

## BIOTIČNA RAZNOVRSTNOST VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV)

Maruša POMPE-NOVAK<sup>1</sup>, Zora KOROŠEC-KORUZA<sup>2</sup>, Irma TOMAŽIČ<sup>3</sup>, Martina KLARIČ<sup>4</sup>, Jana VOJVODA<sup>5</sup>, Marjanca BLAS<sup>6</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>7</sup>, Marc FUCHS<sup>8</sup>, Nataša PETROVIČ<sup>9</sup>

<sup>1,4,5,6,7,9</sup>Nacionalni inštitut za biologijo

<sup>2</sup>Oddelek za agronomijo Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani

<sup>3</sup>Politehnika Nova Gorica

<sup>8</sup>INRA, Centre de Recherche de Colmar, Laboratoire de Virologie

### IZVLEČEK

Virus pahljačavosti listov vinske trte (GFLV) povzroča bolezen imenovano kužno izrojevanje vinske trte, ki je razširjena po vsej Evropi. Bolezenska znamenja se kažejo kot krajšanje medčlenkov, dvojna očesa, bifurkacije, zraslost vitic, cik-cak rast, kloroze v obliki lis ali pik, rumenenje listov, zmanjšano število in velikost socvetij ter osipanje in zmanjšanje jagod. Kužno izrojevanje vinske trte lahko zmanjša pridelek grozdja tudi za 80%. Klasični način omejevanja širjenja virusa temelji na testiranju trsov v okviru zdravstvene selekcije klonov in uporabi neokuženega sadilnega materiala. Ena od novejših možnosti pa je uporaba transgene vinske trte, odporne na GFLV. Evropski projekt TRANSVIR se ukvarja z znanstvenimi vprašanji v zvezi z varstvom okolja v primeru uporabe gensko spremenjene vinske trte, odporne na različne viruse vinske trte ter gensko spremenjenih sliv, odpornih na virus šarke. Ukvarja se z oceno tveganja v okolju, s poljskimi poskusi ter primerjavo ocene rekombinacij med gensko spremenjenimi in konvencionalnimi rastlinami. Projekt TRANSVIR je namenjen za znanstveno podporo organom Evropske skupnosti pri sprejemanju regulatornih odločitev za uporabo na viruse odpornih gensko spremenjenih rastlin v kmetijstvu. Nacionalni inštitut za biologijo in Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani sta vključena v projekt TRANSVIR z raziskavami biotične raznovrstnosti GFLV v Sloveniji, na podlagi analize raznolikosti gena 2C (gen za plaščni protein). Raziskave biotične raznovrstnosti GFLV v Sloveniji na podlagi analize raznolikosti genov 2A in 2B (gen za gibalni protein) pa potekajo v okviru temeljnega raziskovalnega projekta, ki ga izvajata Nacionalni inštitut za biologijo in Politehnika Nova Gorica. V raziskave so vključeni trsi različnih sort iz vinogradov na različnih lokacijah na Primorskem. Podatki o raznolikosti genoma GFLV so osnova za sklepanje na pogostost mutacij in rekombinacij med različki virusa v naravi ter osnova za oceno varnosti uporabe gensko spremenjenih rastlin z vnesenim genom za plaščni protein.

Ključne besede: biološka raznovrstnost, GFLV, vinska trta, virus pahljačavosti listov vinske trte, *Vitis vinifera*

### ABSTRACT

#### BIOTICAL DIVERSITY OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV)

Grapevine fanleaf virus (GFLV) is the causal agent of the grapevine fanleaf degradation, a dangerous disease widespread in all grapevine growing areas in Europe. The disease symptoms are short internodes, double nodes, bifurcations, fasciations of tendrils, zigzag growth, chromatic alterations of the leaves in form of rings or spots, yellowing of the leaves,

<sup>1</sup>dr., Večna pot 111, 1000 SI-Ljubljana

<sup>2</sup>prof. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

<sup>3</sup>dr., Vipavska 13, 5000 SI-Nova Gorica

<sup>4</sup>univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>5</sup>Večna pot 111, 1000 SI-Ljubljana

<sup>6</sup>Večna pot 111, 1000 SI-Ljubljana

<sup>7</sup>prof. dr., Večna pot 111, 1000 SI-Ljubljana

<sup>8</sup>prof. dr., Laboratoire de Virologie, 28, rue de Herrlisheim, F-68021 Colmar cedex

<sup>9</sup>dr., Večna pot 111, 1000 SI-Ljubljana

smaller and fewer bunches, and smaller and unevenly developed berries. Fanleaf degradation can cause up to 80% loss in yield. Classical control measures to prevent a spread of the disease are testing of vines during sanitary selection of clones, and a use of healthy planting material. One of the new possibilities is the introduction of transgenic grapevines resistant to GFLV.

European project TRANSVIR is addressing scientific questions to key environmental safety issues on the release of virus-resistant transgenic grapevines bearing transgenic resistance to several different grapevine viruses, and transgenic plums resistant to plum pox virus. It is dealing with field assessment of environmental risks and comparative evaluation of recombination in transgenic vs. conventional crops. The project will assist European Community authorities in taking scientifically-based regulatory decisions for the proper deployment of virus-resistant transgenic crops. National Institute of Biology and Department of Agronomy, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, are participating in the TRANSVIR project with the research on diversity of 2C gene (coat protein gene) in natural populations of GFLV virus in Slovenia. A research on the diversity of 2A and 2B genes (movement protein gene) in natural populations of GFLV virus in Slovenia is conducted in the frame of basic research project carried out by National Institute of Biology and Nova Gorica Polytechnic. Several cultivars of grapevine from vineyards in different locations of Primorska are included in the research. Data obtained on GFLV genome diversity will serve to predict the frequency of mutations and recombination between natural populations of GFLV. Furthermore, these data will be used to preview the interaction between natural virus populations and a viral transgene, as risk assessment in case of introduction of transgenic grapevine resistant to GFLV.

Key words: biotical diversity, GFLV, grapevine, Grapevine fanleaf virus, *Vitis vinifera*

## 1. UVOD

Virus pahljačavosti listov vinske trte ali Grapevine fanleaf virus (GFLV) spada med Nepoviruse v družino *Comoviridae*. Virusni delci so izometrične oblike s premerom 30 nm. Genom sestavljajo 3 enoverižne molekule RNA: RNA1, RNA2 in RNA3. Plaščni protein je polipeptid z molekulske maso 54 kDa (Serghini *et al.*, 1990; Van Regenmortel *et al.*, 2000).

GFLV okužuje rastline iz rodu *Vitis*, druge rastlinske vrste pa v naravi zelo redko. Na vinski trti povzročča bolezen imenovano kužno izrojevanje vinske trte, ki je razširjena po vsem svetu, kjer gojijo vinsko trto. Literatura navaja različna bolezenska znamenja.

Na listih se bolezenska znamenja izražajo kot deformirani listi, nenormalna razporeditev primarnih žil (glavne žile so razporejene bolj vzporedno v obliki pahljače), pahljačavost listov, asimetrični listi (listni polovici nista enakomerno razviti), nepravilna nazobčanost, poglabljene stranske zareze, široko odprti sinusi ob listnem peclju, sinusi na listih skoraj izginejo, listi podobne oblike kot pri peteršilju, kloroze žil, kloroze medžilnih prostorov v obliki rumenih pik, obročev ali črt, rumenenje listov, manjša velikost listov, nagubani listi, zvijanje listov in redčenje listov. Na poganjkih so opazili bolezenska znamenja kot so deformirani poganjki, nenormalno razvejanje poganjkov (viličasta rast), nasproti ležeča očesa, kratki medčlenki, dvojni členki, zraslost poganjkov, ploščata stebela, cik-cak rast in rumenenje poganjkov. Prihaja tudi do rumenenja vitic, razbrazdanja lubja in razbrazdanja lesa. Cvetenje je lahko moteno, opazili so manjše cvetne nastavke in rumenenje socvetij. Na grozdih se bolezenska znamenja izražajo kot majhne jagode, majhni grozdi, odpadanje jagod takoj po cvetenju, osipavanje grozda, redkejši grozdi (na grozdu ostane le nekaj debelih in nekaj zelo drobnih jagod), nepravilno zorenje, slabo obarvanje grozda, jagode brez semen, majhen pridelek in slaba kvaliteta pridelka. Sorte vinske trte so različno občutljive na okužbo z GFLV. Pri tolerantnih sortah ni vpliva na pridelek, pri zelo občutljivih sortah pa lahko kužno izrojevanje vinske trte zmanjša pridelek grozdja tudi za 80%. Trsi imajo grmast videz, hitreje propadajo in imajo krajšo življenjsko dobo (Blažina, 1992; Grapevine fanleaf virus, 1970; Pearson in Goheen, 1998).

Glede na bolezenska znamenja, ki jih povzročajo, je bilo opisanih več različkov GFLV (Grapevine fanleaf virus, 1970):

- Različek pahljačavosti listov (Fanleaf strain) povzroča deformacije listov, kloroze, široko odprte sinuse ob listnem peclju, poglobljene stranske zareze, poudarjene žile na listih, prekomerno rast stranskih poganjkov, nepravilnosti medčlenkov in dvojne členke.
- Različek rumenenja (Yellow mosaic strain) povzroča zeleno-rumene mozaike različnih vzorcev, rumenenje listov, poganjkov in socvetij, redko pa tudi deformacije listov.
- Različek obzilne progavosti (Veinbanding strain) povzroča izrazite rumene ali zeleno-rumene pasove na listih.
- Različki povezani z razbrzdanjem lesa (Strains associated with the wood pitting disease)
- Različki povezani z enacijsko boleznijo (Strains associated with the enation disease).

GFLV se prenaša z okuženim sadilnim materialom in z ogorčico *Xiphinema index*. Cohn in sodelavci so objavili, da je prenašalec tudi *Xiphinema italiae* (Cohn *et al.*, 1970), česar pa kasnejše raziskave niso nikoli potrdile, vsekakor pa je v naravi verjetno *Xiphinema index* daleč bolj uspešen prenašalec od *Xiphinema italiae*. *Xiphinema index* prenaša GFLV s hranjenjem na koreninah okužene rastline in nato s hranjenjem na koreninah zdrave rastline. Za prenos virusa zadostuje že eno samo hranjenje na okuženi rastlini. *Xiphinema index* lahko prenese virus na zdravo rastlino do 8 mesecev po hranjenju na okuženi rastlini. Ogorčice širijo virus po vinogradu s hitrostjo do 1.5 m na leto (Andret-Link *et al.*, 2004; Grapevine fanleaf virus, 1970; Pearson in Goheen, 1998).

Klasični načini omejevanja širjenja virusa so:

- Testiranje trsov v okviru zdravstvene selekcije klonov in uporaba neokuženega sadilnega materiala.
- Vzgoja zdravega sadilnega materiala s termoterapijo in tkivno kulturo meristema.
- Zatiranje prenašalcev. V vzpostavljenih vinogradih je zatiranje ogorčic težko izvedljivo. Zelo pomembna pa je priprava zemlje pred nasaditvijo vinograda. Potreben je določen čas, dokler iz zemlje ne izginejo vsi ostanki okuženih korenin in dodatnih 8 mesecev, da ogorčice prenehajo biti prenašalci GFLV. Med tem časom je zelo pomembno zatiranje plevelov, kot potencialnega izvora virusne okužbe. Možno je tudi zatiranje ogorčic s kemičnimi sredstvi, vendar je to v nižjih plasteh zemlje neučinkovito (Pearson in Goheen, 1998).
- Navzkrižno varstvo z drugimi virusi. Narejeni so bili poskusi navzkrižnega varstva s serološko sorodnima virusoma GFLV in ArMV (Huss *et al.*, 1989).
- Vzgoja odpornih podlag na GFLV in *Xiphinema index*. Odporne so nekatere sorte *Vitis vinifera* in nekatere divje vrste iz rodov *Vitis* in *Muscadinia*, ki so jih uporabili za vzgojo novih podlag (Pearson in Goheen, 1998).

Novjša možnost pa je uporaba gensko spremenjenih rastlin vinske trte, odpornih na GFLV. Obstaja nekaj podlag odpornih na GFLV, ki imajo vnesen gen za plaščni protein GFLV (Krastanova *et al.*, 1995; Mauro *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 1999; Vigne *et al.*, 2003). Odpornost temelji na v rastlinski genom vstavljenem genu za plaščni protein GFLV (2C gen).

## 2. MATERIALI IN METODE

V raziskavah smo se osredotočili na raznolikost GFLV v različnih trsah iste sorte v istem vinogradu, različnih sortah v istem vinogradu in isti sorti v različnih vinogradih, poleg tega pa smo želeli zajeti kar največjo naravno raznolikost GFLV in časovni potek pojavljanja različnih genotipskih variant GFLV.

Za raziskave raznolikosti GFLV smo izbrali 115 trsov 19 starih slovenskih sort, 82 trsov sorte Refoški in 30 trsov drugih sort v kolekcijskem vinogradu v Ložah, selekcijskem vinogradu v

Komnu, kolekcijskem vinogradu v Malinkovcih, vinogradu v Dutovljah, v ampelografskem vrtu v Kromberku in petih vinogradih v Vrhpolju.

Biotično raznovrstnost GFLV smo raziskovali na nivoju nukleinskih kislin in na biotičnem nivoju. Za oceno raznovrstnosti na nivoju nukleinskih kislin smo uporabili metodo lovljenja virusa na protitelesa, obratno transkripcijo, verižno reakcijo s polimerazo in metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov, ocena na biotičnem nivoju pa je temeljila na osnovi bolezenskih znamenj.

### 3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Biotično raznovrstnost GFLV na nivoju nukleinskih kislin smo raziskovali na treh genih, genih 2A, 2B in 2C, katerih zapisi se nahajajo na RNA2. Po verižni reakciji s polimerazo in rezanju dobljenih fragmentov z restrikcijskimi encimi smo dobili veliko število restrikcijskih vzorcev, iz česar lahko sklepamo na veliko število genotipskih variant GFLV v naravnih populacijah. Število različnih restrikcijskih vzorcev se je med posameznimi geni precej razlikovalo, kar kaže na različno variabilnost posameznih genov. Število različnih restrikcijskih vzorcev je bilo največje pri genu 2C in najmanjše pri genu 2B. Variabilnost posameznega gena je verjetno odvisna od njegove vloge, kar je povezano z še dopustno mero sprememb pri čemer se ohrani funkcionalnost.

Pri nekaterih vzorcih se je pojavil kompleksen vzorec rezanja, njegov vzrok je bila okužba posameznega trsa z več kot eno genotipsko varianto GFLV. Okužba posameznega trsa z več genotipskimi variantami GFLV omogoča rekombinacije med genotipskimi variantami virusa v naravi. V nadaljevanju raziskav biotične raznovrstnosti GFLV na nivoju nukleinskih kislin načrtujemo določanje nukleotidnega zaporedja, na podlagi česar bomo najbrž lahko sklepali na pogostost mutacij in rekombinacij v naravni populaciji GFLV.

Pri sklepanju na pogostost mutacij in rekombinacij med različki virusa v naravi je zelo pomembno, da poznamo način okužbe posameznih trsov. Zato smo v sodelovanju s Kmetijskim inštitutom Slovenije opravili analize na zastopanost ogorčice *Xiphinema index* v 5 izbranih vinogradih. Omenjeno ogorčico smo našli v dveh analiziranih vinogradih.

Za oceno biotične raznovrstnosti GFLV na biotičem nivoju smo popisali bolezenska znamenja na vseh izbranih trsih. Oceno biotične raznovrstnosti GFLV na biotičnem nivoju in natančno opredelitev, katera genotipska varianta povzroča določena bolezenska znamenja, otežuje dejstvo, da je veliko število trsov poleg z GFLV okuženih še z drugimi virusi. Vse trse, ki smo jih vključili v poskus, smo z ELISA testom analizirali na 10 virusov: GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV1, GLRaV2, GLRaV3, GLRaV6, GVA, GVB in GRSPaV. Za zagotovitev čim večje zanesljivosti rezultatov načrtujemo še eno ponovitev analiz z ELISA testom na vseh 10 virusov.

### 4. SKLEPI

V skladu z evropsko zakonodajo je pred dajanjem gensko spremenjenih rastlin na trg potrebno pridobiti ustrezno dovoljenje. Pogoj za pridobitev dovoljenja je med drugim izvedba številnih raziskav in izdelava ustreznih dokumentov, med katerimi je eden glavnih ocena tveganja. Eno glavnih vprašanj pri oceni tveganja gensko spremenjenih rastlin odpornih na viruse z vstavljenim virusnim genom je vprašanje rekombinacije med transkriptom virusnega gena vstavljenega v rastlino in RNA naravnih populacij virusov.

Evropski projekt TRANSVIR se ukvarja z znanstvenimi vprašanji v zvezi z varstvom okolja v primeru uporabe gensko spremenjenih rastlin vinske trte, odpornih na različne viruse vinske trte, in gensko spremenjenih sliv, odpornih na virus šarke. Ukvarja se z oceno tveganja v okolju, s poljskimi poskusi ter primerjavo ocene rekombinacij med gensko spremenjenimi in konvencionalnimi rastlinami. Projekt TRANSVIR je namenjen za znanstveno podporo oblasti Evropske skupnosti pri sprejemanju regulatornih odločitev za uporabo na viruse odpornih gensko spremenjenih rastlin v kmetijstvu.

Nacionalni inštitut za biologijo in Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani sta vključena v projekt TRANSVIR z raziskavami biotične raznovrstnosti GFLV v Sloveniji na podlagi analize raznolikosti gena za plaščni protein (2C gen).

Raziskave smo razširili še na analize raznolikosti 2A gena in 2B gena v okviru temeljnega raziskovalnega projekta, ki ga izvajata Nacionalni inštitut za biologijo in Politehnika Nova Gorica. Podatki o raznolikosti genoma GFLV so osnova za sklepanje na pogostost mutacij in rekombinacij med različki virusa v naravi ter osnova za oceno nevarnosti pri uporabi gensko spremenjenih rastlin zaradi interakcije med naravnimi populacijami GFLV in vnesenim genom za plaščni protein.

## 5. ZAHVALA

Raziskave so potekale v okviru evropskega projekta 5. okvirnega programa Ocena okoljskega vpliva transgene vinske trte in sliv na raznolikost in dinamiko populacij virusov – TRANSVIR in v okviru temeljnega raziskovalnega projekta Biotična različnost dveh virusov vinske trte in njihov pomen za rastline. Za sodelovanje pri raziskavah se zahvaljujemo sodelavcem iz Kmetijskega inštituta Slovenije, Kmetijske zadruga v Komnu, Trsnice v Vrhpolju in lastnikom vinogradov.

## 6. LITERATURA

- Andret-Link P., Schmitt-Keichinger C., Demangeat G., Komar V., Fuchs M. 2004. The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*, 320: 12-22.
- Blažina I. 1992. Vzgoja zdravih trsov vinske trte sorte zelen (*Vitis vinifera* L. cv. Zelen) z metodo termoterapije in tkivne kulture. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 23-26.
- Cohn E., Tanne E., Nitzani F.E. 1970. *Xiphinema italiae*, a new vector of grapevine fanleaf virus. *Phytopathology* 60: 181-182.
- Grapevine fanleaf virus. 1970. Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists Description of Plant Viruses, 28: 6 str.
- Huss B., Walter B., Fuchs M. 1989. Cross-protection between arabis mosaic virus and grapevine fanleaf virus isolates in *Chenopodium quinoa*. *Ann. appl. Biol.*, 114: 45-60.
- Krastanova S., Perrin M., Barbier P., Demangeat G., Cornuet P., Bardonnat N., Otten L., Pinck L., Walter B. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports*, 13: 357-360.
- Mauro M.C., Toutain S., Walter B., Pinck L., Otten L., Coutos-Thevenot P., Deloire A., Barbier P. 1995. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science*, 112: 97-106.
- Pearson R.C., Goheen A.C. (ur.). 1998. Compendium of Grape Disease. St. Paul, APS Press: 48-49
- Serghini M.A., Fuchs M., Pinck M., Reinbolt J., Walter B., Pinck L. 1990. RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General virology*, 71: 1433-1441.
- Van Regenmortel M.H.W., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstems E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., Mc Geoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B. (ur.). 2000. *Virus taxonomy*. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Academic Press: 697-701
- Vigne E., Komar V., Fuchs M. 2003. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research*, 13: 165-179.
- Xue B., Ling K.S., Reid C.L., Sekiya M., Momol E.A., Süle S. 1999. Transformation of five grape rootstocks with plant virus genes and a *virE2* gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *In vitro Cell Biology – Plant*, 35: 226-231.