

POMEN ZANESLJIVEGA ODKRIVANJA VIRUSA RJAVE GRBANČAVOSTI PLODOV PARADIŽNIKA V SEMENIH PARADIŽNIKA IN PAPRIKE

Tjaša JAKOMIN¹, Jakob BRODARIČ², Ana VUČUROVIČ³, Nejc JAKOŠ⁴, Zala
KOGJEJ⁵, Nataša MEHLE⁶

¹⁻⁶Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Ljubljana

⁴Niba Labs, Ljubljana

⁵Mednarodna podiplomska šola Jožefa štefana, Ljubljana

⁶Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Dvorec Lanthieri,
Vipava

IZVLEČEK

Virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (ang. tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV) je nov rastlinski virus, ki povzroča bolezen na paradižniku in papriki. Na okuženih rastlinah se navadno pojavi kloroza, mozaik in pegavost listov. Plodovi lahko neenakomerno zorijo, so deformirani, drobnejši, na njih se pogosto pojavijo rjave ali rumene pege ter grbančavost. Na cvetovih, pecljih in stebelu se lahko pojavijo nekroze. Znamenja okužb so odvisna od sorte paradižnika/paprike ali rastnih razmer. Virus lahko v nasad vnesemo z okuženimi sadikami ali s semeni, znotraj nasada pa se lahko zelo hitro razširi z orodjem ali na drug mehanski način. Ker lahko že eno okuženo seme ali ena okužena sadika povzroči veliko škode v nasadu, so na ravni EU predpisane posebne zahteve za uvoz in trženje semen in sadik paradižnika ter paprike, diagnostične metode za preverjanje morebitne okuženosti semen pa morajo biti visoko občutljive in zanesljive. Z namenom zagotavljanja zanesljive diagnostike, smo sodelovali v testu preizkušanja ustreznosti metod za detekcijo ToBRFV v semenih, ter v testu preverjanja usposobljenosti laboratorijev. Poleti 2020 in spomladi 2021 smo virus ToBRFV odkrili v štirih vzorcih semen paradižnika in petih vzorcih semen paprike, ki so prispele iz Kitajske v Luko Koper kot vstopno točko v EU. Na podlagi rezultatov laboratorijskih analiz sta Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin ter fitosanitarna inšpekcija nemudoma odredili uničenje okuženih semen in s tem je bila preprečena škoda, ki bi lahko nastala v EU, če virusa v semenih ne bi odkrili.

Ključne besede: semena paprike, semena paradižnika, ToBRFV, virus, zanesljiva diagnostika

¹ str. sod., Večna pot 111, SI- 1000 Ljubljana, e-pošta: tjasa.jakomin@nib.si

² str. sod., prav tam

³ dr., prav tam

⁴ str. sod., prav tam, Litostrojska 52, SI-1000 Ljubljana

⁵ mlada raziskovalka, prav tam, Jamova cesta 39, SI-1000 Ljubljana

⁶ doc. dr., prav tam, Glavni trg 8, SI-5271 Vipava

ABSTRACT

THE IMPORTANCE OF RELIABLE DETECTION OF TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS IN TOMATO AND PEPPER SEEDS

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) is a new plant virus that infects tomato and pepper plants. Infected plants exhibit chlorosis, mosaic patterns, and mottling on the leaves. Fruits may be deformed and smaller, show uneven ripening, and have yellow or brown spots or rugose patches. Necrosis may be observed on flowers, petioles, and stems. Symptoms of infection may vary with cultivar and growing conditions. The virus may be introduced into the greenhouse with infected seedlings or seeds and spread in the greenhouse by infested equipment or other mechanical means. As a single infected seed or seedling can cause great damage in the greenhouse, special rules apply in the EU for the import and marketing of seeds and seedlings of tomato and pepper plants. We need diagnostic methods with high sensitivity and reliability for the detection of possibly infected seeds. In order to ensure reliable diagnostic methods, we participated in a test performance study and in a proficiency test. In summer 2020 and spring 2021, we detected ToBRFV in four tomato seed and five pepper seed samples that arrived from China in Luka Koper, the point of entry to the EU. Based on the laboratory tests, the Administration of the republic of Slovenia for food safety, veterinary sector and plant protection and phytosanitary inspection ordered the destruction of the infected seeds. In this way, we prevented damage that could occur in the EU if the virus were not detected.

Key words: pepper seeds, reliable diagnostic, ToBRFV, tomato seeds, virus

1 UVOD

Virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (ang. tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV) je nov škodljiv rastlinski virus iz rodu *Tobamovirus*. Najpomembnejši gostiteljski rastlini virusa sta paprika in paradižnik. Skrb vzbujajoč je ta virus predvsem zato, ker okužba z njim lahko prizadene tudi sorte paradižnika in paprike z genom za odpornost na tobamoviruse.

ToBRFV povzroča neenakomerno zorenje plodov, deformirane in drobnejše plodove, na katerih se lahko pojavijo rumene ali rjave pege in grbančavost, po kateri je virus dobil ime. Na okuženih rastlinah se lahko pojavi kloroza, mozaik in pegavost listov, na cvetovih, pecljih in steblih pa nekroze. Znamenja okužb se razlikujejo glede na sorto rastline ter rastne razmere (UVHVVR, 2022). Okuženi plodovi niso nevarni za človeka, če jih zaužije, vendar so zaradi bolezenskih znakov plodovi manj primerni za prodajo, kar lahko predstavlja za pridelovalce veliko škodo. Izguba pridelka zaradi okužbe s tem virusom je lahko tudi do 100 %. ToBRFV lahko okuži tudi različne plevelne vrste (npr. pasje zelišče, pozidna metlika), ki pogosto ne kažejo nobenih znakov okužbe in posledično predstavljajo nevarnost, kot rezervoar virusa - vir za nove okužbe.

ToBRFV virus so prvič odkrili leta 2014 v Izraelu, pri pridelavi paradižnika, pozneje pa je bil virus potrjen tudi v Jordaniji (Luria in sod., 2017; Salem in sod., 2016), na Kitajskem, v ZDA, Mehiki, Turčiji in Veliki Britaniji (EPPO, 2022). V Evropski uniji je bil prvič potrjen v Nemčiji konec leta 2018 (Menzel in sod. 2019), od takrat dalje pa

so o izbruhih ali prestrežbah tega virusa poročale tudi številne druge države članice EU (EPPO, 2022). Na nove lokacije se lahko virus vnese z okuženim semenom ali sadikami. Že eno samo okuženo seme, iz katerega zraste okužena rastlina, pa je dovolj, da se virus razširi po celem nasadu. Virus se namreč zlahka prenaša mehansko s sokom okuženih rastlin; na primer z okuženim orodjem, obleko, embalažo, ali z oprashaľci, kot so čmrlji in čebele. Različne študije poročajo, da je virus ToBRFV sposoben dolgotrajnega preživetja na različnih površinah, v ostankih okuženih rastlin, tudi na kompostu in v različnih okoljskih razmerah, zaradi česar ga je z uporabo  e razvitih dezinfekcijskih tehnik izredno težko odstraniti iz pridelovalne verige oziroma sistema. Zaradi tega je pomembno, da preprečimo njegov vnos v nasad, kar pa lahko zagotovimo z uporabo zdravega sadilnega materiala.

Zaradi nevarnosti vnosa in širjenja ToBRFV so na ravni EU predpisane posebne zahteve za uvoz in trženje semena in sadik paradižnika ter paprike. Seme mora pred uvozom v EU oziroma pred trženjem znotraj EU izhajati iz območij, kjer je virus odsoten ali pa je seme testirano. Sadike morajo biti vzgojene iz semena, ki izpolnjuje prej navedene pogoje in morajo biti pred trženjem pregledane. Vse države članice EU morajo na svojem ozemlju izvajati program preiskave za ugotavljanje morebitne navzočnosti virusa (Izvedbena Uredba Komisije (EU) 2021/1809).

Za ugotavljanje morebitne prisotnosti virusa v sadilnem materialu na Nacionalnem inštitutu za biologijo uporabljamo visoko občutljive diagnostične teste, katerih zanesljivost smo preverili z udeležbo v različnih medlaboratorijskih primerjalnih poskusih; aktivno pa sodelujemo tudi pri oblikovanju mednarodnega diagnostičnega standarda za ugotavljanje prisotnosti tega virusa (EPPO, 2021a). V prispevku je predstavljen postopek, s katerim preverjamo morebitno prisotnost ToBRFV v vzorcih semen in rezultati analize vzorcev semen iz obdobja zadnjih dveh let.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Izolacija RNA

Vzorec je praviloma sestavljen iz 3000 semen. Pred analizo vzorec razdelimo na tri podvzorce s po 1000 semen in jih analiziramo ločeno. Semena homogeniziramo v vrečkah z mrežico (Bioreba) najprej brez pufr, nato pa še s pufrom (GH+ pufer; EPPO, 2021a). 1 ml ekstrakta prenesemo v epico in mu dodamo 30 l 5M ditiotreitola (DTT). Sledi inkubacija na stresalniku 15 min na 65  C, nato centrifugiramo 10 min pri 16.000g na 4  C. Celokupno RNA izoliramo iz 750  l ekstrakta s kitom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca z izjemo, da vse stopnje centrifugiranja izvajamo na 4  C. Izolirano RNA do analize hranimo na -20  C.

2.2 RT-PCR v realnem času

Uspešnost ekstrakcij RNA preverjamo z RT-PCR v realnem času s setom začetnih oligonukleotidov in sonde, ki pomnožujejo rastlinski gen za citokrom oksidazo (COX) ali NAD5. Z enokora nim RT-PCR v realnem času izvajamo tudi presejalno analizo na ToBRFV. V skladu z EPPO standardom (EPPO, 2021a) vsak vzorec analiziramo s tremi za ToBRFV specifičnimi seti začetnih oligonukleotidov in sonde: s setom CaTa28 in

CSP1325 po ISHI-Veg (ISHI-Veg, 2020) protokolu ter s setom po protokolu Menzel in Winter (Menzel in Winter, 2021).

Pozitivne rezultate lahko dodatno potrjujemo tudi z visokozmogljivim sekvenciranjem in s sekvenciranjem produktov klasične PCR reakcije.

2.3 Zagotavljanje kakovosti diagnostičnih storitev

Diagnostične metode za preverjanje morebitne okuženosti semen morajo biti visoko občutljive in zanesljive. Z namenom zagotavljanja zanesljive diagnostike smo celoten postopek ugotavljanja prisotnosti ToBRFV v vzorcih semen paradižnika in paprike validirali v skladu z EPPO standardom P7/98 (EPPO, 2021b). V letu 2021 smo sodelovali v testu preizkušanja ustreznosti metod za detekcijo ToBRFV v semenih, ki je bil organiziran v okvirju Euphresco projekta 2019-A-327 in na podlagi teh rezultatov aktivno sodelujemo pri oblikovanju mednarodnega (EPPO) diagnostičnega standarda. Visoko usposobljenost za določanje ToBRFV pa smo dokazali tudi v testu preverjanja usposobljenosti laboratorijev za določanje ToBRFV v vzorcih semen paradižnika, ki ga je organiziral GEVES (Francija), saj so bili naši rezultati 100 % pravilni.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V letu 2020 smo v analizo prejeli 17 vzorcev semena paradižnika in 7 vzorcev semena paprike, v letu 2021 pa 38 vzorcev semena paradižnika in 25 vzorcev semena paprike (preglednica 1). Od skupno, v letih 2020 in 2021, analiziranih 87 vzorcev semena, jih je bilo kar 47 (54 %) vzorčenih iz pošiljk, prispelih iz Kitajske v Luko Koper kot vstopno točko v EU.

Leta 2020 smo prisotnost virusa ToBRFV odkrili v enem vzorcu semena paradižnika, leta 2021 pa kar v treh vzorcih semena paradižnika in v petih vzorcih semena paprike. Vsi vzorci, v katerih smo potrdili prisotnost ToBRFV, so vzorci semena iz uvoza, iz pošiljk, prispelih iz Kitajske v Luko Koper kot vstopno točko v EU. Od skupno 47 vzorčenih pošiljk semena, prispelih iz Kitajske v Luko Koper, smo prisotnost ToBRFV tako potrdili v več kot 19 %.

Preglednica 1: Rezultati testiranja semen paprike in paradižnika na ToBRFV v letih 2020 in 2021.

Leto testiranja	2020		2021	
	Paradižnik	Paprika	Paradižnik	Paprika
Število testiranih vzorcev semen	17	7	38	25
Število pozitivnih vzorcev semen	1	0	3	5
Delež pozitivnih vzorcev semen	5,9%	0%	7,9%	20%

Na podlagi rezultatov laboratorijskih analiz sta Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin ter fitosanitarna inšpekcija nemudoma odredili uničenje s ToBRFV okuženega semena in s tem je bila preprečena škoda, ki bi nastala v EU, če virusa ne bi odkrili. S hitro in natančno diagnostiko je bila preprečena večja gospodarska škoda.

4 SKLEPI

Virus rjave grbančavosti plodov paradižnika v nekaterih državah, tudi v nekaterih državah EU, povzroča resne težave, saj so zabeležili že številne izbruhe v različnih nasadih, njegovo izkoreninjanje pa je zelo zahtevno. Od leta 2018 iz različnih držav EU poročajo tudi o številnih prestrežbah virusa na uvoznih pošiljkah semena in sadik paradižnika in paprike. Porast vzorcev, ki so pozitivni na ToBRFV in prihajajo iz uvoza, opažamo tudi v našem laboratoriju.

Vsi, ki smo odgovorni za varstvo rastlin, moramo storiti vse, da zagotovimo, da bodo slovenski pridelovalci in tudi pridelovalci iz drugih držav EU kupovali zdravo seme in sadike. Hkrati je nujno, da se v nasadih izvajajo tudi preventivni ukrepi, kot na primer razkuževanje orodja in opreme ter obutve pred vstopom v rastlinjak, uporaba delovnih oblačil in rokavic za enkratno uporabo, odstranjevanje plevelov iz okolice, itd. Za uspešno preprečevanje širjenja bolezni je zelo pomembno tudi zgodnje odkritje bolezni, zato je ob najmanjšem sumu na okužbo potrebno odvzeti vzorec za analizo na prisotnost tega virusa.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Upravi Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, ter vsem vzorčevalcem in fitosanitarni inšpekciji.

6 LITERATURA

- EPPO (2021a) PM 7/146 (1) Tomato brown rugose fruit virus. EPPO Bulletin, 51, 178-197
- EPPO (2021b) PM 7/98(5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. EPPO Bulletin, 51, 468-498
- EPPO (2022) EPPO Global database, Tomato brown fruit rugose virus (ToBRFV), Reporting service articles. <https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/reporting> (22.03.2022)
- ISHI-Veg. 2020. Detection of infectious Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Tomato and Pepper seed. Version 1.4. International Seed Federation (ISF), 11 str.
- IZVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2021/1809 z dne 13. oktobra 2021 o spremembi Izvedbene uredbe (EU) 2020/1191 o ukrepih za preprečevanje vnosa virusa rjave grbančavosti plodov paradižnika (virusa ToBRFV) v Unijo in njegovega širjenja znotraj Unije, https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2021/1809/oj?locale=sl (22.03.2022)
- Luria, N.; Smith, E.; Reingold, V.; Bekelman, I.; Lapidot, M.; Levin, I.; Elad, N.; Tam, Y.; Sela, N.; Abu-Ras, A.; et al. 2017. A new Israeli *Tobamovirus* isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. PLoS ONE, 12
- Menzel, W. in Winter, S. 2021. Identification of novel and known tobamoviruses in tomato and other solanaceous crops using a new pair of generic primers and development of a specific RT-qPCR for ToBRFV. Acta Hortic., 1316, 143–148
- Menzel W.; Knierim D.; Winter S.; Hamacher J.; Heupel M. 2019. First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. New Disease reports, 36, 1
- Salem, N.; Mansour, A.; Ciuffo, M.; Falk, B.W.; Turina, M. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. Arch. Virol. 161, 503–506
- Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR). 2022. <https://www.gov.si/teme/virus-rjave-grbancavosti-plodov-paradiznika/> (22.03.2022)