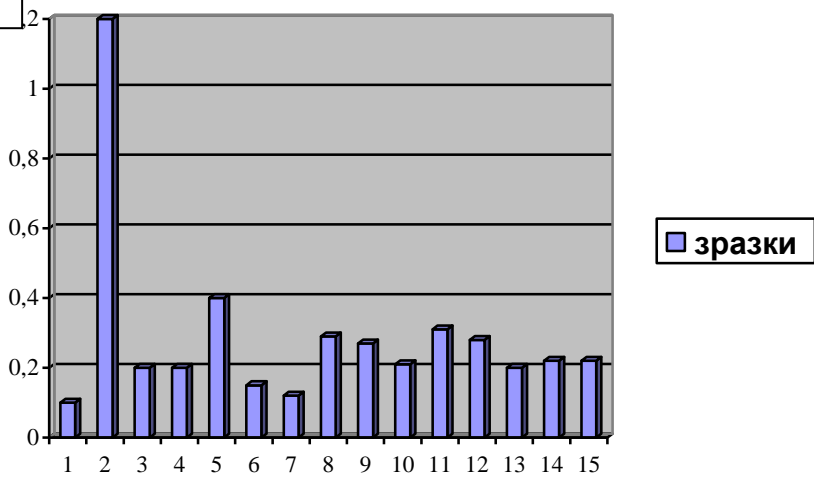


Рис 2. Результати визначення ВЗКМО у зразках моху з привезених з Антарктиди у 2004 році за допомогою імуноферментного аналізу.

1 – негативний контроль; 2 – позитивний контроль; 3 – о. Вінтер; 4 – Бархани 1; 5 – 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.

На рисунку 2 можна бачити, 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.

Отримані, результати можуть свідчити про те, що у зразку з Барханів 2 виявляється вірус зеленої крапчатої мозаїки огірка або антигенно споріднений з ним вірус.

Для перевірки інфекційності вірусу тютюнової мозаїки, який був виявлений за допомогою імуноферментного аналізу, нами був використаний метод рослин-індикаторів.

Для постановки цього дослідження у якості рослини індикатора нами був використаний тютюн сорту „Імунний”. Для дослідження було взято 12 рослин (по 3 рослини до кожного зразка, в якому був виявлений вірус) та контрольні рослини.

У кожній рослині був уражений 1 листок. Результати ураження враховувались через 45 днів після зараження. У рослин спостерігались симптоми у вигляді некрозів, що є типовими для ВТМ. Позитивний результат спостерігався у рослин, уражених інокулюмом 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, антарктичний штам викликав 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* в нижчих рослинах антарктичного континенту. В літературних джерелах даних про віруси з роду *Tobamovirus*, виявлені в рослинах з Антарктиди, не зустрічались.

У 2005 в результаті 10-ї Української Антарктичної експедиції були привезені рослини *Deschampsia Antarctica* з островів Ялур; Пітерман; Барселот, мису Расмунсен.

У цих зразках визначались віруси: ВТМ, ВЗКМО, ХВК, ВОМ, ВМЛ, ВПЗТ.

Результати представлені на рис. 3 та 4.

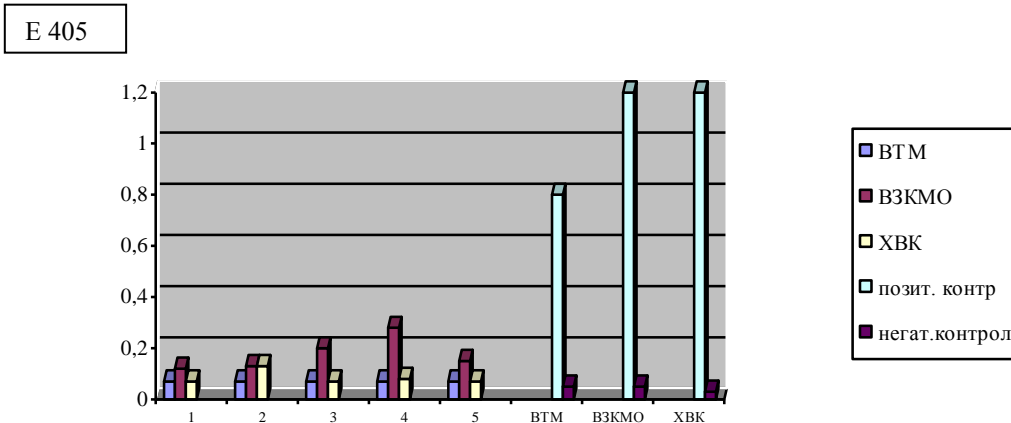


Рис 3. Визначення вірусів ВТМ, ВЗКМО та ХВК у зразках рослин привезених з Антарктиди у 2005 році за допомогою імуноферментного аналізу.

1 – Ялур №4; 2 – Пітерман; 3 – Рамунсен; 4 – Барселот; 5 – Ялур №3.

Отримані результати можуть свідчити про те, що у зразку Рамунсен виявляється вірус зеленої крапчатої мозаїки огірка або споріднений з ним вірус (рис.3).

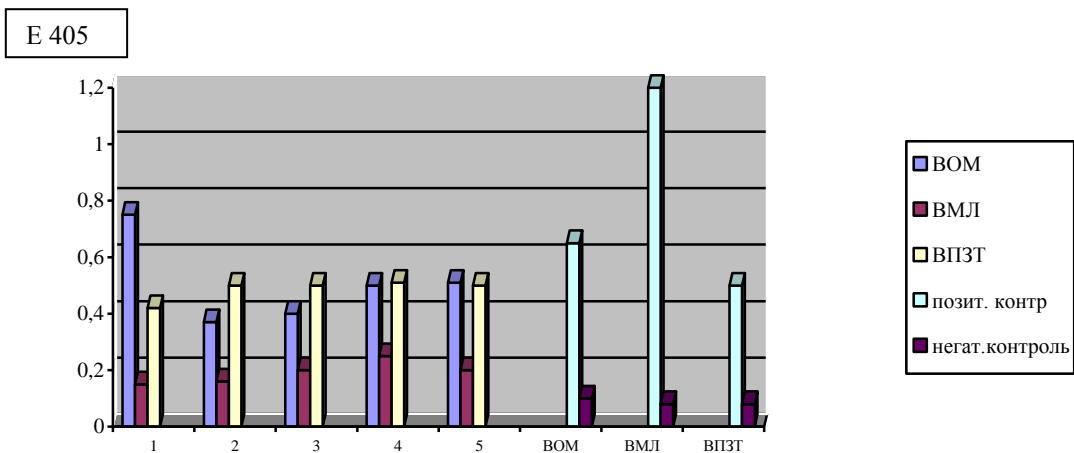


Рис 4. Визначення вірусів WOM, VML, та VPZT у зразках рослин привезених з Антарктиди у 2005 році за допомогою імуноферментного аналізу.

1 – Ялур №4; 2 – Пітерман; 3 – Рамунсен; 4 – Барселот; 5 – Ялур №3.

З рисунку 4 можна побачити, що позитивна реакція на WOM спостерігається у зразках з о. Ялур №4 та Барселот. У визначених зразках позитивний результат більше ніж втричі перевищує негативний контроль. Також позитивний результат більше ніж втричі перевищує негативний контроль у всіх зразках рослин, у яких визначався VPZT.

Отримані результати свідчать про наявність у зразках Ялур та Барселот антигенних детермінант вірусу огіркової мозаїки або серологічно спорідненого з ним; також ці результати свідчать про наявність вірусу плямистого зів'янення томатів або серологічно спорідненого з ним вірусу у зразках Ялур №4; Пітерман; Рамунсен; Барселот; Ялур №3. В продовження досліджень ми плануємо перевірити інфекційність детектованих вірусів 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 крапчатої мозаїки огірка (*Tobamovirus*), вірус огіркової мозаїки (*Bromoviridae, Cucumovirus*), вірус плямистого зів'янення томатів (*Bunyaviridae, Tospovirus*). Дані, отримані в результаті наших досліджень, свідчать про несподівано високу різноманітність антигенних детермінант вірусів рослин, які детектуються в Антарктиді. Проте шляхи, потрапляння цих вірусів можуть бути різними. Віруси можуть бути ендемічними, та періодично циркулювати серед рослин, також ці віруси могли потрапити в рослинні популяції з глибоких шарів вічної мерзлоти, в яких вони довгий час зберігались [2]. Віруси могли бути занесені тваринами чи птахами, які живуть у прибережній зоні чи мігруючими тваринами та птахами. Також потрапляння вірусів можна пояснити активізацією антропогенного впливу на Антарктиду.

## Список літератури

1. Лакин Г.Ф. Биометрия / М.: Высшая школа. – 1980. – 293с.
2. Методы. Антитела / под ред. Этти Д., (в 2 томах) –М: Мир -1991.-с.235.
3. Bird, D. F., R. Maranger, and D. M. Karl. Palmer LTER: Aquatic virus abundances near the Antarctic Peninsula. //Antarctic Journal of the United States. -1993.- V. 28.- P. 234-235.
4. ELISA: Theory and practice / by John Crowler, -1995 -P.115 – 120.
5. Moss SR, Ayres CM and Nuttall PA The Great Island subgroup of tick-borne orbiviruses represents a single gene pool //Journal of General Virology – 1988.- Vol 69. - P. 2721-2727.
6. Rogers S. O., Theraisnathan V., Ma Y. Zhao L. J., Zhang, G. Shin S.-G., Castello J. D., and Starmer W. T. Comparisons of Protocols for Decontamination of Environmental Ice Samples for Biological and Molecular Examinations //Applied and Environmental Microbiology -2004- Vol. 70.- No. 4- P. 2540-2544.
7. Skotnicki, M.L., Selkirk, P.M., McBride, T.P., Shaw, J., Kitajima, E., et al. The first subantarctic plant virus report: Stilbocarpa. mosaic bacilliform badnavirus (SMBV) from Macquarie Island. //Polar Biology - 2002 – V.26. – P. 1-7
8. Smith, D. C., G. F. Steward, F. Azam, and J. T. Hollibaugh. 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.
9. Stephen H. Hill Methods in plant virology /The Association of Applied Biologist.-1984 -P.235
10. Steven M. Short and Curtis A. Suttle Sequence Analysis of Marine Virus Communities Reveals that Groups of Related Algal Viruses Are Widely Distributed in Nature //Applied and Environmental Microbiology -2002.- Vol. 68.- No. 3.- P. 1290-1296.
11. Thomas and Dieckmann, Antarctic Sea Ice--a Habitat for Extremophiles, //Science - 2002.- V. 295.- P. 641-644.