

УДК: 578.4:578.22: 578.522

## ВІРУСИ ДИКОЇ ФЛОРИ ТА СУЧАСНІ МЕТАГЕНОМНІ МЕТОДИ ЇХ ДОСЛІДЖЕННЯ

КИРИЧЕНКО А.М. \*, ЩЕРБАТЕНКО І.С., КОВАЛЕНКО О.Г.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна

E-mail: kirangel.07@meta.ua

*Дикорослі рослини і бур'яни не лише спричиняють зниження врожаю сільськогосподарських культур і змінюють екосистеми, але й слугують альтернативними хазяями для широкого кола шкідників і збудників захворювань чи осередком розмноження і зимування комах-переносників фітопатогенних вірусів. Роль бур'янів як резерваторів вірусів та їхній вплив на епідеміологію і екологію вірусів досліджується у багатьох лабораторіях світу. Кількість публікацій про виявлення вірусів у бур'янах та ідентифікацію нових вірусів у культурних і дикорослих рослинах невинно зростає. Найбільш чутливими методами, що застосовуються при скринінгу та ідентифікації вірусів, є методи, котрі базуються на виявленні вірусної нуклеїнової кислоти. Метагеномний аналіз — це новий підхід, який дозволяє аналізувати вірусні популяції у зразках за допомогою секвенування геному і заповнити прогалину в знаннях про віруси, що циркулюють у дикорослих травах. В огляді подаються дані щодо ролі бур'янів як резерваторів вірусів рослин та розглядаються сучасні методи виявлення збудників і діагностики вірусних хвороб.*

**Ключові слова:** віруси рослин, бур'яни, метагеномний аналіз, діагностика вірусних інфекцій рослин.

В світовій науці наразі відомо понад 4000 вірусів, з яких близько 1200 відносяться до фітопатогенних. Переважну більшість цих вірусів було виділено із культурних рослин і лише біля 10 % — із дикорослих (King et al, 2012; Roossinck et al, 2015). Донедавна наші знання про різноманіття вірусів рослин були досить обмеженими, позаяк увага дослідників зосереджувалась в основному на збудниках захворювань сільськогосподарських культур, а пере-

важна більшість відомих вірусів була виявлена лише завдяки симптомам захворювання, які вони спричинювали у економічно значимих рослинах. Припускають, що кількість видів вірусів, здатних інфікувати рослини, є набагато більшою за відому на сьогодні (Wren et al, 2006). Дослідження вірусів у різноманітних природних екосистемах — екологічних угруповань та дикій флорі, що проводяться впродовж останніх десятиліть, проливають світло на дійсне різноманіття вірусів рослин, а також на істинний ареал їхнього розповсюдження. Останнім часом питання екології природних систем та вірусів рослин дикої флори привертають все більшу увагу дослідників, хоча поодинокі пошуки в цьому напрямку проводились ще в кінці минулого століття (Fraile et al, 1997; Ooi et al, 1999; Raybould et al, 1999; Bodaghi et al, 2004). Отримані результати досліджень сприяли встановленню вірусного різноманіття, а також поглибленню розуміння еволюції та екології вірусів, мутуалістичних взаємовідносин між вірусами і їхніми хазяями.

Позаяк в природі віруси здебільшого адаптувались до існування в культурних видах рослин або неокультурених («диких») видах, Harrison (Harrison, 1981) класифікував віруси рослин на дві групи: «CULPAD» (cultivated plant-adapted viruses) та «WILPAD» (wild plant-adapted viruses). Групу WILPAD складають віруси, які добре пристосовані до виживання в дикорослих рослинах, але можуть випадково інфікувати культурні рослини. Віруси, що пристосувались у процесі еволюції до існування у культурних видах, навпаки, не потребують диких рослин для здійснення свого життєвого цик-

лу. Істинний спектр вірусів, характерний для кожної групи, оцінити досить складно, позаяк більшість відомих вірусів рослин, включно з вірусами WILPAD, були виявлені завдяки характерним симптомам захворювань, які вони спричинювали у культурних рослин (Wgen et al, 2006).

Зі збільшенням числа нових, раніше невідомих вірусів рослин почали виникати питання щодо їхньої екологічної ролі. У рослинах дикої флори віруси можуть не викликати жодних видимих симптомів захворювання, що може бути результатом довготривалої ко-еволюції партнерів у напрямку персистенції збудників в організмі хазяїна, але не через існування природних механізмів обмеження їхнього поширення. Існує думка, що персистентні віруси можуть мати значний вплив на своїх хазяїв як епігенетичні елементи, що забезпечують появу в останніх нових відповідних генів, або слугувати джерелом для виникнення нових вірусів шляхом рекомбінації (Roossinck, 2010). Очевидно, більшість вірусів рослин можуть бути або корисними, або ж не становити жодної загрози своїм природним хазяям, чого не можна стверджувати стосовно культурних рослин, які вирощуються поряд з дикорослими чи не на далекій відстані від них.

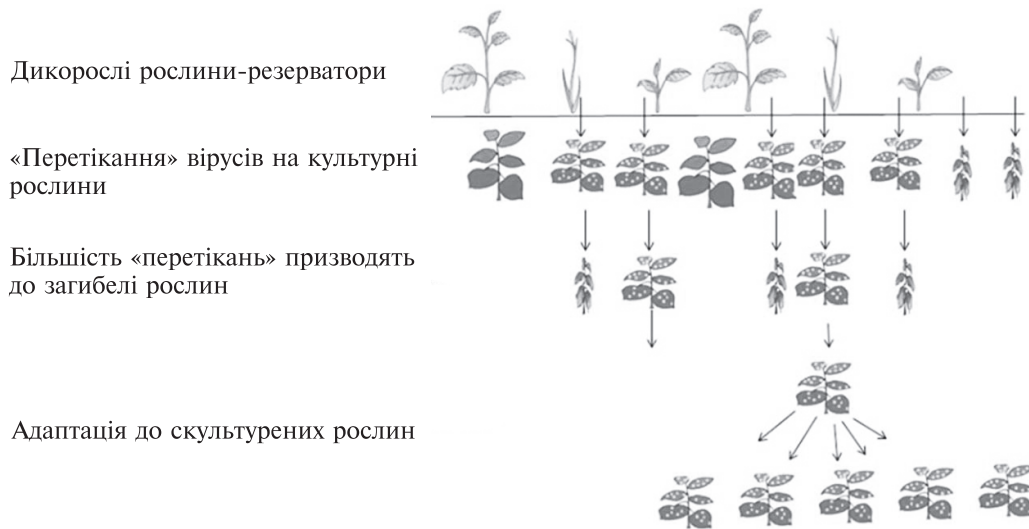
Стрімкий розвиток сільськогосподарського виробництва, окрім переваг у напрямку культурного та технологічного прогресу, призвів до порушення рівноваги в природних екосистемах. Окультурення рослин спричинило появу відповідного селективного відбору у вірусних популяціях. Селективний тиск, що діє одночасно як на хазяїв, так і на збудників хвороб, призводить до значних еволюційних змін, які в агроекосистемах, порівняно з природними, відбуваються значно швидше. Селекція нових сортів рослин та інтенсифікаційні зміни в сільськогосподарській практиці спричинили появу нових патогенів та значні зміни в їхніх популяціях, що вже існували на диких предках окультурених рослин (Stukenbrock et al, 2008). Міжнародна торгівля та діяльність людини сприяли розширенню ареалів та інтродукції рослин за межі центрів свого походження, через що вірогідність зустрічей між хазяями і збудниками хвороб значно зросла. Водночас людиною поширювались і дикі види рослин – випадково у вигляді насінневої контамінації, або навмис-

но з метою розведення екзотичних для певної місцевості видів. Таким чином змінюється фіторізноманіття регіону та розширюється коло потенційних рослин-хазяїв для «аборигенних» вірусів. Постійно зростаючі обсяги і швидкість міжнародної торгівлі рослинами та рослинною продукцією неминуче призводять до збільшення частоти інтродукції інвазивних вірусів, що в свою чергу може змінювати і біорізноманіття рослин.

«Перетікання» (spill over) вірусів на культурні рослини зазвичай відбувається на межі агро-і екосистем. У більшості випадків вірус не може пристосуватись до подальшої передачі в організмі нового хазяїна, або ж його титри в рослинах будуть незначними (низька інтенсивність репродукції вірусу) чи, взагалі, спричинить загибель рослини. Однак інколи «інтродувані» віруси можуть пристосуватись до подальшої передачі в «новому» хазяїні, що спричинить виникнення нових (емерджентних) вірусних інфекцій (рисунок).

В літературі існує безліч прикладів, коли віруси культурних рослин були виявлені в дикорослих, або ж навпаки – віруси поширювались із своїх природних джерел на сільськогосподарські культури. Так, в Австралії багаторічні рослини гарденбергії комптона (*Hardenbergia comptoniana* (Andrews) Benth., родина *Fabaceae*) слугують природними резервуарами вірусу *Hardenbergia mosaic virus* (HarMV) і джерелом вірусної інфекції для люпину *Lupinus angustifolius* L. (родина *Fabaceae*) (Luo et al, 2011). Гарденбергії – це ендемічні рослини південно-західної частини Австралії. З початком вирощування в регіоні дикого вузьколистого люпину (*Lupinus angustifolius*) в 1930 році та початком культивування у 1967 році різноманітних сортів люпину зазначені рослини – гарденбергії та люпину, часто перебували зовсім поряд, і HarMV природним чином поширився від «рідної» рослини-хазяїна на нові інтродуковані види бобових.

Вірус жовтої плямистості рису (*Rice yellow mottle virus*, RYMV) інфікує різні види рису як в дикій природі, так і в агросистемах. Вперше вірус був описаний у 1966 році в Кенії і наразі залишається одним з найбільш економічно значимих для цієї країни вірусів рослин. Головним фактором, що сприяв розповсюдженню



«Перетікання» вірусів із дикорослих рослин на культурні (Stobbe et al, 2016)

RYMV, стало зростання виробництва рису в Кенії у 1960-ті роки (Fargette et al, 2006).

У кліматичних зонах помірних широт багаторічні трави є резерваторами вірусів, які спричиняють тяжкі захворювання, зокрема жовту карликовість зернових (Bisnieks et al, 2006; Pallett et al, 2010; Luo et al, 2011). Так, багаторічні трави *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Ehrharta calycina* Smith, *Eragrostis curvula* (Schrader) Nees, *Paspalum dilatatum* Poiret та однорічні рослини *Digitaria sanguinalis* (L.) слугують резерваторами вірусу жовтої карликовості ячменю (*Barley yellow dwarf viruses*), а дикорослі трави грястиці збірної (*Dactylis glomerata*) – вірусів *Cereal yellow dwarf virus ma Cocksfoot streak virus* (Kendall et al, 1996; Pallett et al, 2010). Одразу три віруси, що викликають жовту карликовість ячменю, було виявлено в ярих злаках та пасовищних травах – *Barley yellow dwarf virus-PAV*, *Barley yellow dwarf virus-MAV* та *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (Bisnieks et al, 2006).

Природним хазяїном для *Alstroemeria virus X* (AlsVX), який, як вважалось, може інфікувати лише рослини альстремерії та цмину (*Helichrysum bracteatum* (Vent.) Andrews), може бути лопух звичайний (*Arctium minus* (Hill.) Bernh) (Be et al, 2012). Окрім AlsVX в рослинах лопуха були виявлені: вірус плямистості лопуха (*Burdock mottle virus*) (Kondo et al, 2013), вірус жовтяниці лопуха (*Burdock yellows closterovirus*) (Inouye et al,

1971), вірус пожовтіння жилок лопуха (*Woolly burdock yellow vein virus*) (Be et al, 2012), а також вірус жовтої плямистості ірисів (*Iris yellow spot virus*), який спричиняє суттєві втрати врожаю цибулі (*Allium cepa* L.) і зустрічається, окрім лопуха, на багатьох однорічних чи багаторічних бур'янах та польових культурах (Hsu et al, 2011).

Перші спроби моніторингу вірусів в дикорослих видах стримувались відсутністю чутливих методів діагностики. Більше того, увагу дослідників привертала лише рослини із чіткими симптомами захворювання. З появою нових підходів до вивчення різноманіття вірусів (дослідження безсимптомних рослин) та методів їх діагностики було не лише виявлено нові віруси, а й показано, що різноманіття вірусів в природній флорі набагато більше за таке на культурних рослинах (Roossinck et al, 2015).

#### Діагностика хвороб та методи виявлення вірусів

Більшість сучасних методів дослідження вірусів рослин базуються на виявленні патогенів та ідентифікації їх до виду. Основними діагностичними засобами є специфічні методи, які потребують попередньої інформації щодо збудника – імуноферментний аналіз (ІФА), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), ПЛР у режимі реального часу та дот-блотинг. Ці методи є ефективними за незначного спек-

тру потенційних збудників, в іншому випадку для ідентифікації патогена необхідно провести значну кількість специфічних тестів. З появою методів метагеномного аналізу, що не потребують інформації щодо специфічних вірусних послідовностей, стало можливим досліджувати окремі віруси чи вірусні угруповання в певній екосистемі або організмі (віромі).

Метагеноміка — розділ геноміки, що вивчає геном не окремого організму, а сукупності організмів чи вірусів. Метагеномний аналіз можливий лише за біоінформатичної обробки величезного масиву даних, одержаних при сиквенуванні сумарної метагеномної ДНК і/або окремих генів. Метагеномний підхід вперше було застосовано для дослідження вірусних популяцій у водному середовищі та у ссавців, а згодом він поширився в галузі вірусної екології та патології (Edwards et al, 2005; Casas et al, 2007; Delwart, 2007; Zablocki et al, 2016; Pedron et al, 2019).

Метагеномні дослідження вірусів дозволяють: дослідити різноманіття вірусів, які зустрічаються на нашій планеті (Stobbe et al, 2014); виявити нові, раніше невідомі віруси (Roosinck, 2012b; Mutuku et al, 2018); дослідити мутуалістичні взаємозв'язки між рослинами, векторами та вірусами. Результати метагеномних досліджень мають важливе стратегічне значення, позаяк вони дозволяють попереджати інфікування культур потенційними збудниками із природних резервуарів і, таким чином, сприяти підвищенню врожаю, а отже, і продовольчої безпеки (MacDiarmid et al, 2013).

#### Основні підходи метагеномного аналізу

Основні підходи метагеноміки вірусів рослин базуються на аналізі чотирьох основних класів нуклеїнових кислот: тотальної РНК або ДНК, нуклеїнових кислот, виділених із вірусоподібних частинок (virus-like particles, VLPs), дволанцюгових РНК (dsRNA) та малих інтерферуючих РНК вірусного походження (Roosinck et al, 2015).

Метод сиквенування тотальної ДНК або РНК використовується для ідентифікації вірусних послідовностей, виділених із безсимптомних та симптоматичних рослин з подальшим біоінформаційним аналізом сиквенування ділянок. Цей підхід вперше був використаний

для характеристики нового вірусного захворювання винограду (Al Rwahnih et al, 2009) і з того часу використовується для визначення нуклеотидних послідовностей нових вірусів у культурних та диких рослинах. До недоліків методу відносять отримання масиву сиквенсів невірусного походження, що значно ускладнює аналіз прочитаних послідовностей, а також неможливість виявити віруси, що присутні в рослині у низьких титрах та з геномом, представленим дволанцюговою РНК (dsRNA).

Метагеномні підходи, засновані на аналізі нуклеїнових кислот, виділених із вірусоподібних часток (virus-like particles (VLPs) спершу використовувались у процесі виявлення нових РНК- та ДНК-геномних вірусів тварин та людини і показали свою ефективність (Allander et al, 2001; Breitbart et al, 2005; Jones et al, 2005). Метод передбачає диференціальне центрифугування рослинних гомогенатів для отримання фракції вірусоподібних частинок (VLP); виділення нуклеїнових кислот із VLP та їх ампліфікацію із наступним сиквенуванням; аналіз отриманих сиквенсів та їх категоризацію за допомогою біоінформаційного пошуку в базі даних Генбанк. У 2008 р. цей підхід було використано для метагеномного аналізу вірусів рослин (Melcher et al, 2008). Дані дослідження були пілотними в започаткованому у 2005 р. проекті «Біорізноманіття та екологія вірусів рослин», метою якого було дослідити біорізноманіття вірусів рослин в окремих агроценозах та природних екосистемах методами метагеномного аналізу (Wren et al, 2006). Ці дослідження проводились на північному сході Оклахоми в заповіднику прерій Талграсс, який нараховує понад 700 видів рослин (Melcher et al, 2008, Muthukumar et al, 2009). В роботі були використані рослини із симптомами захворювання (2,3 % від загальної кількості аналізованих) та безсимптомні. За результатами досліджень, у 59 % із 687 обстежених рослин було виявлено специфічні продукти ампліфікації. Більш детальний аналіз 95 продуктів ПЛР, виділених із 52 видів рослин, підтвердив наявність вірусоспецифічних послідовностей у 25 % аналізованих зразків. Найбільшу частку (29 %) становила категорія «невизначених» в базі даних Генбанк. Послідовності, характерні для представників роду *Tymovirus* були виявлені у 16

зразках 6 видів рослин, що дозволило авторам зробити висновок про значне поширення тм-вірусів у досліджуваному регіоні. Факт присутності вірусоподібних послідовностей, дозволив зробити припущення про існування в природі значно більшої кількості вірусів, ніж визнано Міжнародним Комітетом із таксономії вірусів (МКТВ) (Muthukumar et al, 2009).

Ще чотири масштабні екогеномні дослідження були проведені у 2010 та 2012 рр. у природних та культурних ценозах у регіонах із великим різноманіттям рослинних видів (Камарг і Західно-Капські острови, Франція та Південна Африка відповідно). В результаті таких широкомасштабних метагеномних досліджень було встановлено наявність вірусоподібних послідовностей у 25–58 % проаналізованих зразків, причому у переважній більшості з них не було зафіксовано жодних ознак захворювання (Bernardo, 2014). Проведені дослідження показали, що кількість класифікованих видів вірусів рослин надзвичайно занижена, оскільки серед сиквенсів, визначених як вірусні у Південній Африці у 2010 р., лише 10 % можна з упевненістю віднести до відомих на сьогодні видів вірусів. Причину цього автори вбачали в тому, що переважна більшість досліджень проводилась у напрямку вивчення вірусів окультурених рослин, які складають лише невелику частку видів, поширених у природних екосистемах (Bernardo, 2014).

Основними недоліками зазначеного підходу (аналіз нуклеїнових кислот, виділених із вірусоподібних часток) вважають його методологічну складність і громіздкість, а також неможливість виявляти віруси без капсидів та з нестабільними вірусними частками. Метод виявився малоінформативним при дослідженні вірусів у рослинах із високим вмістом фенольних сполук та високов'язких полісахаридів, позаяк зазначені сполуки значно ускладнюють процес очищення вірусів.

Метагеномний аналіз дволанцюгових РНК (dsRNA) базується на факті, що РНК-геномні віруси часто утворюють dsRNA в якості вірусного геному або реплікативних форм, тому dsRNA можуть бути свідченням присутності вірусів у рослині (Dodds et al, 1984). Методи виділення та аналізу dsRNA широко викорис-

туються для виявлення міковірусів (Roossinck et al, 2015).

Початковим етапом аналізу dsRNA є отримання тотальної ДНК і РНК. Після цього із екстракту виділяють dsRNA, проводять зворотну транскрипцію і ПЛР, а по тому – сиквенування отриманого ПЛР-продукту. Перший протокол виділення dsRNA було розроблено ще у 1979 р. (Morris et al, 1979). Для оптимізації етапів очищення нуклеїнових кислот та отримання більшого виходу очищеного продукту з часом були розроблені і апробовані в різних комбінаціях вірус-рослина й інші підходи – хроматографічне фракціонування з використанням dsRNA-зв'язуючих білків або целюлози, селективну преципітацію РНК 4 M LiCl, фенольний метод депротейнізації вірусних препаратів, електрофорез, селективну деградацію відмінних від dsRNA нуклеїнових кислот або комбінацію цих методів (Franklin, 1966; Diaz-Ruiz et al, 1978; Dodds et al, 1984; Flegel, 1987; Kobayashi et al, 2009; Crabtree et al, 2019; Fagnan et al, 2019).

Застосування методу метагеномного аналізу dsRNA дозволило виявити безліч нових вірусів. Так, за результатами дослідження Roossinck (Roossinck et al, 2010) у понад 70% із 473 зразків рослин, що належали до 15 родин, було виявлено послідовності вірусних НК, причому щонайменше одну інфіковану пробу було виявлено серед досліджуваних зразків кожної родини рослин. Для діагностики вірусних інфекцій дослідники виділяли dsRNA як із здорових (безсимптомних) рослин, так і з симптомами захворювання. Більшість отриманих вірусних послідовностей представляли нові віруси, а близько половини з них належали до родин «персистентних» вірусів – *Partitiviridae*, *Endornaviridae*, *Chysoviriidae* та *Totiviridae* (Roossinck et al, 2010), які зазвичай не викликають симптомів у своїх хазяїв, не поширюються від клітини до клітини, мають низькі титри і передаються насінням. Зазначені підходи виділення dsRNA та аналізу VLPs дозволили виявити нові, раніше невідомі віруси (Min et al, 2012; Thapa et al, 2012; Scheets, 2013). Основним недоліком цього підходу є його трудомісткість, мала ефективність для детекції вірусів із геномом у вигляді (–)ssRNA (під час реплікації утворюється

незначна кількість dsRNA) та неможливість виявлення вірусів із ДНК-геномом.

Інша стратегія метагеномного дослідження вірусів рослин передбачає сиквенування мікроРНК (малих інтерферуючих РНК) – специфічних дволанцюгових молекул РНК довжиною 21–24 нуклеотиди, які беруть участь у регуляції трансляції та деградації мРНК і синтезуються у відповідь на інфікування РНК/ДНК – геномними вірусами (Donaire, 2009; Kreuze, 2009). У 2009 р. було доведено, що мікроРНК можуть бути використані для виявлення в інфікованих рослинах як відомих, так і раніше не охарактеризованих вірусів (Donaire et al, 2009; Kreuze et al, 2009). В одному з перших досліджень автори на основі даного підходу виявили послідовності вірусів, якими були штучно інокульовані рослини і, окрім того, послідовності невідомих вірусів, які не спричинювали жодних симптомів на експериментальних рослинах (Kreuze et al, 2009). Наразі цей підхід широко застосовується для виявлення різних вірусних інфекцій (Barba et al, 2014; Roossinck et al, 2015).

МікроРНК можна виділити за допомогою досить простої техніки – електрофорезу в поліакриламідному гелі, однак метод не дозволяє діагностувати ДНК віруси, оскільки, як вже згадувалось, в процесі реплікації цих вірусів синтезується незначна кількість dsRNA – мікроРНК. Перевагою даного підходу перед іншими є його висока чутливість, а також можливість застосування для виявлення ендемічних вірусних елементів.

В основі всіх метагеномних підходів виявлення вірусів рослин лежить аналіз отриманих сиквенсів, тому точність отриманих результатів більшою мірою залежить від розвитку нових високопродуктивних технологій сиквенування (Roossinck et al, 2015). Так, метод сиквенування нового покоління (Next generation sequencing (NGS) або Non-targeted high throughput sequencing (HTS), який з'явився в середині 2000-х років, дозволив безпосередньо виявляти та ідентифікувати віруси без попередньої інформації про геном збудника (консервативні ділянки вірусного геному для розробки вірус специфічних праймерів) і його антигенну структуру (Al Rwahnih et al, 2015). Одним із прикладів застосування методу може бути до-

слідження, метою якого було встановлення вірусної етіології карликовості люцерни. Необхідно зазначити, що єдиної точки зору щодо природи збудника цього захворювання до цього часу не існувало. В різні роки вважали, що збудником захворювання є віруси (Weimer, 1931), бактерії (*Xylella fastidiosa*) (Thomson et al, 1978) або мікоплазми (Panyna et al, 1992).

Вперше метод NGS було застосовано для дослідження вірусів рослин у 2009 році (Adams et al, 2009). З того часу за допомогою цього методу різними дослідниками було ідентифіковано низку РНК- та ДНК-вірусів, причому деякі з них виявились неописаними раніше (Barba et al, 2014; Roossinck et al, 2015; Samarfard et al, 2020).

Застосування методів масивного паралельного сиквенування трансформувало наше уявлення щодо мікробної геноміки та значно поглибило уявлення про склад і функціонування геному живих організмів, в тому числі і вірусів. Метод дозволяє сиквенувати мільярди фрагментів нуклеїнової кислоти одночасно та незалежно і має безліч переваг над серологічними та молекулярними методами діагностики, позаяк не потребує наявності специфічних антитіл чи специфічних праймерів. За допомогою цього методу стало можливим не лише ідентифікувати відомі та виявляти невідомі віруси рослин, а й досліджувати їх генетичну різноманітність і еволюційні зв'язки на різних таксономічних рівнях (Kim et al, 2018; Nemchinov et al, 2018; Wejermanm et al, 2019; Ho et al, 2019; Ibaba et al, 2020; Maclot et al, 2020). До того ж, нові досягнення в технології NGS і вдосконалення біоінформаційних методів дозволяє суттєво знизити витрати на сиквенування та зберегти час.

В Україні дослідження вірусів дикої флори дотепер системно не проводились, позаяк увага дослідників в основному була зосереджена на вивченні вірусів економічно важливих та стратегічних культур, хоча було опубліковано деякі результати виявлення емерджентних вірусів, поширених на теренах нашої держави, а також проведена діагностика збудників вірусних хвороб на окремих бур'янах і лікарських рослинах.

Так, у 2019 р. на рослинах пшениці та кукурудзи було діагностовано вірус мозаїки пше-

ниці Високих рівнин (*New Zealand High Plains wheat mosaic virus*, HPWMoV) – емаравірус, циркулювання якого в природі було зафіксовано вперше не лише в Україні, але і в Європі (Snihur et al, 2020). Результати філогенетичного аналізу показали, що українські ізоляти, отримані із пшениці, на 99 % були ідентичними між собою та на 83 % – подібними до ізолятів, вилучених із кукурудзи. Автори припускають, що вірус потрапив до країни неодноразово, а згодом поширився в країні та набув епідеміологічного значення через здатність передаватися пшеничним кліщем роду *Aceria* (Snihur et al, 2020).

Спроби виявити інший емаравірус *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) в рослинах горобини звичайної *Syrbus aucuparia* виявились невдалими (Pozhylov et al, 2017). Попри наявність у рослин симптомів, подібних до таких, що спричинює EMARaV, методом ЗТ-ПЛР послідовностей, характерних для даного вірусу, виявити не вдалось.

Методами візуальної діагностики та електронної мікроскопії було встановлено вірусну природу захворювання рослин лопуха великого, досліджено його симптоматику та визначено морфологію збудника (Dashchenko, 2014). А втім, ідентифікувати ниткоподібні віруси, очищені із рослин лопуха авторам не вдалось. Те саме стосується і інтродукованої в Україну лікарської та овочевої культури якону, де були виявлені характерні для вірусного захворювання симптоми мозаїки (Dashchenko, 2014).

X-вірус хости (*Hosta virus X*, ХВХ) завдає значної шкоди декоративному квітникувству в усьому світі. ХВХ вперше був описаний у 1996 р., однак припускають, що вірус впродовж тривалого часу персистентно інфікував рослини цього виду, перш ніж був ідентифікований. Глобалізація торгівлі декоративними рослинами значно актуалізувала ризик поширення вірусу в різних частинах світу (Currier et al, 1996). В Україні ХВХ вперше було ідентифіковано у 2012 р. в колекції Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАНУ (Shchetynina et al, 2012). Пізніше вірус було виявлено і в приватних колекціях Київської області (Kurychenko et al, 2014). Встановлено, що симптоми захворювання у рослин спричиняються щонайменше двома різними віруса-

ми – ХВХ і *Tobacco Rattle Virus* (TRV). TRV поширюється, головним чином, нематодами, відтак контролювати поширення вірусу досить складно. Оскільки за допомогою нематод вірус може передаватися від рослини до рослини, хости можуть слугувати природним джерелом і резерватом вірусної інфекції. Ризик масового інфікування рослин ХВХ обумовлюється ще й тим, що вірус легко передається механічно, а також тривалою безсимптомною персистенцією вірусу в рослинах (упродовж декількох тижнів, місяців або навіть років після інфікування) і, головним чином, складністю ранньої діагностики вірусної інфекції.

Наведені приклади переконливо доводять, що застосування нових підходів, і в першу чергу метагеномного аналізу, дозволять не лише діагностувати збудників вірусних захворювань рослин, а і здійснювати довготривалий моніторинг вірусів в природних екосистемах та агроценозах, передбачити та попередити «перетікання» вірусів із природних осередків їхнього існування та дикорослих хазяїв на потенційні та інтродуковані види і сорти культурних рослин.

*Роботу виконано відповідно до планів відомчих фундаментальних тем лабораторії вірусів рослин Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за напрямком «Вірусні інфекції дикої флори як чинники продуктивності рослин в агробіоценозах» (ДР № 0120U000221).*

#### VIRUSES OF WILD PLANTS AND MODERN METAGENOMIC METHODS OF THEIR INVESTIGATION

*A.N. Kurychenko, I.S. Shcherbatenko, A.G. Kovalenko*

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, the National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Acad. Zabolotnoho Str., Kyiv 03143, Ukraine  
E-mail: kirangel.07@meta.ua

In addition to reducing crop yields and altering the function of ecosystems, weeds also serve as alternate hosts for pests and plant pathogens or harbour vectors and vector-borne diseases. The role of weeds as reservoirs of viral pathogens and their impact on viral epidemiology and ecology is investigated in many parts of the world. The number of reports on viruses identified on weeds and new viruses discovered in cultivated and uncultivated plants is increasing globally. The most sensitive techniques used in screening and identification of viruses are nucleic acid-based detection methods.

The metagenomic strategies are new approaches to analyzing viral populations in environmental samples through nucleic acid sequencing and filling the gap in our knowledge of viruses of non-cultivated plants. The review presents the data on weeds as reservoirs of plant viruses and on modern pathogen research methods.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Adams IP, Glover RH, Monger WA et al (2009) Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol Plant Pathol* 10(4):537–545. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x
- Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D et al (2009) Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology* 387(2):395–401. doi: 10.1016/j.virol.2009.02.028
- Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D et al (2015) Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. *Phytopath* 105(6):758–763. doi: 10.1094/PHYTO-06-14-0165-R
- Allander T, Emerson SU, Engle RE et al (2001) A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20):11609–11614. doi: 10.1073/pnas.211424698
- Barba M, Czosnek H, Hadidi A (2014) Historical perspective, development, and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 6(1):106–136. doi: 10.3390/v6010106
- Bejerman N, Humberto D, Nome C et al (2019) Re-defining the medicago sativa alphapartitiviruses genome sequences. *Virus Res* 265:156–161. doi: 10.1016/j.virusres.2019.03.021
- Bernardo P *Ecologie, diversité et découverte de phyto-virus a l'échelle de deux agro-écosystèmes dans un cadre spatio-temporel a l'aide de la géo-métagénomique*. Ph.D. Thesis, University of Montpellier II., 2014. [https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01697877/file/2017\\_FRANCOIS\\_archivage.pdf](https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01697877/file/2017_FRANCOIS_archivage.pdf)
- Bi YQ, Tugume AK, Valkonen JPT (2012) Small-RNA deep sequencing reveals *Arctium tomentosum* as a natural host of Alstroemeria virus X and a new putative Emaravirus. *Plos One* 7(8):e42758. doi: 10.1371/journal.pone.0042758
- Bisnieks M, Kvarnheden A, Turka I et al (2006) Occurrence of barley yellow dwarf virus and cereal yellow dwarf virus in pasture grasses and spring cereals in Latvia. *Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci* 56(3):171–178. doi: 10.1080/09064710500297658
- Bodaghi S, Mathews DM, Dodds JA (2004) Natural incidence of mixed infections and experimental cross protection between two genotypes of Tobacco mild green mosaic virus. *Phytopath* 94(12):1337–1341. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.12.1337
- Breitbart M, Rohwer F (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* 13(6):278–284. doi: 10.1016/j.tim.2005.04.003
- Casas V, Rohwer F (2007) Phage metagenomics. *Methods Enzymol* 421:259–268. doi: 10.1016/S0076-6879(06)21020-6
- Crabtree AM, Kizer EA, Hunter SS et al (2019) A rapid method for sequencing double-stranded RNAs purified from yeasts and the identification of a potent K1 killer toxin isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Viruses* 11:70. doi: 10.3390/v11010070
- Currier S, Lockhart B (1996) Characterization of a potyvirus infecting *Hosta* spp. *Plant Disease* 80:1040–1043. doi: 10.1094/PD-80-1040
- Dashchenko AV (2014) Monitoring of viruses of medicinal plants of the family Asteraceae. *Quarantine and plant protection* 1:10–14.
- Delwart EL (2007) Viral metagenomics. *Revi Med Virol* 17(2):115–131. doi: 10.1002/rmv.532
- Diaz-Ruiz JR, Kaper JM (1978) Isolation of viral double-stranded RNAs using a LiCl fractionation procedure. *Prep Biochem* 8(1):1–17. doi: 10.1080/00327487808068215
- Dodds JA, Morris TJ, Jordan RL (1984) Plant viral double-stranded RNA. *Annu Rev Phytopathol* 22:151–168. doi: 10.1146/annurev.py.22.090184.001055
- Donaire L, Wang Y, Gonzalez-Ibeas D et al (2009) Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology* 392(2):203–214. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.005
- Edwards RA, Rohwer F (2005) Viral metagenomics. *Nat Rev Microbiol* 3(6):504–510. doi: 10.1038/nrmicro1163
- Fagnan MW, Rowley PA (2019) A rapid method for sequencing double-stranded RNAs purified from yeasts and the identification of a potent K1 killer toxin isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Viruses* 11:70. doi: 10.3390/v11010070
- Fargette D, Konate G, Fauquet C et al (2006) Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 44:235–260. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.120705.104644
- Flegr J (1987) A rapid method for isolation of double stranded RNA. *Prep Biochem* 17(4):423–433. doi: 10.1080/00327487808062505
- Fraile A, Escriu F, Aranda MA, Malpica JM et al (1997) A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *J Virol* 71(11):8316–8320. doi: 10.1128/JVI.71.11.8316-8320.1997
- Franklin RM (1966) Purification and properties of the



- replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. *Proc Natl Acad Sci USA* 55:1504–1511. doi:10.1073/pnas.55.6.1504
- Harrison BD (1981) Plant virus ecology: ingredients, interactions, and environmental influences. *Ann Appl Biol* 99(3):195–209. doi:10.1111/j.1744-7348.1981.tb04787.x.
- Ho T, Al Rwahnih M, Martin RR et al (2019) High throughput sequencing in plant virus detection and discovery. *Phytopath* 109(5):716–725. doi:10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW
- Hsu CL, Hoeping CA, Fuchs M et al (2011) Sources of Iris yellow spot virus in New York. *Plant Dis* 95(6):735–743. doi:10.1094/PDIS-05-10-0353
- Ibaba JD, Gubba A. (2020) High-throughput sequencing application in the diagnosis and discovery of plant-infecting viruses in Africa, a decade later. *Plants (Basel)* 9(10):1376. doi:10.3390/plants9101376
- Inouye T, Mitsuhashi K (1971) Viruses in burdock *Arctium lappa* L. (Studies on the viruses of plants in Compositae in Japan). *Nogaku Kenkyu* 54(1):1–14. (in Japanese)
- Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV et al (2005) New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol* 79(13):8230–8236. doi:10.1128/JVI.79.13.8230-8236.2005
- Kendall DA, George S, Smith BD (1996) Occurrence of barley yellow dwarf viruses in some common grasses (Gramineae) in south west England. *Plant Pathol* 45(1):29–37. doi:10.1046/j.1365-3059.1996.d01-98.x
- Kim H, Park D, Hahn Y (2018) Identification of novel RNA viruses in alfalfa (*Medicago sativa*): An Alphapartitivirus, a Deltapartitivirus, and a Marafivirus. *Gene* 638:7–12. doi: 10.1016/j.gene.2017.09.069
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam. doi: 10.1016/B978-0-12-384684-6.00136-1
- Kobayashi K, Tomita R, Sakamoto M (2009) Recombinant plant dsRNA-binding protein as an effective tool for the isolation of viral replicative form dsRNA and universal detection of RNA viruses. *J Gen Plant Pathol* 75(87). doi: 10.1007/s10327-009-0155-3
- Kondo H, Hirano S, Chiba S et al (2013) Characterization of burdock mottle virus, a novel member of the genus Benyvirus, and the identification of benyvirus-related sequences in the plant and insect genomes. *Virus Res* 177(1):75–86. doi: 10.1016/j.virusres.2013.07.015
- Kreuzer JF, Perez A, Untiveros et al (2009) Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery, and sequencing of viruses. *Virology* 388(1):1–7. doi: 10.1016/j.virol.2009.03.024
- Kyrychenko AN, Kovalenko AG (2014) Detection and identification of viruses Hosta plants in Ukraine. *Agroecological Journal* 1:92–97
- Luo H, Wylie SJ, Coutts B et al (2011) A virus of an isolated indigenous flora spreads naturally to an introduced crop species. *Ann Appl Biol* 159(3):339–347. doi: 10.1111/j.1744-7348.2011.00496.x
- MacDiarmid R, Rodoni B, Melcher U et al (2013) Biosecurity implications of new technology and discovery in plant virus research. *PLoS Pathog* 9(8):e1003337. doi: 10.1371/journal.ppat.1003337
- Maclot F, Candresse T, Filloux D et al (2020) Illuminating an ecological blackbox: Using High Throughput Sequencing to characterize the plant virome across scales. *Front Microbiol* 11:art 578064. doi: 10.3389/fmicb.2020.578064
- Massart S, Chiumenti M, De Jonghe K et al (2019) Virus detection by high-throughput sequencing of small RNAs: Large scale performance testing of sequence analysis strategies. *Phytopath* 109(3):488–497.
- Melcher U, Muthukumar V, Wiley GB et al (2008) Evidence for novel viruses by analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from *Ambrosia psilostachya*. *J Virol Methods* 152(1–2):49–55. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.05.030
- Min BE, Feldman TS, Ali A et al (2012) Molecular characterization, ecology, and epidemiology of a novel tymovirus in *Asclepias viridis* from Oklahoma. *Phytopath* 102(2):166–176. doi: 10.1094/PHYTO-05-11-0154
- Morris TJ, Dodds JA (1979) Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopath* 69:854–858. doi: 10.1094/Phyto-69-854.
- Muthukumar V, Melcher U, Pierce M et al (2009) Non-cultivated plants of the Tallgrass Prairie Preserve of northeastern Oklahoma frequently contain virus-like sequences in particulate fractions. *Virus Res* 141(2):169–173. doi: 10.1016/j.virusres.2008.06.016
- Mutuku JM, Wamunje FO, Mukeshimana G et al (2018) Metagenomic analysis of plant virus occurrence in common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Central Kenya. *Front Microbiol* 9:2939. doi: 10.3389/fmicb.2018.02939
- Nemchinov LG, Lee MN, Shao J (2018) First Report of alphapartitiviruses infecting alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the United States. *Microbiol Resour Announc* 7(21): e01266-18. doi: 10.1128/MRA.01266-18
- Ooi K, Yahara T (1999) Genetic variation of gemini-viruses: comparison between sexual and asexual host plant populations. *Mol Ecol* 8(1):89–97. doi: 10.1046/j.1365-294X.1999.00537.x

- Pallett DW, Ho T, Cooper I et al (2010) Detection of Cereal yellow dwarf virus using small interfering RNAs and enhanced infection rate with Cocksfoot streak virus in wild cocksfoot grass (*Dactylis glomerata*). *J Virol Methods* 168(1–2):223–227. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.06.003.
- Panyina EH, Petruk YV, Zvomikkmy VP (1992) К вопросу изучения природы карликовости люцерны. In collection: Aktualnye problemy ahroekologii i zemledeliya Nizhney Volhi. RUDN, Moscow, 174–185. (in Russian)
- Pedron R, Esposito A, Bianconi I et al (2019) Genomic and metagenomic insights into the microbial community of a thermal spring. *Microbiome* 7(8) doi: 10.1186/s40168-019-0625-6
- Pozhylov I, Stakhurska O, Shybanov S Monitoring of mountain ash plants for the emaravirus infection in the biocoenoses of Ukraine. Youth and Progress of Biology: XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students, Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 25–27 April 2017. [http://www.terreco.univ.kiev.ua/\\_media/library/antarctic/pimb-tezi-2017.pdf](http://www.terreco.univ.kiev.ua/_media/library/antarctic/pimb-tezi-2017.pdf)
- Raybould A, Maskell L, Edwards M et al (1999). The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleracea*. *New Phytologist* 141(2):265–275. doi: 10.1046/j.1469-8137.1999.00339.x
- Roossinck MJ (2010) Lifestyles of plant viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1548):1899–1905. doi: 10.1098/rstb.2010.0057
- Roossinck MJ (2012b) Plant virus metagenomics: Biodiversity and ecology. *Annu Rev Genet* 46:357–367. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155600
- Roossinck MJ (2015) Metagenomics of plant and fungal viruses reveals an abundance of persistent lifestyles. *Front Microbiol* 5:767. doi: 10.3389/fmicb.2014.00767
- Roossinck MJ, Martin DP, Roumagnac P (2015) Plant virus metagenomics: advances in virus discovery. *Phytopathology* 105(6):716–727. doi: 10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW
- Roossinck MJ, Saha P, Wiley GB, et al (2010) Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Mol Ecol* 19(1):81–88. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04470.x
- Samarfard S, McTaggart AR, Sharman M et al (2020) Viromes of ten alfalfa plants in Australia reveal diverse known viruses and a novel RNA virus. *Pathogens* 9(3):214. doi: 10.3390/pathogens9030214
- Scheets K (2013) Infectious transcripts of an asymptomatic panicovirus identified from a metagenomic survey. *Virus Res* 176(1–2):161–168. doi: 10.1016/j.virusres.2013.06.001
- Shchetytnina G, Budzanivska I, Kharina A et al (2012) First detection of Hosta Virus X in Ukraine. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv* 62:8–50
- Snihur H, Pozhylov I, Budzanivska I et al (2020) First report of High Plains wheat mosaic virus on different hosts in Ukraine. *J Plant Pathol* 102:545–546. doi: 10.1007/s42161-019-00435-y
- Stobbe A, Roossinck MJ (2016). Plant Virus Diversity and Evolution. In: Wang A, Zhou X (eds) *Current Research Topics in Plant Virology*, Cham: Springer International Publishing, 241–250. doi: 10.1007/978-3-319-32919-2\_8
- Stobbe AH, Roossinck MJ (2014) Plant virus metagenomics: What we know and why we need to know more. *Front Plant Sci* 5, art. 150. doi: 10.3389/fpls.2014.00150
- Stukenbrock EH, McDonald BA (2008) The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annu Rev Phytopathol* 46(1):75–100. doi: 10.1146/annurev.phyto.010708.154114
- Thapa V, Melcher U, Wiley GB et al (2012) Detection of members of the Secoviridae in the Tallgrass Prairie Preserve, Osage County, Oklahoma, USA. *Virus Res* 167(1):34–42. doi: 10.1016/j.virusres.2012.03.016
- Thomson SV, Davis MJ, Kloepper JW et al (1978) Alfalfa dwarf: relationship of the bacterium causing Pierce's disease of grapevines and almond leaf scorch disease. p. 64. In: *Third Int Cong Plant Pathol*, Munich.
- Weimer JL (1931) Alfalfa mosaic virus. *Phytopath* 21:122. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60880-5
- Wren JD, Roossinck MJ, Nelson RS et al (2006) Plant virus biodiversity and ecology. *PLoS Biol* 4(3):e80. doi: 10.1371/journal.pbio.0040080
- Zablocki O, Adriaenssens EM, Cowan D. (2016) Diversity and ecology of viruses in hyperarid desert soils. *Appl Environ Microbiol* 82:770–777. doi: 10.1128/AEM.02651-15

Надійшла в редакцію 15.06.20  
Після доопрацювання 22.11.20  
Прийнята до друку 18.05.21