

## **ПІДВИЩЕНА КОНЦЕНТРАЦІЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У ҐРУНТІ – ВЕЛИКИЙ РИЗИК РОЗВИТКУ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ РОСЛИН**

**Будзанівська І.Г.<sup>1</sup>, Поліщук В.П.<sup>2</sup>, Бойко А.Л.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут Агротехнології та біотехнології УААН,

вул. Метрологічна 12, м. Київ, Україна;

<sup>2</sup> Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, кафедра вірусології,

вул. Володимирська 64, м. Київ, 01033 Україна, E-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

Вплив хімічних речовин та елементів, які знаходяться в ґрунті природно та привносяться з техногенні викидами, добривами, фунгіцидами тощо, є досить вагомим фактором для виживання вірусів та їх вектор. Деякі хімічні речовини, які вносять як добрива на поля, можуть бути інгібіторами для зооспор вірусних вектор в експериментах *in vitro*. На даний час спостерігається значне збільшення рівня важких металів навколишньому середовищі. Серед хімічних елементів важкі метали найбільш токсичні для рослин. При цьому до надзвичайно токсичних відносять такі хімічні елементи: Co, Ni, Cu, Zn, Sn, As, Se, Te, Rb, Ag, Cd, Au, Hg, Sb, Bi, Pt [1]. Фітотоксичність важких металів залежить від їх хімічних властивостей: валентності, іонного радіусу та здатності до комплексоутворення. В більшості випадків елементи за ступенем їх токсичності розташовуються в послідовності [4]: Cu > Ni > Cd > Zn > Pd > Hg > Fe > Mo > Mn.

Підвищення концентрації важких металів може призводити до загальних, малоспецифічних фізіологічних та біохімічних змін рослин. Найбільш загальними проявами стресу, зумовленого надлишком важких металів, є пошкодження мембран, зміна активності ферментів, інгібування росту коренів. Зазначені порушення ведуть до вторинних ефектів, таких як гормональний дисбаланс, дефіцит необхідних елементів, пригнічення фотосинтезу, зміна водного режиму тощо, які, в свою чергу, прискорюють гальмування росту коренів і сповільнюють процеси росту рослин.

Останнім часом на агроценози все сильніше впливають різноманітні стреси як біотичної (наприклад, вірусні інфекції), так і абіотичної природи (наприклад, вплив важких металів). Причому найчастіше вони діють одночасно.

етою даної роботи було дослідження зв'язку між підвищенням концентрації важких металів у ґрунті та фітовірусних інфекцій культур в агроценозах України та тест-рослин в умовах моделювання.

### МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Обстежено три регіони України: Волинська область (Шацький національний парк); Київська область (Київський район); Харківська область (район Зміївської ДРЕС). Відібрані зразки сільськогосподарських та бур'янів досліджували за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) [12], електронної мікроскопії та логічних тестів [2]. У пробах ґрунту з орного шару визначали вміст важких металів за допомогою адсорбційної спектроскопії (ААС) [8].

Зразки ґрунту відбирали з полів вирощування різних сільськогосподарських культур (злакових, цукрового картоплі) та необроблюваних ділянок (заповідників, балок тощо) вагою від 200 г і більше в трьох яках з трьох точок методом рендомізованого польового експерименту та вносили в стерильний пакет. вносили на глибині 20 см.

Для детекції антигенів фітовірусів в ґрунті була розроблена методика спеціальної підготовки зразків.

Зібрані зразки ґрунту гомогенізували з 0,01М фосфатно-сольовим (рН 7,2-7,4) буферним розчином в апараті протягом ночі. Потім проводили виділення та очистку вірусу [6]. Частину отриманого матеріалу використовували для зараження рослин-індикаторів (частіше всього *Datura stramonium* та *Chenopodium album*), а іншу частину – для визначення наявності вірусів методом ІФА.

Рослини готували шляхом гомогенізації листкових пластинок в натрій-фосфатному буфері (рН 7,5) в співвідношенні 1 до 4 (маса:об'єм). Після гомогенізації зразки центрифугували. ІФА застосовували в форматі непрямий плашковий *dot*-ELISA на полістиролових плашках (Lab Systems) за загальноприйнятою методикою [1, 8]. Для діагностики використовували поліклональні кролячі сироватки (ПАТ). Інші антитіла використовували проти пероксидазою з хрину (баранячі) проти IgG кроля та кролячі проти IgG миші. В якості субстрату для реакції окиснення та забарвлювання використовували перекис водню та діамінобензидин.

Виконували також серію модельних експериментів по вивченню впливу важких металів на тест-рослини *tabacum*, *Datura stramonium* та на перебіг фітовірусної інфекції, викликані вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ) та Х-вірусом картоплі (ХВК).

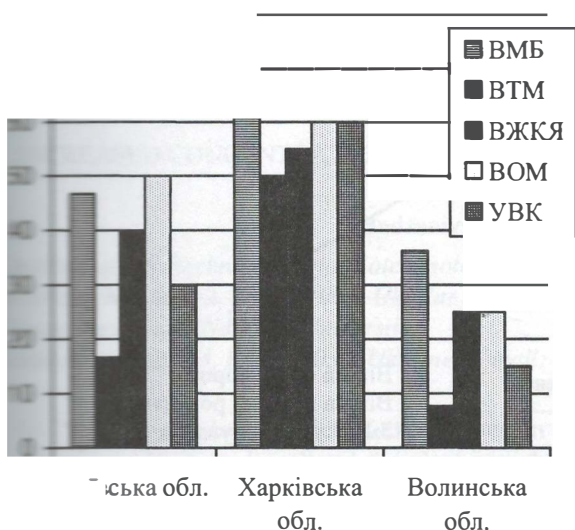
В першому випадку тест-рослини *Nicotiana tabacum*, висаджені в окремі горшечки, поливали розчинами важких металів ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), цинку ( $\text{ZnSO}_4$ ) та свинцю ( $\text{PbNO}_3$ ) до кінцевої концентрації в ґрунті відповідно 10,

а в другому випадку рослини поливали цими ж розчинами паралельно з вірусною інкуляцією (ВТМ) листкових пластинок. У третьому випадку рослини поливали звичайною водою та були інфіковані тим же вірусом. Четверта група рослин служила контролем. Всі рослини вирощували на стерильній ґрунтовій суміші: пісок - торф - ґрунт у співвідношенні 1:1:1.

Для тест-рослин *Datura stramonium* створювали аналогічні дослідні умови, однак вони були інкульовані відповідно ХВК. Поливання та інфікування рослин проводили паралельно. Дослід проводили в 4 повторностях.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені дослідження показали, що концентрації важких металів, таких як кадмій, нікель, свинець, мідь, цинк, у ґрунтах досліджених регіонів неоднакові. Так, за вмістом цих мікроелементів ґрунти Київської та Волинської областей майже не відрізнялися, в той час як ґрунти Харківської області характеризувалися їх значним вмістом, хоча ємність поглинання в Харківській та Київській областях практично однакова. Підвищений рівень важких металів у районі Зміївської ДРЕС (Харківський регіон) вочевидь пов'язаний з діяльністю потужної теплоелектростанції, в той час як агроценози Волині розташовані в зоні Національного парку. В обстежених агро- та природних ценозах Київської області значних антропогенних навантажень не спостерігали [6].



Результати обстеження агроценозів різних України на наявність антигенів вірусів

При аналізі результатів досліджень цих агроценозів на наявність вірусних антигенів виявлено, що найчастіше зустрічаються такі з них: ВТМ, вірус мозаїки буряку (ВМБ), вірус жовтої карликовості ячменю (ВЖКЯ), вірус огіркової мозаїки (ВОМ) та У-вірус картоплі (УВК) (рис. 1). На рисунку 2 показана поширеність цих самих вірусів у природних ценозах. Як і у випадку з важкими металами, адсорбція вірусних частинок такої залежить від властивостей ґрунту: його механічного складу, рН, гумусового горизонту тощо. Аналізуючи кількість вірусів, які виявляли у ґрунтах Волинської області, у порівнянні з Київською та Харківською, можна

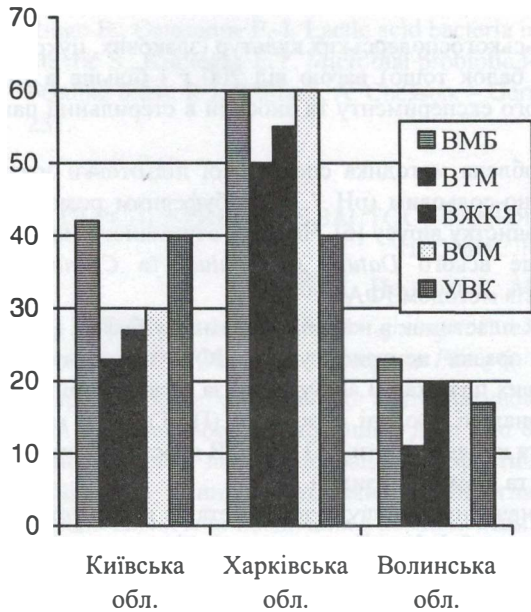


Рис. 2. Результати обстеження необроблюваних ділянок ландшафту різних регіонів України на наявність антигенів фітовірусів.

Було встановлено, що у рослин – контрольних та вирощених на ґрунті з важкими металами – вірусний антиген був відсутній. В той же час, в рослинах, попередньо інокульованих вірусом, вирощених як

зробити висновок про значно меншу концентрацію антигенів за рахунок як механічного складу, так і, можливо, відсутності антропогенного навантаження. Причому ця тенденція простежувалась як у випадку агроценозів, так і у випадку необроблюваних ділянок ландшафту. Концентрація антигенів вірусів у ґрунтах Харківської області у порівнянні з Київською значно вища, хоч механічний склад ґрунту та ємність поглинання в обох областях практично однакові.

У серії експериментів з модельними системами ВТМ - *Nicotiana tabacum* та ХВК - *Datura stramonium* аналізували всі варіанти вирощування рослин в ґрунті з різними концентраціями важких металів (мідь, свинець, цинк), розрахованих за показниками цих поліютантів Харківській області. Результати візуального обстеження показали, що контрольні рослини мали абсолютний нормальний, здоровий вигляд, тоді як рослини, вирощені на ґрунті з важкими металами, помітно відставали в рості. У рослин, уражених вірусом, через два тижні після зараження спостерігали симптоми перебігу вірусної інфекції (деформація листової пластинки, утворення енації, пожовтіння). Рослини, уражені вірусом, вирощені на ґрунті з поліютантами, найбільше відставали в рості, характеризувались появою симптомів вірусного ураження вже на 10-й день після інокуляції, тобто значно раніше, ніж у випадку без поліютантів та гинули на 20-й день дослідів.

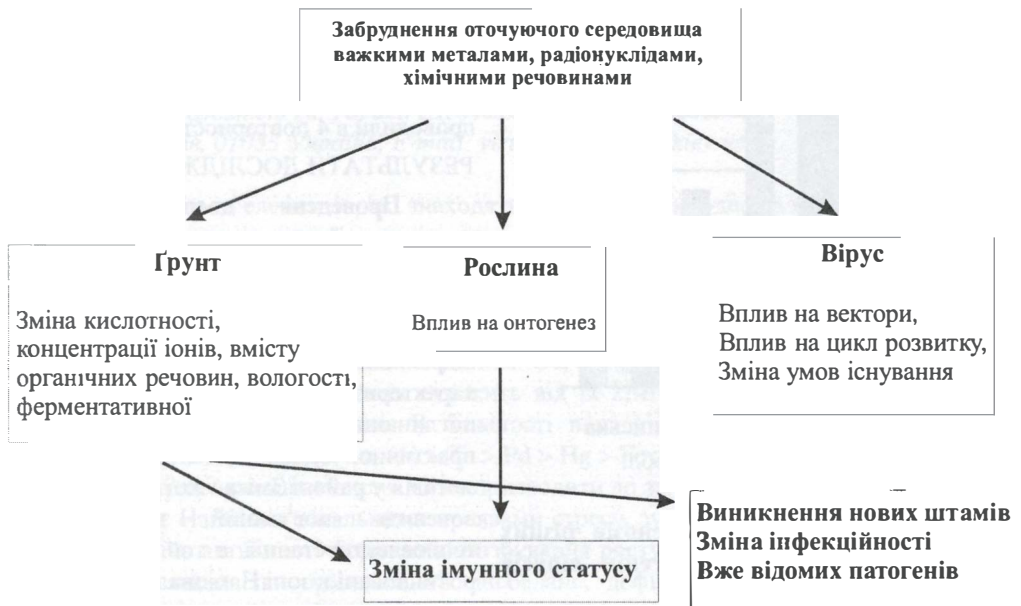


Рис. 3. Загальні закономірності впливу забруднення оточуючого середовища на віруси рослин.

поліютантами так і без них, вірусні антигени знаходили в значних кількостях. При цьому виявили, що у рослин, які вирощувалися на ґрунті без поліютантів, загальна концентрація вірусу була вищою, ніж у рослин, як

рошувалися на ґрунті з додаванням важких металів. Аналізуючи одержані результати, можна зробити висновок, що сумісна дія вірусів та важких металів призводить до погіршення фізіологічного стану рослин, що, знову ж таки, негативно відбивається на розвитку вірусної інфекції та загальній концентрації вірусів у рослині.

Вплив важких металів та вірусної інфекції на загальний вміст білка експериментальних рослин вивчали за допомогою [3, 7]. Показано, що у контрольних рослин і рослин, уражених вірусом, вміст сумарного білка вищий, ніж у дослідних рослин. При сукупній дії вірусної інфекції і важких металів, а саме міді і свинцю, кількість сумарного білка зменшувалась. Це є одним із доказів негативного впливу полютантів разом з вірусною інфекцією на ріст та розвиток рослин в процесі їх онтогенезу.

Зважаючи на отримані результати та відомі літературні дані [9-11], можна сформулювати деякі загальні висновки про вплив забруднення оточуючого середовища на віруси рослин (рис.3). Полютанти шляхом зміни кислотності, концентрації іонів металів, умісту органічних речовин, вологості та ферментативної активності, опосередковано впливають на онтогенез рослин, що призводить до зміни їх імунного статусу, порушення рівня взаємодії вірус-рослина і вірус-переносник або, безпосередньо, на самі вірусні частинки. При сукупній або поодинокій дії цих факторів можливе виникнення нових, більш патогенних вірусів, чи зміна активності процесів вже відомих патогенів.

#### ЛІТЕРАТУРА

- Гармаш Н.Ю. Влияние возрастающих доз тяжелых металлов на накопление их пшеницей и бобами в онтогенезе // Физиол. и биохимия культ. раст. – 1989. – 21, № 2. – С. 141-146.
- Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. – М.: Мир, 1978. – 429 с.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991. – С. 446-447.
- Грибача-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. – М.: Мир, 1989. – 439 с.
- Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. – Санкт-Петербург: Наука, 1994. – 399 с.
- Поліщук В.П., Сенчугова Н.А., Будзанівська І.Г., Головенько О.Л., Бойко А.Л. Моніторинг та стратегія прогнозування вірусних захворювань сільськогосподарських рослин в різних агроценозах України // Доп. НАН України. – 1998. – № 2. – С. 186-190.
- Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. – М.: Наука, 1976. – 335 с.
- Физические и физико-химические методы анализа при геохимических исследованиях. – Ленинград: Недра, 1986. – С. 3-209.
- Segler H., Spaar D. et al. Viruses in soil and ground water (review) // Arch. Phytopathol. und Pflanzenschutz. – 1995. – N29. – P. 349-371.
- Boenig R. Detection in surface waters of plant viruses with known and unknown natural hosts // Viruses with fungal vectors. – Dev. in Appl. Biol. – 1988. – N2. – P. 305-313.
- Matthews R.E. F. Fundamentals of plant virology. – California, San Diego: Acad. press, 1992. – 403 p.
- Methods in molecular biology. ELISA: theory and practice / Ed. by J.R. Crowther. – Totowa: Humana Press, 1995. – 223 p.

#### INCREASED CONCENTRATION OF HEAVY METALS IN SOIL – A GREAT RISK OF DEVELOPMENT OF PLANT VIRAL INFECTIONS

Budzanivska I.G.<sup>1</sup>, Polishchuk V.P.<sup>2</sup>, Boiko A.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Agrotechnology and Biotechnology, UAAS,

Logichna St., 12, Kyiv, 01001, Ukraine;

<sup>2</sup>Taras Shevchenko National University,

Myrskyi St., 64, Kyiv, 01033, Ukraine, E-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

We have conducted series of experiments on the following model systems: *Nicotiana tabacum* – TMV, *Datura innoxiosa* – PVX, and analyzed the plant growth in soil with various heavy metal concentrations. Whereas control plants have absolutely normal habitus, plants growing on soil with heavy metals showed a significant development inhibition. When plants growing on clear ground were infected, they showed disease symptoms (leaf deformation, yellowing) after two weeks, thus plants growing on polluted ground show symptoms on the 10<sup>th</sup> day and were died after 15 days. Our investigation proves that a high degree of heavy metals causes a higher level of infections of plants, reducing the plant physiological activity (immunological state).