

NOWY PATOTYP SZCZEPU CH2 WIRUSA MOZAIKI PEPINO (*PEPINO MOSAIC VIRUS*)

HENRYK POSPIESZNY, BEATA HASIÓW-JAROSZEWSKA, NATASZA BORODYNKO

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
H.Pospieszny@iorpib.poznan.pl

I. WSTĘP

W ostatnim dziesięcioleciu wirus mozaiki pepino (PepMV) stał się jednym z najgroźniejszych patogenów pomidora szklarniowego, praktycznie na wszystkich obszarach uprawy tej rośliny. Jest on typowym reprezentantem wirusów z rodzaju *Potexvirus*, zarówno jeśli chodzi o organizację genomu, jak i morfologię cząstek wirusa. Dotychczas opisane izolaty PepMV wykazują duże zróżnicowanie genetyczne, co jest podstawą pogrupowania ich do 4 genotypów (szczepów): peruwiańskiego (LP), europejskiego (EU), amerykańskiego 1 (US1) i chilijskiego 2 (CH2). Odrębną pozycję zajmuje izolat US2, początkowo zakwalifikowany jako jeden ze szczepów, a obecnie jako rekombinant pomiędzy izolatami Ch1 i Ch2 (Hasiów-Jaroszevska i wsp. 2010). Przez wiele lat w Europie dominował genotyp EU, jednak obecnie pojawiają się izolaty z innych szczepów, głównie CH2, często w mieszanej infekcji z EU, a także ich rekombinanty (Pagan i wsp. 2006; Hanssen i wsp. 2008). Z kolei w Stanach Zjednoczonych ciągle jeszcze przeważają izolaty należące do genotypu EU (Ling i wsp. 2008). Ze względu na swoją dużą szkodliwość i łatwość rozprzestrzeniania się wirus został umieszczony na liście Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin (EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization) (Spence i wsp. 2006) i tym samym objęty specjalnymi działaniami fitosanitarnymi.

W Polsce, w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego (IOR – PIB) zgromadzono kolekcję izolatów PepMV z pomidora szklarniowego, należących do dwóch genotypów: EU i CH2 (Pospieszny i wsp. 2003; Pospieszny i Borodynko 2006; Pospieszny i wsp. 2008; Hasiów-Jaroszevska i wsp. 2009). Intensywne badania nad PepMV wykazały, że zdecydowanie najliczniej występują izolaty szczepu CH2, a EU sporadycznie. Wśród izolatów należących do obu genotypów można wyróżnić takie, które pomimo 99% podobieństwa sekwencji genomowej, wywołują odmienne objawy na roślinach pomidora, a nawet porażają różny zakres roślin gospodarzy, tworząc tym samym różne patotypy w obrębie genotypu. Do roku 2010 szczep CH2 był reprezentowany przez dwa patotypy: łagodny i nekrotyczny (Pospieszny i wsp. 2008; Hasiów-Jaroszevska i wsp. 2009). W końcu roku 2010 i w roku 2011 w IOR – PIB wyodrębniono nowy, żółtaczkowy patotyp PepMV (PepMV-ZI), którego identyfikację zaprezentowano w niniejszej pracy.

II. MATERIAŁ I METODY

W II połowie roku 2010, w Wielkopolsce, na pomidorze szklarniowym obserwowano występowanie objawów chorobowych w postaci licznych, niekiedy silnie żółtych, większych lub mniejszych plam zarówno na młodych, jak i na starszych liściach. Z młodych liści pomidora z objawami żółtaczki wykonano reizolację wirusa przez mechaniczne pocieranie sokiem liści *Nicotiana benthamiana* i *N. occidentalis* posypanych karborundem. Rośliny te stanowiły źródło wirusa do badań nad zakresem porażanych roślin przez PepMV-ZI. Sok z roślin pomidora i także z *N. benthamiana* po wybarwieciu octanem uracylu przeglądano w mikroskopie elektronowym.

Izolację całkowitego RNA przeprowadzono z zainfekowanych roślin standardową metodą fenol/chloroform. Do reakcji RT-PCR użyto startery z literatury (Pagan i wsp. 2006) amplifikujące gen kodujący białko płaszczka (coat protein-CP) i jedno z białek odpowiedzialne za transport wirusa w roślinie (triple gene block 3-TGB3). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z użyciem odwrotnej transkryptazy Superscript II (Invitrogen) i startera oligodT₂₂. Reakcję PCR prowadzono przez 30 cykli (denaturacja 94°C, 40 sekund, przyłączanie starterów 47°C, 30 sekund, i elongacja 72°C, 1 minuta). Reakcję kończono cyklem 10 minut w 72°C. Uzyskane produkty reakcji oczyszczano z żelu i przeprowadzono ligację do wektora pGEM-Teasy (Promega). Tak uzyskanymi konstrukcjami transformowano komórki bakteryjne szczepu Dh5α. Następnie izolowano plazmidowe DNA i sekwencjonowano. Uzyskane sekwencje porównano z sekwencjami innych izolatów PepMV i skonstruowano drzewa filogenetyczne z wykorzystaniem programu MEGA5.

III. WYNIKI I DISKUSJA

Zakres porażanych roślin przez izolat żółtaczkowy PepMV nieznacznie różni się od tych porażanych przez pozostałe patotypy genotypu CH2. PepMV-ZI nie poraża niektórych gatunków tytoniu, a na innych powoduje infekcje utajone. Rośliną zdecydowanie różnicującą patotypy jest pomidor (tab. 1). PepMV-ZI powodował objawy typu żółtaczkowego na 10 odmianach pomidora. W warunkach eksperymentalnych objawy żółtaczki występowały praktycznie już w 2 tygodnie po inokulacji i w różnym nasileniu, przez cały sezon wegetacyjny. Nasilenie występowania żółtaczki na pomidorze zależało od odmiany i temperatury. W okresie letnim nasilenie objawów żółtaczki było słabsze. PepMV-ZI powodował bardzo silne i charakterystyczne objawy na owocach w postaci nekroz, zniekształceń, przebarwień i pęknięć (rys. 1). Owoce takie nie mają żadnej wartości handlowej. Niektóre izolaty wirusa mozaiki pepino, mogą porażać niektóre odmiany pomidora. PepMV-ZI, z 3 zakażanych mechanicznie odmian ziemniaka na 2 z nich (Elanda i Lord), wywołał objawy żółtaczki, przy czym w większym nasileniu na odmianie Elanda. Powtarzalne i stabilne objawy żółtaczki na pomidorze a także niektórych odmianach ziemniaka należy uznać za charakterystyczne i różnicujące dla patotypu PepMV-ZI. W soku z roślin porażonych PepMV-ZI, w mikroskopie elektronowym, obserwowano cząsteczki wirusowe długości około 500 nm, charakterystyczne dla wirusów z rodzaju Potexvirus.



Rys. 1. Owoce pomidora zainfekowane PepMV-Z1

Fig. 1. Tomato fruits infected with PepMV-Z1

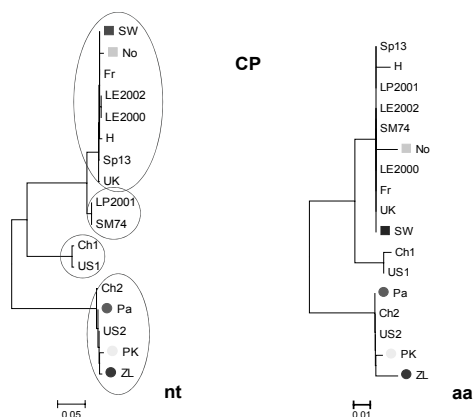
Tabela 1. Zakres porażanych roślin i objawy indukowane przez patotypy CH2 wirusa mozaiki pepino

Table 1. Host range and symptoms caused by the Polish pathotypes of CH2 of *Pepino mosaic virus*

Rośliny Plants	Genotyp CH2 – Genotype CH2		
	PepMV-Z1	PepMV-PK	PepMV-Pa
<i>Nicotiana tabacum</i> Xanthi	–	s	–
<i>N. tabacum</i> Samsun	–	(s)	–
<i>N. tabacum</i> White Burley	(s)	S	–
<i>N. benthamiana</i>	Lch, Sm	Lch, Sm	Lch, Sm
<i>N. glutinosa</i>	(s)	(Lch), Sm	–
<i>N. affinis</i>	(s)	s	s
<i>N. debneyi</i>	(s)	(Lch), Sm	s
<i>Datura innoxia</i>	Lch, Sm	(Lch-n), Sm	Ln, s, (Sns)
<i>Physalis floridana</i>	–	–	–
<i>Solanum lycopersicum</i>	Z1 (Z1)	s, (Sm)	N,(N), s, (Sm)

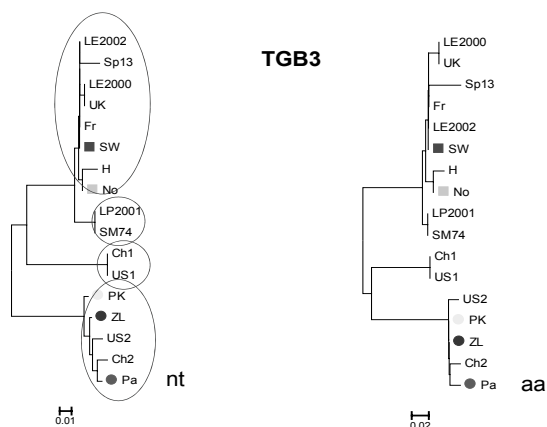
Lch – lokalne chlorotyczne plamy – local chlorotic lesions; Ln – lokalne nekrotyczne plamy – local necrotic lesions; Lch-n – lokalne chlorotyczno-nekrotyczne plamy – local chlorotic-necrotic lesions; Sm – systemiczna mozaika – systemic mosaic; Z1 – żółtaczka – yellowing; Sns – systemiczne nekrotyczne plamy – systemic necrotic lesions; s – infekcja systemiczna utajona – latent infection; () – infekcja wirusowa nie występuje zawsze – occasionally observed infection; – brak objawów, brak wirusa – no symptoms, no virus

Analiza filogenetyczna wykazała 99% podobieństwa sekwencji między PepMV-Z1 a innymi izolatami należącymi do genotypu CH2 zarówno w przypadku genu CP (rys. 2), jak i TGB3 (rys. 3). Odnotowano obecność pojedynczych substytucji nukleotydowych prowadzących w konsekwencji do zmiany sekwencji kodowanego białka w przypadku obu genów. Występowanie nowego patotypu PepMV reprezentującego genotyp CH2 potwierdza dużą zmienność wirusa i łatwość tworzenia nowych wariantów genetycznych.



Rys. 2. Drzewa filogenetyczne utworzone na podstawie sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej genu białka płaszczka: nt – nukleotydy, aa – aminokwasy

Fig. 2. Phylogenetic trees created using nucleotide and amino acid sequences of coat protein gene: nt – nucleotide, aa – amino acids



Rys. 3. Drzewa filogenetyczne utworzone na podstawie sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej genu TGB3: nt – nukleotydy, aa – aminokwasy

Fig. 3. Phylogenetic trees created using nucleotide and amino acid sequences of TGB3 gene: nt – nucleotide, aa – amino acids

IV. WNIOSKI

1. W latach 2010–2011 zidentyfikowano nowy patotyp PepMV, który zakwalifikowano do genotypu CH2.
2. Izolat powoduje silne objawy żółknienia blaszki liściowej oraz charakterystyczne objawy na owocach w postaci nekroz, zniekształceń, przebarwień i pęknięć, co powoduje, że tracą one wartość handlową.

3. Badania nad nowym izolatem potwierdzają, że pojedyncze substytucje nukleotydowe w genomie PepMV mogą wpływać na rodzaj objawów wywoływanych na roślinach.

V. LITERATURA

- Hanssen I.M., Paeleman A., Wittemans L., Goen K., Lievens B., Bragard C., Vanachter A., Thomma B. 2008. Genetic characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 131–146.
- Hasiów-Jaroszewska B., Kuzniar A., Peters S.A., Leunissen J.A.M., Pospieszny H. 2010. Evidence for RNA recombination between distinct isolates of *Pepino mosaic virus*. *Acta Biochim. Pol.* 57: 385–388.
- Hasiów-Jaroszewska B., Pospieszny H., Borodynko N. 2009. New necrotic isolates of *Pepino mosaic virus* representing the CH2 genotype. *J. Phytopathol.* 157: 494–496.
- Ling K.S., Wintermantel W.M., Bledsoe M. 2008. Genetic composition of *Pepino mosaic virus* population in north American greenhouse tomatoes. *Plant Dis.* 92: 1683–1688.
- Pagan I., Cordoba-Selles M.D., Martinez-Priego L., Fraile A., Malpica J.M., Jorda C., Garcia-Arenal F. 2006. Genetic structure of the population of *Pepino mosaic virus* infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* 96: 274–279.
- Pospieszny H., Borodynko N. 2006. New Polish isolate of *Pepino mosaic virus* highly distinct from European tomato, Peruvian, and US2 strains. *Plant Dis.* 90, p. 1106.
- Pospieszny H., Borodynko N., Palczewska M. 2003. First record of *Pepino mosaic virus* in Poland. *J. Plant Dis. Protect.* 100, p. 97.
- Pospieszny H., Hasiów B., Borodynko N. 2008. Characterization of two distinct Polish isolates of *Pepino mosaic virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 443–445.
- Spence N.J., Basham J., Mumford R.A., Hayman G., Edmondson R., Jones D.R. 2006. Effect of *Pepino mosaic virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathol.* 55: 595–606.

HENRYK POSPIESZNY, BEATA HASIÓW-JAROSZEWSKA, NATASZA BORODYNKO

NEW PATHOTYPE OF CH2 STRAIN OF *PEPINO MOSAIC VIRUS*

SUMMARY

In Poland, several isolates of *Pepino mosaic virus* (PepMV) belonging to EU and CH2 genotypes have been found since 2003. Majority of them belong to CH2 strain and are represented by two extremely different pathotypes: mild and necrotic. Mild CH2 isolates did not induce any remarkable symptoms on tomato leaves. In 2010 and 2011, the PepMV isolates inducing severe yellowing symptoms on tomato plants were collected. Analysis revealed that new pathotype designated as PepMV-Z1 belongs to CH2 genotype. PepMV-Z1 shared 99% sequence identity in coat protein and triple gene block 3 with previously identified mild and necrotic isolates of CH2 genotype. However, single nucleotide substitutions were identified suggesting that minor nucleotide differences may affect the symptoms and virus virulence.

Key words: PepMV-Z1, yellowing, CH2 genotype