



УДК 578.282+581.143.5+632.38

З. Ю. Ткачук, В. С. Артеменко, Л. И. Семерникова

ИНГИБИРОВАНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ 2'—5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТОМ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ МЕРИСТЕМ КАРТОФЕЛЯ

Изучено влияние разных концентраций 2'—5'-олигоаденилата в культуральной среде на процесс регенерации меристем и количество регенерантов, свободных от X-, S-, M- и F-вирусов картофеля. Подобраны концентрации препарата, угнетающие репродукцию вирусов не влияя при этом на развитие регенерантов. Показано наличие сортовой зависимости при оздоровлении картофеля и универсальность противовирусного действия 2'—5'-олигоаденилата.

Введение. Благодаря вегетативному размножению картофель, как и другие подобные растения, накапливает большое количество разнообразных патогенных микроорганизмов и вирусов. При благоприятных условиях вирусы картофеля быстро распространяются и могут вызвать потерю от 30 до 100 % урожая клубней.

Для освобождения картофеля от вирусных, бактериальных, грибковых и нематодных болезней самым эффективным является метод регенерации меристем. Ранее показано, что вирусы плохо проникают в клетки верхушки растений, в результате чего тонкий слой верхушки меристем часто бывает свободным от вирусной инфекции [1]. Выращивая тонкий срез такой верхушки на питательной среде, позволяющей регенерировать из нее растения, можно получить картофель с очень низким содержанием вируса. Иногда подобным методом получают безвирусные растения. Однако последние встречаются довольно редко, что свидетельствует о несовершенстве данного метода.

Гипотетически можно предложить такие объяснения случаев появления безвирусных растений, которые в определенных условиях регенерируют из клеток, свободных от вирусов:

- 1) репликация вируса не поспевает за клеточным делением;
- 2) некоторые клетки приобретают устойчивость к вирусу путем спонтанного мутагенеза;

- 3) устойчивость клеток к вирусу может существовать в одной и той же ткани наряду с чувствительностью к нему; после дедифференциации как из устойчивых, так и из чувствительных клеток способны регенерировать соответственно здоровые и инфицированные растениям.

Ванг и Хуанг [2] подтвердили возможность спонтанной утраты растительной клеткой вирусов и показали, что частота возникновения растений, свободных от X-вируса картофеля, выше среди регенерантов из меристемного каллуса (46 %), чем среди регенерантов из меристем.

Однако наряду со способностью освобождать от вирусов метод регенерации каллуса не гарантирует генетической стабильности полученных с его помощью растений, что исключает возможность применения этого метода для оздоровления сортового материала. В этих случаях более перспективными могут быть методы, обеспечивающие увеличение

частоты получения безвирусных растений за счет обработки эксплантатов противовирусными веществами.

Использование антивирусных препаратов в сочетании с методом регенерации меристем позволяет получать безвирусные растения. Эффективность антивирусных препаратов при этом оценивается по увеличению частоты выхода здоровых растений из меристем. Однако для практического оздоровления важно также и увеличение количества прижившихся эксплантатов, т. е. жизнеспособность меристем и время с момента перенесения их на регенерационную среду до получения взрослых растений. Эти показатели зависят в основном от размеров эксплантатов. Применение антивирусных препаратов позволяет увеличить размеры эксплантатов, регенерирующих безвирусные растения. Таким образом, для картофеля удалось увеличить размеры эксплантатов от 0,1 до 0,5 мм и этим сократить процесс регенерации до 2—1,5 месяца [3].

Ранее была показана высокая противовирусная эффективность 2'—5'-олигоаденилатов на протопластах, листовых дисках и интактных растениях, зараженных вирусом табачной мозаики (ВТМ) [4]. Однако в вышеуказанной работе авторы не ставили перед собой цель получить свободные от ВТМ растения. Они обнаружили только значительное уменьшение концентрации вируса в обработанном материале непосредственно после действия 2'—5'-олигоаденилата и не определяли количество безвирусных растений, тем более после длительного культивирования.

После публикации Деваша и др. [4] не появлялось ни одной значительной работы, которая бы подтверждала или опровергала их довольно сенсационные результаты. Известно также, что проблема противовирусных препаратов для растений с тех пор существенно не прояснилась.

В то же время исследования противовирусного действия олигоаденилатов на животных клетках успешно продолжаются [5—11].

Исходя из вышеизложенного нам кажется перспективным применение комбинированного метода, совмещающего метод культуры меристем и химиотерапию 2'—5'-олигоаденилатами. Надеемся, что таким способом можно достичь полного освобождения растений практически от всех вирусов. Параллельно планировалось снижение до минимума расхода веществ, угнетающих инфекцию, и таким образом удешевить химиотерапию.

В связи с этим было изучено действие дефосфорилированного 2'—5'-олигоаденилата (2'—5'-Аз) в разных концентрациях как ингибитора репликации вирусов в меристеме нескольких сортов картофеля и возможность регенерации безвирусных растений. Разработаны также методы получения безвирусных растений из районированных сортов картофеля, зараженных природным комплексом вирусов этой культуры.

Материалы и методы. Меристему изолировали под бинокулярным микроскопом с 24—48-кратным увеличением из верхушечных и пазушных почек растений стерильной культуры или побегов проросших клубней. У нас не возникала потребность в стерилизации нестерильного материала, как это рекомендуется основными методиками. Покровные листья неповрежденной почки защищали нижние слои и собственно меристему от инфицирования. Отказ от стерилизации позволил упростить методику и избавиться от лишнего фактора влияния на меристему.

Операцию проводили в ламинарном боксе. Оптическую систему микроскопа МБС-10 разворачивали вокруг оси на 180° так, чтобы перед предметным столиком было свободное пространство. Это значительно уменьшало инфицирование. На предметном столике размещали подставку из термостойкого пластика, которую стерилизовали после каждой операции, обжигая в спирте. Почка придерживается на подставке пинцетом с прикрепленными к его концам половинками пера из нержавеющей стали. Микробиологическим петледержателем со

вставленным в него кусочком лезвия снимали покровные листья и отделили меристему с одним—двумя примордиями длиной до 0,3 мм.

Вычлененную меристему переносили на кончике осколка лезвия, смоченного средой, и ставили на бумажные мостики в микропробирки с жидкой средой (минеральная основа MS; мг/л: В1 — 1; В6 — 1; РР — 0,5; С — 3; фолиевая кислота — 0,05; БАП — 0,1; аденин — 1; глицин — 2; гидролизат казеина — 30; дрожжевой экстракт — 20; агар — 500; глюкоза — 8000; сахароза — 15 000; рН — 5,8), в которую добавляли препарат 2'—5'-Аз в разных концентрациях. Среду наливали в микропробирки диаметром 10 мм, длиной 30 мм с мостиками из фильтровальной бумаги. Пробирки закрывали крышками из алюминиевой фольги и влагонепроницаемой пленкой.

На мостик можно высаживать до четырех меристем. Расход среды при такой методике составлял около 150 мкл на одну меристему.

Небольшие затраты среды позволяют сократить до минимума количество используемых дорогостоящих олигонуклеотидов, а также улучшить конденсирование среды меристемой.

Перед введением в среду препарат стерилизовали, растворяя и выдерживая его до этого в 50 %-м этиловом спирте не менее 96 ч при температуре 22 °С, и после выпаривания спирта добавляли в стерильную среду.

Через 3 месяца после высаживания меристем регенерировали растения высотой 10—15 мм, большинство из которых укоренилось. Для дальнейшего доращивания черенки из этих растений рассаживали в большие пробирки на ту же самую среду (но агаризованную и без олигонуклеотидов) или в длинные тонкие пробирки с жидкой средой.

Содержание X-, S-, M- и F-вирусов картофеля определяли в течение 9 месяцев методом иммуноферментного анализа [12]. Так были отобраны клоны растений, в которых вирус не проявлялся на протяжении 10 пассажей.

Чтобы предупредить перезаражение растений вирусами во время эксперимента особое внимание уделяли стерилизации инструментов после пересадки каждого эксплантата. Инструменты выдерживали в 70 %-м спирте в течение 1 мин, потом погружали в 96 %-й спирт и обжигали над спиртовкой не менее 30 с.

В опыте использовали районированные сорта картофеля Гатчинский, Зов, Луговской, Невский.

Препарат 2'—5'-олигоденилата любезно предоставлен нам И. А. Михайлопуло (Ин-т биоорг. химии АН Беларуси).

Результаты опытов обрабатывали методами статистики по Зайцеву [13].

Результаты и обсуждение. Мы изучили и проверили предыдущий опыт вычленения меристем картофеля и регенерации из них растений, изложенный в основных публикациях по этому вопросу. Наши собственные исследования проводились по значительно модифицированной методике, описанной в разделе «Материалы и методы».

В экспериментах использовано 1648 эксплантатов меристем из зараженных вирусами растений картофеля. Меристемы выращивали на среде без олигонуклеотида (контроль) и с 2'—5'-Аз в концентрации 10^{-7} — 10^{-4} М (от 200 до 400 эксплантатов в каждом варианте).

При исследованиях учитывали общее количество нормально развивающихся растений и количество оздоровленных растений, полученных из меристем после обработки разными концентрациями 2'—5'-Аз. Для того чтобы исключить влияние на результаты опыта таких факторов, как сортовая принадлежность и происхождение материала, а также специфичность действия препарата на разные вирусы, количество нормально развитых регенерантов и оздоровленных растений учитывали в зависимости от сорта и происхождения материала и отдельно определяли влияние препарата на освобождение от X-вируса. Полученные результаты приведены в табл. 1—7.

Прежде всего необходимо было ответить на вопрос: влияет ли на регенерацию меристем 2'—5'-Аз? Поскольку в опыте использовали растения картофеля четырех сортов из разных областей Украины, нам казалось необходимым исследовать зависимость от сорта и происхождения выхода нормально развитых растений из меристем.

В табл. 1 приведены результаты, свидетельствующие об отсутствии сортовой зависимости выхода нормально развитых растений, полученных из меристемы четырех районированных сортов. Отличия в показателях выхода растений не являются достоверными, так как ни один из показателей критерия Стьюдента для сравниваемых совокупностей не превышает значения 1,96.

Не обнаружено также зависимости между выходом нормально развитых растений и происхождением исходного материала, из которого брали меристему. Это видно из табл. 2, содержащей результаты сравнения показателей выхода нормальных растений из меристем картофеля сорта Невский, сгруппированных по происхождению. Процент нормально развитых регенерантов из меристем, вычлененных из растений разного происхождения, колеблется в пределах от 17,4 до 21,3 %, но значения показателей критерия Стьюдента указывают на отсутствие достоверной разницы между ними. Таким образом, показано, что жизнеспособность регенерированных меристем одинакова в основных «картофельных» регионах Украины.

Результаты, приведенные в табл. 1 и 2, позволяют утверждать, что на выход нормально развитых растений при действии 2'—5'-олигодезилата в разных концентрациях влияние происхождения и сортовой принадлежности исходного материала исключено.

Поскольку для исследования противовирусного действия 2'—5'-Аз планировалось использовать довольно значительные концентрации пре-

Таблица 1

Выход нормально развитых регенерантов из меристем картофеля в зависимости от сорта

Сорт	Количество высаженных меристем	Количество нормально развитых растений		Критерий Стьюдента			
		Абсолютная величина	%	1	2	3	4
Зов	644	118	18,3±3,0	—	1,09	1,30	0,33
Гатчинский	144	21	14,6±5,8	1,09	—	0,17	1,29
Луговой	144	20	13,9±5,7	1,30	0,17	—	1,51
Невский	716	136	19,0±2,9	0,33	1,29	1,51	—
Всего	1648	295	17,9±1,9	—	—	—	—

Таблица 2

Выход нормально развитых регенерантов из меристем картофеля сорта Невский в зависимости от происхождения

Происхождение	Количество высаженных меристем	Количество нормально развитых растений		Критерий Стьюдента			
		Абсолютная величина	%	1	2	3	4
Волынское НПО «Элита»	216	39	18,1±5,1	—	0,83	0,17	0,12
Сумское НПО «Элита»	216	46	21,3±5,7	0,83	—	0,91	0,62
Тернопольское НПО «Элита»	144	25	17,4±6,2	0,17	0,91	—	0,26
Агрофирма «Прут»	140	26	18,6±6,5	0,12	0,62	0,26	—
Всего	716	136	19,0±2,9	—	—	—	—

парата, необходимо было изучить его токсическое влияние на процесс регенерации меристемы. Результаты опыта, приведенные в табл. 3, показывают, что ни один из показателей критерия Стьюдента ни в контроле, ни в случае использования разных концентраций препарата не указывают на отличия между ними. Таким образом, можно с определенностью утверждать, что препарат 2'-5'-олигоаденилата в изученных концентрациях не токсичен для меристемы картофеля и не влияет на ее регенерацию.

Кроме того, из табл. 1 и 2 видно, что с использованием приведенной методики можно получать в среднем $17,9 \pm 1,9$ % нормально развитых растений от высаженных меристем.

Для того, чтобы при изучении вопроса об ингибировании вируса разными концентрациями 2'-5'-олигоаденилата не использовать те растения, процесс оздоровления которых зависит от их сортовой принадлежности или происхождения, мы убедились в наличии или отсутствии влияния этих факторов (табл. 4, 5).

Результаты, приведенные в табл. 4, указывают на то, что количество растений, оздоровленных методом регенерации меристемы, не зависит от происхождения растений, из которых брали эксплантаты, и колеблется в пределах $9,5 \pm 2,2$ %. В то же время показатели критерия Стьюдента в табл. 5 позволяют утверждать, что такая зависимость существует для некоторых сортов картофеля. В нашем случае достоверно отличается от других низким выходом безвирусных регенерантов сорт Луговской.

Таким образом, на следующем этапе при изучении влияния разных концентраций 2'-5'-Аз на количество регенерантов, освобожденных от X-вируса и других вирусов картофеля, мы использовали только сорта Зов, Гатчинский и Невский, чем исключили зависимость результатов

Таблица 3

Влияние концентрации 2'-5'-олигоаденилата на выход нормально развитых регенерантов из меристем

Концентрация 2'-5'-АрАрА, М	Количество высаженных меристем	Количество нормально развитых растений		Критерий Стьюдента				
		Абсолютная величина	%	2	3	4	5	
0	416	72	$17,3 \pm 3,6$	—	0,36	0,27	0,45	0,80
10^{-7}	200	37	$18,5 \pm 5,4$	0,36	—	0,58	0,00	0,38
10^{-6}	416	69	$16,6 \pm 3,6$	0,27	0,58	—	0,72	1,02
10^{-5}	416	77	$18,5 \pm 3,7$	0,45	0,00	0,72	—	0,44
10^{-4}	200	40	$20,0 \pm 5,5$	0,80	0,38	1,02	0,44	—
Всего	1648	295	$17,9 \pm 1,9$	—	—	—	—	—

Таблица 4

Выход свободных от X-, S-, M- и F-вирусов картофеля регенерантов сорта Невский из меристем в зависимости от происхождения

Происхождение материала	Количество высаженных меристем	Количество оздоровленных растений		Критерий Стьюдента			
		Абсолютная величина	%	1	2	3	4
Волинское НПО «Элита»	216	19	$8,8 \pm 3,9$	—	0,67	0,51	0,30
Сумское НПО «Элита»	216	23	$10,7 \pm 4,2$	0,67	—	0,08	0,89
Тернопольское НПО «Элита»	144	15	$10,4 \pm 5,1$	0,51	0,08	—	0,73
Агрофирма «Прут»	140	11	$7,9 \pm 4,5$	0,30	0,89	0,73	—
Всего	716	68	$9,5 \pm 2,2$	—	—	—	—

опытов от фактора сортовой принадлежности. Эти результаты представлены в табл. 6 и 7. Показано, что выход оздоровленных растений в контроле составляет $8,2 \pm 2,8$ %, т. е. 46 % растений, развившихся из меристем, свободны от X-, S-, M- и F-вирусов картофеля. При регенерации меристемы на среде с 2'-5'-Аз в оптимальной концентрации 10^{-5} M получено $13,3 \pm 3,5$ % безвирусных растений.

Итак, на среде с оптимальной концентрацией препарата удалось получить регенеранты из меристем, 72 % которых были свободными от всех четырех изученных вирусов разной природы (табл. 6). Противовирусную активность 2'-5'-олигоаденилата в данных условиях опыта подтверждает концентрационная зависимость его действия. Показано, что в концентрации 10^{-5} M препарат оказывает существенное влияние на выход безвирусных растений, а дальнейшее увеличение концентрации до 10^{-4} M не приводит к усилению его действия.

Влияние препарата на выход регенерантов, свободных от X-вируса, подобно таковому на выход регенерантов без S-, M- и F-вирусов. При сравнении табл. 6 и 7 видно, что оптимальной концентрацией как для освобождения от X-вируса, так и от S-, M- и F-вирусов является 10^{-5} M, а показатели выхода оздоровленных растений существенно не отличаются между собой. Это дает основание предположить универсальность действия препарата, что, в свою очередь, вероятно, поможет выяснить механизмы его действия на вирусы.

Изучение возможности получения оздоровленных растений методом регенерации верхушечной меристемы началось с обнаружения того

Таблица 5

Выход свободных от X-, S-, M- и F-вирусов картофеля регенерантов из меристем в зависимости от сорта

Сорт	Количество высаженных меристем	Количество оздоровленных растений		Критерий Стьюдента			
		Абсолютная величина	%	1	2	3	4
Зов	644	56	$8,7 \pm 2,1$	—	1,57	2,02*	0,52
Гатчинский	144	19	$13,2 \pm 5,8$	1,57	—	2,81*	1,28
Луговской	144	6	$4,2 \pm 3,3$	2,02*	2,81*	—	2,34*
Невский	716	68	$9,5 \pm 2,2$	0,52	1,28	2,34*	—
Всего	1648	149	$9,0 \pm 1,3$	—	—	—	—

* Значения критерия Стьюдента $> 1,96$, указывающие на достоверные отличия сравниваемых совокупностей на 95 %-м доверительном уровне.

Таблица 6

Влияние концентрации 2'-5' олигоаденилата на выход свободных от X-, S-, M- и F-вирусов картофеля регенерантов из меристем

Концентрация 2'-5'-АрАА, M	Количество высаженных меристем	Количество оздоровленных растений		Критерий Стьюдента				
		Абсолютная величина	%	1	2	3	4	5
0	368	30	$8,2 \pm 2,8$	—	0,98	0,00	2,25	1,08
10^{-7}	200	12	$6,0 \pm 3,3$	0,98	—	0,98	2,87*	1,81
10^{-6}	368	30	$8,2 \pm 2,8$	0,00	0,98	—	2,25*	1,08
10^{-5}	368	49	$13,3 \pm 3,5$	2,25*	2,87*	2,25*	—	0,81
10^{-4}	200	22	$11,0 \pm 4,3$	1,08	1,81	1,08	0,81	—
Всего	1504	143	$9,5 \pm 1,5$	—	—	—	—	—

* Значения критерия Стьюдента $> 1,96$, указывающие на достоверные отличия сравниваемых совокупностей на 95 %-м доверительном уровне.

факта, что условия культуры органов *in vitro* играют какую-то роль в освобождении растений от вирусов. Так, Холлингс и Стоун [14] сообщили, что соотношение меристем гвоздики, развивающихся в свободные от вируса огуречной мозаики растения, было большим, чем ожидалось исходя из кривой частоты появления инфицированных меристем. Это подтвердили и результаты исследований, в которых Ванг и Ху [15] регенерировали свободные от вируса мозаики гвоздики растения табака и петунии из эксплантатов меристем размером более чем 200 мкм, в то время как Мори [16] с помощью иммуноферментных методов установил, что в верхушках побегов растений этих видов ниже 200 мкм уже находится вирус.

Некоторые авторы связывали уменьшение количества вируса во время культивирования с действием регуляторов роста, содержащихся в среде [17, 18]. Уолкей [19], культивируя *Nicotiana rusticum* на среде с большим количеством ауксинов и цитокининов, установил, что регуляторы роста могут уменьшать концентрацию вирусов в тканях, однако полностью от вирусов растения они не освобождают.

В первых экспериментах по выращиванию меристемы картофеля с целью получения здоровых растений Норрис использовал среду Уайта с добавлением НУК и 2,4-Д по 0,1 мг/л. В этих опытах 2,5 % меристем выростали в нормальные растения [20]. Позднее Кассанису удалось регенерировать на среде, модифицированной Морелем, около 10 % высаженных меристем [21, 22]. Мэлор и Стейтс-Смит, сравнив вышеописанные среды со средой Гудвина и Мурасиге—Скуга, пришли к выводу о том, что среда с минеральной основой Мурасиге—Скуга является лучшей для выращивания меристем картофеля [23—25]. Дальнейшие работы по усовершенствованию метода позволили улучшить способы регенерации меристем и повысить выход оздоровленных растений [26—31]. Мы, испытав среды, примененные в перечисленных работах, а также несколько собственных модификаций этих сред, остановились на варианте, приведенном в разделе «Материалы и методы».

Согласно общепринятым методикам, размеры высаженных эксплантатов составляют 100—150 мкм. Регенерация меристем при этом продолжается 3—5 месяцев и около 90 % из них погибает. Использование эксплантатов большего размера приводит к значительному снижению выхода безвирусных растений. В то же время приживление меристем улучшается, а продолжительность регенерации значительно уменьшается.

Полученные нами показатели выхода нормально развитых регенерантов из меристем (в среднем $17 \pm 1,9$ %) более эффективны по сравнению с таковыми, приведенными Морелем, Мюллером [22] и Хромовой [29], у которых выход нормально развитых растений из такого размера меристем не превышал 10 %. Увеличение вероятности получения нормально регенерированных меристем можно, скорее всего,

Таблица 7
Влияние 2'-5'-олигоаденилата на количество свободных от X-вируса картофеля регенерантов из меристем

Концентрация 2'-5'-АрАрА, М	К количество высаженных меристем	Количество оздоровленных растений		Критерий Стьюдента		
		Абсолютная величина	%	1	2	3
0	368	39	$10,6 \pm 3,1$	—	0,35	1,98*
10^{-6}	368	36	$9,8 \pm 3,0$	0,35	—	2,33*
10^{-5}	368	57	$15,5 \pm 3,7$	1,98*	2,33*	—
Всего	1104	132	$11,0 \pm 1,9$	—	—	—

* Значения критерия Стьюдента $> 1,96$, указывающие на доверительные отличия сравниваемых совокупностей на 95 %-м доверительном уровне.

объяснить использованием исходного материала для вычленения меристем, необработанного дезинфицирующими веществами, применением среды нашей модификации и в значительной степени уменьшением объема питательной среды почти в 50 раз, что способствовало ее лучшему конденсированию эксплантатами.

В литературе описано большое количество натуральных и синтетических соединений, угнетающих фитопатогенные вирусы, их репликацию в растениях, инфекционность и проявление патогенных признаков.

В качестве ингибиторов вирусов изучали препараты из культуральных сред микроорганизмов, высших растений, синтетические антибиотики, аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, производные мочевины и т. д. Изучали также такие препараты, как циклогексамид, 2-тиоурацил, хлорамфеникол, фенил-аллил-тиомочевина, додецил-N-эффедриниум бромид, 2,4-диоксогексагидротриазид, актиномицин, анилин-адамантил-тиодиазол, спиртовой экстракт *Hedericum perforatum*.

Кассанис и Тинслей освободили каллус табака от Y-вируса картофеля добавлением к культуральной среде 100 мкг/л 2-тиоурацила [32]. Однако в этой работе авторы не регенерировали из оздоровленного каллуса нормальные растения. Кроме того, получить свободные от вируса растения можно регенерацией их из протопластов и каллусной ткани без какой-либо обработки.

Согласно данным Хансена и Хилдебрандта [33], в каллусах, полученных из инфицированных тканей, не все клетки содержат вирус патогена. Только 40 % растений, выращенных из отдельных клеток, которые были механически отделены от каллуса табака, инфицированного ВТМ, содержали вирус. Свободные от вируса растения регенерировали из меристемного каллуса нескольких видов растений [34—36].

Шепард [37], регенерируя растения из протопластов табака на среде, содержащей 10 мг/л антивирусного препарата виразола (рибавирин), — эффективного ингибитора многих животных ДНК-овых и РНК-овых вирусов, достиг 94 %-го выхода полностью свободных от X-вируса картофеля регенерантов против 19 %-го выхода на средах без виразола.

Однако антивирусный эффект вышеупомянутых препаратов при оздоровлении целых растений имеет временный характер: через определенное время репликация вируса и патологические симптомы восстанавливаются. В литературе не описан ни один достоверный способ, позволяющий достичь полного освобождения зараженных растений с помощью ингибиторов. Считается, что практическое применение антивирусных препаратов способствует лишь снижению распространения вирусной инфекции, а не ее уничтожению.

Полученные же нами данные дают основание утверждать, что, используя 2'-5'-олигоаденилат, можно регенерировать из меристемы вегетативно размножающихся культур полностью безвирусные растения.

При сравнении наших результатов изучения действия 2'-5'-три-олигоаденилатов на репродукцию X-вируса картофеля с данными других авторов [4, 38], исследовавших влияние 2'-5'-Аз на синтез ВТМ, заслуживает внимания более слабое угнетение препаратом в нашем случае. Деваш [4] показал, что 2'-5'-Аз ингибирует репродукцию ВТМ в зависимости от условий опыта от 50 до 90 %.

В наших исследованиях выход регенерантов, не содержащих X-, S-, M- и F-вирусов, при использовании среды с 2'-5'-олигоаденилатом в концентрации 10^{-5} М составляет 13,3 % от высаженных меристем или 72 % от нормально развитых растений, что только на 26 % больше, чем в контроле.

Это можно объяснить как различием в структуре РНК этих вирусов, так и отличиями в процессах синтеза вирусных белков, образующихся при репликации.

Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали возможность непосредственного воздействия 2'-5'-Аз на двуспиральные нуклеиновые кислоты [39]. Исходя из различий структур геномных

РНК этих вирусов, можно предположить и расхождения в действии 2'—5'-триолигоаденилатов на их нуклеиновые кислоты *in vivo*. Отличия во влиянии олигоаденилатов могут проявиться и на уровне трансляции в процессе синтеза вирусных белков субгеномными РНК.

Однако наиболее вероятной причиной является то, что в эксперименте мы использовали меристему из растений картофеля, реагирующую системной инфекцией на заражение X-вирусом картофеля. Авторы, работавшие с ВТМ, изучали действие олигоаденилата на модели сверхчувствительных (*N*-ген содержащих) растений табака [4, 38].

Некоторые исследователи предполагают, что у так называемых сверхчувствительных и иммунных растений собственный механизм образования 2'—5'-олигоаденилатов включается на более ранних стадиях инфекционного процесса по сравнению с растениями, у которых наблюдается системное заражение [40]. Возможно, дополнительное внесение 2'—5'-триолигоаденилата стимулирует дальнейшие этапы проявления механизма стабильности, к тому же общий пул (собственных и привнесенных) олигоаденилатов в этом случае выше.

В растениях с системным поражением механизм собственных защитных реакций включается на более поздних этапах инфекционного процесса, а общее количество их олигоаденилатов даже после обработки препаратами значительно ниже, чем в растениях, устойчивых и сверхчувствительных к вирусам.

Использование 2'—5'-олигоаденилата в питательной среде позволяет повысить процент выхода оздоровленных от X-, S-, M- и F-вирусов с 46 до 72 % от нормально развитых растений.

Таким образом, 2'—5'-олигоаденилат проявил универсальную противовирусную активность, и его можно рекомендовать для применения в качестве противовирусного препарата при оздоровлении растений комбинированным методом химиотерапии меристем во время их регенерации.

Summary. The effect of 2'—5'-oligoadenylates taken at different concentrations on the process of meristems regeneration and the amount of regenerants free of potato viruses X, S, M and F in the culture medium was studied. The preparation concentrations inhibiting viruses reproduction without effecting the regenerants development were chosen. Variety dependence in the process of potato improvement and 2'—5'-oligoadenylates universal antiviral effect were shown.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Limasset P., Cornuet P.* Recherche de virus de la mosaïque du tabac (Marmor Tabaci, Holmes) dans les meristemes des plantes infectees // C. R. Acad. Sci. D.—1949.—228.—P. 1971—1972.
2. *Wang P. J., Huang L. C.* Callus cultures from potato tissues and the exclusion of potato virus X from plants regenerated from stem tips // Can. J. Bot.—1975.—53.—P. 2565—2567.
3. *Борисенко С. И., Шмыгля В. А., Шустер Г.* Эффективность оздоровления картофеля методом культуры апексов с помощью ингибиторов вирусов // Докл. ВАСХНИЛ.—1985.—№ 10.—С. 10—12.
4. *Devash V., Geru A., Willis D. H. et al.* 5'-Dephosphorylated 2',5'-adenylate trimer and its analogs inhibition of tobacco mosaic virus-infected leaf discs, protoplasts, and intact tobacco plants // J. Biol. Chem.—1984.—259.—P. 3482—3486.
5. *Hovanessian A. G., Wood J. N.* Anticellular and antiviral effects of pppA(2'p5'A)n // Virology.—1980.—101.—P. 81—90.
6. *Higashi Y., Sokawa Y.* Microinjection of interferon and 2',5'-oligoadenylate into mouse L cells and their effects on virus growth // J. Biochem.—1982.—91.—P. 2021—2028.
7. *Cayley P. J., Davies J. A., Mccullagh K. G., Kerr I. M.* Activation of the ppp(A2'p)nA system in the interferon-treated, herpes simplex virus-infected cells and evidence for novel inhibitors of the ppp(A2'p)nA-dependent RNase // Eur. J. Biochem.—1984.—143.—P. 165—174.
8. *Bayrd B., Leserman L. D., Bisbal C., Lebleu B.* Antiviral activity in L1210 cells of liposome-encapsulated (2'—5')oligo(adenylate) analogues // Ibid.—1985.—151.—P. 319—325.
9. *Sharma O. K., Goswami B. B., Cohrs R. J.* Mechanism of growth inhibition of DNA containing viruses by interferon: Role of 2-5 A // The 2-5 A system: Molecular and clinical aspects of the interferon-regulated pathway.—New York: Alan R. Liss, 1985.—P. 317—324.

10. Kumar R., Choubey D., Lengyel P., Sen G. C. Studies on the role of the 2'—5'-oligoadenylate synthetase-RNase L-pathway in beta interferon-mediated inhibition of encephalomyocarditis virus replication // *J. Virol.*— 1988.— 62.— P. 3175—3181.
11. Fujihara M., Mulligan J. R., Kaji A. Effect of 2',5'-oligoadenylate on herpes simplex virus-infected cells and preventive action of 2',5'-oligoadenylate on the lethal effect of HSV-2 // *J. Interferon Res.*— 1989.— N 9.— P. 691—707.
12. Пасерп Е. У., Овод В. В., Позур В. К., Вихоть Н. Е. Иммунология: Практикум.— Киев: Выща шк., 1989.— С. 162—174.
13. Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике.— М.: Наука, 1984.— 424 с.
14. Hollings M., Stone O. M. Investigation of carnation viruses. I. Carnation mottle // *Ann. Appl. Biol.*— 1964.— 53.— P. 103—118.
15. Wang P. J., Hu N. Y. Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture // *Adv. biochem. engineering: Plant cell culture.*— Berlin: Springer, 1980.— Pt 2.— P. 61—69.
16. Mori K. // *Proc. Kanto Plant Soc.*— 1973.— 20.— P. 74—76.
17. Johnstone G. R., Wade G. C. Therapy of virus-infected plants by heat treatment. II. Host protein synthesis and multiplication of tomato aspermy virus at 36 °C // *Aust. J. Bot.*— 1974.— 22.— P. 451—460.
18. Quak F. Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus free plants // *Adv. Hortic. Sci. Appl.*— 1961.— 1.— P. 144—148.
19. Walkey D. G. A. *In vitro* methods for virus elimination // *Frontiers in plant tissue culture.*— Calgary: Univ. Calgary press, 1978.— P. 245—254.
20. Norris D. O. Development of virus-free stock of green Mountain potato by treatment with malachite green // *Aust. J. Agr. Res.*— 1954.— 5.— P. 658—663.
21. Kassanis B. A. The production of virus-free clones of some British potato varieties // *Ann. Appl. Biol.*— 1967.— 59.— P. 3.
22. Morel G., Muller J. La culture *in vitro* du meristeme apical de la pomme de terre // *C. R. Acad. Sci. D.*— 1964.— N 21.— P. 5250—5252.
23. Mellor F. C., Stace-Smith R. Development of excised potato buds in nutrient culture // *Can. J. Bot.*— 1969.— 47.— P. 1617—1621.
24. Goodwin P. B. An improved medium for rapid growth of isolated potato buds // *J. Exp. Bot.*— 1966.— 17, N 52.— P. 590—595.
25. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.*— 1962.— 15, N 13.— P. 473—497.
26. Mellor F. C., Stace-Smith R. Virus-free potatoes by tissue culture // *Appl. and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture* / Eds J. Reinert, Y. P. S. Bajaj.— Berlin: Springer, 1977.— P. 616—636.
27. Трофимец Л. Н., Князев В. А., Хромова Л. М., Егорова Л. И. Оздоровление картофеля от вирусных болезней методом верхушечной меристемы // *С.-х. биология.*— 1975.— 10, № 5.— С. 760—765.
28. Трофимец Л. Н., Князев В. А., Хромова Л. М., Остапенко Д. П. Методические указания по оздоровлению и ускоренному размножению картофеля.— М., 1976.— 12 с.
29. Хромова Л. М. Культивирование верхушечных меристем картофеля для оздоровления сортов от вирусных болезней // *Тканевые и клеточные культуры в селекции растений.*— М.: Колос, 1979.— С. 128—137.
30. Волкова Р. И., Курлович М. М., Бурова В. В. Технология производства элиты картофеля, оздоровленного методом апикальных меристем // *Разработка и совершенствование методов селекции и первичного семеноводства картофеля.*— Л., 1988.— С. 110—114.
31. Дуба А., Айрапетян Э., Винклер Г., Бутенко Р. Освещение и морфогенез изолированных меристем // *Картофель и овощи.*— 1972.— № 3.— С. 44.
32. Kassanis B., Tinsley T. W. The freeing of tobacco tissue culture from potato virus Y by 2-thiouracil // *Proc. third conf. potato virus dis.*— Lisse-Wageningen, 1957.— P. 153—155.
33. Hansen J., Hildebrandt A. C. The distribution of tobacco mosaic virus in plant callus culture // *Virology.*— 1966.— 28.— P. 15—21.
34. Pillai S. K., Hildebrandt A. C. Geranium plants differentiated *in vitro* from stem tip and callus cultures // *Plant dis. rep.*— 1968.— 52.— P. 600—601.
35. Abo El-Nil M. M., Hildebrandt A. C. Differentiation of virus-symptomless geranium plants from anther callus // *Plant dis. rep.*— 1971.— 55.— P. 1017—1020.
36. Simonsen J., Hildebrandt A. C. *In vitro* growth and differentiation of Gladiolus plants from callus cultures // *Can. J. Bot.*— 1971.— 49.— P. 1817—1819.
37. Shepard J. F. Regeneration of plants from protoplasts of potato virus X-infected tobacco leaves // *Virology.*— 1977.— 78.— P. 261—266.
38. Reichman M., Devach Y., Suhadolnik R., Sela I. Human leukocyte interferon and the antiviral factor (AVF) from virus infected plants stimulate plant tissues to produce nucleotides with antiviral activity // *Virology.*— 1983.— 128.— P. 240.
39. Matsuka G. Kh., Tkachuk Z. Y., Tkachuk L. V. et al. Influence of 2'—5' oligoadenylates on the secondary structure of nucleic acids // *Structure of eukaryotic genome and regulation of its expression: 2 nd bilateral symp. USSR—USA (Tbilisi, 16—20 October): Abstr.*— Moscow, 1989.— P. 29—30.
40. Бабоша А. В., Трофимец Л. Н., Ладыгина М. Е. Олигоденилаты и олигоденилат-синтетаза растений картофеля в защитных реакциях против вирусного патогена // *Докл. АН СССР.*— 1990.— 313, № 1.— С. 252—255.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 23.10.92