

VIRUS OVENELOSTI BOBA 1 (BBWV1) – NOV GOSPODARSKO POMEMBEN VIRUS PAPRIK V SLOVENIJI

Nataša MEHLE¹, Magda TUŠEK ŽNIDARIČ², Maja RAVNIKAR³

^{1,2,3}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Ljubljana.

IZVLEČEK

Poleti 2006 so bile v jugovzhodni Sloveniji, v nasadu za komercialno pridelavo paprike (*Capsicum annuum*), opažene rastline paprike z bolezenskimi znamenji značilnimi za okužbo z virusi. Zaradi razbarvanja, obročev in temnih izboklin na plodovih je bila izguba pridelka v okuženem območju skoraj 100 %. Na večini listov so bila opazna rahla razbarvanja, na nekaterih pa izrazit vzorec kot ornament v mavrskem slogu ali v obliki koncentričnih obročev. V jesenskem obdobju so bili plodovi istih rastlin brez bolezenskih znamenj. Liste in plodove paprik z bolezenskimi znamenji, smo analizirali z ELISA na prisotnost različnih virusov. Pozitiven rezultat smo dobili le na virus ovenelosti boba 1 (BBWV 1; *Broad bean wilt virus 1*). Rezultat je bil potrjen z imunsko-serološko elektronsko mikroskopijo (ISEM), testnimi rastlinami, z RT-PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za BBWV 1 in z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja DNA dela gena za večji in manjši plaščni protein. Virus BBWV 1 smo dokazali tudi v plevelni rastlini iz družine radičevk z rahlo vidnim mozaikom, ki je rasla v neposredni bližini okuženih paprik. Diagnoza in karakterizacija obeh vzorcev predstavljata prvo določitev virusa BBWV1 v Sloveniji (Mehle in sod., 2008). V prispevku predstavljamo tudi najdbo virusa BBWV 1 v srednji Sloveniji iz leta 2005 na vzorcu verbene s klorotičnimi madeži na listih ter najdbe iz leta 2007 na dveh vzorcih paprike, ki pa sta bili hkrati okuženi tudi z virusom mozaika kumar (CMV). Poleg orisa najdb virusa BBWV 1 v Sloveniji v prispevku predstavljamo tudi biotične karakteristike tega gospodarsko pomembnega virusa paprik.

Ključne besede: BBWV 1, detekcija, paprika, Slovenija, virus ovenelosti boba 1

BROAD BEAN WILT VIRUS 1 (BBWV 1) – THE NEW ECONOMICALLY IMPORTANT VIRUS OF PEPPER IN SLOVENIA

ABSTRACT

During summer of 2006, pepper plants (*Capsicum annuum*) showing virus-like symptoms, were observed in a commercial field in south-eastern Slovenia. Discolorations, rings or dark bumps on fruits led to almost 100% loss of the yield in some areas. Symptoms on leaves were usually expressed as slight discolorations, but also as arabesques or concentrating rings. In autumn, infected plants expressed less severe symptoms and produced symptomless fruits. The infected leaves and fruits of pepper, with different types of symptoms, were tested by ELISA for the presence of different viruses. Positive results were obtained only with *Broad bean wilt virus 1* (BBWV 1). Immuno-serological electron microscopy (ISEM), test plants, RT-PCR with BBWV 1 specific primers and the sequence of the RT-PCR product, encompassing part of the two coat proteins genes, confirmed BBWV 1 infection. The BBWV 1 was also

¹ mag., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

² dr., prav tam

³ prof. dr., prav tam

identified in one weed species belonging to family *Cichoriaceae*, expressing mild mosaic and growing near the epidemic area. The diagnosis and characterization of both samples is the first determination of BBWV 1 in Slovenia (Mehle *et al.*, 2008). In this paper additional the finding of BBWV 1 in central Slovenia on *Verbena* plants in 2005 and finding of mix infections with *Cucumber mosaic virus* on two samples of pepper in 2007 are presented. Besides findings of BBWV 1 in Slovenia, the biological characteristics of this economically important virus of pepper are provided.

Key words: BBWV 1, *Broad bean wilt virus 1*, detection, pepper, Slovenia

1 UVOD

Poznamo dva sorodna virusa ovenelosti boba (BBWV): BBWV 1 in BBWV 2. Virusa sta serološko in po nukleotidnem zaporedju različna in so ju do leta 1999 obravnavali kot en virus (Kobayashi in sod., 1999); zato v literaturi ni ločenih podatkov o gostiteljskih rastlinah in drugih biotičnih lastnostih. Nekatere države poročajo o odkritju obeh virusov (Mumford in sod., 2006), vendar je BBWV 2 pogostejši v Aziji, Avstraliji in S Ameriki, BBWV 1 pa v Evropi (Zhou, 2002).

Naravni gostitelji BBWV so številne vrtnine, okrasne in plevelne rastline (Taylor in Stubbs, 1972; Zhou, 2002). Virus BBWV se prenaša neperzistentno z listnimi ušmi (*Myzus persicae*, *Aphis craccivora*, *Macrosiphum euphorbiae*,...), lahko tudi mehansko s sokom okuženih rastlin (Taylor in Stubbs, 1972; Zhou, 2002). Virus je relativno stabilen v okolju (v soku okuženega boba, pri 21°C, ostane infektiven dva do tri dni) (Taylor in Stubbs, 1972). Po podatkih iz literature se virus ne prenaša s semeni boba, graha in kapucinke, razen izolat virusa BBWV 2 iz Sirije v zelo nizki frekvenci (0,4-0,6 %) s semeni boba (Taylor in Stubbs, 1972; Zhou, 2002). Glede možnosti prenosa virusa BBWV 1 s semeni paprike v literaturi ni podatkov, prav tako ni podatkov o preživetju virusa v ostankih rastlin v zemlji. Na Kitajskem so BBWV 2 dokazali v 70 % od 23 analiziranih sadik paprike, kar nakazuje na možnost prenosa virusa BBWV 2 s semeni paprike, vendar z laboratorijskimi testi možnost prenosa virusa BBWV 2 s semeni paprike niso potrdili (AVRDC, 2000).

Na papriki virus BBWV povzroči sistemsko okužbo, vendar navadno ne poročajo o močnih bolezenskih znamenjih; izjema je korejski različek virusa BBWV 2, ki povzroča nekroze in posledično propad rastlin paprike (Lee in sod., 2000). Teodora Tornos (Laboratori de Sanitat Vegetal, Barcelona) poroča o močnih bolezenskih znamenjih na listih in plodovih paprike v Španiji, ki bi jih naj povzročil virus BBWV 1 v času visokih temperatur (neobjavljeni podatki)..

2 MATERIAL IN METODE

V letih od 2000 do 2008 smo na prisotnost virusov testirali 204 vzorce rastlin paprike. Večino vzorcev so nabrali fitosanitarni inšpektorji v okviru stalnega nadzora škodljivih organizmov, ki ga vrši Fitosanitarna uprava Republike Slovenije. Nabrani so bili večinoma vzorci z bolj ali manj tipičnimi bolezenskimi znamenji, redkeje vzorci brez bolezenskih znamenj. Večinoma smo za analize uporabljali liste in poganjke, redkeje plodove. Vzorce paprike smo diagnosticirali po shemi, ki vključuje kombinacijo različnih metod od serologije, elektronske mikroskopije, testnih rastlin do novejših molekularnih tehnik.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Poleti 2006 so bile v jugo-vzhodni Sloveniji (Malence, Kostanjevica) v nasadu za komercialno pridelavo paprike opažene rastline paprike z bolezenskimi znamenji značilnimi za okužbo z virusi. Bolezenska znamenja so bila vidna na vseh štirih kultivarjih paprike, ki jih

je lastnik prideloval: Atol, Olimp, Bjanca in Verbrana. V času pojava bolezenskih znamenj so bile temperature okolja izredno visoke. Zaradi razbarvanja, obročev in izboklin na plodovih, je bila izguba pridelka v okuženem sklopu tunelov skoraj 100 %. Na večini listov so bila opazna rahla razbarvanja, na nekaterih pa je bil izrazit vzorec kot ornament v mavrskem slogu ali v obliki koncentričnih obročev. Rast rastlin in število plodov je bilo nespremenjeno. V jesenskem obdobju, ko so bile temperature okolja nižje, so bili plodovi istih rastlin brez bolezenskih znamenj. Podobno kot pri nas so tudi v Španiji pred leti opazili vpliv visokih temperatur na pojav podobnih bolezenskih znamenj (ustna informacija: Theodore Tornos; Laboratori de Sanitat Vegetal, Barcelona).

Liste in plodove z različnimi tipi bolezenskih znamenj, smo analizirali z ELISA na vsebnost BBWV 1, BBWV 2, CSNV (virus stebelne nekroze krizantem), CMV (virus mozaika kumar), INSV (virus nekrotične pegavosti vodenke) in TSWV (virus pegavosti in uvelosti paradižnika). Pozitiven rezultat smo dobili le na BBWV 1 in sicer za vse vzorce paprike, nabrane na okuženem območju. Virus BBWV 1 smo dokazali tudi v plodu in listih paprike brez bolezenskih znamenj ter v plevelni rastlini iz družine radičevk z rahlo vidnim mozaikom, ki sta rasli v neposredni bližini okuženih paprik. V drugih vzorčenih in analiziranih plevelnih ter kmetijskih rastlinah (koruza, jagode, zelje), ki so rasle v bližini okuženih paprik, virusa BBWV 1 nismo dokazali. Rezultat je bil potrjen tudi z imunsko-serološko elektronsko mikroskopijo (ISEM). Za ELISA in ISEM smo uporabili BBWV 1 specifična protitelesa iz zbirke DSMZ (Nemčija).

Z mehansko okužbo smo virus uspešno prenesli na papriko, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana rustica* in *N. tabacum* cv. White Burley. Na vseh okuženih testnih rastlinah smo opazili lokalna in sistemska bolezenska znamenja. Na testni rastlini paprike smo opazili lisavost na listih, na *C. quinoa* rumenenje in mozaik, na *N. rustica* pa gubanje. Na nekaterih listih testne rastline *N. tabacum* cv. White Burley smo opazili klorotične obroče in črte, drugi listi niso imeli očitnih bolezenskih znamenj. Prenos virusa z mehansko okužbo na *N. clevelandii*, *N. benthamiana* in *Lycopersicon esculentum* kultivar Money maker ni bil uspešen.

Diagnoza vzorcev iz leta 2006 in karakterizacija BBWV 1 predstavlja prvo opisano odkritje tega virusa v Sloveniji (Mehle in sod., 2008). Virus BBWV 1 smo v Sloveniji, v okolici Ponikve, odkrili že leta 2005 na vzorcu verbene s klorotičnimi madeži na listih. Leta 2007 smo virus BBWV 1 ponovno dokazali na dveh vzorcih paprike, ki pa sta bili hkrati okuženi tudi s CMV. 1 vzorec iz leta 2007 je bil nabran na isti lokaciji kot vzorci iz leta 2006, drugi pa je bil iz nasada oddaljenega cca 1 km (Sajevce, Kostanjevica). V letu 2007 naj bi po informaciji vzorčevalke virus BBWV 1 ne povzročil večje gospodarske škode, saj so bili okuženi le posamezni plodovi.

Z RT-PCR, s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi B1/B2, ki pomnožujejo del gena za večji in manjši plaščni protein (Rubio in sod., 2002), smo analizirali RNA izolirano z RNeasy iz vzorca paprike in iz mehansko okužene testne rastline *N. tabacum* cv. White Burley. Specifičen pomnožek, dolg približno 500 bp, smo očistili iz 1 % agaroznega gela z modificiranim TAE pufrom z DNA Gel Extraction kit (Millipore) in poslali v ugotavljanje nukleotidnega zaporedja DNA v Korejo (Macrogen INC, Korea). Nukleotidni zaporedji, dobljeni s smiselnim in protismiselnim začetnim oligonukleotidom, smo poravnali s programom Align v Vector NTI. Del nukleotidnega zaporedja iz vzorca paprike, ki je bil prebran v obeh smereh (334 bp), smo vložili v gensko banko (št. nukleotidnega zaporedja iz baze NCBI: EF405826). Z BLAST analizo 334 bp dolgega odseka, ki je ustrezal delu genov za večji in manjši plaščni protein, smo ugotovili, da je stopnja podobnosti nukleotidnega zaporedja našega izolata z drugimi BBWV 1 izolati iz genske banke približno 80 %. Stopnja podobnosti amino kislin pa je bila od 90-92 % z BBWV1 izolati in 54-58 % z BBWV 2 izolati iz genske banke. Primerjali smo tudi nukleotidno zaporedje izolata iz paprike z izolatom iz verbene in ugotovili, da imata 80 % stopnjo podobnosti. Izolat iz verbene smo

primerjali nato še z drugimi izolati BBWV 1 in BBWV 2 iz genske banke in ugotovili sledeče: stopnja podobnosti nukleotidnega zaporedja z drugimi BBWV 1 izolati iz genske banke je 82-83 %, stopnja podobnosti aminokislinskega zaporedja pa je od 95-96 % z BBWV 1 in 50-55 % z BBWV 2. O podobnem razmerju stopnje podobnosti med različnimi izolati BBWV na istem delu genoma (na delu genoma za manjši in večji plaščni protein), poročajo tudi Rubio in sod. (2002). Razmerje stopnje podobnosti aminokislinskega zaporedja se ohranja tudi v primeru primerjave celotnega genoma (RNA 1 in RNA 2) španskega izolata z drugimi izolati BBWV: 92,1-93,3 % stopnja podobnosti z ameriškim BBWV 1 izolatom (stopnja podobnosti nukleotidnega zaporedja je 81,5 %) in 56,2-61,6 % s sedmimi različnimi BBWV 2 izolati (Ferrer in sod., 2005).

Zaradi širokega kroga naravnih gostiteljev je zatiranje virusa BBWV težka. Odstranjevanje plevelnih rastlin in drugih rastlinskih ostankov, uporaba zdravih rastlin za sajenje, previdnost pri delu z rastlinami, uporaba dezinfekcijskih sredstev ter razni načini zavarovanja polj pred ušmi, so možnosti za preprečitev širjenja virusa.

4 SKLEPI

Virus ovenelosti boba 1 (BBWV1) je nov gospodarsko pomemben virus paprik v Sloveniji, saj lahko v za virus ugodnih pogojih okolja povzroči velike ekonomske izgube pridelka, zato je nujna kontrola širjenja virusa.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se sodelavcem Fitosanitarnе inšpekcije (še posebno Klavdiji Matjaž Petek in Marti Jurečič) za nabrane vzorce in koristne informacije o stanju pri pridelovalcih, Smiljani Tomše za posredovanje prvega pozitivnega vzorca paprike ter Fitosanitarni upravi RS in Fitosanitarni inšpekciji za sofinanciranje. Za strokovno pomoč se zahvaljujemo Teodori Tornos (Laboratori de Sanitat Vegetal, Barcelona, Španija) ter D.-E. Lesemannu (Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Plant Virology, Microbiology and Biosafety, Braunschweig, Nemčija).

6 LITERATURA

- AVRDC. 2000. Project 5. Integrated insect and disease management (IPM) for environment-friendly production of safe vegetables. AVRDC Report 1999. Taiwan, AVRDC-Asian Vegetable Research and Development Center: 52-64
- Ferrer R.M., Guerri J., Luis-Arteaga M.S., Moreno P., Rubio L. 2005. The complete sequence of a Spanish isolate of *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1) reveals a high variability and conserved motifs in the genus Fabavirus. *Archives of Virology*, 150, 10: 2109-2116
- Kobayashi Y.O., Nakano M., Kashiwazaki S., Naito T., Mikoshiba Y., Shiota A., Kameya-Iwaki M., Honda Y. 1999. Sequence analysis of RNA-2 of different isolates of *Broad bean wilt virus* confirms the existence of two distinct species. *Archives of Virology*, 144: 1429-1438
- Lee U., Hong J.S., Choi J.K., Kim K.C., Kim Y.S., Curtis I.S., Nam H.G., Lim P.O. 2000. *Broad bean wilt virus* causes necrotic symptoms and generates defective RNAs in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*, 90: 1390-1395
- Mehle N., Tušek-Znidarič M., Tornos T., Ravnikar M. 2008. First report of *Broad bean wilt virus 1* in Slovenia. *Plant Pathology*. 57, 395.
- Mumford R.A., Jarvis B., Harju V., Boonham N., Skelton A. 2006. First report of *Broad bean wilt virus 2* in the UK: findings in foxglove and salvia. *Plant Pathology*, 55, 6: 819-819.
- Rubio L., Luis-Arteaga M., Cambra M., Serra J., Moreno P., Guerri J. 2002. First report of *Broad bean wilt virus 1* in Spain. *Plant Disease*, 86, 6: 698-698
- Taylor R.H., Stubbs L.L. 1972. *Broad bean wilt virus*: 81. V: Descriptions of plant viruses. Warwick, Commonwealth Mycological Institute / Association of Applied Biologists (jun. 1972). <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=81> (5. jun. 2007): 7 str.
- Zhou X. 2002. *Broad bean wilt virus 2*: 392. V: Descriptions of plant viruses. Warwick, Commonwealth Mycological Institute / Association of Applied Biologists (okt. 2002). <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=392> (3. maj 2007): 9 str.