

УДК 518.143.6:634.2:632.38

ВПЛИВ ХЕМОТЕРАПІЇ НА СКЛАДНІ ВІРУСНІ ПАТОКОМПЛЕКСИ В ЕКСПЛАНТАХ МАЛИНИ

Н.В. ТРЯПЩИНА, кандидат сільськогосподарських наук

Т.В. МЕДВЕДЄВА, кандидат біологічних наук

Інститут садівництва (ІС) НААН України

Більшість з перспективних сортів малини необхідно оздоровлювати від комплексних вірусних інфекцій. Розробка максимально стандартизованих та універсальних методів оздоровлення – одне із актуальних завдань біотехнологічних робіт при виробництві садивного матеріалу малини. Методом напівкількісного ІФА було оцінено падіння концентрації трьох неповірусів та ідеовірусу в експлантах двох перспективних гібридних форм малини, вражених комплексною вірусною інфекцією, після однократної обробки трьома різними віроцидами. Оцінено терапевтичний, токсичний та пролонгований ефект дії саліцилової кислоти, віразолу та аміксину на елімінацію вірусів. Виявлено універсальні, сортоспецифічні та вірусоспецифічні аспекти застосування цих віроцидів для оздоровлення експлантів малини.

Ключові слова: *Аміксин, віразол, експланти малини, ідеовірус, неповіруси, саліцилова кислота, хемотерапія.*

Виділення та розмноження клонів малини для виробництва необхідної кількості здорового садивного матеріалу є сьогодні найменш результативним завданням порівняно з вирощуванням садивного матеріалу інших ягідних культур. Для малини відомо понад 30 вірусних патогенів, які можуть її колонізувати у природний спосіб. Зрозуміло, що не всі вони є об'єктами уваги при виробництві здорового садивного матеріалу в Україні, адже мають суттєві відмінності за рівнем розповсюдження в різних географічних зонах, патогенністю і впливом на врожайність. Малині як жодній іншій ягідній культурі властиве явище інфікування складними комплексами вірусних патогенів. Серед виділеного тестованого на віруси (категорія "virus tested") матеріалу цієї культури в Україні для подальшої перевірки на рослинних індикаторах можна передавати не більше 17% від загальної кількості матеріалу,

що перевіряється. Тестування на рослинних індикаторах значно корегує і цей показник. Такі труднощі під час виробництва здорового садивного матеріалу малини спонукають до пошуку додаткових заходів для оптимізації роботи зі створення колекцій базових клонів. Одним із шляхів підвищення результативності виробництва безвірусного садивного матеріалу є оздоровлення в культурі *in vitro*, яке може суттєво знижувати в рослинах титр вірусу, хоча і не призводить до повної його елімінації [6]. Таке зниження може бути підсиленим термо- та хемотерапією з використанням віроцидів різної природи [6,7,8]. Але ці технології є затратними, сортоспецифічними і тривалими. Тому надзвичайно актуальним є пошук можливих універсальних підходів при розробці схем оздоровлення з огляду на економію часу та затрат на пошукові дослідження при доборі концентрацій віроцидів та схем їх застосування при роботі з різними патосистемами вірус-господар.

Мета досліджень полягає в оцінці впливу трьох віроцидів: саліцилової кислоти (СК), рибавірину (Віразол) та аміксину на елімінацію комплексної інфекції в експлантах малини двох перспективних гібридних форм, спричиненої неповірусами латентної кільцевої плямистості суниці (ВЛКПС), кільцевої плямистості малини (ВКПМ), чорної кільчастості томатів (ВЧКТ) та ідеовірусом куцистої карликовості малини (ВККМ).

Матеріали та методи дослідження. Робота виконувалась у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодових і ягідних культур Інституту садівництва НААН протягом 2012-2014 рр. Об'єктами дослідження можливості елімінації вірусу ККМ та трьох неповірусів при культивуванні в культурі *in vitro* слугували дві перспективні гібридні форми (ГФ) малини селекції Інституту садівництва НААН (селекціонер Лушпіган О.П.). Ініціювання меристемної культури здійснено з використанням етіюльованих кореневих бруньок. Як стерилізуючий агент застосовували сулему (0,1% HgCl_2) і 70%-ний етанол. Експозиція стерилізації становила 3-5 хвилин. На етапі введення в культуру та проліферації використовували модифіковане живильне середовище Мурасіге – Скуга (MS) з додаванням вітамінів та фітогормонів, рН = 5,5-5,7. Експланти

культивували при 16-годинному світловому дні з освітленням 2000 – 2500 лк при температурі 23-25⁰ С і вологості повітря 50-60%. Для досягнення необхідної кількості мікропагонів їх культивували на середовищі з підвищеним вмістом БАП (1мг/л). Інфіковані лінії розмножених пагонів були використані як вихідний матеріал для хемотерапії *in vitro*.

Як віроциди були використані препарат віразол - 20мг/мл ((1-β-D-рібофуранозил-1,2,4-тріазол-3-карбоксамід), комерційна назва рибавірин, C₈H₁₂N₄O₅), саліцилова кислота -20 мг/мл та аміксин - 200 мг/мл (ОАО ІнтерХім, Одеса). Діючою речовиною аміксину ® ІС є тилорон- дигідрохлорид 2,7-біс-[2-(діетиламіно)етокси]-флуорен-9-он, синтетична низькомолекулярна речовина. Усі антивірусні препарати стерилізували через мембранний фільтр (d = 0,22μm) і додавали до середовища після автоклавування. В контрольному варіанті антивірусний препарат не застосовували. Тривалість пасажу становила 30 днів. На кожний варіант використали по десять мікропагонів.

Детекцію вірусів проводили методом ІФА з використанням сертифікованих специфічних поліклональних антитіл виробництва Loewe Phytodiagnostica (Німеччина) методом DAS-ELISA. При тестуванні польових зразків відбирали верхівкові листки з візуальними ознаками враження вірусом. При тестуванні матеріалу з культури *in vitro* відбирали частину експланта, не занурену у середовище. Розведення проби в гомогенаті дорівнювало 1:100.

Зміни концентрації покривного білка досліджуваного вірусу виявляли методом напівкількісного ІФА, виходячи з того, що титр (t) покривного білка вірусу є пропорційним кількості вірусних часточок у пробі. Для цього виконували серію послідовних двократних розведень соку рослини (від 1:2 до 1:1024) у фосфатному буфері [5]. Найвищим титром антигена в цій серії вважали той, що достовірно відхилявся від негативного контролю. Таким відхиленням вважали дворазове збільшення екстинкції зразка по відношенню до екстинкції негативного контролю. Оцінку відносної зміни концентрації вірусного покривного білка проводили за такою формулою:

$$c_i / c_k = t_k \cdot 100\% / t_i, \quad (1)$$

де c_i - концентрація покривного протеїну вірусу досліджуваного зразка;

t_i – титр покривного протеїну досліджуваного зразка;

c_k - концентрація покривного протеїну вірусу контрольного зразка;

t_k – титр покривного протеїну контрольного зразка.

Результати досліджень. Для введення в культуру були відібрані зразки малини, вражені комплексною вірусною інфекцією. Слід зауважити, що результати тестування методом ІФА вірусу ККМ у гібридної форми 4 (ГФ 4) виявились хибно-негативними, оскільки в експлантах наявність цієї вірусної інфекції підтвердилася в процесі експерименту.

Після ініціювання асептичної культури регеновані пагони розмножили на модифікованому середовищі MS з подвійною концентрацією хелату заліза до кількості, необхідної для проведення експерименту. Далі інфіковані мікропагони кожної гібридної форми за винятком контрольних пересадили на середовище з ідентичним гормональним складом, але з додаванням віроцидів: саліцилової кислоти (20 мг/л), рибавіріну (20 мг/л), аміксину (200 мг/л). У наступних пасажах їх не застосовували.

Перший замір концентрації вірусного покривного білка здійснили після місячного культивування на середовищі з додаванням віроциду для оцінки фази швидкої дії. Швидкість нарощування хемотерапевтичного ефекту віразолу та аміксину на падіння концентрації вірусних білків ВЛКПС та ВКПМ у цій фазі достовірно відрізнялася, при цьому антивірусна дія аміксину була більш вираженою (табл.1). Найефективніший результат дії аміксину спостерігали для вірусів КПМ та ЧКТ: залишкова кількість покривного білка становила відповідно 56 та 57,3%. Найбільш чутливим до дії віразолу виявився вірус ЧКТ (51,2%). Максимальна антивірусна дія саліцилової кислоти була зафіксована для вірусів КПМ (48,9%) та ЛКПС (66,8%). Слід відзначити, що на цьому етапі ідеовірус кущистої карликовості малини виявився найменш чутливим до дії всіх трьох віроцидів. За використання рибавіріну відзначено досить широку

реакцію відповіді на антивірусну терапію - коефіцієнт варіації титру покривного вірусного білка в експлантах становив 0,208. Варіативність антивірусної дії саліцилової кислоти та аміксіну на цей вірус була менш вираженою.

1. Залишкова кількість покривного білка чотирьох вірусів на різних пасажах культивування після однократної обробки віроцидами, %

Вірус	Пасаж	Віроцид		
		Саліцилова кислота	Рибавірин	Аміксин
Латентної кільцевої плямистості суниці ВЛКПС	I	66,8±10,6	94,0±9,6**	66,2±11,3**
	IV	75,2±7,4	73,3±6,7*	72,1±9,7
	VI	80,2±11,5	70,8±7,9	58,5±9,8
	VIII	60,9±10,9	64,9±16,9**	80,2±27,2
Кільцевої плямистості малини (ВКПМ)	I	48,9±7,2	89,5±15,9**	56,0±6,4**
	IV	56,1±12,9	57,9±11,2**	59,4±8,5
	VI	63,0±11,5	39,2±8,4	45,5±9,2
	VIII	38,2±9,2	48,6±40,8	30,7±6,14**
Чорної кільчастості томатів (ВЧКТ)	I	71,1±7,4	51,2±8,9**	57,3±13,6
	IV	78,9±15,4	42,2±6,5	42,4±11,7
	VI	90,5±12,4	43,0±7,3**	58,1±10,4
	VIII	70,7±17,7	57,9±13,9	50,7±7,6
Куцистої карликовості малини (ВККМ)	I	84,2±7,5	85,2±17,7	77,7±4,4
	IV	69,5±14,1	75,2±8,2**	76,2±7,3
	VI	38,2±10,7	45,2±11,2**	82,1±9,2
	VIII	24,6±6,64	69,6±82,8	28,0±27,1

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Після місячного культивування протягом місяця на середовищі з віроцидами всі експланти пересадили на стандартне МС середовище з додаванням БАП (0,5 мг/л). Для з'ясування пролонгованої антивірусної дії препаратів після 4-х, 7-ми та 11-ти місяців культивування провели повторні оцінки концентрації вірусних покривних білків в експлантах. Статистична обробка даних показала, що через чотири місяці достовірно відбувається зниження титру покривного білка лише двох вірусів –ЛКПС та КПМ і лише за дії рибавіріну. У варіантах з використанням СК та аміксіну титр цих вірусів на четвертому пасажі достовірно не змінився, хоча за усередненими даними він дещо підвищився.

На VII пасажі для всіх чотирьох вірусів було виявлено достовірне падіння концентрації вірусного покривного білка під впливом рибавірину. Найвищий антивірусний ефект цього препарату спостерігали на вірус КПМ з падінням концентрації покривного білка до 39,2%. На цьому етапі віразол також відчутно посилив антивірусний вплив на титр ВКМ порівняно з попередніми фазами (45,2%), завдяки цьому відзначено достовірну динаміку зниження концентрації вірусу. Водночас його пролонгований вплив на титр вірусу ЧКТ в експлантах практично не змінився. Слід зауважити, що в інфікованих вихідних рослинах, від яких відбирали матеріал для ініціації культури *in vitro*, титр вірусу ЧКТ був порівняно з рештою вірусів найвищим. Отже, на цьому етапі підтверджено достовірний ефект післядії рибавірину на елімінацію трьох вірусів – КМ, КПМ та ЛКПС і відсутність його на вірус ЧКТ.

Достовірний ефект пролонгованої дії СК зареєстровано лише для вірусу КМ. Для решти вірусів при оцінці його дії мова може йти лише про утримування первинного ефекту зниження титру вірусів на досягнутому рівні. Дія аміксину не призвела до виражених змін концентрації жодного з вірусів і проявлялася в утриманні первинного ефекту зниження їх титру.

На XI пасажі привертає увагу високий рівень варіації розрахованих показників залишкової кількості покривного білка вірусів. У деяких випадках коефіцієнт варіації становив майже 100%. На цьому етапі експланти можна було чітко розділити на дві групи: перша – рослини з високим титром покривного білка вірусу, друга – рослини, в яких на рівні достовірності методу не можна було виявити наявність вірусів. На попередніх етапах заміру такої різниці не спостерігали. Особливо варіативні дані було отримано за використання віразолу для вірусів КМ та КПМ, а за використання аміксину – для вірусу КМ.

Таким чином на цьому етапі можна було виділити перспективні експланти для подальшої перевірки більш чутливими методами та подальшого оздоровлення. Зокрема серед рослин, оброблених саліциловою кислотою, частка таких рослин становила 35%, віразолом – 60%, аміксином – 60%. Отже,

виражені терапевтичні наслідки одноразового оброблення віроцидами спостерігали лише на 11-му місяці утримання експлантів малини на стандартному МС середовищі з додаванням БАП.

На цьому етапі було також відзначено достовірні відмінності між експлантами малини за загальною масою в різних варіантах досліду, чого не спостерігали на жодному з попередніх етапів культивування (табл.2). Найбільшу біомасу мали рослини, оброблені саліциловою кислотою. У ГФ3 було виявлено достовірну різницю за масою між експлантами, обробленими трьома віроцидами, а у ГФ4 – тільки між експлантами, обробленими СК та контрольними рослинами. Коефіцієнт варіації маси у рослин, оброблених СК, виявився значно нижчим, ніж у рослин, оброблених рибавірином та аміксином. Отримані нами дані свідчать про те, що терапевтичний ефект саліцилової кислоти серед трьох використаних віроцидів меншою мірою залежить як від вірусу, так і від господаря. Такі висновки дають певні підстави розцінювати антивірусну дію цієї сполуки як більш передбачувану.

Експланти, культивовані на середовищі з додаванням рибавірину та аміксину, характеризувалися низьким тургором та затримкою в рості порівняно з рослинами, обробленими СК. При цьому зміни кольору не спостерігалися. Зниження життєздатності, яке проявляється через декілька субкультур після обробки віразолом, інші автори спостерігали у експлантів сливи [3] та яблуні [2]. Наші дослідження свідчать про те, що як під дією віразолу, так і аміксину такий ефект може мати місце і у експлантів малини, при цьому важливу роль відіграють генетичні особливості рослини, адже з двох гібридних форм малини чутливою до токсичної дії віразолу та аміксину при тривалому культивуванні виявилася тільки ГФ3. Коефіцієнт варіації розрахованих показників свідчить, що експланти, оброблені віразолом та аміксином, морфологічно менш однорідні, тому важливою умовою застосування цих віроцидів у малини є контроль генетичної ідентичності рослин-регенерантів.

Слід зауважити, що роботу було розпочато на чотирьох гібридних формах малини. Рослини двох з них, оброблені аміксином, було втрачено на перших

етапах культивування через його токсичність. Це не дало можливості включити їх у подальший аналіз, тому увагу в роботі було сконцентровано лише на гібридній формі 3 та гібридній формі 4. Таким чином, аміксин у концентрації 200 мг/л для деяких генотипів малини є високотоксичним вже на фазі швидкої дії. Тому широта терапевтичної дії цього препарату для експлантів малини є досить обмеженою, оскільки для різних генотипів одна й та сама доза може бути як терапевтичною, так і токсичною.

Ефект пригнічення росту експлантів малини деяких сортів при тривалому культивуванні після декількох субкультур є однією зі складових пролонгованої дії препаратів віразол та аміксин, але за конкурентним впливом на механізми обмеження репродукції вірусів порівняно з пригніченням синтетичних процесів у клітині, аміксин може суттєво поступатися рибавірину.

2. Загальна маса експлантів малини, оброблених різними віроцидами

Віроцид	Гібридна форма 3		Гібридна форма 4	
	Маса експлантів, мг	Коеф. варіації	Маса експлантів, мг	Коеф. варіації
СК 20 мг/л	93,0±6,71*	7,21	93,2±7,78*	8,34
Рибавірин 20 мг/л	42,4±14,19*	33,46	84,8±26,5	49,23
Аміксин 200 мг/л	42,0±11,09*	26,41	61,4±30,4	49,45
Контроль	75,0±19,6	26,13	66,2±16,05*	24,25

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Отримані дані було також згруповано з огляду на таксономічну приналежність чотирьох вірусів, зокрема падіння титрів вірусів розраховували окремо для ВККМ як представника родини ідеовірусів та в сумі для ВЛКПС, ВКПМ та ВЧКТ, як представників родини неповірусів (табл.3). На перших трьох етапах контролювання виявлено достовірну різницю між впливом аміксину окремо на елімінацію неповірусів та ідеовірусу кущистої карликовості малини, а на момент останнього заміру такої різниці не виявлено. За підсумками цей препарат є вірусоспецифічним як у фазі швидкої, так і

продовженої дії. У всіх проаналізованих випадках порівняння виявлено, що аміксин ефективніше впливав на зниження титру неповірусів, ніж ідеовірусу ККМ. Виражена різниця зменшення концентрації покривних білків вірусів різних таксономічних груп свідчить про суттєвий вплив генетичних особливостей вірусу на реалізацію хемотерапевтичного потенціалу цього віроциду.

3. Залишкова кількість покривного білка вірусів двох таксономічних груп в експлантах малини на різних етапах оздоровлення, %

Пасаж	Таксономічна приналежність	Саліцилова кислота	Рибавірин	Аміксин
I	Неповіруси	62,27±6,80**	78,21±3,6	59,83±3,21 **
	Ідеовірус	84,2±7,5**	85,2±17,7	77,7±4,4**
IV	Неповіруси	70,07±7,06	57,80±8,98**	57,97±8,60**
	Ідеовірус	69,5±14,1	75,2±8,2**	76,2±7,3**
VI	Неповіруси	85,7±12,0	43,7±14,5	67,93±5,73**
	Ідеовірус	84,9± 9,32	45,2±8,54	82,0±6,97**
VIII	Неповіруси	56,6±16,67**	57,13±8,18	49,4±18,81
	Ідеовірус	24,6±6,64**	69,6±82,8	28,0±27,1

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Механізм антивірусної дії аміксину у людини пов'язують зі здатністю стимулювати утворення інтерферонів, іншим способом дії цієї речовини вважають пряме пригнічення трансляції вірусних білків в інфікованій клітині, внаслідок чого знижується репродукція вірусів [4].

Неповіруси мають суттєві відмінності від вірусу ККМ за довжиною РНК, організацією вірусної частки, співвідношенням між пуринами та піримідинами. Вірусні частки неповірусів складаються з двох субодиниць, відповідно довжина вірусної РНК неповірусів більш як у двічі перевищує довжину молекули РНК вірусу ККМ, який має одну субодиницю. Не виключено, що за однакової швидкості трансляції білків наслідки її пригнічення для неповірусів можуть реалізовуватися із більшою ефективністю, оскільки порушення синтезу хоча б

однієї субодиниці буде перешкоджати утворенню нової вірусної частки. Не виключено також, що це відбувається завдяки механізмам, які обмежують суперінфекцію або змагання різних вірусних генотипів в дубль-інфікованих клітинах [1]. Отже з трьох застосованих у роботі віроцидів, аміксин виявився більш залежним від специфіки патоконплексу «вірус-господар», що певним чином обмежує можливості універсалізації схем оздоровлення експлантів малини за його використання, але надає великі можливості щодо розробки прецизійних схем оздоровлення.

Висновки

1. З'ясовано, що підбір універсальних схем оздоровлення експлантів малини від складних вірусних патоконплексів визначається рівнем специфічності віроцидів до господаря та вірусу, а також від діапазону між мінімальною терапевтичною і мінімальною токсичною дозами препарату.

2. Серед трьох застосованих віроцидів за антивірусною дією найбільш універсальним виявилась саліцилова кислота.

3. Аміксин має виражену вірусоспецифічну дію на всіх етапах оздоровлення експлантів малини, а терапевтична доза цього препарату потребує оптимізації для окремого генотипу.

4. Віразол забезпечує достовірну динаміку зниження концентрації вірусів, але може призводити до пригнічення росту експлантів та до морфологічної неоднорідності рослинного матеріалу деяких генотипів малини після тривалого культивування на МС-середовищі з додаванням БАП в низьких концентраціях.

Список літератури

1. Gonzalez-Jara P. The multiplicity of infection of a plant virus varies during colonization of its eukaryotic host/ [P.Gonzalez-Jara, A.Fraile, T.Canto et al.]// J Virol. – 2009. - № 83. – P. 7487–7494.
2. *In vitro* techniques for plum pox virus elimination from two infected romanian plum cultivars / [L.A.Vescan, I.D.Pamfil, I.V.Zagrai et al.]// Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies. – 2011. - № 68(1-2). – P.389-395.

3. *In vitro* thermotherapy and chemotherapy of apple cultivar 'Jarka' [J.Sedlák, F.Paprštein, L.Svobodová et al.]// Journal Vědecké Práce Ovocnářské. - 2013. - № 23. – P. 233-240.
4. Katz E. Inhibition of herpes virus deoxyribonucleic acid and protein synthesis by tilor one hydrochloride / E.Katz, E. Margalith, B. Winer // Antimicrob. Agents. Chemother. — 1976.—№9(1).— P. 189-195.
5. Polák J. Identification of interspecific *Peach* and *Prunus sp.* Hybrids resistant to Plum pox virus infection /J. Polák, I.Oukropec// Plant Protect. Sci. – 2010. - №46(4). – P.139–144.
6. Pūpola N. Occurrence of RBDV in Latvia and virus elimination *in vitro* by chemotherapy / N.Pūpola, L.Lepse, A. Kāle // Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture, Sodininkystė ir Daržininkystė. - 2009.-№28(3).- P. 165-172.
7. Wang Q.-C. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method/ Q.-C.Wang, J.P.T.Valkonen//Trends in Plant Science.- 2009.-№14(3).- P.119-122.
8. Wang Q.-C. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation on virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips/ Q.-C. Wang, W.J.Cuellar, M.-L.Rajamäki // Molecular Plant Pathology. - 2008.-№9 (2).- P. 237-250.

Влияние хемотерапии на сложные вирусные патоконплексы в эксплантах малины

Тряпицына Н.В., Медведева Т.В.

Большинство из перспективных сортов малины необходимо оздоравливать от комплексных вирусных инфекций. Разработка максимально стандартизированных и универсальных методов оздоровления - одна из актуальных задач биотехнологических работ при производстве посадочного материала малины. Методом полуколичественного ИФА было оценено падение концентрации трех неповирусов и идеовируса в эксплантах двух перспективных гибридных форм малины, пораженных комплексной вирусной инфекцией, после однократной обработки тремя различными вироцидами. Оценено терапевтический, токсический и пролонгированный эффект действия салициловой кислоты, виразола и амиксина на элиминацию вирусов. Выявлено

универсальные, сортоспецифические и вирусоспецифические аспекты применения этих вироцидов для оздоровления эксплантов малины.

Ключевые слова: Амиксин, виразол, идеовирус, неповирусы. салициловая кислота, химиотерапия, экспланты малины.

CHEMOTHERAPY EFFECTS ON COMPLEX VIRUS PATOSYSTEMS IN RASPBERRY EXPLANTS

Tryapitsyna N.V., Medvedyeva T.V.

Most of promising raspberry varieties need to be heal from complex viral infections. Development of the most standardized and universal plant healing methods - one of the actual tasks of biotechnology works for raspberries plant material production. The decrease of virus concentration in explants of two promising hybrid forms of raspberry affected by complex viral infection were analyzed with semi quantitative ELISA method after explants treatment with three different virocid. The therapeutic, toxic and prolonged effect of three compound for elimination of four viruses were evaluated. It was revealed universal, virus-specific and varieties-specific peculiarities for chemotherapy of raspberries shoots using three virocides.

Keywords: Amixin, chemotherapy, ideovirus, raspberry explants, salicylic acid, nepoviruses, virasole.