

ПРЕДВАРИТЕЛНИ РЕЗУЛТАТИ ЗА ВЛИЯНИЕТО НА РИБАВИРИН ВЪРХУ IN VITRO КУЛТИВИРАНИ ЯБЪЛКОВИ РАСТЕНИЯ С ЦЕЛ ЕЛИМИНИРАНЕ НА НЯКОИ ВИРУСИ

Л. Начева, С. Милушева

Институт по овощарство - Пловдив
e-mail: lilyn@abv.bg; instov@infotel.bg

PRELIMINARY RESULTS OF THE EFFECT OF RIBAVIRIN ON IN VITRO CULTIVATED APPLE PLANTS WITH THE AIM OF ELIMINATING SOME VIRUSES

L. Nacheva, S. Milusheva

Fruit Growing Institute – Plovdiv

РЕЗЮМЕ

Приложена е хемотерапия с Рибавирин (виразол) за елиминиране на ACLSV, ApMV и ASGV от микроразмножени растения на ябълковия сорт „Ремо“.

Връхни и странични пъпки, изолирани от инфектирани дървета, са подготвени, стерилизирани и въведени в култура както е описано по-рано (Милушева и Иванова, 2004).

Единични връхни пъпки (дължина около 1 см) са изолирани от микроразмножени растения и са прехвърлени на хранителна среда с рибавирин. Рибавиринът (20, 40, 80 and 100 mg.l⁻¹), предварително стерилизиран с милипор филтър (0.22µm), е добавен към автоклавираната хранителна среда преди втвърдяването ѝ.

Растенията са култивирани в камера при температура 22±2°C и 16 часа фотопериод (40 µmol.m⁻²s⁻¹ PAR) за три седмици.

Ефектът от хемотерапията зависи от концентрацията на рибавирин.

SUMMARY

Chemotherapy with Ribavirin (virazole) were applied to eliminate ACLSV, ApMV and ASGV from micropropagated apple plants cv. "Remo".

The apical and axillary buds isolated from infected trees were prepared, surface sterilized and placed onto growth medium as described previously (Milusheva and Ivanova, 2004).

Single apical buds (about 1.0 cm length) were excised from micropropagated plants and transferred in nutrition medium with Ribavirin.

Filter sterilized Ribavirin (20, 40, 80 and 100 mg.l⁻¹) was added to the autoclaved medium before solidification.

Plantlets were grown at 22±2°C with 16h photoperiod (40 µmol.m⁻²s⁻¹ PAR) for three weeks.

The effect of chemotherapy depended on concentration of Ribavirin. Ribavirin in concentration 20 mg.l⁻¹ slightly

Рибавирин в концентрация 20 mg.l⁻¹ слабо повлиява растежа на микрорастенията, без да причинява хлороза или некроза. ELIZA тестовете не показват наличие на ACLSV, ApMV или ASGV.

По-високите концентрации на рибавирин са фитотоксични. Микрорастенията, третирани с 40 и 80 mg.l⁻¹ рибавирин имат слаб растеж и некроза на връхчетата. Най-високата концентрация на Рибавирин (100 mg.l⁻¹) причинява загиване на ябълковите микрорастения.

Микрорастенията, показали отрицателни резултати при ELISA тестовете, са клонирани и ще бъдат вкоренени и аклиматизирани при *ex vitro* условия за бъдещ мониторинг.

Ключови думи: *in vitro* култури, хемотерапия, рибавирин, ACLSV, ApMV and ASGV.

Използвани съкращения:

BAP - 6-benzylaminopurine; **IAA** - indole-3acetic acid; **ACLSV** - вирус на хлоротичните листни петна по ябълката; **ApMV** - вирус на мозайката по ябълката; **ASGV** - вирус на набраздяването на стъблото на ябълката.

УВОД

Ябълковият сорт Remo е един от представителите на така наречените „Re” сортове (англ. resistant), устойчиви на три фитопатогена, причиняващи икономически най-важните болести при ябълката: *Venturia inaequalis* (струпяване), *Podosphaera leucotricha* (брашнеста мана) и *Erwinia amylovora* (огнен пригор).

Серологичните анализи (DAS ELISA) на интродуцираните в Института по овощарство – Пловдив няколко растения от

affect plant growth, did not cause chlorosis and apex necrosis. ELIZA test of the plants did not show any presence of ACLSV, ApMV and ASGV.

The higher concentrations of Ribavirin were phytotoxic. Plantlets treated with 40, 80 mg.l⁻¹ Ribavirin had poor growth and apex necrosis.

The highest concentration of Ribavirin (100 mg.l⁻¹) caused the death of the apple shoots.

The plantlets which showed negative ELISA results were subcloned and will be rooted and planted in the field for a future monitoring.

Keywords: *in vitro* culture, chemotherapy, ribavirin, ACLSV, ApMV and ASGV.

Abbreviations: **BAP** – 6-benzylaminopurine; **IAA** - indole-3acetic acid; **ACLSV** – apple chlorotic leaf spot virus; **ApMV** apple mosaic virus; **ASGV** apple stem grooving virus.

INTRODUCTION

Remo apple cultivar is one of the representatives of the so-called Re-cultivars, resistant to three phytopathogens that cause the economically most important diseases in apple: scab (*Venturia inaequalis*), powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) and fire blight (*Erwinia amylovora*).

The DAS ELISA serological analyses of the several plants of that cultivar introduced at the Fruit Growing Institute – Plovdiv,

този сорт показва наличието на смесена вирусна инфекция от ACLSV, ApMV и ASGV.

Много автори съобщават за успешно елиминиране на вируси чрез хемотерапия с Рибавирин при редица икономически важни видове като картофи, фъстъци, тютюн, грозде, банан, ябълки, круши, малини и други (Hansen and Lane, 1985; Griffiths et al., 1990; Chen and Sherwood, 1991; Toussaint et al., 1993; Prasada et al., 1995; Cieslinska and Zawadzka, 1999; Nascimento et al., 2003).

Рибавиринът (Virazole; 1-beta-D-ribofuranosyl -1,2,4-triazole-3-carboxamide) е синтетичен нуклеозид, структурен аналог на гуанина. Ефективно инхибира репликацията на много РНК вируси, вкл. и при бозайниците.

Целта на настоящата разработка е да се изследва влиянието на Рибавирин върху растежа на *in vitro* култивирани растения от ябълковия сорт Remo и да се установят оптималните дози, при които не се наблюдава фитотоксичност.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследванията са проведени в лабораториите по биотехнологии и вирусология на Институт по Овощарство – Пловдив.

Експланти от ябълковия сорт Remo са въведени и се поддържат в *in vitro* култура на

revealed the presence of a mixed viral infection with ACLSV, ApMV and ASGV.

Many authors announced about successful elimination of viruses by chemotherapy with Ribavirin in a number of economically important species such as potatoes, peanuts, tobacco, grapes, banana, apple, pear, raspberry, etc. (Hansen and Lane, 1985; Griffiths et al., 1990; Chen and Sherwood, 1991; Toussaint et al., 1993; Prasada et al., 1995; Cieslinska and Zawadzka, 1999; Nascimento et al., 2003).

Ribavirin (Virazole, 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) is a synthetic nucleoside, a structural analogue of guanine. It inhibits effectively the replication of many RNA viruses including in mammals.

The aim of the present investigation was to study the effect of Ribavirin on the growth of *in vitro* cultivated plants of Remo apple cultivar and to establish the optimal rates that do not cause phytotoxicity.

MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out at the Laboratories of Biotechnologies and Virology at the Fruit Growing Institute – Plovdiv.

Explants of Remo apple cultivar were introduced and maintained in *in vitro* culture on a modified nutrient medium by MS

модифицирана хранителна среда по MS (Murashige and Skoog, 1962), обогатена с 0.5 mg.l^{-1} BAP, 0.01 mg.l^{-1} IAA, 30 g.l^{-1} захароза, 5.5 g.l^{-1} агар, pH 5.6 (преди автоклавиране), както е описано преди (Милушева и Иванова, 2004). Рибавиринът (в концентрации 20, 40, 80 and 100 mg.l^{-1}) е стерилизиран с милипор филтър ($0.22 \mu\text{m}$) и е добавен към автоклавираната среда преди втвърдяването ѝ. Като контрола е използвана среда без Рибавирин. За всеки вариант са залагани по 20 единични връхчета с дължина 1.0 см с две двойки листа.

Растенията са култивирани във фитостатна камера с температура $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ и фотопериод 16/8 часа ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ФАР).

След 3 седмици са отчетени броят и дължината на новополучените леторастчета. Връхната пъпка (около 3 mm) е прехвърлена на среда без Рибавирин, а останалата част от растенията е използвана за серологичен анализ.

Извършен е серологичен анализ чрез DAS ELISA за следните вируси: вирус на хлоротичните листни петна по ябълката (ACLSV), вирус на мозайката по ябълката (ApMV) и вирус на набраздяването на стъблото на ябълката (ASGV). Имуноензимният анализ за ApMV е проведен по варианта двоен антицяло сандвич (DAS) (Clark

and Skoog, 1962) enriched with 0.5 mg.l^{-1} BAP, 0.01 mg.l^{-1} IAA, 30 g.l^{-1} sucrose, 5.5 g.l^{-1} agar, pH 5.6 (before autoclaving) as described before (Milusheva and Ivanova, 2004). Ribavirin (at concentrations of 20, 40, 80 and 100 mg.l^{-1}) was sterilized with a millipore filter ($0.22 \mu\text{m}$) and it was added to the autoclaved medium before its solidification.

A Ribavirin-free medium was used as a control. In each variant 20 single tips of 1.0 cm length with two couples of leaves were set for the experiment.

The plants were cultivated in a growth chamber at a temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a photoperiod of 16/8 hours ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR).

Three weeks later the number and length of the newly formed shootlets were reported. The apical buds (about 3 mm in length) were transferred to ribavirin-free medium and the rest plant parts were used for a serological analysis.

The DAS ELISA serological analysis was carried out for the following viruses: apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), apple mosaic virus (ApMV) and apple stem grooving virus (ASGV).

The immunoenzyme analysis (ELISA) for ApMV was conducted by the double antibody sandwich method (DAS), (Clark and Adams, 1977), and for ACLSV and ASGV – by the modified variant cocktail

and Adams, 1977), а за ACLSV и ASGV по модифицирания вариант cocktail DAS ELISA (Flegg and Clark, 1979). Използвани са китове на Loewe Phytodiagnostica GmbH с конюгат маркиран с алкална фосфатаза.

Направена е статистическа обработка на получените резултати като е използван t - тест за определяне на LSD (Least Significant Difference - най-малка съществена разлика).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Проведеният тест за фитотоксичност ясно показва, че ефектът от хемотерапията зависи от концентрацията на Рибавирин в хранителната среда (фигури 1 и 2).

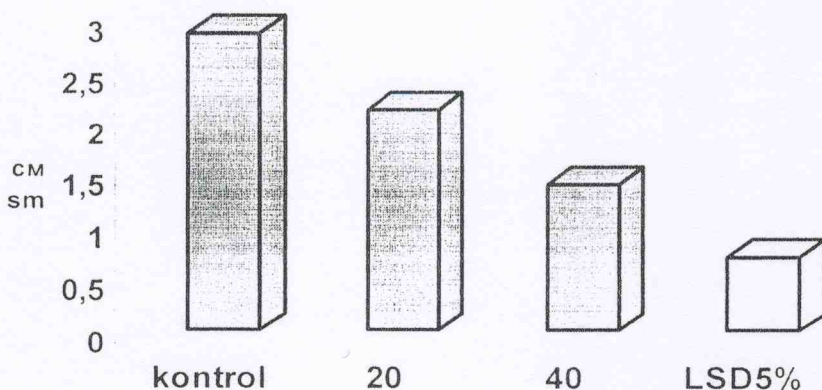
DAS ELISA method (Flegg and Clark, 1979).

Diagnostic sets of Loewe Phytodiagnostica GmbH were used with a conjugate labeled with alkaline phosphatase.

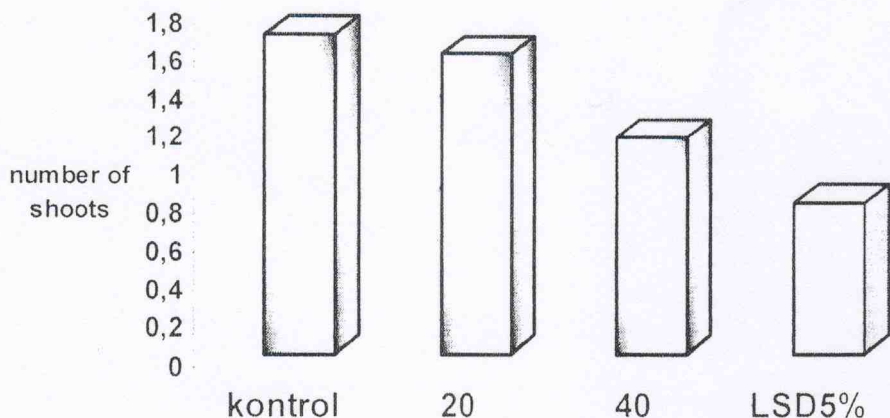
The results obtained were statistically processed using t - test for determining the least significant difference (LSD).

RESULTS AND DISCUSSION

The test carried out for phytotoxicity clearly revealed that the effect of the chemotherapy depended on the concentration of Ribavirin in the nutrient medium (Figure 1 and 2).



Фиг. 1. Дължина на леторастчетата в зависимост от концентрацията на Рибавирин (mg.l⁻¹) в хранителната среда
Fig. 1. The length of the shoots depending on the concentration of Ribavirin (mg.l⁻¹) in the nutrient media



Фиг. 2. Брой новоформиран латорастчета в зависимост от концентрацията на Рибавирин (mg.l^{-1}) в хранителната среда
 Fig. 2. Number of the newly formed shoots depending on the concentration of Ribavirin (mg.l^{-1}) in the nutrient media

С увеличаване дозата на Рибавирин значително намалява дължината на латорастчетата. Има тенденция за понижаване на техния брой, но тя не е статистически доказана.

Микрорастенията, третирани с Рибавирин в концентрация 20 mg.l^{-1} са свежи, зелени и не се наблюдават признаци на хлороза и некроза. Въпреки това е отчетено доказано понижаване в дължината на латорастчетата с около 26% (фиг. 1).

По-високите концентрации Рибавирин са фитотоксични. Растенията, култивирани с 40 и 80 mg.l^{-1} имат слаб растеж и се наблюдава некроза на вегетационния връх.

Най-високата концентрация на Рибавирин (100 mg.l^{-1})

Increasing the Ribavirin rate caused a significant decrease of the shootlet length. There was a tendency to a decrease of their number but it was not proven statistically.

The microplants treated with Ribavirin at a concentration of 20 mg.l^{-1} were fresh, green, without any characteristics of chlorosis or necrosis.

Despite that a significant decrease of the shootlet length by about 26 % was reported (Fig. 1).

The higher concentrations of Ribavirin were phytotoxic. The plants cultivated with 40 and 80 mg.l^{-1} had a poorer growth and necrosis in the vegetation tip was observed.

The highest concentration of Ribavirin (100 mg.l^{-1}) caused death

причинява загиване на
ябълковите микрорастения.

Резултатите от
серологичния анализ чрез
метода DAS ELISA не показват
наличие на нито един от трите
изследвани вируса – ACLSV,
ApMV и ASGV.

Връхната пъпка (около 3
mm) на всички оцелели след
третирането растения е
прехвърлена на среда без
Рибавирин и клонирана за
последващо наблюдение.

Получените от нас
резултати са аналогични с
докладваните от Cieslinska and
Zawadzka (1999). Авторите
посочват, че 50 и 100 mg.l⁻¹
Рибавирин силно редуцират
растежа на леторастчетата и
причиняват некроза на връхната
пъпка при ябълка (cv. Jonagold) и
круша (cv. "Pierre Corneille"). Те
постигат добър ефект (81.8%
елиминиране на ACLSV) при
използване на 25 mg.l⁻¹
Рибавирин.

James (2001) съобщава за
успешно елиминиране на ASGV
при ябълка след 9 седмично
третиране с 10 mg.l⁻¹ Рибавирин
самостоятелно или в комбинация
с 10 mg.l⁻¹ кверцетин (quercetin).

Аналогични са и
резултатите при лоза (*Vitis
vinifera* L. Cv. „Zalema”).
Рибавирин в концентрация 20
mg.l⁻¹ елиминира GFLV
(Grapevine fanleaf virus) при 94%
от третираните растения, без да
влияе на растежа и

на of the apple microplants.

The results of the serological
analysis by the DAS ELISA method
did not show the presence of any of
the three studied viruses - ACLSV,
ApMV and ASGV.

The apical buds (about 3 mm
in length) of all the plants that
survived after the treatment were
transferred to a Ribavirin-free
medium and cloned for further
studies.

The results obtained were
analogous to those reported by
Cieslinska and Zawadzka (1999).
The authors mentioned that 50 and
100 mg.l⁻¹ of Ribavirin reduced
strongly the shootlet growth and
caused necrosis of the apical bud in
apple (cv. Jonagold) and pear (cv.
Pierre Corneille).

A good effect was achieved
by the authors (81.8 % elimination
of ACLSV) when using 25 mg.l⁻¹ of
Ribavirin.

James (2001) mentioned
about successful elimination of
ASGV in apple after 9-week
treatment with 10 mg.l⁻¹ of Ribavirin
applied separately or in a
combination with 10 mg.l⁻¹ of
Quercetin.

The results in grapevines
(*Vitis vinifera* L., cv. Zalema) were
analogous. Application of Ribavirin
at a concentration of 20 mg.l⁻¹
eliminated GFLV (Grapevine fanleaf
virus) in 94 % of the treated plants
without affecting their growth and
rooting.

ИЗВОДИ

1. Синтетичният нуклеозид Рибавирин (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) в концентрации по-високи от 40 mg.l⁻¹ има силно фитотоксично действие върху *in vitro* култивирани растения от ябълковия сорт „Remo“.

2. Концентрация от 20 mg.l⁻¹ Рибавирин се понася добре от микрорастенията и може да се използва за хемотерапия с цел вирусно елиминиране.

CONCLUSIONS

1. The synthetic nucleoside Ribavirin (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) applied at concentrations above 40 mg l⁻¹ had a strong phytotoxic effect on *in vitro* cultivated plants of Remo apple cultivar.

2. The concentration of 20 mg.l⁻¹ of Ribavirin exerted a good effect on the microplants and it could be used for chemotherapy for virus elimination.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Милушева С., К. Иванова, 2004. Вирусно елиминиране чрез *in vitro* хемотерапия при ябълковия сорт Ремо. Сборник с научни трудове от конференция, Кърджали. 204-208
2. Chen W., J. Sherwood, 1991. Evaluation of tip culture, thermotherapy and chemotherapy for elimination of peanut mottle virus from *Arachis hypogaea*. J. Phytopathology 74. 211-213.
3. Cieslinska M. and B. Zawadzka, 1999. Preliminary results of investigation on elimination of viruses from apple, pear and raspberry using thermotherapy and chemotherapy *in vitro*. Phytopathol. Pol. 17, 41-48.
4. Clark M. F. and A. N. Adams, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34 475-481.
5. Flegg C. L. and M. F. Clark, 1979. The detection of apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay. Ann. Appl. Biol., 91. 61-65.
6. Griffiths H., S. Slack, J. Dodds, 1990. Effect of chemical and heat therapy on virus concentrations in *in vitro* potato plantlets. Can. J. Bot. 68. 1515-1521.
7. Hansen A., W. Lane, 1985. Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoots cultures by ribavirin. Plant Disease 69, 134-135.
8. James D., 2001. Long term assessment of the effects of *in vitro* chemotherapy as a tool for apple stem grooving virus elimination. Acta Hort. 550, 459-462.
9. Murashige T., F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473 - 497.
10. Nascimento L., G. Rio-Roberto, L. Willandino, G. Andrade, 2003. Stock indexing and potato virus elimination from potato plants cultivated *in vitro*. Sci. Agricola, 60, 525-530.
11. Prasada R., R. Ribeiro, R. Pittman, D. Reddy, J. Demski, 1995. *In vitro* culture to eliminate peanut stripe virus from peanut seed. Peanut Sci. 22, 54-56.

12. Toussaint A., J. Kummert, C. Maroquin, A. Lebrun, N. Roggema, 1993
Use of virazole to eradicate odonlossum ringspot virus from in vitro cultures of
Cymbidium Sw. Plant cell, tissue and organ culture, 32. 303-309.