

**А.В. Харіна<sup>1</sup>, Т.Г. Кот<sup>1</sup>, В.П. Поліщук<sup>1</sup>, І.Є. Заєць<sup>2</sup>, Н.В. Черватюк<sup>2</sup>,  
А.І. Потопальський<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01033, Україна, тел.: +38 (044) 521 35 02,  
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ, вул. Академіка Заболотного,  
150, м. Київ, 03143, Україна, тел.: +38 (044) 526 11 69,  
e-mail: zkora@ukr.net

## **ІЗАТІЗОН ЯК ІНГІБІТОР ФІТОВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ**

*Представлено результати дослідження активності ізатізону проти вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) на двох модельних системах. Обробка ізатізоном насіння та рослин *Nicotiana tabacum* до інокуляції вірусом покращує ріст рослин і захищає їх від вірусної інфекції, що проявляється у зниженні ступеню прояву симптомів і зменшенні кількості вірусу в рослині. Показано, що ізатізон у розведенні 1:500 пригнічує розвиток ВТМ у культурі тканин тютюну і знижує кількість вірусу в калусній тканині на 21,7%.*

*К л ю ч о в і с л о в а: ізатізон, ВТМ, захист рослин.*

Віруси рослин здатні швидкими темпами розповсюджуватися в агроценозах, завдаючи значних збитків сільському господарству України та інших країн світу. В середньому втрати врожаю від вірусних інфекцій становлять 30% і навіть 100%. З огляду на вказане доцільними є застосування існуючих методів та розробка нових засобів боротьби з фітовірусними інфекціями.

Одним із методів контролю фітовірусних інфекцій, на який слід звернути увагу, є хіміотерапія. В літературі наведено дані стосовно антифітовірусної активності сполук різних класів, а саме аналогів нуклеозидів, екстрактів рослин, неорганічних сполук синтетичного походження [5, 7, 9], проте на практиці застосовуються лише деякі з них, такі як рибавірин та похідні бензотіадиазолу [8, 11]. Пошук активних сполук для їх наступного застосування в агросфері триває. Метою даної роботи було визначення антифітовірусної активності ізатізону. Вибір препарату обумовлений низкою причин, головна з яких — широкий спектр біологічної активності препарату.

### **Матеріали і методи**

В роботі використовували ВТМ (вірус тютюнової мозаїки, штам U1), попередньо накопичений та очищений за загальноприйнятою методикою [4].

Для проведення дослідів застосовували рослини тютюну (*Nicotiana tabacum* cv. Trapeson).

Досліджували антифітовірусну активність ізатізону, отриманого в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України. Ізатізон — це 2% розчин



*n*-тіосемикарбазону (метисазону) в універсальному розчиннику, до складу якого входять димексид і поліетиленгліколь-400 у співвідношенні 1:3.

Антивірусна активність ізатізону була досліджена в умовах *in vivo* на модельній системі ВТМ — *Nicotiana tabacum*. Для цього проводили передпосівну обробку насіння тютюну препаратом, розведеним дистильованою водою у співвідношенні 1:80. Рослини на стадії трьох листків оприскували ізатізоном у розведенні 1:200. Через 10 днів проводили третю обробку рослин препаратом шляхом оприскування. Через 1 добу після останньої обробки здійснювали інфікування рослин ВТМ, шляхом механічної інокуляції з використанням карборунду. Концентрація вірусу становила 400 мкг/мл. Контрольні рослини обробляли дистильованою водою. Для статистичної достовірності в кожному варіанті використовували по 5 рослин. Вплив речовин на розвиток вірусної інфекції в даній системі оцінювали за часом прояву і ступенем вираженості симптомів хвороби та за допомогою імуноферментного аналізу.

Для дослідження впливу ізатізону на перебіг вірусної інфекції у калусній тканині рослин тютюну як джерело експлантів було використано асептичні, інфіковані ВТМ рослини *Nicotiana tabacum*. Для індукції калусної тканини *in vitro* рослинний матеріал переносили на поживне середовище MS-1 [3], яке містило у своєму складі ізатізон у кінцевих розведеннях 1:100, 1:200 та 1:500. Контрольний калус отримували на середовищах без сполуки. Зразки ізольованого калусу тестували на присутність вірусу за допомогою імуноферментного аналізу. Регенеровані пагони переносили на безгормональне поживне середовище MS. Надалі проводили візуальну діагностику розвитку симптомів вірусної інфекції.

Для визначення концентрації вірусу в досліджуваних зразках проводили непрямий ІФА з використанням сироваток власного виготовлення.

### Результати та їх обговорення

З літературних даних відомо, що препарат ізатізон проявляє широкий спектр біохімічної, фізіологічної, протипатогенної дії [1, 6, 11]. Препарат затверджений у ветеринарії України та Росії для попередження та лікування інфекційних захворювань птахів і тварин. Показана активність ізатізону проти вірусів людини та тварин [2], а отже перспективність даного препарату очевидна.

Дослідження впливу ізатізону на рослини показали, що фенотипові ознаки рослин, оброблених ізатізоном, значно більше виражені, ніж у рослин необроблених препаратом. Це проявляється у збільшенні довжини колосу та стебла, листової пластинки та загальної біомаси рослини. Ймовірно, паралельно з очевидним фізіолого-біохімічним впливом на рослини даний препарат може мати антивірусні властивості.

Антифітовірусну активність ізатізону було вирішено досліджувати на двох модельних системах ВТМ-*Nicotiana tabacum* та ВТМ — культура тканин *Nicotiana tabacum*.

В результаті проведених експериментів показано, що ізатізон пригнічує розвиток вірусної інфекції, викликаної ВТМ на тютюні. Слід відмітити, що симптоми вірусної інфекції формувалися як у контрольних рослин, так і у рослин, оброблених ізатізоном. У контрольних рослин спостерігали затримку росту (рис. 1), мозаїку та значну деформацію листових пластинок. В той же час, у оброблених препаратом рослин симптоми були менше вираженими і з часом маскувались.





**Рис. 1. Вплив ізатізону на ріст рослин, інфікованих ВТМ:**

1 — контрольні рослини, інокульовані ВТМ; 2 — рослини, оброблені ізатізонам і інокульовані ВТМ

**Fig. 1. Influence of izatizone on the growth of tobacco plants inoculated with TMV:**

1 — control plants inoculated with TMV; 2 — plants treated with the izatizone and inoculated with TMV

За результатами ІФА обробка рослин ізатізонам призводила до зниження кількості вірусного антигену в рослинній тканині на 67%, у порівнянні з контролем. Таким чином, ізатизон певною мірою захищає рослини, значно знижуючи негативний вплив вірусу. Ймовірно у рослин, оброблених препаратом, відбувається активація захисних механізмів, які протидіють розмноженню та розповсюдженню вірусу у рослині.

Одним з методів боротьби з вірусними інфекціями рослин є отримання безвірусного посадкового матеріалу в процесі мікроклонального розмноження рослин. Однак, у багатьох випадках регенерація рослин з калусу чи апікальної меристеми не гарантує їх повного звільнення від вірусу. Саме тому сьогодні ведуться інтенсивні пошуки антивірусних сполук, при додаванні яких у середовище для регенерації рослин можна було б підвищувати відсоток виходу безвірусних рослин. Зважаючи на результати, які свідчать про здатність ізатізону пригнічувати розвиток вірусної інфекції викликаной ВТМ на тютюні *in vivo*, ми поставили собі за мету дослідити активність цього препарату *in vitro*.

Оскільки рослинна тканина, яка культивується *in vitro* є більш чутливою до хімічних чинників порівняно з нативною рослиною, то для досліджень у культурі тканин використовувалися більші розведення ізатізона, такі як: 1:100, 1:200, 1:500.

В результаті проведених експериментів показано, що ізатизону в правильно підбраній концентрації притаманна антифетовірусна активність у даній модельній системі. Так, при розведенні препарату 1:100 спостерігається негативний вплив на рослинну тканину, при цьому регенерація пагонів значно пригнічується.

При розведенні ізатізону 1:500 відмічено антивірусну активність препарату. Останній знижував кількість вірусу в калусній тканині на 21,7% (рис. 2). При збільшенні концентрації препарату (1:200) рівень антивірусної активності значно знижується. При цьому значно зростає фітотоксичний вплив на культуру.

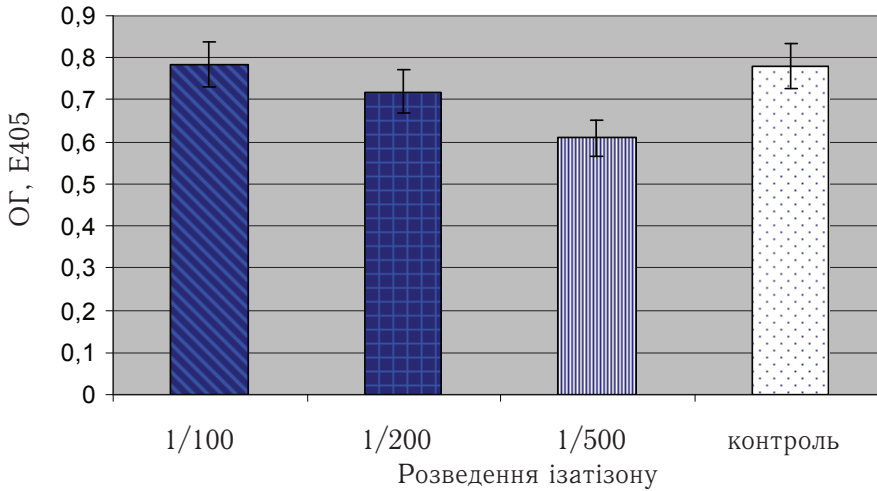


Рис. 2. Зниження кількості вірусного антигену в рослинах під впливом ізатізону (за результатами ІФА)

Fig. 2. Decrease of viral antigen quantity under izatizone influence (the results of ELISA)

Таким чином, кінцеве розведення ізатізону в поживному середовищі 1:500 є оптимальним розведенням за даних умов проведення експерименту. Така концентрація не спричиняла негативного впливу на ріст і розвиток калусної культури і водночас пригнічувала розвиток вірусу.

Співставивши результати дослідження антифітотвірної активності та біологічної активності ізатізону можна розглядати можливість застосування цього препарату в агросфері. Очевидні явні переваги цього препарату: низький рівень токсичності препарату і здатність стимулювати ріст та розвиток рослин. Крім того, в нашій роботі показано, що ізатізон має значно більший спектр біологічних властивостей і здатний пригнічувати розмноження вірусів рослин.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Заїка Л.А., Болсунова О.І., Потопальський А.І., Рибалко С.Л., Дядюн С.Т. Вивчення антивірусної дії препарату ізатізон на моделі герпес вірусу простого І (ВПГ І) // Імунологія та алергологія. — 2002. — № 3. — С. 67–68.
2. Зейдо Ф., Луцик Б. Д., Лозюк Л. В., Лозюк Р. М. Супозиторії з ізатізоном на основі поліетиленгліколю з противірусною активністю (клініко-фармацевтичні аспекти) // Acta Medica (Львівський медичний часопис). — 2005. — Т. XI, № 1. — С. 67–69.
3. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — С. 13–22.
4. Практикум по общей вирусологии/ под ред. Атабекова И.Г. — М.: Издательство Московского Университета. — 1981. — 192 с.
5. Реунов А.В., Лапшина Л.А., Нагорская В.П., Елкова Л.А. Подавление 1,3; 1,6-β-D-глюканом инфекций, вызванных X-вирусом картофеля, в листьях гомфрены и дурмана // Физиология растений. — 2000. — Т. 47, № 2. — С. 240–243.
6. Сич Г.О., Сокирко Т.О., Буцацький Л.П., Матвієнко Н.М., Попова Е.М. Вивчення стану ліпопероксидації, антиоксидантного захисту та білкового обміну у цьогорічок коропових

риб під впливом різних концентрацій імуномодуючого препарату „Ізатізон”// Науковий вісник ЛНАВМ імені С.З. Гжицького. — 2007. — Т. 9, № 2. — С. 37.

7. *Bonnes M.S., Ready M. P., Irvin J.D. and Mabry T. J.* Pokeweed antiviral protein inactivates ribosomes; implications for the antiviral mechanisms// *The Plant Journal*. — 1994. — Vol. 5. — P. 173–183.

8. *Friendrich L., Lawton K. A., Ruess W., et al.* A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco// *Plant J.* — 1996. — Vol. 10. — P. 61–70.

9. *Lavanya N., Saravanakumar D., Rajendran L., Ramiah M., Raguchander T., Samiyappan R.* Management of sunflower necrosis virus through anti-viral substances// *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. — 2009. — Vol. 42, № 3. — P. 265–276.

10. *Potopalskiy A.I., Lozyuk L.V.* Antiviral and antitumor preparation IZATIZON — Lviv, “Scientific conception”. — 1995. — P. 90.

11. *Quecin V., Lopes M., Pacheco F., Ongarelli M.* Ribavirin, a guanosine analogue mammalian antiviral agent, impairs tomato spotted wilt virus multiplication in tobacco cell cultures// *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. — 2008. — Vol. 41, № 1. — P. 1–13.

**A.V. Kharina<sup>1</sup>, T.G. Kot <sup>1</sup>, V.P. Polischuk<sup>1</sup>, I.E. Zaets<sup>2</sup>, N.V. Chervatyuk<sup>2</sup>,  
A.I. Potopalsky<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv  
Volodymyrska str., 64, Kyiv, 01033, Ukraine, tel.: +38 (044) 521 35 02  
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU  
Zabolotny str., 150, Kyiv, 03143, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 11 69  
e-mail: zkora@ukr.net

## IZATIZONE AS INHIBITOR OF PLANT VIRUS INFECTION

### Summary

Izatizone was investigated for biocontrol efficiency against tobacco mosaic virus (TMV) in two model systems. The izatizone treatment of seeds and *Nicotiana tabacum* plants prior to inoculation with the virus enhanced plant growth and protected them against TMV that displayed in decrease of symptoms severity and reduction of virus quantity in plants. It was shown that investigated compound was capable of reducing the development of TMV in tissue culture and caused 21.7% reduction of virus quantity in callus.

**К e y w o r d s:** izatizone, TMV, plant protection.



А.В. Харина<sup>1</sup>, Т.Г. Кот<sup>1</sup>, В.П. Полищук<sup>1</sup>, И.Е. Заец<sup>2</sup>, Н.В. Черватюк<sup>2</sup>,  
А.И. Потопальский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Киевский университет имени Тараса Шевченка,  
ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина, тел.: +38 (044) 521 35 02

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ,  
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03143, тел.: +38 (044) 526 11 69  
e-mail: zkora@ukr.net

## ИЗАТИЗОН КАК ИНГИБИТОР ФИТОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

### Реферат

Представлено результаты исследований активности изатизона против вируса табачной мозаики в двух модельных системах. Обработка изатизоном семян и растений *Nicotiana tabacum* до инокуляции вирусом улучшала рост растений и защищала их от вирусной инфекции, что проявлялось в снижении степени проявления симптомов и снижении количества вируса в растениях. Показано, что изатизон ингибирует развитие ВТМ в культуре ткани табака и снижает количество вируса в калусной ткани на 21,7%.

К л ю ч е в ы е с л о в а: изатизон, ВТМ, защита растений.

