

## Ribavirin alkalmazása a szőlő vírusmentesítésében

**Turcsán Mihály<sup>1\*</sup>, Demián Emese<sup>2</sup>, Oláh Krisztina<sup>1</sup>, Várallyay Éva<sup>2</sup> és Oláh Róbert<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>NAIK Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet Kecskeméti Kutató Állomás, 6000 Kecskemét,  
Katona Zsigmond utca 5.

<sup>2</sup>NAIK Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

\*e-mail: turcsan.mihaly@szbki.naik.hu

### Összefoglalás

A patogénmentes szőlő szaporítóanyag előállításnak fontos szerepe van abban, hogy megakadályozza a fertőző betegségek terjedését. A ribavirin egy kemoterápiában alkalmazott antivirális szer, amelynek használata több növényfaj számos RNS vírusa ellen hatásos volt. Kísérletünk során a kemoterápia szőlő vírusokra gyakorolt hatását vizsgáltuk több szőlőfajtán. A ribavirin kezelés alkalmas volt a *Szőlő rupestris faszöveti barázdáltság vírus* (GRSPaV), a *Szőlő Pinot gris vírus* (GPGV) és a *Szőlő Syrah vírus-1* (GSyV-1) eliminálására *Vitis vinifera cv.* Sárfehér növények esetén, ezért a kezelést további, különböző vírusokkal fertőzött szőlőfajta esetében is elvégeztük, hogy megvizsgáljuk a módszer hatékonyságát.

Kulcsszavak: szőlő vírusmentesítés, ribavirin, kemoterápia, mikroszaporítás

### Abstract

Producing pathogen-free grapevine propagation material has a critical importance to prevent the *spread* of infectious diseases. Ribavirin is an antiviral agent is used in elimination processes, and its application was effective against several RNA viruses in different plant species. During our experiment the effect of chemotherapy on grapevine viruses was investigated in case of some grapevine cultivars. Ribavirin treatment of *Vitis vinifera cv.* Sárfehér was successful for eliminating *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) and *Grapevine Syrah virus-1* (GSyV-1), therefore we tested efficiency of this method on some other cultivars infected with other viruses.

**Keywords:** grapevine virus elimination, ribavirin, chemotherapy, micropropagation

## Bevezetés

A szőlőültetvényekben nem állnak rendelkezésre megfelelő módszerek a különböző vírusfertőzések megszüntetésére, így a vírusmentes szaporítóanyag előállítás kiemelt jelentőséggel bír. A szőlőt fertőző vírusok közül ma már közel 70-et azonosítottak (Martelli, 2017), köztük olyan széles körben elterjedteket is, amelyeknek diagnosztikája az érzékeny fajták esetében indokolt lehet a szőlő szaporítóanyag előállítás során (Massart és mtsai, 2017). Az elterjedt vírusmentesítési módszerek alapja az *in vitro* merisztéma- és hajtáscsúcs tenyésztés (Panattoni és mtsai, 2013), valamint a szomatikus embriogenezis alkalmazása (San Pedro és mtsai, 2017).

A kemoterápiában alkalmazott antivirális vegyületek bizonyos esetekben hatékonyan gátolták a növényi vírusok replikációját akkor is, amikor a fenti módszerek különböző okokból hatástalannak bizonyultak (Chauan és mtsai, 2019). A ribavirin egy nukleozid analóg, amely antivirális hatást fejt ki számos RNS vírus ellen (Crotty és mtsai, 2002). Az előzetes eredmények alapján a ribavirin egyes vírusok növényen belüli eloszlását oly módon befolyásolja, hogy a hajtáscsúcs egy néhány mm-es apikális szegmense vírusmentes marad, segítve ezzel a hatékonyabb munkát. Az évek során több kutató is sikeresen használta a ribavirint különböző fajták *in vitro* kultúráiban a GRSPaV, a *Szőlő levélsodródás vírus-1* (GLRaV-1), a *Szőlő látens foltosság vírus* (GFkV) és GPGV vírusok eltávolítására (Guta és mtsai, 2011; Skiada és mtsai, 2013; Komínek és mtsai, 2016).

## Anyag és módszer

Kísérletünkben a ribavirin kezelés hatását vizsgáltuk a különböző vírusokkal fertőzött 05-6-26/1, Andor, Furmint, Glória és Sárfehér fajtajelöltek vírusmentesítésében. A vírusfertőzött *in vitro* növények felszaporítására és fenntartására MS alapú táptalajt (Zok és mtsai, 2010) használtunk, amelyben az eredeti recepthez képes a makroelemek mennyiségét megfeleltük és 10 g/l szacharózzal, valamint 2 g/l gelrite-tal (Duchefa) egészítettük ki (MSEM).

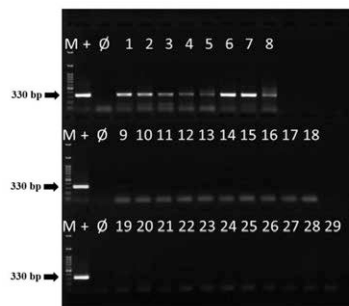
Első lépésben az *in vitro* növényekről kb. 1,5 cm-es hajtáscsúcsokat helyeztünk a ribavirint 25 mg/l-es koncentrációban tartalmazó növényi táptalajra, majd a hajtásnövekedés gyorsaságától függően kb. 60 nap után 2 mm-es hajtáscsúcsokat preparáltunk a fejlődő növényekről. A

lemetszett hajtáscsúcsokat 1 mg/l metatopolint, valamint 0,5 g/l aktív szénen tartalmazó MSEM táptalajra, majd a gyökeresedő hajtáskezdeményeket hormonmentes MSEM táptalajra helyeztük.

A Sárfehér növények esetében a kezeletlen *in vitro* egyedek 2 mm-es hajtáscsúcsából, a ribavirinnel kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsából, és a kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsából felnevelt növények leveléből is, míg a 05-6-26/1, Andor, Furmint, Glória fajták esetében a kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsaiból felnevelt növények leveléből tisztítottunk össznukleinsavat (Xu és mtsai, 2004). A víruselimináció sikerességét RT-PCR reakcióval vizsgáltuk. Ehhez kiindulásként cDNS-t szintetizáltunk a RevertAid First cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1622) segítségével. Az RT-PCR reakciót a DreamTaq DNA Polymerase Kit (Thermo Scientific, #EP0703) és a különböző szőlő vírusokra specifikus primerek (Farkas és mtsai, 2014) segítségével végeztük.

### Eredmények és megvitatásuk

Első kísérletünkben GRSPaV, GPGV és GSYV-1-el fertőzött *in vitro* Sárfehér növényekről származó hajtáscsúcsokat kezeltünk a fent leírt módon, majd a vírusok jelenlétét ellenőriztük a preparált 2 mm-es hajtáscsúcsokban és az azokból felnevelt növényekben is. A GRSPaV a kontroll növények 2 mm-es hajtáscsúcsában mindenütt jelen volt, míg a ribavirines kezelésen átesett növények 2 mm-es hajtáscsúcsaiban csak egyetlen esetben tudtuk kimutatni és a 2 mm-es hajtáscsúcsokból felnevelt növények levelében sem volt detektálható (1. ábra).



1. ábra. A GRSPaV 330 bp nagyságú szakaszának amplifikációja Sárfehér növényekből: M: mólsúlymarker; +: pozitív kontroll; Ø: null-kontroll; 1-8: kontroll növények 2 mm-es hajtáscsúcsa; 9-18: ribavirinnel kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsa; 19-29: kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsaiból nevelt növények levele

A GPGV az előzőhöz hasonlóan az összes kezeletlen növény hajtáscsúcsában jelen volt, míg a ribavirin kezelést követően a 2 mm-es hajtáscsúcsokban és a regenerált növényekben sem volt detektálható. A GSyV-1 esetében a hatás nem volt 100% -os. A kezeletlen növények nagy részében a vírus *in vitro* állapotban is detektálható volt, és kb. harmadában a mentesítési eljárást követően is megmaradt (1. táblázat).

1. táblázat. A ribavirin kezeléssel átesett Sárfehér fajta vírusdiagnosztikájának eredménye

Vírus	Kontroll növények 2 mm-es hajtáscsúcsai: fertőzött/összes (db)	Kezelt növények 2 mm-es hajtáscsúcsai: fertőzött /összes (db)	Regenerált növények levelei: fertőzött /összes (db)
GRSPaV	8/8	1/10	0/11
GPGV	8/8	0/10	0/11
GSyV-1	6/8	3/10	3/11

A Sárfehér növényeken végzett sikeres ribavirin kezelés eredményei alapján további fajtákon is kemoterápiát végeztünk. Az egyes vírusokra vonatkozó adatokat a 2. táblázatban tüntettük fel.

2. táblázat. A ribavirinnel kezelt növények hajtáscsúcsaiból regenerált hajtások száma

Vírus	Vírusmentes hajtások/ felnevelt hajtások (db)	Vírusmentes hajtások aránya
GFLV	7/10	70 %
ArMV	14/22	70 %
GLRaV-1	2/10	20 %
GVA	2/10	20 %
GFKV	34/34	100 %
GRSPaV	21/34	61,8 %

Újabb kísérleteink során a GFKV esetében értük el a legmagasabb vírusmentesítési hatékonyságot ribavirin alkalmazásával, de a módszer az *Arabis mosaic virus* (ArMV), a Szőlő fertőző leromlás vírus (GFLV) és GRSPaV eliminálása szempontjából is hatékonynak bizonyult, megerősítve az alapoó kísérletek eredményeit.

Eddigi tapasztalataink alapján tehát elmondható, hogy a hajtáscsúcsok kemoterápiás kezelése lehetővé tette a fajták mentesítését számos vírustól. Ez az eredmény azért nagyon fontos, mert így a nehezebben preparálható merisztémák (0,5 mm <) helyett a sokkal egyszerűbben

(mikroszkóp nélkül is) izolálható 2 mm-es hajtáscsúcsokkal dolgozhatunk, ami megerősíti a kemoterápiás szerek használatának létjogosultságát a szőlő vírusmentesítésében, valamint megalapozza a további kutatásokat.

### Köszönetnyilvánítás

Munkánkhoz az NKFIH nyújtott anyagi támogatást (K119783), valamint a GINOP 2.3.3-15-2016-00042 számú pályázata támogatta (OR). TM a SZIE Kertészettudományi Doktori Iskola, DE a SZIE Biológiai tudományi Doktori Iskolájának PhD hallgatója.

### Hivatkozások

- Chauhan P., Singla K., Rajbhar M., Singh A., Das N. and Kumar K. 2019. A systematic review of conventional and advanced approaches for the control of plant viruses. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 7. 4. 89-98.
- Crotty S., Cameron C. and Andino R. 2002. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?. *Journal of molecular medicine*, 80. 2. 86-95.
- Farkas E. M., Czotter N., Lózsa R., Dula T., Ember I., Várallyay É. and Szegedi E. 2014. Conventional PCR primers for the detection of grapevine pathogens disseminated by propagating material. *International Journal of Horticultural Science*, 20. 3-4. 69-80.
- Guta I. C. and Buciumeanu E. C. 2011. Grapevine chemotherapy for elimination of multiple virus infection. *Romanian Biotechnological Letters*, 16. 5.
- Komínek P., Komínková M. and Jandová B. 2016. Effect of repeated Ribavirin treatment on grapevine viruses. *Acta virologica*, 60. 4. 400-403.
- Martelli G. P. 2017. An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause. In: Meng B., Martelli G., Golino D. and Fuchs M. (eds): *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer, Cham, Bari, 698. 21-46.
- Massart S., Candresse T., Gil J., Lacomme C., Predajna L., Ravnikar M., Reynard J.-S., Rumbou A., Saldarelli P., Škorić D., Vainio E.J., Valkonen J.P.T., Vanderschuren H., Varveri C. and Wetzel T. 2017. A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Frontiers in Microbiology* 8. 45.
- Panattoni A., Luvisi A. and Triolo E. 2013. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11. 1. 173-188.

San Pedro T., Gammoudi N., Peiró R., Olmos A. and Gisbert C. 2017. Somatic embryogenesis from seeds in a broad range of *Vitis vinifera* L. varieties: rescue of true-to-type virus-free plants. *BMC Plant Biology*, 17. 1. 226.

Skiada F. G., Maliogka V. I., Katis N. I. and Eleftheriou E. P. 2013. Elimination of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars by *in vitro* chemotherapy. *European journal of plant pathology*, 135. 2. 407-414.

Xu Q. Wen X. and Deng X. 2004. A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) for RFLP and PCR analyses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22. 3. 301-302.

Zok A., Oláh R., Hideg E., Horváth V. G., Kós P. B., Majer P., Varadi Gy. and Szegedi E. 2010. Effect of *Medicago sativa* ferritin gene on stress tolerance in transgenic grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100. 3. 339-344.