

ЗАСТОСУВАННЯ РИБАВІРИНУ ПРИ ОЗДОРОВЛЕННІ СОРТІВ КАРТОПЛІ

Волкова І.В., Демчук І.В.

Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН України,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027
e-mail: iza_volk@mail.ru

Запропоновано методикау оздоровлення сортів картоплі від Х, Y та S-вірусів за використання рибавірину, яка робить процес оздоровлення ефективнішим та дозволяє в контрольованих умовах in vitro значно скоротити строки отримання безвірусного матеріалу. Процес складається з таких операцій: введення матеріалу в культуру in vitro, двофазна хіміотерапія, скринінг безвірусних регенерантів, оцінювання отриманих ліній в умовах ґрунту.

Ключові слова: картопля, рибавірин, віруси, оздоровлення.

Картопля – культура, яка у світовому виробництві продуктів харчування посідає четверте місце після пшениці, рису та кукурудзи. Найбільш повно реалізувати генетичний потенціал сучасних високопродуктивних сортів неможливо без якісного насінневого матеріалу, оскільки вірусні інфекції, які призводять до виродження сортів, передаються бульбами і накопичуються при репродукуванні. В Україні мають широке розповсюдження такі вірусні хвороби картоплі, як зморшкувата і смугаста мозаїки, скручування листків, збудниками яких на більшості сортів є Х-, Y-, S-віруси, що зустрічаються часто в змішаних інфекціях з ВСЛК і М-вірусом картоплі.

Труднощі боротьби з вірусними інфекціями обумовлені як особливостями біології рослин, так і особливостями паразитизму вірусів. Вихідним матеріалом для відтворення еліти картоплі нарівні з матеріалом від добору клонів є також матеріал, оздоровлений методами біотехнології, зокрема, культивуванням меристем. Багатьма авторами, в тому числі і нашими дослідженнями, доведено присутність вірусів у меристематичній тканині. Експериментальні дані свідчать про те, що найбільша зона верхівкової меристеми вільна від вірусів Y, A, ВСЛК, менша – від Х і найменша – від S і М вірусів [1, 2]. Оскільки звільнитися від вірусної інфекції

лише за використання методу культури меристем не завжди можливо, ефективність оздоровлення підвищують за допомогою додаткових антивірусних заходів, а саме, використовують термо- або хіміотерапію.

Стандартною речовиною, яка широко використовується при оздоровленні сортів картоплі, є рибавірин, або віразол (1- β -D-рібофуранозіл-1, 2, 4-триазол-3-карбоксамід) [3] – аналог нуклеозидів з антивірусною активністю проти багатьох вірусів рослин, у тому числі вірусів картоплі. Хіміотерапією рибавірином доповнюють метод культури меристем, або додають рибавірин при оздоровленні сортів за використання більших експлантів – бруньок та експлантів з брунькою. Щодо ефективності використання різних технологічних прийомів у літературі існують суперечливі повідомлення. За численними даними, звичайно приживається від 8 до 29-63 % виділених меристем [4, 5], з них регенерують 34-68 % [6]. У залежності від величини висаджених експлантів, безвірусними виявляються від 3 до 98 % регенерантів [4-6]. Багаторічний досвід співробітників Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН України дає підставу стверджувати, що регенерують у рослини, залежно від сорту, від 0 до 50 % висаджених меристем. Відповідно, залежно від застосованої терапії, від 10 до 81 % отриманих регенерантів за результатами електронної мікроскопії виявляються безвірусними.

Що стосується антивірусної специфічності дії рибавірину, існуючі дані також неоднозначні. Наприклад, протокол Інтернаціонального Центру Картоплі – СІР [7] рекомендує використання рибавірину для звільнення картоплі лише від Y, X, та S-вірусів картоплі. Проте, Cassels і Long повідомляли [8] про успішне оздоровлення від Y, X, M, S-вірусів картоплі при додаванні 10^{-5} M рибавірину в середовище для культивування меристем. Klein та Livingston [9] описали оздоровлення двох сортів картоплі від Y вірусу з 80-відсотковою ефективністю за використання рибавірину в концентрації 10 мг/л. Sanchez із співробітниками підсумували дані по оздоровленню 34 сортів картоплі: 74 % рослин, що регенерували з експлантів з брунькою, та 91 % рослин, які регенерували з меристем, було звільнено від S, X, Y та ВСЛК. При змішаній інфекції X та S-вірусами, ефективність оздоровлення значно підвищувалася за одночасного використання термотерапії та рибавірину і становила близько 90 % [10]. У той же час,

дані інших дослідників свідчать лише про 10-відсотковий вихід безвірусних регенерантів при оздоровленні картоплі від S, X та Y-вірусів за використання подібної технології [11]. Wambugu та ін. [12] описали звільнення матеріалу картоплі від Y та S-вірусів за дії рибавірину на експланти з брунькою. Використовуючи експланти з брунькою, Mahmoud та ін. показали, що ефективність оздоровлення картоплі від Y-вірусу підвищується від 40 до 100 % за доповнення дії рибавірину (20 мг/л) електротерапією [13]. Серед іншого описано двофазну хіміотерапію рибавірином, як прийом, що підвищує ефективність біотехнологічного оздоровлення сортів картоплі [14].

Метою наших досліджень було вдосконалення технологічного процесу оздоровлення сортів картоплі за використання рибавірину.

Матеріали і методи. Для дослідження було відібрано клони та мікроклони сортів Аріель, Рів'єра, Санте, Роко, Зоряна, Адретта, Нагорода, Сатурна, Дніпрянка, Кондор, Вінета, інфіковані S, X, Y та M-вірусами картоплі в різних комбінаціях.

Відбір вихідних материнських клонів для оздоровлення проводили на насінницьких ділянках. Під час вегетації в полі відмічали розвинені кущі з типовими сортовими ознаками. Перевіряли наявність в них латентних вірусних інфекцій імунологічними та електронномікроскопічними методами. З тестованих клонів для подальшої роботи відбирали найпродуктивніший. З відібраних бульб в умовах вегетаційної кімнати при 16-годинному фотоперіоді виросували рослини до висоти від 25 см до 30 см.

Матеріал під час технологічного процесу оздоровлення перевіряли імунологічно (ІФА) та електронномікроскопічно – методом негативного контрастування. Метод негативного контрастування дозволяє зберегти морфологічні особливості і структуру віріонів. Суть методу полягає в тому, що контрастуюча речовина високої щільності оточує об'єкт більш низької щільності, в результаті чого малоконтрастний об'єкт чітко виділяється на фоні плівки-основи.

Для виготовлення препарату рослинну тканину розміром 0,25 см² розтирали безпосередньо у краплі 10 % розчину фосфорновольфрамової кислоти (рН 7,0). Сітку з плівкою-основою витримували на поверхні краплі від 1 до 5 хвилин, відмивали у краплі розчину фосфорновольфрамової кислоти впродовж 1

хвилини. Після підсихання на повітрі впродовж кількох хвилин препарат проглядали в електронному мікроскопі.

Введення сорту, що оздоровлюється, в культуру *in vitro* проводили за стандартним протоколом з використанням 70 % етанолу та 0,1 % розчину діациду, час стерилізації – від 5 хв до 7 хв. Виділяли експланти розміром 0,4-0,5 мм на поживне середовище за прописом Мурасиге-Скуга (МС). Щоб запобігти утворенню калуса, пробірки поміщали в умови з розсіяним освітленням на 3-4 дні, після чого їх культивували на стелажах з освітленням 4-6 тис. люкс при 16-годинному фотоперіоді. Під час регенерації експланти послідовно пересаджували на свіжі поживні середовища, видаляючи відмерлі тканини.

Для оздоровлення сортів картоплі ми застосовували прийом двофазної хіміотерапії мікророслин рибавірином.

Хіміотерапії I піддавали одновузлові живці від добре розвинених рослин-регенерантів. Мікророслини розрізали по числу вузлів, видаляли листочки та поміщали в стерильний розчин рибавіріну (200 мг/л) на 1 годину.

Хіміотерапія II. Після експозиції в розчині антивірусної речовини живці висаджували на середовище МС із додаванням рибавіріну (10-20 мг/л). Пробірки культивували на стелажах з освітленням 4-6 тис. люкс при 16-годинному фотоперіоді до формування пагону, після чого паростки переносили на середовище без рибавіріну. Отримані рослини-регенеранти з 5-6 листочками живцювали та піддавали вірусологічному контролю. Всі живці від однієї рослини-регенеранта є однією клоновою лінією.

Під час оздоровлення патогени можуть не виявлятися описаними методами діагностики внаслідок низької концентрації. Тому виникає необхідність проведення ретельного вірусологічного контролю оздоровлених ліній упродовж всього періоду клонування мікроклонів *in vitro*, оскільки не завжди вдається виявити інфекцію в рік оздоровлення. Крім того, бажано проводити підтверджувальний вірусологічний аналіз оздоровлених сортозразків картоплі молекулярно-генетичними методами.

Лінії, що показували негативний результат на наявність вірусів під час усіх тестувань, розмножували послідовним живцюванням у культурі *in vitro* для подальшого висаджування в ґрунт і перевірки на відповідність сортовим ознакам та добору кращих за господарсько-біологічними ознаками.

Результати та їх обговорення. Введення в технологію оздоровлення змін (використання бруньок або експлантів з брунькою від мікророслин замість виділення меристем) обумовлено не лише високою вірогідністю присутності вірусів у меристематичній тканині [1, 2], низькою приживаністю експлантів, але й великою кількістю факторів (вторинна бактеріальна контамінація, ефект поранення, зникнення організуючої ролі тканин під час ізоляції та регенерації меристем, стрес ініціації культури *in vitro*, людський чинник тощо) [15, 16], що впливають на тривалість регенерації та якість отриманих регенерантів. Метою оздоровлення і клонального розмноження *in vitro* є отримання фізіологічно оновленого безвірусного матеріалу, що зберігає повну тотожність генотипу вихідних сортів. Як правило, в більшості випадків при оздоровленні регенерація відбувається шляхом прямого органогенезу, без дедиференціації клітин. Проте, з меристемами може утворюватися морфогенний калюс унаслідок її сильного поранення при виділенні або за деяких співвідношеннях фітогормонів у середовищі та з інших причин. Як приклад, на рис. 1 представлено пробірки з меристемними регенерантами сорту Аріель, які через п'ять місяців культивування *in vitro* перебувають на різних етапах морфогенезу – від шматочка калюсу до повністю сформованої рослини.

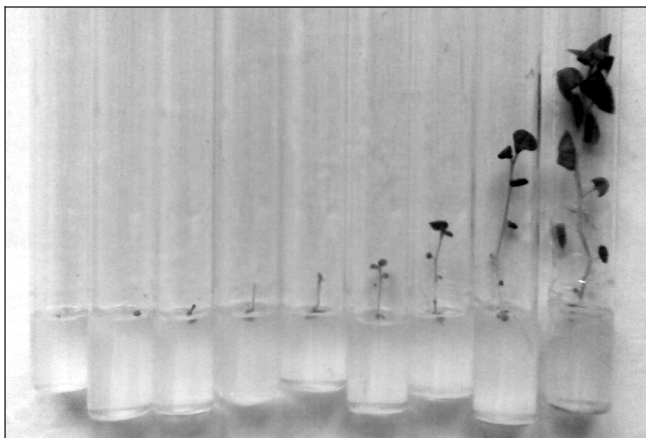


Рис. 1. Пробірки з одночасно висадженими меристемними експлантами сорту Аріель, які через п'ять місяців культивування *in vitro* перебувають на різних етапах морфогенезу

З метою оптимізації хіміотерапії за використання рибавірину, досліджували прийом двофазної хіміотерапії рослин картоплі *in vitro*, коли дії антивірусної речовини піддавались експланти з брунькою від пробіркових рослин.

Хіміотерапії I піддавали однузлові живці від добре розвинених рослин-регенерантів сортів Зоряна, Аріель, Рів'єра, Санте, Роко, Адретта, Нагорода, Сатурна, Дніпрянка, Кондор, Вінета, які висаджували на поживне середовище з додаванням рибавірину (хіміотерапія II). Відмічали високу приживлюваність живців, проте рослини з них упродовж хіміотерапії мали знижені темпи росту та змінену форму листової пластинки відносно контролю без дії антивірусної речовини (рис. 2, 3).

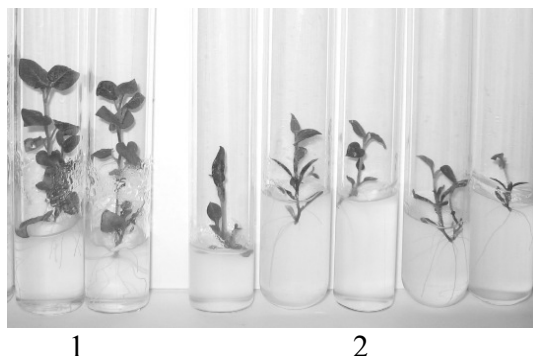


Рис. 2. Мікророслини картоплі сорту Зоряна: 1 – контроль, 2 – рослини впродовж процесу хіміотерапії

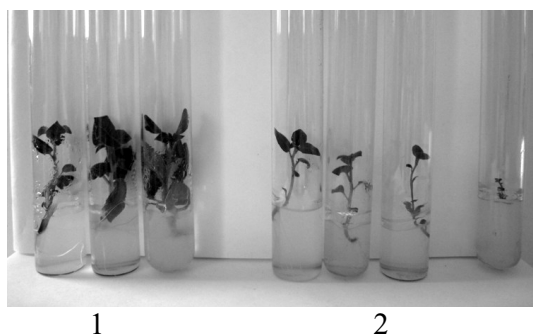


Рис. 3. Мікророслини картоплі сорту Рив'єра: 1 – контроль, 2 – рослини впродовж процесу хіміотерапії

Через 2-3 тижні після хіміотерапії I та II сформовані пагони пересаджували на середовище без антивірусної речовини. За 1-1,5 місяця визначали ефективність оздоровлення за використання електронної мікроскопії. Результати аналізу наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Ефективність хіміотерапії інфікованих мікророслин картоплі за використання рибавірину

| Сорти | Хіміотерапія I та II | | | Рослини з балом розвитку | | | | | Середній бал | Наявність вірусів |
|-----------|----------------------|-------------|-------|--------------------------|---|---|---|---|--------------|-------------------|
| | висаджено експлантів | регенеранти | | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | | |
| | | од. | % | | | | | | | |
| Нагорода | 16 | 14 | 87,5 | 2 | 5 | 6 | 1 | 0 | 3,57 | + |
| Кондор | 12 | 12 | 100,0 | 1 | 1 | 5 | 4 | 1 | 2,75 | - |
| Зоряна | 17 | 9 | 52,9 | 0 | 1 | 3 | 5 | 0 | 2,56 | + |
| Адретга | 16 | 14 | 87,5 | 0 | 3 | 7 | 4 | 0 | 2,93 | - |
| Аріель | 14 | 14 | 100,0 | 1 | 6 | 6 | 1 | 0 | 3,50 | - |
| Санте | 10 | 8 | 80,0 | 0 | 0 | 6 | 2 | 0 | 2,50 | - |
| Вінета | 9 | 9 | 100,0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 0 | 3,00 | - |
| Дніпрянка | 12 | 12 | 100,0 | 6 | 5 | 0 | 1 | 0 | 4,25 | + |
| Сатурна | 11 | 9 | 81,8 | 1 | 1 | 5 | 2 | 0 | 3,11 | + |
| Рив'єра | 10 | 10 | 100,0 | 0 | 1 | 4 | 4 | 1 | 2,20 | - |
| Роко | 17 | 11 | 64,7 | 0 | 1 | 3 | 5 | 2 | 2,27 | - |

Проте, від сортів Нагорода, Зоряна, Кондор, Дніпрянка не вдалось отримати безвірусний матеріал. За результатами вірусологічного контролю виявилось, що вони уражені М-вірусом картоплі.

Порівняно з методом культивування меристем описана технологія дозволила зробити процес оздоровлення більш технологічним, оскільки запобігала вторинній бактеріальній контамінації експлантів, забезпечила регенерацію від 52,9 % до 100 % та значно скоротила час регенерації, а відтак, тривалість технологічного процесу. Слід наголосити, що використання рибавірину дозволило звільнити рослинний матеріал від S, Y та X-вірусів картоплі. Проте, хіміотерапія рибавірином не тільки не позбавляла рослини М-вірусу картоплі, але й сприяла виявленню цього патогена навіть у тих зразках, де він не діагностувався до оздоровлення (рис. 4). Дослідження щодо оздоровлення рослин від М-вірусу будуть продовжені з іншими антивірусними речовинами.

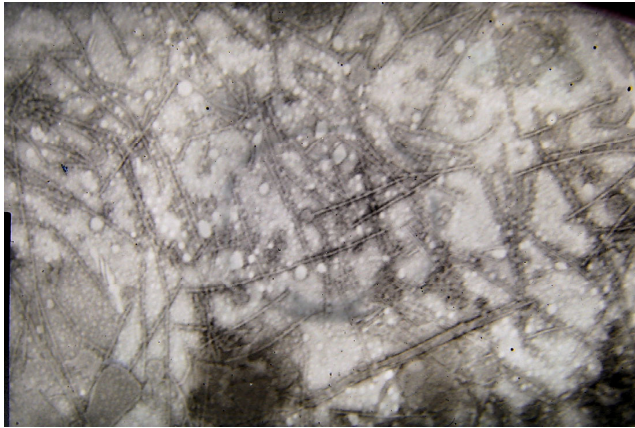


Рис. 4. Вірусні частки в препараті з соку пробіркової рослини сорту Зоряна

Таким чином, у ході досліджень сформовано етапи та послідовність робіт технологічного процесу оздоровлення сортів із застосуванням рибавіріну: попереднє польове оцінювання клонів сорту, що потребує оздоровлення; введення матеріалу в культуру *in vitro*, хіміотерапія I експлантів з мікробрунькою та хіміотерапія II; експланти, що регенерують, піддаються періодичним чисткам та пересадкам на свіжі поживні середовища; кількаразові електронномікроскопічні тестування первинних регенерантів та мікроклонів із них; прискорене розмноження безвірусних мікроклонів; оцінювання відібраних безвірусних клонових ліній в умовах ґрунту на продуктивність та тотожність ознакам вихідного сорту.

1. MacKinnon J.P. Comparative rates of potato virus X into tubers and eyes of three potato varieties /MacKinnon J.P., Munro J. //Am. potato J. – 1959. – № 36. – Р. 410-413.

2. Зарицький М.М. Електронномікроскопічні дослідження апікальних меристем картоплі та вплив хіміотерапії на процес оздоровлення /Зарицький М.М., Петренко О.М. //С.-г. мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2005. – Вип. 1-2. – С. 164-171.

3. Mechanism of action of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. //Proc. Nat. Acad. Sci. – 1973. – № 70. – Р. 1174-1178.

4. Трускинов Э.В. Регенерация коллекционных образцов картофеля в культуре ткани /Э.В. Трускинов, Л.И. Алексеева //Регуляция роста и

развития картофеля. – М.: Наука, 1990. – С. 98-105.

5. Трускинов Э.В. Оздоровление коллекции картофеля в культуре ткани /Э.В. Трускинов, Е.В. Рогозина //Физиол. раст. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 432-439.

6. Трофимец Л.Н. Регуляция роста и развития картофеля при оздоровлении и клональном микроразмножении /[Трофимец Л.Н., Бойко В.В., Зейрук Т.В. и др.] //Регуляция роста и развития картофеля. – М.: Наука, 1990. – С. 150-154.

7. Lizarrago R. Tissue culture for elimination of pathogens /Lizarrago R., Panta A., Jayasinghe U., Dodds J. //CIP Research Guide. – 1991. – № 3. – P. 8-12.

8. Cassels A.C. The elimination of potato viruses X, Y and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of virazole /Cassels A.C., Long R.D. //Pot. Res. – 1982. – № 25. – P. 165-173.

9. Klein R.E. Eradication of potato virus X from potato by ribavirin treatment of cultivated potato shoot tips /Klein R.E., Livingston C.H. //Amer. Potato J. – 1982. – № 59. – P. 359-365.

10. Sanchez G.E. Response of selected *Solanum* species to virus eradication therapy /G.E. Sanchez, S.A. Slack, J.H. Dodds //Am. J. of Pot. Res. – 1991. – Vol. 68, № 5. – P. 299-315.

11. Zapata C. An *in vitro* procedure to eradicate potato viruses X, Y, and S from Russet Norkotah and two of its strains /Zapata C., Miller J.C., Smith R.H. //In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. – 1995. – Vol. 31, N 3. – P. 153-159.

12. Wambugu F.M. Eradication of potato virus Y and S from potato by chemotherapy of cultured axillary bud tips /Wambugu F.M., Secor G.A., Gudmestad N.C. //Am. Potato J. – 1985. – № 62. – P. 667-672.

13. Mahmoud S.Y.M. Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants /Mahmoud S.Y.M., Hosseney M.H., Abdel-Ghaffar M.H. //Intern. J. of Virol. – 2009. – Vol. 5. – №2(64-76). – P. 1816-4900.

14. Оптимизация приемов оздоровления, размножения и защиты семенного картофеля от вирусной инфекции: Методические указания /[Ж.В. Блоцкая, Н.Н. Тимофеев, О.Н. Зубкевич и др.]. – Минск, 1996. – 16 с.

15. Хромова Л.М. Возможности соматоклональной вариабельности генотипов картофеля для улучшения сортов /Л.М. Хромова //Исследования по клеточной селекции: науч. тр. – М., 1984. – С. 68-75.

16. Кунах В.А. Еволюція геному рослин в культурі клітин *in vitro*: особливості, причини, механізми та наслідки /Кунах В.А. //Генетика і селекція на межі тисячоліть: Зб. наук. праць: у 4-х т. – К.: Логос, 2001. – Т. 1. – С. 53-67.

ПРИМЕНЕНИЕ РИБАВИРИНА ПРИ ОЗДОРОВЛЕНИИ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ

Волкова И.В., Демчук И.В.

Институт сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины,
г. Чернигов

Предложена методика оздоровления сортов картофеля от X, Y и S-вирусов картофеля с использованием рибавирина, которая делает процесс оздоровления более эффективным и позволяет в контролируемых условиях in vitro значительно сократить сроки получения безвирусного материала. Процесс состоит из таких операций: введение материала в культуру in vitro, двухфазовая химиотерапия, скрининг безвирусных регенерантов, оценка полученных линий в условиях грунта.

Ключевые слова: *картофель, рибавирин, вирусы, оздоровление.*

APPLICATION OF RIBAVIRIN IN POTATO CULTIVARS SANITATION

Volkova I.V., Demchuk I.V.

Institute of Agricultural Microbiology, NAAS of Ukraine, Chernihiv

The sanitation means for elimination of potato viruses X, Y, and S from potato cultivars using ribavirin preparation was suggested. The proposed procedure has noticed to be more efficient and has resulted in significant decrease of the time of obtaining virus-free material at controlled conditions in vitro. The process consists of certain stages: material introduction in vitro, two-phase chemotherapy, screening of virus-free regenerants and complex estimation of clone lines in soil conditions.

Key words: *potato, ribavirin, viruses, sanitation.*