

## VIRUSI NA PARADIŽNIKU V SLOVENIJI

Nataša MEHLE<sup>1</sup>, Magda TUŠEK ŽNIDARIČ<sup>2</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

### IZVLEČEK

V okviru stalnega nadzora škodljivih organizmov, ki ga vršita fitosanitarna uprava in fitosanitarna inšpekcija, izvajamo na Nacionalnem inštitutu za biologijo laboratorijsko diagnostiko karantenskih in drugih škodljivih virusov na okrasnih rastlinah in vrtninah.

Zadnja leta smo na paradižniku najpogosteje našli virusa CMV (*Cucumber mosaic virus*) in PVY (*Potato virus Y*), redkeje pa tudi AMV (*Alfalfa mosaic virus*), TMV (*Tobacco mosaic virus*), ToMV (*Tomato mosaic virus*) in TSWV (*Tomato spotted wilt virus*). Poleg tega smo z elektronskim mikroskopom opazili virusne delce, ki jih natančneje nismo uspeli identificirati, po morfologiji pa ustrezajo cucumo-, gemini- in tobamovirusom. Karantensko škodljivih virusov kot so PepMV (*Pepino mosaic virus*), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) in ToRSV (*Tomato ringspot virus*) do sedaj v Sloveniji še nismo našli.

Pogosto paradižnik okužujeta CMV in PVY hkrati, našli pa smo tudi druge mešane okužbe, kot npr. kombinacijo PVY in TSWV, pri kateri smo opazili nekroze na stebelu in pecljih ter zvijanje listov. ToMV smo leta 2004 našli v enem rastlinjaku, kjer je povzročil sušenje in nekroze rastlin paradižnika, na listih pa smo opazili tudi kloroze in gubanje.

Leta 2003 smo v testiranje prejeli paradižnik z nenavadnimi bolezenskimi znamenji: na plodovih so bile klorotične pege in gube, liste pa je imel ozke in nekrotične. Z ELISA zgoraj omenjenih virusov v tem vzorcu nismo dokazali, smo pa v mehansko inokuliranih testnih rastlinah *Nicotiana tabacum* cv. White Burley, *Nicotiana clevelandii* in *Nicotiana benthamiana* pod elektronskim mikroskopom opazili viruse iz družine Rhabdoviridae in neznane izometrične virusne delce.

Gljučne besede: virusi, paradižnik, Slovenija

### ABSTRACT

#### VIRUSES INFECTING TOMATO IN SLOVENIA

Diagnostic laboratory at the National Institute of Biology is performing laboratory testing of viruses on vegetables and ornamentals, in the frame of a monitoring of quarantine and harmful pathogens carried out by the Phytosanitary Administration and Phytosanitary Inspection Service of the Republic of Slovenia.

During last few years most frequently found viruses on tomato were CMV (*Cucumber mosaic virus*) and PVY (*Potato virus Y*). Occasionally, AMV (*Alfalfa mosaic virus*), TMV (*Tobacco mosaic virus*), ToMV (*Tomato mosaic virus*) and TSWV (*Tomato spotted wilt virus*), were found. Other, not identified particles were observed by electron microscopy, with the morphology corresponding to Cucumoviruses, Geminiviruses and Tobamoviruses. Quarantine pests, such as PepMV (*Pepino mosaic virus*), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) and ToRSV (*Tomato ringspot virus*) have not been found, yet.

CMV and PVY were often found in mixed infection, as well as in combinations with other viruses, for example a combination of PVY and TSWV was found, causing necrosis on stem and petioles, and leaves curling. ToMV, found in one tomato glasshouse in 2004, causing wilting and necrosis, the leaves were also wrinkled and chlorotic.

In 2003, we analysed tomato plant expressing unusual symptoms of distinct chlorotic spots and wrinkles on fruits, and narrow, necrotic leaves. No above mentioned viruses were found by ELISA. Electron microscopy revealed very clear Rhabdoviridae particles and isometric particles of an unknown identity in sap of mechanically inoculated test plants *Nicotiana tabacum* cv. White Burley, *Nicotiana clevelandii* and *Nicotiana benthamiana*.

Key words: viruses, tomato, Slovenia

<sup>1</sup>univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>2</sup>mag. biol. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>3</sup>prof. dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

## 1. UVOD

Zaradi kompleksnih interakcij med gostitelji, vektorji, virusi in okoljem, se pojav in moč virusnih bolezní močno razlikuje od ene do druge rastne dobe. Na izražanje bolezenskih znamenj vplivajo številni dejavniki, kot na primer genetski, enkratna okužba z drugimi virusi, razvojni stadij rastline v času okužbe, temperatura, svetloba, hranila in vlažnost. Manjše klorotične ali nekrotične poškodbe na mestu vstopa virusa v rastlino imenujemo lokalne poškodbe. Sistemična bolezenska znamenja pa se pojavijo, ko se virus razširi po rastlini. Bolezenska znamenja se najpogosteje pojavijo na listih okuženih rastlin, nekateri virusi pa jih povzročajo tudi na stebelu, cvetovih, plodovih in koreninah. Nekatere virusne bolezni težko preprečujemo in lahko zato povzročijo velike izgube pridelka. V primeru, da se virus v celicah gostiteljske rastline namnoži, ne povzroča pa vidnih bolezenskih znamenj, govorimo o latentni okužbi (Agrios, 1997, Matthews, Jones s sod., 1997).

V prispevku so opisani virusi, ki smo jih določili v Sloveniji na rastlinah paradižnika ter ekonomsko pomembni virusi, ki jih v Sloveniji sicer še nismo zasledili, povzročajo pa večje ekonomske izgube paradižnika v drugih državah.

## 2. MATERIAL IN METODE

V letih 2000 do 2004 smo testirali 282 vzorcev rastlin paradižnika. Večino vzorcev so nabrali fitosanitarni inšpektorji v okviru stalnega nadzora škodljivih organizmov, ki ga vrši Fitosanitarna uprava Republike Slovenije. Vzorce smo testirali na viruse iz karantenske liste I.A.I (ToRSV (*Tomato ringspot nepovirus*, slo: virus obročkaste pegavosti paradižnika) in II.A.II (TSWV (*Tomato spotted wilt tospovirus*, slo: virus pegavosti in uvelosti paradižnika), INSV (*Impatiens necrotic spot tospovirus*, slo: virus nekrotične pegavosti vodenke), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl bigeminivirus*, slo: virus rumenega zvijanja listov paradižnika) ter na virus iz EPPO A1 liste (CSNV (*Chrysanthemum stem necrosis tospovirus*, slo: virus stebelne nekroze krizantem)) in EPPO opozorilne liste (PepMV (*Pepino mosaic potexvirus*, slo: virus mozaika pepina)). Poleg teh pa smo nekatere vzorce paradižnika testirali tudi na druge gospodarsko pomembne viruse, ki so pogosti v Evropi, kot npr. AMV (*Alfalfa mosaic alfamovirus*, slo: virus mozaika lucerne), CMV (*Cucumber mosaic cucumovirus*, slo: virus mozaika kumar), PVY (*Potato virus Y (potyvirus)*, slo: krompirjev virus Y), PVX (*Potato virus X (potexvirus)*, slo: krompirjev virus X), TMV (*Tobacco mosaic tobamovirus*, slo: virus mozaika tobaka), ToMV (*Tomato mosaic tobamovirus*, slo: virus mozaika paradižnika) in TAV (*Tomato aspermy cucumovirus*, slo: virus aspermije paradižnika).

Bolezenska znamenja na vzorcih paradižnika (Jones s sod., 1997) smo primerjali z dobljenimi rezultati serološkega testa ELISA. V primeru nejasnih rezultatov, oziroma neznanega povzročitelja, smo vzorce testirali še z elektronsko mikroskopijo in s testnimi rastlinami ter v primeru tospovirusov in TYLCV še z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR). V zadnjem letu smo razvili molekularne metode (PCR) za detekcijo dveh crinivirusov iz EPPO opozorilne liste: ToCV (*Tomato chlorosis virus*) in TICV (*Tomato infectious chlorosis virus*).

## 3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Virusa, ki najpogosteje okužujeta paradižnik sta CMV in PVY. Okužba s PVY je bila potrjena v 22%, s CMV pa v 11% od 148 testiranih vzorcev paradižnika. Poleg njiju, smo do sedaj na paradižniku dokazali tudi AMV, TMV, ToMV in TSWV. Z elektronskim mikroskopom smo v vzorcih paradižnika našli tudi druge virusne delce, ki jih natančneje nismo uspeli identificirati, po morfologiji pa ustrezajo cucumo-, gemini-, rhabdo- in tobamovirusom. Virusov kot so PepMV, TYLCV, ToRSV, INSV, CSNV, TICV, ToCV, TAV in PVX do sedaj v Sloveniji na paradižniku še nismo našli.

Najpomembnejši prenašalec virusov CMV in PVY so listne uši. Rastline paradižnika okužene s CMV običajno počasneje rastejo, na listih lahko opazimo mozaik, kloroze, listna površina se pogosto zmanjša, tako da so listi ozki, le-ti se lahko tudi zvijajo. Na površini plodov se lahko

pojaviyo lise in nekroze. PVY na listih običajno povzročajo deformacije, lisavost in nekroze, ki so opazne tudi na steblih ter plodovih. Virus PVY in CMV smo pogosto našli skupaj v mešanih okužbah, kjer sta povzročila močnejša bolezenska znamenja kot v primeru okužbe s posameznim virusom. Našli pa smo tudi druge mešane okužbe, kot npr. kombinacija PVY in TSWV, pri kateri smo opazili zvijanje listov paradižnika ter nekroze na listih, pecljih in steblih.

Svetlo rumena ali rdeča območja na površju zrelih plodov so lahko posledica okužbe s TSWV. Takšna bolezenska znamenja na plodovih pa so lahko tudi posledica okužbe s CMV, TAV, PVX, ToMV in PepMV. Na nezrelih plodovih paradižnika TSWV povzročajo nekrotične obroče. Plodovi s TSWV okuženih rastlin paradižnika so lahko tudi brez bolezenskih znamenj. Na listih paradižnika okuženega s TSWV lahko opazimo zvijanje, rumenenje, nekrotične pege in proge, ki pa so lahko tudi na steblih in peclju. Rastline paradižnika okužene s TSWV so navadno pritlikave, lahko so nekroze tako močne, da rastline popolnoma propadejo.

AMV povzročajo močne nekroze na plodovih paradižnika, na listih pa klorotične pege. Rastline paradižnika okužene s TMV so lahko pritlikave, listi imajo lahko svetlo in temno zelene lise, lahko se zvijajo ali pa so celo deformirani. ToMV smo leta 2004 našli v enem rastlinjaku, kjer je povzročil sušenje in nekroze rastlin paradižnika, na listih pa smo opazili tudi kloroze in gubanje. Leta 2001 smo z elektronskim mikroskopom v soku testne rastline *Chenopodium quinoa*, ki je bila mehansko okužena z vzorcem paradižnika s klorotičnimi madeži na listih, našli tobamoviruse. V tem primeru z ELISA nismo dokazali ne virusa TMV in ne ToMV. Leta 2003 smo prejeli v testiranje vzorec paradižnika (*Lycopersicon esculentum* cv. Belle) z nenavadnimi bolezenskimi znamenji: lisasti in nagubani plodovi ter ozki in nekrotični listi. Takšna bolezenska znamenja je vzorčevalec opazil le na dveh rastlinah v rastlinjaku paradižnika. Pod elektronskim mikroskopom smo zasledili filamentozne virusne delce, ki bi bili lahko nukleoproteini tospovirusov, vendar z ELISA nismo uspeli dokazati sledečih tospovirusov: TSWV, INSV, CSNV, TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*) in ne GRSV (*Groundnut ringspot virus*). Tospovirusov nismo dokazali niti z metodo RT-PCR. Mehansko smo okužili različne testne rastline. 14 dni po mehanski okužbi smo na testni rastlini *Nicotiana benthamiana* opazili nekroze na steblih, pecljih in listih. Sistemična bolezenska znamenja smo opazili tudi na testni rastlini *N. clevelandii* in *N. tabacum* cv. *White Burley*. V soku iz mehansko okuženih testnih rastlin *N. clevelandii* in *N. tabacum* cv. *White Burley* smo z elektronskim mikroskopom našli virusne delce iz družine Rhabdoviridae, v testni rastlini *N. benthamiana* pa izometrične virusne delce premera 30 nm, ki jih nismo uspeli natančneje diagnosticirati. Izometrične virusne delce smo iz testne rastline *N. benthamiana* mehansko prenesli na *N. tabacum* cv. *White Burley*, kjer je ta neznan izometrični virus povzročil nastanek lokalnih nekrotičnih madežev. Mehanski prenos virusov na testno rastlino paradižnika (*L. esculentum* cv. *Money Maker*) ni bil uspešen, zato do sedaj ni znano ali so bila bolezenska znamenja na paradižniku posledica okužbe z neznanimi izometričnimi virusi ali z virusi iz družine Rhabdoviridae ali mešane okužbe. PepMV so najprej našli na rastlinah pepina leta 1980 v Peruju, leta 1999 pa na rastlinah paradižnika na Nizozemskem in Veliki Britaniji, kasneje tudi v Nemčiji, Franciji, Španiji, Italiji, Finski, Norveški, Poljski, Švedski in Ameriki (EPPO, 2004-03). V Sloveniji testiramo rastline paradižnika na virus PepMV od leta 2001 in v nobenem, od skupno 210 testiranih vzorcev, ga nismo potrdili. V literaturi (Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, 2001) navajajo, da izolat tega virusa iz pepina na paradižniku povzročajo latentne okužbe, izolat iz paradižnika pa različna bolezenska znamenja, odvisno od kultivarja, starosti rastline v času okužbe in klimatskih razmer. Bolezenska znamenja so različna v različnih letnih časih – najizrazitejša se razvijejo spomladi in jeseni, očitno v povezavi s slabo osvetljenostjo rastlin. V začetku okužbe na mlajših listih opazimo medžilno rumenenje, rahlo lisavost/mozaik, lahko tudi 'mehurčke'. S časom listi postanejo zgubani. Ti listi imajo rumenkast ali sivkast videz. Starejši listi so temno zelene barve, včasih se na njih pojavijo oglate, klorotične pege velike do 10 mm, ki se lahko širijo preko vse listne površine, tako da je njen večji del klorotičen. Znamenja na listih so podobna okužbi s PVX ali zaradi slabe osvetlitve. Rastni vršiček je svetlejšo zelene barve, listi v

rastnem vršičku so lahko ožji in koničasti z mozaikom na listni površini. Večina rastlin nekaj tednov po okužbi ne kaže več bolezenskih znamenj, ali pa so le-ta milejša. Okužene rastline navadno rahlo zaostajajo v rasti, lahko pa je rast močno zavrtta. Le na nekaterih plodovih so opazna razbarvanja, ki dajejo marmorirano sliko – oranžne in rdeče predele. Znamenja na plodovih so podobna kot pri okužbi s CMV, TAV, TSWV ali PVX. Virus lahko povzroči precejšnje izgube pridelka. V rastlinjakih se bolezen širi zelo hitro, hitreje kot ostale virusne okužbe. PepMV se širi mehansko z rastlinskimi sokovi, z okuženim orodjem in priborom, z dotikom rok, obleke (na obleki so našli infektivne viruse tudi po 14 dneh), z neposrednim stikom med rastlinami, z odpadki iz okuženih rastlin, z vegetativnim razmnoževanjem s potaknjenci, s cepljenjem, z vektorji (čmrlji) in s semeni.

TICV in ToCV, virusa iz EPPO opozorilne liste, ki ju v Sloveniji še nismo dokazali (testirano 10 vzorcev paradižnika leta 2004), sta bila do sedaj najdena v ZDA, Španiji, Italiji, Grčiji, Taiwanu, TICV tudi na Japonskem in Indoneziji ter ToCV v Franciji in Južni Afriki. Njun najpomembnejši prenašalec je *Trialeurodes vaporariorum*, ToCV pa prenašata tudi *Bemisia tabaci* in *T. abutilonea*. Bolezenska znamenja, ki jih povzročata na rastlinah paradižnika se najprej pojavijo na nižjih listih, kasneje pa tudi na zgornjem delu rastline. Na listih najprej opazimo klorotične pege, nato se rumenenje razširi po celi listni površini, tako da v končni fazi ostanejo zelene le listne žile. Listi se zvijajo in postanejo krhki, na starejših listih pa lahko opazimo tudi nekrotične pege. Plodovi so manjši in manj številčni ter dozoriijo kasneje (Dovas in Katis, 2002; Novas-Castilo in sod., 2000; Hartono in sod., 2003; Li in sod., 1998; EPPO, 2004-03).

Podobno kot PepMV, TICV in ToCV, tudi TYLCV, virus iz II.A.II karantenske liste, še ni bil najden v Sloveniji (od leta 2001 do vključno 2004 smo testirali 180 vzorcev paradižnika), čeprav je bil dokazan med drugim tudi že v sosednji Italiji. TYLCV se iz okuženih rastlin na zdrave prenaša s cepljenjem in s prenašalcem *Bemisia tabaci*. Bolezenska znamenja se pojavijo 2-4 tedne po okužbi in se razlikujejo glede na starost rastline v času okužbe, okoljskih razmer in kultivarja. Listi so majhni, odebeljeni in imajo klorotične robove, ki se zvijajo navzgor. Vrh rastline je lahko podoben kot pri brokoliju. Rastline, ki se okužijo zelo zgodaj so močno pritlikave in imajo malo ali nič plodov - propade lahko do 90% cvetov, zato se število plodov precej zmanjša, poleg tega pa je notranjost plodov pogosto deformirana (Moriones in Accotto, 2000; Morris, EPPO; Bulletin).

Od karantensko škodljivih virusov, ki jih v Sloveniji na paradižniku še nismo dokazali, naj omenimo še ToRSV, virus na katerega smo od leta 2001 skupno testirali 209 vzorcev paradižnika. ToRSV povzroča zvijanje in nekroze ravnih poganjkov. Bazalni del mlajših listov razvije rjave, jasno izražene nekrotične obroče in sinusoidne črte. Peclji nekrotičnih listov in stebela imajo pogosto nekrotične proge. Zgodaj okuženi plodovi so slabotni, sivo do rjave barve, plutasti, na površini imajo pogosto koncentrične obroče ali dele obročev (EPPO, 2003).

#### 4. SKLEPI

V letih od 2000 do 2004 smo na paradižniku najpogosteje našli virusa CMV in PVY, redkeje pa tudi AMV, TMV, ToMV in TSWV. Poleg teh pa smo v vzorcih paradižnika z elektronskim mikroskopom opazili virusne delce, ki jih natančneje nismo uspeli identificirati, po morfologiji pa ustrezajo cucumo-, gemini-, tobamo- in rhabdovirusom. Karantensko škodljivih virusov kot so TYLCV, ToRSV in virusov iz EPPO opozorilne liste, kot so PepMV, TICV in ToCV, do sedaj v Sloveniji na rastlinah paradižnika še nismo našli.

## 5. ZAHVALA

Zahvaljujemo se sodelavcem Fitosanitarnе inšpekcije za nabrane vzorce ter Fitosanitarni upravi RS za finančna sredstva. Dr. Ko Verhoeven (Plant Protection Service, Wageningen, Nizozemska) in Dr. D.-E. Lesemann (Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Plant Virology, Microbiology and Biosafety, Braunschweig, Nemčija) sta nam večkrat priskočila na pomoč s koristnimi nasveti.

## 6. LITERATURA

- Agrios G.N. 1997. Plant pathology. 4th ed. London, Academic Press: 479–518.
- Bulletin. *Tomato yellow leaf curl virus* (<http://spraytec.com/articles/Tylcv/tylcv.htm>)
- Dovas C.I., Katis N.I. 2002. Multiplex detection of Criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. 2002. Plant Disease, 86(12): 1345-1349.
- EPPO. 2003. Diagnostic protocols for regulated pests - *Tomato ringspot nepovirus* (EPPO, 03/10476-II, P Diag Point 5.2)
- EPPO. 2004-03. *Tomato chlorosis crinivirus*; a new tomato virus transmitted by whiteflies. *Tomato infectious chlorosis crinivirus*, a new tomato virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Pepino mosaic potexvirus*, a new virus of tomato introduced into Europe (<http://www.eppo.org>)
- Hartono S., Natsuaki T., Sayama H., Atarashi H., Okuda S. 2003. Yellowing disease of tomatoes caused by *Tomato infectious chlorosis virus* newly recognized in Japan. J Gen Plant Pathol, 69: 61-64.
- Jones J.B., Jones J.P., Stall R.E., Zitter T.A. 1997. Compendium of tomato diseases. USA, The American Phytopathological society, third printing, 73 str.
- Li R.H., Wisler G.C., Liu, H.Y., Duffurs, J.E. 1998. Comparison of diagnostic technique for detecting *Tomato infectious chlorosis virus*. Plant disease, 82: 84-88.
- Matthews R.E.F. 1992. Fundamentals of plant virology. London, Academic Press, Inc., 403 str.
- Moriones E., Accotto G.P., 2000. *Tomato yellow leaf curl virus* complex (TYLCV). European Whitefly Studies Network, part B: 1.
- Morris J. Protocol for the diagnosis of quarantine organisms *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and *Tomato mottle virus* (ToMoV) (EPPO, 03/10274, P Diag Point 4.1.6, + NL comments 03/10549) (<http://www.csl.gov.uk>)
- Navas-Castillo J., Camero R., Bueno M., Moriones E. 2000. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. Plant Disease, 84(8): 835-837.
- Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen. 2001. *Pepino mosaic virus*. Summary of surveys and experimental work in the Netherlands (01/1999-04/2001).