

## POMEN IZVAJANJA MONITORINGA NA PRISOTNOST BEGOMOVIRUSOV IN RAZVOJ LABORATORIJSKE DIAGNOSTIKE

Jakob BROADARIČ<sup>1</sup>, Zala KOGEJ<sup>2</sup>, Ana VUČUROVIĆ<sup>3</sup>, Anja PECMAN<sup>4</sup>, Tjaša  
JAKOMIN<sup>5</sup>, Denis KUTNJAK<sup>6</sup>, Nataša MEHLE<sup>7</sup>

<sup>1-7</sup> Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,  
Ljubljana

<sup>2,4</sup> Mednarodna podiplomska šola Jožefa Štefana, Ljubljana

<sup>7</sup> Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Dvorec Lanthieri,  
Vipava

### IZVLEČEK

Rod begomovirusov (družina Geminiviridae) zajema veliko skupino virusov, v kateri je opisanih več kot 400 vrst, ki lahko okužijo številne vrste rastlin. Med njimi jih več kot 200 lahko okuži bučevke in/ali paradižnik. Vsi begomovirusi, razen nekaj izjem, so uvrščeni na seznam karantenskih virusov. Najpogostejša znamenja okužb na rastlinah so zvijanje listov, porumenelost žil in rumeni mozaik na listih. Okužbe v zgodnji rastni dobi lahko povzročijo zastoj v rasti, razvoj manjšega števila cvetov, prekinjen razvoj plodov ter vsesplošno slabo stanje rastlin, kar lahko na gojenih rastlinah povzroči veliko gospodarsko škodo. Okužbe se pojavljajo sporadično, predvsem v tropskih in subtropskih regijah, zaradi spremenjenih klimatskih razmer pa obstaja tveganje za njihovo širitev tudi na druga območja. Begomoviruse lahko v nasad vnesemo z okuženimi sadikami, znotraj nasada pa jih učinkovito raznaša tobakova ščitkar (*Bemisia tabaci*), ki je pri nas zastopan. Laboratorijske metode odkrivanja begomovirusov vključujejo različne PCR teste, sekvenciranje PCR produktov po Sangerju in visokozmogljivo sekvenciranje (HTS). PCR testi za odkrivanje begomovirusov so bili izbrani in preverjeni v medlaboratorijski primerjavi v okviru Euphresco projekta, dodatna preverjanja teh metod in metod primernih za identifikacijo odkritih begomovirusov pa smo izvedli v okviru aktivnosti, ki jih izvajamo kot EU referenčni laboratorij. Intenzivno smo vključeni tudi v pripravo EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) diagnostičnega protokola za določanje begomovirusov. V letu 2021 smo v okviru programa preiskav škodljivih organizmov rastlin testirali 28 vzorcev bučevk in 28 vzorcev paradižnika iz različnih delov

489

---

<sup>1</sup> str. sod., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: jakob.broadaric@nib.si

<sup>2</sup> mlada raziskovalka, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana; Jamova cesta 39 SI-1000 Ljubljana

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

<sup>4</sup> mlada raziskovalka, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, Jamova cesta 39 SI-1000 Ljubljana

<sup>5</sup> str. sod., prav tam

<sup>6</sup> dr., prav tam

<sup>7</sup> doc. dr., Glavni trg 8, SI-5271 Vipava

Slovenije na prisotnost begomovirusov iz priloge II/A Uredbe 2021/2285/EU. V nobenem vzorcu nismo potrdili okužbe s temi begomovirusi.

**Ključne besede:** begomovirusi, diagnostika, molekularne metode, monitoring

## ABSTRACT

### THE IMPORTANCE OF MONITORING BEGOMOVIRUSES AND THE DEVELOPMENT OF THEIR DIAGNOSTICS

The genus *Begomovirus* (family Geminiviridae) comprises a large group of viruses with over 400 described species that can infect numerous plant species. Of these, more than 200 species can infect cucurbits and/or tomato plants. All begomoviruses, with some exceptions, are quarantine pests. Symptoms of begomovirus infections in plants usually include leaf curl, yellowing of leaf veins or yellow mosaic. Early infections result in reduced growth, reduced flowering, abortion of fruit development, and generally poor plant condition, which can cause major economic damage. Outbreaks occur sporadically, mainly in tropical and subtropical regions. Due to climate change, there is a risk of their spread to other parts of the World. Begomoviruses can be introduced into the plantation with infected seedlings. Within the plantation, they are successfully transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*, which also occurs in our region. Laboratory methods for the detection of begomoviruses include various PCR tests, Sanger sequencing of amplicons from PCR tests, and high-throughput sequencing (HTS). The PCR tests recommended for the detection of begomoviruses were selected and evaluated in a test performance study as part of the Euphresco project. A further review of these methods and other tests suitable for the identification of begomoviruses, has been carried out as part of our EU reference laboratory activities. We are actively involved in the preparation of the EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) diagnostic protocol for the detection and identification of begomoviruses. In 2021, as part of the national survey, we tested 28 samples of cucurbits and 28 samples of tomato plants from different regions of Slovenia to determine whether they were infected with any of the begomoviruses, listed in Annex II/A Regulation 2021/2285/EU. Infection was not confirmed in any of the samples.

**Key words:** begomoviruses, diagnostics, molecular methods, monitoring

## 1 UVOD

Rod begomovirusov (družina Geminiviridae) zajema veliko skupino rastlinskih virusov, v kateri je opisanih več kot 400 vrst, od tega jih več kot 200 lahko okuži rastline paradižnika in/ ali bučevke. Begomovirusi lahko okužijo tudi druge gospodarsko pomembne rastlinske vrtse, kot so stročnice, tobak, bombaž itd.

Vsi begomovirusi, z izjemo virusa mozaika oslezovca (abutilon mosaic virus; AbMV), virusa gubavosti listov papaj (papaya leaf crumple virus; PaLCrV), virusa kodravosti listov sladkega krompirja (sweet potato leaf curl virus; SPLCV), Newdelhijskega virusa kodravosti listov paradižnika (tomato leaf curl New Delhi virus; ToLCNDV), virusa rumenjenja in kodravosti listov paradižnika (tomato yellow leaf curl virus; TYLCV),

sardinijskega virusa rumenenja in kodravosti listov paradižnika (tomato yellow leaf curl Sardinia virus; TYLCSV), malaškega virusa rumenenja in kodravosti listov paradižnika (tomato yellow leaf curl Malaga virus; TYLCMaV) in axarquijskega virusa rumenenja in kodravosti listov paradižnika (tomato yellow leaf curl Axarquia virus; TYLCAxV), so uvrščeni v prilogo II/A Uredbe 2021/2285/EU. Za begomoviruse, ki so uvrščeni v prilogo II/A Uredbe 2021/2285/EU, ni znano da bi se pojavljali na ozemlju EU, sporadično se pojavljajo le v tropskih in subtropskih regijah. Spremenjene klimatske razmere povečujejo tveganje za širitev begomovirusov tudi na druga območja.

V Sloveniji do sedaj begomovirusov še nismo zaznali, so pa okužbe z nekaterimi begomovirusi zaznali v naši neposredni bližini, v Italiji. Begomovirus TYLCSV so na primer v Italiji, v nasadih paradižnika, odkrili že pred več kot 20 leti (Accotto in sod., 2000); odkrili pa so ga tudi na rastlinah paprike (Comes in sod., 2009). Kmalu po odkritju okužb s TYLCSV, so poročali tudi o okuženih nasadih paradižnika s TYLCV (Accotto in sod., 2003), ki je uvrščen na seznam nadzorovanih nekarantenskih škodljivih organizmov v zvezi z razmnoževalnim in sadilnim materialom paradižnika, razen semen. Poleg že omenjenih begomovirusov, so v Italiji na bučevkah in jajčevcih dokazali okužbe s ToLCNDV (Luigi in sod., 2016; Parrella in sod., 2018; Parrella in sod., 2020). ToLCNDV je uvrščen v prilogo II/B Uredbe 2021/2285/EU; program preiskav za ugotavljanje morebitne prisotnosti tega virusa pa se v Sloveniji izvaja že od leta 2016.

Begomoviruse lahko v nasad vnesemo z okuženimi sadikami. Podatkov o možnosti vnosa begomovirusov s semenom ni. Glavno pot prenosa begomovirusov na krajše razdalje pa predstavlja tobakov ščitkar (*Bemisia tabaci*), ki je zastopan tudi pri nas in je prenašalec različnih rastlinskih virusov (Brown in sod., 2017). Za begomoviruse, z izjemo ToLCNDV, ni znano da bi se prenašali mehansko s sokom okuženih rastlin.

Bolezenska znamenja na rastlinah so odvisna od sorte, rastnih razmer, starosti rastlin v času okužbe itd. Najpogostejša znamenja okužbe s temi virusi so zvijanje listov, porumenelost žil ali rumeni mozaik na listih. V primeru okužbe v zgodnji rastni dobi, lahko opazimo zastoj v rasti, razvoj manjšega števila cvetov, prekinitvev razvoja plodov in vsesplošno slabo stanje rastlin. Posledica okužbe v tej razvojni fazi lahko rezultira v izgubi celotnega pridelka (EFSA, 2013).

Pri omejevanju širjenja begomovirusov so potrebni preventivni ukrepi, kot na primer uporaba preverjeno zdravega sadilnega materiala, odstranjevanje prosto rastočih in plevelnih rastlin iz okolice nasadov, ki lahko predstavljajo rezervoar virusov in omejevanje prenašalca tobakovega ščitkarja. Prav tako je ključno zgodnje odkrivanje okužb, ki temelji na hitrih, zanesljivih ter cenovno dostopnih laboratorijskih testih. Zaradi velikosti in kompleksnosti te skupine virusov, poseben izziv za laboratorije predstavlja razvoj in optimizacija diagnostike.

## **2 DIAGNOSTIKA BEGOMOVIRUSOV**

### **2.1 Razvoj diagnostike begomovirusov**

Zaradi velikega števila vrst begomovirusov, vpeljava posameznih tarčnih diagnostičnih testov ni racionalna, zato smo v okviru Euphresco projekta BegomoVal (2016-A-212; vodja projekta: ANSES, Francija) iskali najustreznejše generične teste, s katerimi bi lahko zaznali vse begomoviruse. Ker je visokozmogljivo sekvenciranje za mnoge laboratorije iz EU še vedno nedostopno, smo se v okviru tega projekta osredotočili na iskanje generičnih testov na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR). Izbrane teste smo preverili v medlaboratorijski primerjavi – v testu preizkušanja ustreznosti metod. Dodatna preverjanja teh metod in metod, ustreznih za identifikacijo odkritih begomovirusov, smo izvedli v okviru aktivnosti, ki jih izvajamo kot EU referenčni laboratorij. Na podlagi rezultatov obeh študij, smo pripravili osnutek EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) diagnostičnega protokola za določanje begomovirusov, ki bo predvidoma objavljen že v letu 2022.

## **2.2. Postopek diagnostike begomovirusov na Nacionalnem inštitutu za biologijo**

Iz vzorčenega rastlinskega materiala ekstrahiramo celokupno DNA po postopku Mehle in sod. (2013). Tarčne odseke ekstrahirane DNA nato pomnožimo s PCR, pri čemer uporabimo vsaj dva seta začetnih oligonukleotidov: sete začetnih oligonukleotidov, ki so jih načrtovali Li in sod. (2004) in Wyatt in Brown (1996) in/ali Saison in Gentit (2015). Morebitno prisotnost produktov reakcije PCR preverimo z agarozno gelsko elektroforezo in v primeru pozitivnega rezultata vsaj enega od PCR, določimo nukleotidno zaporedje produktov PCR. Prisotnost begomovirusov lahko preverimo tudi z visokozmogljivim sekvenciranjem (HTS). Shema postopka je prikazana na sliki 1. Z namenom zagotavljanja zanesljive diagnostike smo celoten postopek ugotavljanja prisotnosti begomovirusov s PCR v vzorcih paradižnika in bučevk validirali v skladu z EPPO standardom P7/98 (EPPO, 2021), v teku pa so tudi validacije določanja s HTS.

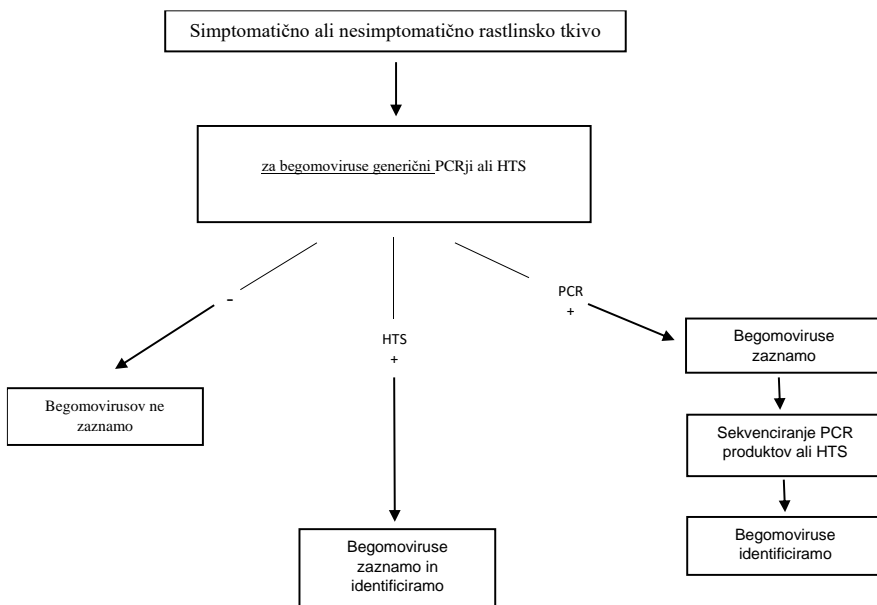
## **2.3 Zagotavljanje kakovosti diagnostičnih storitev na nivoju EU**

Kot EU referenčni laboratorij smo dolžni poskrbeti, da se za ugotavljanje prisotnosti begomovirusov, tudi v drugih laboratorijih v EU uporabljajo ustrezni diagnostični postopki. V ta namen smo v letu 2021 oblikovali smernice glede postopkov zanesljivega določanja begomovirusov v nacionalnih referenčnih laboratorijih iz EU. Usposobljenost nacionalnih referenčnih laboratorijev iz EU za detekcijo in identifikacijo begomovirusov smo nato preverili z medlaboratorijsko primerjavo, ki smo jo organizirali jeseni 2021 in v kateri so sodelovali laboratoriji iz 26 držav. Marca 2022 pa smo za nacionalne referenčne laboratorije iz EU organizirali spletno delavnico z namenom, da izvajalce testiranj v EU dodatno izobrazimo in na ta način zagotovimo, da se bo v vseh državah EU preverjala prisotnost teh, za rastline nevarnih virusov na ustrezen in predvsem zanesljiv način.

## **3 REZULTATI PROGRAMA PREISKAVE**

V Sloveniji se je program preiskave za begomoviruse iz priloge II/A Uredbe 2021/2285/EU prvič izvajal leta 2021. Skupno smo na prisotnost begomovirusov analizirali 28 vzorcev bučevk in 28 vzorcev paradižnika iz različnih delov Slovenije. Za analizo na begomoviruse smo izbrali vzorce z bolezenskimi znamenji, ki bi bili

lahko posledica okužbe z begomovirusi. Izbirali smo med vzorci, ki smo jih prejeli v okviru programa preiskave za virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV) in v okviru programa preiskave za ToLCNDV. V nobenem izmed analiziranih vzorcev nismo potrdili prisotnosti begomovirusov.



Slika 1: Shema diagnostike begomovirusov

#### 4 SKLEPI

Begomovirusi, ki so uvrščeni v prilogo II/A Uredbe 2021/2285/EU, trenutno ogrožajo pridelavo paradižnika, bučevk in nekaterih drugih gospodarsko pomembnih rastlin predvsem v tropskih in subtropskih regijah. Ker se zaradi globalnega segrevanja in razširjenosti njihovega glavnega prenašalca povečujejo tveganje za širitev teh nevarnih virusov tudi na druga območja, smo odgovorni, da storimo vse, da preprečimo njihov vnos v EU. Ker se zavedamo, da je za uspešno preprečevanje širjenja boleznih pomembno tudi zgodnje odkritje boleznih, za kar potrebujemo zanesljive diagnostične teste, smo v zadnjih letih naše napore usmerili v razvoj in optimizacijo diagnostike begomovirusov ter v diseminacijo teh rezultatov med druge laboratorije v EU.

#### 5 ZAHVALA

Razvoj in optimizacija diagnostike begomovirusov je bila izvedena v okviru aktivnosti, ki jih izvajamo kot EU referenčni laboratorij in so sofinancirane s strani EU komisije ter v okviru projekta Eupresco BegomoVal (2016-A-212), ki je bil financiran iz strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin, katerih naročnik in plačnik je Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Posebna zahvala gre Upravi za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin ter vsem vzorčevalcem v okviru

programa preiskav za ugotavljanje prisotnosti virusa rjave grbančavosti plodov paradižnika in Newdelhijskega virusa kodravosti listov paradižnika, saj smo vzorce za analizo na begomoviruse iz priloge II/A Uredbe 2021/2285/EU izbirali iz vzorcev nabranih v okviru omenjenih preiskav.

## 6 LITERATURA

- Accotto, G.P., Bragaloni, M., Luison, D., Davino, S., Davino, M. 2003. First report of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Italy. *Plant Pathology*, 52, 6: 799 str.
- Accotto, G.P., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E., Louro, D. 2000. Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 2: 179-186.
- Brown, J.K., Ur-Rehman, M. Z., Avelar, S., Chingandu, N., Hameed, U., Haider, S., Ilyas, M. 2017. Molecular diagnostic development for begomovirus-betasatellite complexes undergoing diversification: A case study. *Virus research*, 241: 29–41.
- Comes, S., Fanigliulo, A., Pacella, R., Crescenzi, A. 2009. Pepper leaf curl disease caused by Tomato yellow leaf curl Sardinia virus on pepper in Southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91, 4 Suppl.: S4.55.
- EFSA. 2013. Scientific Opinion on the risk to plant health posed by *Bemisia tabaci* species complex and viruses it transmits for the EU territory. *EFSA Journal*, 11, 4: 3162
- EPPO. 2021. PM 7/98(5). Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*, 51: 468-498.
- 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
- Luigi, M., Mangli, A., Valdes, M., Sitzia, M., Davino, S., Tomassoli, L. 2016. Occurrence of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting zucchini in Sardinia (Italy). *Journal of Plant Pathology*, 98, 3: 695 str.
- Mehle, N., Nikolić, P., Rugar, M., Boben, J., Ravnikar, M., Dermastia, M. 2013. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. In: *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 938: 139–145.
- Parrella, G., Troiano, E., Formisano, G., Accotto, G.P., Giorgini, M. 2018. First report of Tomato leaf curl New Delhi virus associated with severe mosaic of pumpkin in Italy. *Plant Disease*, 102, 2: 459 str.
- Parrella, G., Troiano, E., Lee, S., Kil, E.J. 2020. Tomato Leaf Curl New Delhi Virus found associated with eggplant yellowing disease in Italy. *Plant Disease*, 104, 7: 2034 str.