

## GENSKA RAZNOVRSTNOST VIRUSA PAHLJAČAVOSTI LISTOV VINSKE TRTE (GFLV) IN NJEN BIOLOŠKI POMEN

Maruša POMPE-NOVAK<sup>1</sup>, Ion GUTIÉRREZ-AGUIRRE<sup>2</sup>, Jana VOJVODA<sup>3</sup>, Marjanca BLAS<sup>4</sup>, Irma TOMAŽIČ<sup>5</sup>, Zora KOROŠEC-KORUZA<sup>6</sup>, Emmanuelle VIGNE<sup>7</sup>, Marc FUCHS<sup>8</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>9</sup>, Nataša PETROVIČ<sup>10</sup>

<sup>1,2,3,4,9,10</sup> Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo, Ljubljana

<sup>5</sup>Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper

<sup>6</sup>Oddelek za agronomijo, Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani

<sup>7</sup>Laboratoire de Virologie, Centre de Recherche de Colmar, Institute National de la Recherche Agronomique and Université Louis Pasteur (INRA)

<sup>8</sup>Department of Plant Pathology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station.

### IZVLEČEK

Virus pahljačavosti listov vinske trte (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) povzroča bolezen imenovano kužna izrojenost vinske trte, ki je razširjena po vseh vinorodnih deželah sveta in ki povzroča zmanjšanje količine in kakovosti pridelka ter tudi propad trsov. GFLV se prenaša s talno ogorčico *Xiphinema index* ter z uporabo okuženega sadilnega materiala. Klasični način omejevanja širjenja virusa temelji na uporabi neokuženega sadilnega materiala in na zatiranju ogorčic. Novejša možnost je uporaba gensko spremenjene vinske trte, odporne na okužbo z virusom GFLV. Ker odpornost temelji na izražanju vnesenega plaščnega proteina GFLV v gensko spremenjenih trsah, je za gojenje take vinske trte v vinogradih potrebna predhodna ocena tveganja, ki zajema analizo genske variabilnosti virusa GFLV in možnosti rekombinacij med genotipskimi variantami virusa GFLV, ki so zastopane v naravi. Naše raziskave so pokazale različno gensko variabilnost na območju treh izbranih genov, od katerih je največja variabilnost dosegla 13,2 % pri genu 2C. Ugotovili smo rekombinacijo med restrikcijiskima tipoma virusa GFLV na območju enega izmed preiskovanih genov. Potrdili smo več restrikcijiskih tipov virusa znotraj ene rastline. Na izbranih trsah smo opazovali bolezenska znamenja in iskali morebitne povezave med restrikcijiskimi tipi GFLV ter izražanjem bolezenskih znamenj.

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

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

<sup>2</sup> dr., prav tam

<sup>3</sup> univ. dipl. mikrobiol., prav tam

<sup>4</sup> univ. dipl. mikrobiol., prav tam

<sup>5</sup> doc. dr., Garibaldijeva 1, SI-6000 Koper, Slovenija

<sup>6</sup> prof. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>7</sup> 28, rue de Herrlisheim, 68021 Colmar cedex, France

<sup>8</sup> prof. dr., Geneva, NY 14456, USA

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

<sup>10</sup> dr., Večna pot 111, prav tam

## ABSTRACT

### GENETIC VARIABILITY OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS (GFLV) AND ITS BIOLOGICAL IMPACT

Grapevine fanleaf virus (GFLV) is a causal agent of grapevine fanleaf degeneration disease, which is one of the most important viral diseases of grapevine that results in progressive decline of infected vines, yield loss and poor fruit quality in all wine producing areas in the world. The virus is spread naturally by a nematode vector *Xiphinema index* and through the use of infected planting material. Classical control measures are the use of healthy planting material and control of the vector. New methods comprise the introduction of transgenic grapevines, resistant to GFLV. Because the resistance is mainly based on expressing GFLV coat protein transgene, the assessment of environmental risks, including a measure of the GFLV variability baseline, must be done prior to the release of transgenic grapevines. The results showed that the three investigated genes are differently variable, with the largest variability being 13.2 % in the case of 2C. A recombination event was identified in one of the investigated genes. We confirmed the presence of more than one GFLV restrictotype in a single plant. Furthermore, we have selected grapevines infected with GFLV for detailed recording of visual symptoms.

**Key words:** biological 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 sestavljata dve enoverižni pozitivno usmerjeni molekuli RNA (RNA1 in RNA2) in satelitna RNA3. Molekule RNA imajo na 5' koncu kovalentno vezan virusni protein (VPg) in na 3' koncu poli-A rep. RNA1 in RNA2 nosita zapis za poliproteina, ki ju proteaza, ki je kodirana na RNA1, razreže v funkcionalne proteine. RNA2 vsebuje 3 gene, ki nosijo zapis za "homing" protein (HP), gibalni protein (MP) in plaščni protein (CP). Plaščni protein je polipeptid z molekulsko maso 54 kDa (Serghini *et al.*, 1990; Van Regenmortel *et al.*, 2000).

GFLV okužuje rastline iz rodu *Vitis*. Na vinski trti povzroča bolezen imenovano kužno izrojavanje vinske trte, ki je razširjena po celem svetu, kjer gojijo vinsko trto. Omenjena bolezen povzroča zmanjšanje količine pridelka in njegove kakovosti, ter tudi propad trsov. 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 se ne razgradijo vsi ostanki okuženih korenin in

dodatnih 8 mesecev, da ogorčice prenehajo prenašati 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) in ekološko sporno.

- 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).

Novejša 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 (gen 2C).

## 2 MATERIALI IN METODEDE

V raziskavo smo vključili 9 trsov sorte Volovnik iz vinograda v Ložah. 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. Nukleotidna zaporedja smo določali na dolžini celotnega bralnega okvirja RNA2 GFLV in jih z metodo razvrščanja razvrstili v skupine. Za ugotavljanje rekombinacije smo uporabili program Recombination Detection Program 2 (Pompe-Novak *et al.*, 2007).

Ocena raznovrstnosti GFLV na biološkem nivoju je temeljila na osnovi opazovanja 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 restrikcijskih tipov 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.

Določili smo 28 nukleotidnih zaporedij na dolžini celotnega bralnega okvirja RNA2 GFLV in jih z metodo razvrščanja razvrstili v 3 skupine. Naše raziskave so pokazale različno gensko variabilnost na območju treh izbranih genov, največjo pri genu 2C in najmanjšo pri genu 2B. Pri genu 2C je variabilnost dosegla 13,2 %.

Pri nekaterih vzorcih se je pojavil kompleksen vzorec rezanja, vzrok katerega je bila okužba posameznega trsa z več kot enim restrikcijskim tipom GFLV. Okužba posameznega trsa z več restrikcijskimi tipi GFLV omogoča rekombinacije med genotipskimi variantami virusa v naravi. S programom Recombination Detection Program 2 smo pokazali rekombinacije med restrikcijskima tipoma virusa GFLV na območju gena 2A.

V sodelovanju s Kmetijskim inštitutom Slovenije smo opravili analize na zastopanost ogorčice *Xiphinema index*, ki je v preiskovanem vinogradu nismo našli. Za oceno biotične raznovrstnosti GFLV na biotičnem nivoju smo na izbranih trsih opazovali bolezenska

znamenja in iskali morebitne povezave med restrikcijskimi tipi GFLV ter izražanjem bolezenskih znamenj. Med bolezenskimi znamenji, izraženimi na trsih, in restrikcijskimi tipi RNA2 GFLV, ki so okuževali trse sorte Volovnik, nismo našli povezave.

#### 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.

Nacionalni inštitut za biologijo in Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani sta bila vključena v projekt TRANSVIR z raziskavami biotične raznovrstnosti GFLV v Sloveniji. Podatki o raznolikosti genoma GFLV so osnova za sklepanje na pogostost rekombinacij med različki virusa v naravi ter osnova za oceno nevarnosti pri uporabi gensko spremenjenih rastlin zaradi potencialne interakcije med naravnimi populacijami GFLV in vnesenim genom za plašni protein.

Evropski projekt TRANSVIR se je ukvarjal 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. Med drugim se je ukvarjal z oceno tveganja v okolju, s poljskimi poskusi ter oceno rekombinacij med genom vnesenim v rastlino in virusom, ki okužuje gensko spremenjeno rastlino. V uporabljenih razmerah ni bil najden noben rekombinanten virus nad mejo detekcije v gensko spremenjenih trsih, ki so izražali plašni protein GFLV, virusa vinske trte A (*Grapevine virus A*, GVA) ali virusa vinske trte B (*Grapevine virus B*, GVB) in so bili okuženi s homolognim ali heterolognim virusom, čeprav so se v omenjenih rastlinah kopičile velike količine transkripta vnesenega gena. V času trajanja poskusa ni bilo zaznanega vpliva gensko spremenjenih trsov na populacije virusov (Fuchs *et al.*, v tisku). Projekt TRANSVIR je bil namenjen za znanstveno podporo oblastem Evropske skupnosti pri sprejemanju regulatornih odločitev za uporabo na viruse odpornih gensko spremenjenih rastlin v kmetijstvu.

#### 5 ZAHVALA

Raziskave so potekale v okviru evropskega projekta 5. okvirnega programa QLK3-CT-2002-02140 Ocena okoljskega vpliva transgene vinske trte in sliv na raznolikost in dinamiko populacij virusov – TRANSVIR in v okviru temeljnega raziskovalnega projekta J1-6040 Biološka različnost dveh virusov vinske trte in njihov pomen za rastline. Za sodelovanje pri raziskavah se zahvaljujemo sodelavcem iz Kmetijskega inštituta Slovenije, Kmetijske zadruge 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.
- Cohn E., Tanne E., Nitzani F. E. 1970. *Xiphinema italiae*, a new vector of grapevine fanleaf virus. *Phytopathology* 60: 181-182.
- Fuchs M., Cambra M., Capote N., Jelkmann W., Kundu J., Laval V., Martelli G. P., Minafra A., Petrovič N., Pompe-Novak M., Ravelonandro M., Saldarelli P., Stussi-Garaud C., Vigne E., Zagrai I. 2007. Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: New insights into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance. *Journal of Plant Pathology*, in press.

- 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., Bardonnnet 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.
- Pompe-Novak M., Gutiérrez-Aguirre I., Vojvoda J., Blas M., Tomažič I., Vigne E., Fuchs M., Ravnikar M., Petrovič N. 2007. Genetic variability within RNA2 of Grapevine fanleaf virus. European Journal of Plant Pathology 117: 307-312.
- 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, Academica 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.