

SKUTECZNOŚĆ RYBAWIRYNY W UWALNIANIU ROŚLIN ZIEMNIAKA OD WIRUSÓW S I M

EFFICACY OF RIBAVIRIN IN RELEASING POTATO PLANTS FROM S AND M VIRUSES

mgr inż. Dorota Michałowska
IHAR-PIB Oddział w Boninie, Pracownia Zasobów Genowych i Kultur in vitro
e-mail: d.michalowska@ihar.edu.pl

Streszczenie

Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* 4 genotypów ziemniaka umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS. Pożywkę z ustalonym pH 5,8 poddano uprzednio sterylizacji w autoklawie z zachowaniem parametrów procesu, tj. temperatura 121°C, ciśnienie 0,2 MPa i czas 15 min. Rybawirynę (RBV) w dawkach 20, 30 i 40 mg/l pożywki dodawano za pomocą filtrów strzykawkowych pod komorą laminarną. Wszystkie kultury *in vitro* utrzymywano 3-4 tygodnie w fitotronie w temperaturze 22-20°C, z zachowaniem 16-godzinnego dnia i oświetlenia ok. 8 W/m². W 4. tygodniu z każdej kombinacji wysadzono rośliny w szklarni do doniczek z substratem torfowym. Po kolejnych 4-5 tygodniach rośliny przebadano testem DAS ELISA na obecność wirusów. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach. RBV w dawce 40 mg/l w 100% uzdrowiła rośliny porażone wirusem S, ale zadziałała fitotoksycznie na eksplantaty, które słabiej się korzeniły i rosły niższe w stosunku do obiektu kontrolnego. Dawki 20 i 30 mg/l w 60-80% uwolniły badane odmiany od wirusa S i nie miały negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. W przypadku wirusa M poszczególne dawki RBV nie zadziałały antywirusowo.

Słowa kluczowe: chemioterapia, rybawiryna, wirusy ziemniaka

Abstract

The single-node *in vitro* plant fragments of 4 potato genotypes were placed individually in tubes containing 2-3 ml of MS medium. The medium with the adjusted pH of 5.8 was previously sterilized in an autoclave with the process parameters, i.e., temperature 121°C, pressure 0.2 MPa, and time 15 min.

Ribavirin (RBV) at doses of 20, 30, and 40 mg/l medium was added using syringe filters under the laminar chamber. All in vitro cultures were kept for 3-4 weeks in a phytotron at a temperature of 22-20°C, with a 16-hour day and an illumination of approx – 8 W/m². At week 4, the plants from each combination were planted in the greenhouse in pots with peat substrate. After another 4-5 weeks, the plants were tested for viruses by the DAS ELISA. The experiment was performed in four replications. RBV at a dose of 40 mg/l 100% healed plants infected with the S virus, but phytotoxic effects on explants that rooted less well and grew smaller than in the control object. The doses of 20 and 30 mg/l released 60-80% of the tested cultivars from the S virus and had no adverse effect on plants' growth and development in vitro. In the case of the M virus, individual doses of RBV did not work antivirally.

Keywords: chemotherapy, potato viruses, ribavirin

Genotypy ziemniaka (odmiany,rody perspektywiczne) gromadzone w postaci roślin in vitro w Banku Genów są źródłem materiałów wyjściowych do hodowli zachowawczej i twórczej oraz dostarczają materiał roślinny do badań innym placówkom naukowym. Ważnym elementem utrzymywania i udostępniania kolekcji in vitro ziemniaka jest jej wysoka zdrowotność. Materiał wprowadzany do długoterminowego przechowywania w Banku powinien być wolny od patogenów, w tym od wirusów.

Jednym ze sposobów eliminowania wirusów z roślin in vitro, obok kultury merystemów, termo-, krio- i elektroterapii, jest chemioterapia. Antymetabolity używane w chemioterapii są to analogi nukleotydów o wysokiej aktywności przeciwwirusowej. Mechanizm ich działania polega na włączaniu się w metabolizm wirusów, co wywołuje letalne zmiany w ich genomach i skutkuje zahamowaniem namnażania wirusów w komórkach rośliny (Malepszy 2001). Zwykle są stosowane jako dodatek do pożywki w kulturze merystemów wierzchołkowych lub jednowęzłowych fragmentów roślin in vitro. Ważny jest zarówno dobór odpowiedniego preparatu, jak i jego koncentracja, gdyż wraz ze wzrostem stężenia w pożywce wprawdzie wprost proporcjonalnie rośnie liczba roślin wolnych od wirusów po zakończeniu terapii, ale też zmniejsza się liczba roślin zdolnych do regeneracji (Nasir i in. 2010, Mahmoud i in. 2009).

Najbardziej znanym chemioterapeutycznym przeciwwirusowym jest rybawiryna (1-β-D-rybofuranozylo-1H-1, 2, 4-triazolo-3-karboksylamid), która hamuje replikację wirusowego DNA i RNA, co w rezultacie może uwolnić roślinę od wirusa. Według danych literaturowych rybawiryna (Virazole) jest skuteczna w szerokim zakresie stężeń (5-200 mg/l).

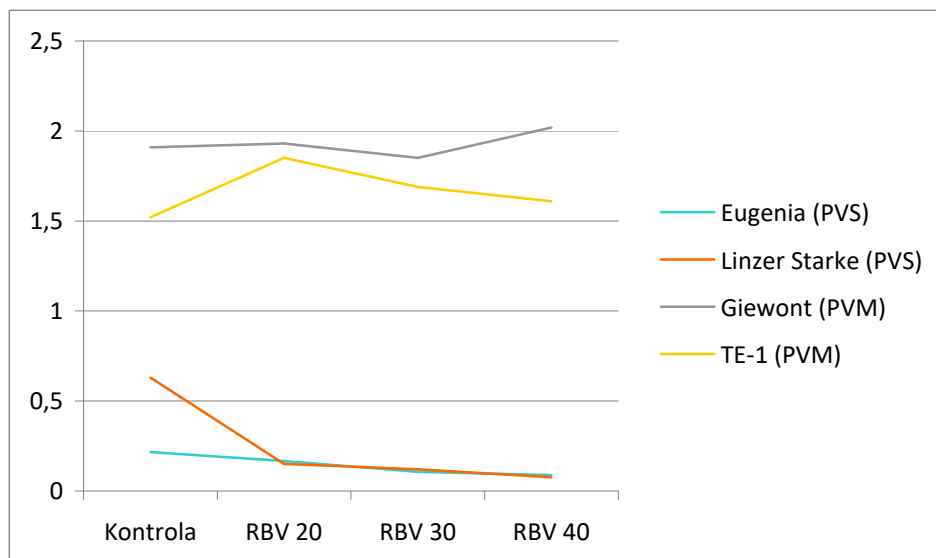
Materiał i metody

Rośliny in vitro 4 genotypów: Eugenia i Linzer Starke (PVS), Giewont i TE-1 (PVM), w których testem DAS-ELISA stwierdzono wysokie porażenie wirusami, poddano działaniu rybawiryny (RBV). Jednowęzłowe fragmenty roślin umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS z dodatkiem RBV. Pożywkę z ustalonym pH na poziomie 5,8 poddano uprzednio sterylizacji w autoklawie z zachowaniem parametrów procesu, tj. temperatura 121°C, ciśnienie 0,2 MPa i czas 15 min. Do sterylnej pożywki, za pomocą filtrów strzykawkowych, pod komorą laminarną, dodano rybawirynę w dawkach 20, 30 i 40 mg/l pożywki. Kontrolę stanowiły fragmenty roślin wyszczepione na pożywkę bez antymetabolitu.

Wszystkie kultury in vitro utrzymywano 3-4 tygodnie w fitotronie w temperaturze 22-20°C, z zachowaniem 16-godz. dnia i oświetlenia ok. 8 W/m². W 4. tygodniu z każdej kombinacji wysadzono rośliny w szklarni do doniczek z substratem torfowym. Po kolejnych 4-5 tygodniach rośliny zbadano testem DAS ELISA na obecność wirusów. Doświadczenie wykonano w 4 powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Zastosowane dawki rybawiryny w różnym stopniu wpływały na eliminowanie wirusów w ocenianych genotypach. RBV dodana do podłoża w dawce 40 mg/l w 100% uzdrowiła rośliny in vitro porażone wirusem S, ale zadziałała fitotoksycznie na eksplantaty, które słabiej się korzeniły i rosły niższe w stosunku do obiektu kontrolnego (fot. 3 i 4). Dawki 20 i 30 mg/l w 60-80% uwolniły badane odmiany od wirusa S, a jednocześnie nie zaobserwowano negatywnego działania preparatu na wzrost i rozwój roślin (fot. 1 i 2). W przypadku wirusa M poszczególne dawki RBV nie zadziałały antywirusowo.

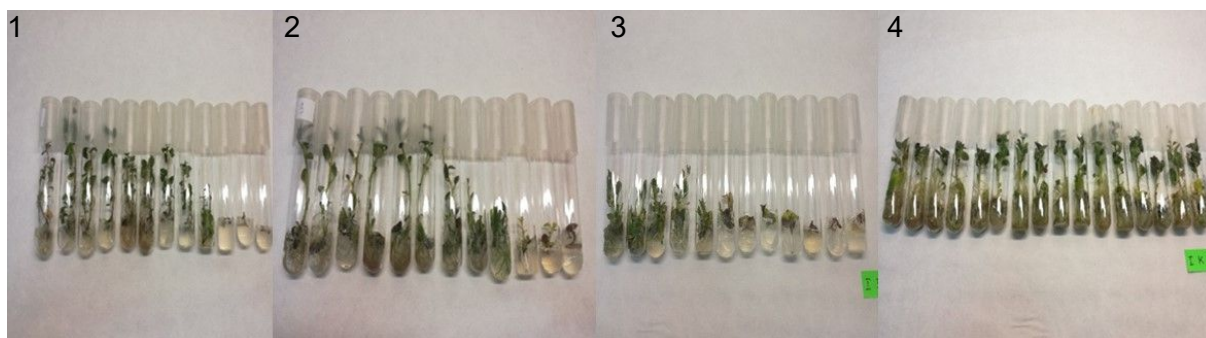


Rys. 1. Średni poziom ekstynkcji wirusów S i M po zastosowaniu różnych dawek rybawiryny (RBV)

Tabela 1

Procentowy udział roślin in vitro uwolnionych od wirusów S i M (średnia z 3 cykli)

Genotyp	Kontrola	RBV 20	RBV 30	RBV 40
Eugenia (PVS)	0,0	11,1	28,6	30,0
Linzer Starke (PVS)	0,0	40,0	60,0	85,7
Giewont (PVM)	0,0	0,0	0,0	0,0
TE-1 (PVM)	0,0	0,0	0,0	0,0



Fot. 1, 2, 3. Reakcja roślin in vitro na dawkę 20, 30 i 40 mg/l rybawiryny
Fot. 4. Obiekt kontrolny (fot. D. Michałowska)

Rybawiryna od lat jest uznawana za najskuteczniejszy chemioterapeutyk eliminujący wirusy z roślin ziemniaka. Nasir i inni (2010) oraz Mahmoud i inni (2009) zaobserwowali, że rybawiryna z wysoką skutecznością eliminuje wirusy A, X, S, M, Y i liściozwoju. W 2014 r. Yang i inni w badaniach nad skutecznością rybawiryny w eliminowaniu wirusów z roślin ziemniaka zastosowali bardzo wysokie jej dawki, od 75 do 200 mg/l pożyw-

ki, udowadniając skuteczność RBV, ale jednocześnie stwierdzili, że wysokie dawki mają fitotoksyczne działanie na pasażowane eksplantaty. Nasze badania potwierdziły, że wyższe dawki RBV, od 40 mg/l, obniżają poziom ekstynkcji wirusa, ale działają fitotoksycznie na wzrost i rozwój roślin in vitro.

Według badaczy na wyeliminowanie wirusa w znacznym stopniu wpływa odmiana ziemniaka, środki przeciwwirusowe, rodzaj

wirusa oraz kombinacja wirusów (gdy roślina jest zainfekowana kilkoma wirusami). Dlatego największą efektywnością, zwłaszcza jeśli chodzi o trudne do zwalczania wirusy, jak M i S, odznaczają się metody kombinowane, łączące dwa, trzy rodzaje terapii, np. kulturę *in vitro* merystemów wierzchołkowych z termo- i chemioterapią.

Wnioski

1. Rybawiryna dodana do pożywki zmniejsza koncentrację wirusa S wprost proporcjonalnie do zastosowanego stężenia.
2. Dodanie do pożywki rybawiryny nie ma wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa M.
3. Wyższe dawki RBV (40 mg/l) działają fitotoksycznie na wszczepione eksplantaty (negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin *in vitro*).

Literatura

1. Chrzanowska M. 2000. Choroby ziemniaka wywołane przez wirusy. – *Więś Jutra* 3(20): 27-29; **2. Facioli G. 2001.** Control of Potato Viruses Rusing Meri-

stem and Stem-cutting Cultures. *Thermotherapy and Chemotherapy*. Ed. Virus and Virus-like Disease of Potatoes and production of seed potatoes: 382-385; **3. Kostiw M. 2013.** Przyrodnicze i pozaprzyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasienną ziemniaka. – *Więś Jutra* 1(174): 28-29; **4. Mahmoud S. Y. M., Hosseney M. H., Abdel-Ghaffar M. H. 2009.** Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. – *Int. J. Virol.* 5(2): 64-76; **5. Malepszy S. 2001.** *Biotechnologia roślin*. PWN Warszawa. 736 s.; **6. Nasir I. A., Tabassum B., Latif Z., Javed M. A., Haider M. S., Husnain T. 2010.** Strategies to control potato virus Y under *in vitro* conditions. – *Pak. J. Phytopath.* 22b(1): 63-70; **7. Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. 2013.** Review of viruses in plants: twenty years of progress. – *Span. J. Agric. Res.* 11(1): 173-188; **8. Smyda P. 2012.** Metody eliminacji wirusów z roślin *in vitro* ziemniaka. – *Ziemn. Pol.* 2: 4-7; **9. Yang L., Nie B., Jun Liu, Song B. 2014.** A Re-examination of the Effectiveness of Ribavirin on Eradication of Viruses in Potato Plantlets *in vitro* Using ELISA and Quantitative RT-PCR. – *Am. J. Potato Res.* 91: 304-311; **10. Zaklukiewicz K. 1982.** Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. – *Ziemniak* 1981/82: 137-160

