

POJAV TOSPOVIRUSOV V SLOVENIJI - NJIHOV POMEN, ZNAČILNOSTI IN METODE DOLOČANJA

Irena MAVRIČ¹, Maja RAVNIKAR²

^{1,2} Nacionalni inštitut za biologijo

Tospovirusi so pomembni patogeni predvsem na okrasnih rastlinah in vrtninah, med njimi povzročajo največjo škodo na paprikah, zemeljskih oreških, paradižnikih, zeleni, solati, krompirju, grahu, tobaku, čebuli, krizantemah, dalijah, gerberah, perunikah in mnogih drugih. Okužujejo preko 800 rastlinskih vrst iz 82 družin enokaličnic in dvokaličnic. Prenašalci tospovirusov so predstavniki različnih rodov žuželk iz družine Thripidae. Najpogostejši prenašalci so *Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei* in *Thrips tabaci*, poleg njih pa še *F. fusca*, *T. setosus*, *T. palmi*, *Scirtothrips dorsalis* in *F. intonsa*. Prenos posameznih virusov je vezan na določene vrste prenašalcev, različna pa je tudi učinkovitost prenašanja posameznih virusov. Vrste, ki prenašajo tospoviruse se hranijo izključno na rastlinah in mnoge med njimi so polifagne. Virus pegavosti in uvelosti paradižnika (*Tomato spotted wilt tospovirus* - TSWV) spada med 10 ekonomsko najpomembnejših rastlinskih virusov v svetu, saj povzroča izgube pridelka za več kot milijardo ameriških dolarjev. Predvsem je pomemben povzročitelj bolezni zunaj rastlinjakov na vrtninah pa tudi na nekaterih okrasnih rastlinah. Virus nekrotične pegavosti vodenke (*Impatiens necrotic spot tospovirus* - INSV) se pogosto pojavlja v rastlinjakih, kjer povzroča veliko škodo pri pridelavi okrasnih rastlin. Za razliko od TSWV se ne pojavlja na vrstah iz družine Solanaceae. Najučinkovitejši prenašalec obeh virusov je cvetlični resar *Frankliniella occidentalis*. V letu 2000 smo dokazali okužbe nekaterih okrasnih rastlin, predvsem krizantem, s TSWV in INSV. Poleg teh pa smo na območju Slovenije zasledili še okužbo z virusom rumene pegavosti perunik (*Iris yellow spot virus* - IYSV). Virus je bil opisan šele v zadnjih letih in lahko povzroča velike izgube pri pridelavi čebule. Najučinkovitejši prenašalec tega virusa je tobakov resar *Thrips tabaci*. Za identifikacijo vrst in različkov se uporabljajo serološke značilnosti nukleoproteina in homologija nukleotidnega zaporedja gena za nukleoprotein. V predavanju bo predstavljena biologija vseh treh virusov, njihov pomen za pridelavo s poudarkom na izkušnjah iz preteklega leta in možni načini diagnostike.

Ključne besede: TSWV, INSV, IYSV, tospovirusi, metode določanja

ABSTRACT

OCURRENCE OF TOSPOVIRUSES IN SLOVENIA – THEIR IMPORTANCE, CHARACTERISTICS AND DETECTION METHODS

Tospoviruses are important pathogens of ornamental and vegetable crops, such as pepper, peanut, tomato, celery, lettuce, potato, pea, tobacco, onion, chrysanthemum, dahlia, gerbera, iris and many others. They are known to infect more than 800 plant species from 82 plant families. Virus vectors are different insect species from family

¹ mag.; Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

² izr. prof. dr.; Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Thripidae. The most frequently reported vectors are *Frankliniella occidentalis*, *F. schultzei* in *Thrips tabaci*, other recorded vectors are also *F. fusca*, *T. setosus*, *T. palmi*, *Scirtothrips dorsalis* and *F. intonsa*. One vector species is able to effectively transmit only one or few tospovirus species. They feed exclusively on plants and most of them are polyphagous. *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) is one of ten most important plant viruses, causing crop losses worldwide of more than 1 billion US dollars. It is found to infect mostly vegetables and some ornamentals mainly outside greenhouses. *Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV) is mainly found in greenhouses causing big losses in production of ornamental plants. It does not occur in solanaceous crops. The most effective vector of both viruses is Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. TSWV and INSV were detected on some ornamentals, mostly chrysanthemums, in Slovenia in the year 2000. In southwestern part of Slovenia also *Iris yellow spot virus* (IYSV) infections were found. IYSV was reported only in last years and can cause big crop losses in seed and bulb production of onions. Its most effective vector is reported to be Onion thrips, *Thrips tabaci*. Methods used for tospovirus identification are based on serological characteristics of nucleoprotein and nucleotide homology of the gene for the same protein. Biology, economical importance and methods for detection and identification of all three tospoviruses will be presented.

Key words: TSWV, INSV, IYSV, tospoviruses, identification methods

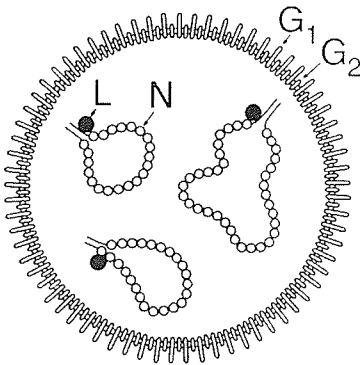
1. UVOD

Rod *Tospovirus* je edini rod družine *Bunyaviridae*, katerega predstavniki so pomembni rastlinski patogeni. Poleg tega so v družini še štirje rodovi, *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus* in *Nairovirus* (Elliott *et al.*, 2000).

Bolezen "spotted wilt" je bila na paradižniku opisana že leta 1915 v Avstraliji, petnajst let kasneje pa so dokazali, da je povzročitelj bolezn virus. Poimenovali so ga *Tomato spotted wilt virus* oziroma virus pegavosti in uvelosti paradižnika (TSWV) in dokazali, da ga prenašajo resarji. Tospovirusi so pomembni povzročitelji bolezn predvsem na okrasnih rastlinah in vrtninah. Največjo škodo povzročajo na papriki, zemeljskih oreških, paradižniku, zeleni, solati, krompirju, grahu, tobaku, krizantemah, dalijah, gerberah, perunikah in mnogih drugih. Okužujejo preko 800 rastlinskih vrst iz 82 družin enokaličnic in dvokaličnic (Prins in Goldbach, 1998). TSWV spada med 10 ekonomsko najpomembnejših rastlinskih virusov v svetu, saj povzroča izgube pridelka za več kot milijardo ameriških dolarjev (Goldbach in Peters, 1996).

Dolgo časa je bil TSWV znan kot edini predstavnik rodu *Tospovirus*, nato pa so začeli odkrivati nove vrste, ki jih je v zadnjem času vedno več. Prvi novo identificirani virus je bil virus nekrotične pegavosti vodenke (*Impatiens necrotic spot tospovirus* - INSV), o katerem so najprej poročali leta 1987 v ZDA, nato pa leta 1990 tudi v Evropi, na Nizozemskem. Pomemben je predvsem kot povzročitelj bolezn na okrasnih rastlinah, vrst iz družine *Solanaceae* načeloma ne okužuje, če pa jih, povzroča le lokalna znamenja (Goldbach in Peters, 1996). V rodu *Tospovirus* je sedaj že 13 virusov, med njimi poleg omenjenih TSWV in INSV tudi virus nekroze stebela krizantem (*Chrysanthemum stem necrosis tospovirus* - CSNV) in virus rumene pegavosti perunik (*Iris yellow spot tospovirus* - IYSV) (Elliott *et al.*, 2000). Za identifikacijo vrst in različkov se uporabljajo serološke značilnosti nukleoproteina in homologija nukleotidnega zaporedja gena za nukleoprotein (Goldbach in Peters, 1996).

Slika 1: Zgradba tospovirusov. N - nukleoprotein, L - virusna polimeraza, G₁ in G₂ - glikoproteina (Peters in Goldbach, 1995)



Tospovirusi so poleg rabdovirusov edini rastlinski virusi z lipidno ovojnico. Genom predstavljajo tri molekule RNA, ki so obdane z nukleoproteinom (N), priključeno pa jim je še 10-20 kopij virusne polimeraze (L-protein) in tako tvorijo nukleokapside (Slika 1). Vse tri nukleokapside so obdane z lipidno ovojnico, v kateri sta nameščena dva glikoproteina, G₁ in G₂. Vsi trije genomske segmenti imajo približno 65 nukleotidov dolge komplementarne konce, ki lahko hibridizirajo in tvorijo nekakšne delno cirkularne strukture. Glikoproteina G₁ in G₂ sta skupna različnim tospovirusom, medtem ko so N-proteini različni. Zato se pri ELISA testu za identifikacijo tospovirusov običajno uporabljajo protitelesa proti N-proteinu.

1. 1. Virus pegavosti in uvelosti paradižnika (*Tomato spotted wilt tospovirus* - TSWV)

TSWV je pomemben patogen na vrtninah in okrasnih rastlinah. V sosednjih državah povzroča veliko škodo v nasadih paprike, paradižnika, bazilike in okrasnih rastlin. Na občutljivih sortah povzroča lahko tudi popoln propad pridelka. Najučinkovitejši prenašalec virusa je cvetlični resar *Frankliniella occidentalis*, ki je bil v Evropo zanesen v 80ih letih iz USA. Takrat so se v Evropi tudi pojavile prve večje težave zaradi okužbe s TSWV. Poleg cvetličnega resarja, ki je njegov najučinkovitejši prenašalec, lahko TSWV prenašajo še drugi resarji, vendar manj učinkovito (Goldbach in Peters, 1996).

1. 2. Virus nekrotične pegavosti vodenke (*Impatiens necrotic spot tospovirus* - INSV)

INSV okužuje večinoma okrasne rastline in je pogost povzročitelj bolezni v rastlinjakih. Nekatere okrasne rastline, med njimi *Sinningia speciosa* (*Gloxinia*), *Ranunculus asiaticus*, *Impatiens wallerana*, *Impatiens* New Guinea hibridi in krizanteme so na virus zelo občutljive, medtem ko so druge lahko okužene brez vidnih bolezenskih znamenj. Vrtnine okužuje zelo redko in na njih večinoma ne povzroča resnih težav. Na papriki in paradižniku povzroča le pojavljanje lokalnih bolezenskih znamenj na mestu okužbe. Edini znani prenašalec INSV je cvetlični resar (Daughtrey *et al.*, 1997).

1. 3. Virus rumene pegavosti irisa (*Iris yellow spot tospovirus, IYSV*)

Od leta 1992 so na Nizozemskem na perunikah občasno opazili pojavljanje bolezenskih znamenj, klorotičnih peg, ki so se kasneje razvile v rumene in nekrotične pege, ki so bile posledica okužbe z IYSV (Cortes *et al.*, 1998). Podobna znamenja so opazili tudi na poru, vendar so jih pripisali glivični okužbi. Kasneje so okužbo pora z IYSV potrdili z ELISA testom. Delež okuženih rastlin je bil odvisen od sorte in je nihal med 50 in 90 %. Okužbo čebule z IYSV so leta 1997 dokazali tudi v Izraelu, kjer je znamenja okužbe kazalo 20-60% rastlin (Gera *et al.*, 1998).

Tudi v Braziliji so leta 1994 na čebuli opazili očesu podobne pege na listih in cvetnih steblih (Pozzer *et al.*, 1999), posledica pa je bil propad cvetov. Okužba je bila zelo močna in včasih je dosegla celo 100%, kar je vodilo v popolni propad pridelka, tako semena, kot čebul. Ugotovili so, da je *Thrips tabaci* učinkovit prenašalec virusa, medtem ko *Frankliniella occidentalis* in *F. schultzei* virusa ne prenašata (Nagata *et al.*, 1999).

2. MATERIAL IN METODE

2. 1. Material

Detekcijo tospovirusov smo opravili na rastlinah nabranih v rastlinjakih in njihovi okolici, ter na vzorcih nabranih na prostem. Najštevilčnejše so bile krizanteme, poleg njih pa smo testirali tudi ciklame, kale, paradižnik, papriko, navadno vodenko, astro, dalijo, spatifil in nekatere plevele. Okužbo z IYSV smo ugotavljali na poru, čebuli in samoniklih rastlinah. Na okuženih rastlinah pora in čebule smo opazili klorotične pege, ki so kasneje postale rumene in nekrotične in so bile zelo podobne znamenjem glivne okužbe. Vse tri viruse, TSWV, INSV in IYSV smo izolirali na testnih rastlinah, zastopanost tospovirusov preverili z elektronsko mikroskopijo in izolate poslali v potrditev v Central Science Laboratory, York, Velika Britanija.

2. 2. Inokulacija testnih rastlin

Inokulacijo smo izvedli kot je opisano v Mavrič (1998). Za inokulacijo smo uporabili 0.01M natrijev fosfatni pufer pH 7 z dodanim 0.01M natrijevim sulfitom. Inokulirali smo rastline *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis* in *N. rustica*.

2. 3. ELISA test

Za detekcijo TSWV in INSV smo uporabili DAS in TAS ELISA test, za katera smo uporabili protitelesa različnih proizvajalcev (Loewe, Adgen in DSMZ). Uporabljali smo za TSWV in INSV specifična poliklonska in monoklonska protitelesa ter mešanico protiteles primernih za sočasno detekcijo TSWV in INSV. Za detekcijo IYSV smo v DAS ELISA testu uporabili specifična poliklonska protitelesa (Loewe).

3. REZULTATI IN DISKUSIJA

3. 1. Inokulacija testnih rastlin

Po izolaciji posameznih virusov smo primerjali njihove reakcije na različnih testnih rastlinah. Rezultati, ki kažejo jasne razlike med posameznimi virusnimi izolati, so

prikazani v preglednici 1. Obstoj virusa v inokuliranih rastlinah smo, za ugotavljanje morebitne latentne okužbe, preverili tudi z ELISA testom.

Tabela 1: Reakcije izolatov TSWV, INSV in IYSV na testnih rastlinah po mehanski inokulaciji

	TSWV	INSV	IYSV
<i>C. amaranticolor</i>	–	ss	LL
<i>C. murale</i>	LL	LL	LL
<i>C. quinoa</i>	LLL	L, ss	LL, ss
<i>D. stramonium</i>	LL, SS	LL, ss	LL
<i>L. esculentum</i>	LL, SS	LL	–
<i>N. benthamiana</i>	LL, SS	LL, SS	LL, SS
<i>N. clevelandii</i>	LL, SS	/	ll
<i>N. occidentalis</i>	LL, SS	LLLL, ss	
<i>N. rustica</i>	LL, SS	ll	–

LL - vidne lokalne poškodbe na inokuliranih listih, ll - lokalna okužba brez vidnih bolezenskih znamenj, SS - sistemska okužba z vidnimi znaki, ss - sistemska okužba brez vidnih bolezenskih znamenj, – - ni okužbe, / - netestirano

3. 2. ELISA test

Pri izvedenem ELISA testu smo ugotovili, da z mešanico protiteles, ustreznih za hkratno detekcijo TSWV in INSV dobimo pozitivne rezultate tudi v primerih, ko obeh virusov v vzorcih ne moremo dokazati s specifičnimi protitelesi. Tak rezultat nakazuje možnost zastopanosti drugega, za zdaj še neidentificiranega tospovirusa. Glede na podatke iz literature domnevamo, da gre verjetno za okužbo s CSNV.

S protitelesi, specifičnimi za IYSV, smo dokazali njegovo zastopanost v poru in čebuli, ne pa tudi v pregledanih samoniklih rastlinah. Zaradi okuženosti pora in čebule z IYSV za zdaj v Sloveniji še nismo opazili večje ekonomske škode, vendar ne smemo zanemariti dejstva, da ponekod po svetu povzroča ogromno gospodarsko škodo. Čeprav virus še nima karantenskega statusa, bi bilo potrebno ugotoviti in spremljati njegovo razširjenost v Sloveniji.

4. SKLEPI

V Sloveniji smo v preteklih letih dokazali zastopanost treh tospovirusov, TSWV, INSV in IYSV, rezultati raziskav pa kažejo na možnost zastopanosti vsaj še enega, zaenkrat še neidentificiranega tospovirusa. Velik ekonomski pomen okužb s tospovirusi in težavnost njihovega zatiranja oziroma omejevanja kažeta nujno potrebo po ugotovitvi njihove razširjenosti v Sloveniji in uvedbi tudi molekulske bioloških metod za njihovo določanje.

5. VIRI

Cortes I., Livieratos I. C., Derks A., Peters D., Kormelink R. 1998. Molecular and serological characterization of Iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology*, 88, 12: 1276-1282.

Daughtrey M. L., Jones R. K., Moyer J. W., Daub M. E., Baker J. R. 1997. Tospoviruses Strike the Greenhouse Industry. INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Disease* 81, 11: 1220-1230.

Elliott R. M., Bouloy M., Calisher C. H., Goldbach R., Moyer J. T., Nichol S. T., Pettersson R., Plyusnin A., Schmaljohn C. S. 2000. Family Bunyaviridae. V: *Virus taxonomy. Seventh report of the International committee on taxonomy of viruses.* van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M.,

- Bishop D. H. L., Carstens E. B., Estes M. K., Lemon S. M., Maniloff J., Mayo M. A., McGeoch D. J., Pringle C. R., Wickner R. B. (eds.). San Diego, Academic Press: 599-621.
- Gera A., Kritzman A., Cohen J., Raccach B. 1998. Detection of Iris yellow spot tospovirus in Israel. *Petria*, 9, 3: 297.
- Goldbach R., Peters D. 1996. Molecular and biological aspects of tospoviruses. V: *The Viruses. The Bunyaviridae*. Elliott R. M. (ed.). New York in London, Plenum Press: 129-257.
- Mavrič I. 1998. Osamitev in identifikacija virusov česna (*Allium sativum* L.). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 73s.
- Nagata T., Almeida A. C. L. 1999. The identification of the vector species of Iris yellow spot tospovirus occurring on onion in Brasil. *Plant Disease* 83, 4: 399.
- Peters D., Goldbach R. 1995. *The Biology of Tospoviruses. V: Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Volume III: Viruses and viroids*. Singh R. P., Singh U. S., Kohmoto K. (eds.). Oxford, New York, Tokio, Elsevier Science: 199-210.
- Pozzer L., Kormelink L., Prins M., Peters D., Rosende R. de O., de Avila A. C. 1999. Characterization of a tospovirus isolate of Iris yellow spot virus associated with a disease in onion fields in Brasil. *Plant Disease*, 83, 4: 345-350.
- Prins M., Goldbach R. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends in Microbiology* 6, 1: 31-35.