

PREŽIVETJE IN INFEKTIVNOST VIRUSA MOZAIKA PEPINA (PepMV) V VODNEM OKOLJU

Nina PREZELJ¹, Duška DELIĆ², Ion GUTIERREZ AGUIRRE³, Magda TUŠEK
ŽNIDARIČ⁴, Nataša MEHLE⁵, Maja RAVNIKAR⁶

^{1,3,4,5,6}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Ljubljana

²Univerza v Banjaluki, Fakulteta za agrikulturno, Bosna in Hercegovina

IZVLEČEK

Virus mozaika pepina (PepMV) uvrščamo v družino *Flexiviridae* in rod *Potexvirusov*. Prvič je bil opisan na rastlinah pepina (*Solanum muricatu*) iz Peruja, danes pa je razširjen po celem svetu in povzroča resne težave predvsem pri gojenju paradižnika. Virus se z lahkoto prenaša mehansko, njegov specifični prenašalec ni znan, raven prenosa s semeni je nizka. Pokazali so možnost prenosa virusa preko krožeče hranilne raztopine v hidroponičnem sistemu, zato smo ugotavljali njegovo preživetje in ohranjanje infektivnosti v vodnem ne-gostiteljskem okolju. Dva različna virusa smo namnožili ločeno v propagacijski rastlini *Datura stramonium*. Okužene liste smo narezali v vodo in inkubirali pri 25 °C. Vsak teden smo analizirali inokulum okužene vode. Preživetje in infektivnost virusa smo določali z inokulacijo testnih rastlin *Datura stramonium* in spremljanjem pojava simptomov ter z določanjem prisotnosti virusa s pomočjo hitrega testa za detekcijo PepMV (Lateral flow) in RT-PCR v realnem času v enem koraku. Tako evropski kot čile 2 različek virusa PepMV sta ostala infektivna vse do treh tednov po inkubaciji v vodi. Razmeroma dolgo preživetje in infektivnost virusa v vodnem ne-gostiteljskem okolju opozarja na vodo kot potencialen vir okužbe s PepMV.

Ključne besede: infektivnost, PepMV, preživetje, voda

SURVIVAL AND INFECTIVITY OF PEPINO MOSAIC VIRUS (PepMV) IN AQUEOUS ENVIRONMENT

ABSTRACT

Pepino mosaic virus (PepMV) belongs to the genus *potexvirus* within the family *Flexiviridae* and was first described in pepino plants (*Solanum muricatum*) in Peru. It is highly mechanically transmitted and has spread throughout the world causing serious problems for tomato production. It is readily sap transmitted, a specific insect vector for PepMV transmission is not yet identified while the rate of seed transmission is very low. Because it has been indicated that PepMV can spread in hydroponic system via nutrient solution, survival and infectivity of the virus in an aqueous non-host environment was determined. Two PepMV strains, European and Chile 2, were separately propagated in *Datura stramonium* plants. Then infected leaves were chopped in to water and incubated at 25 °C. Every week

¹ univ. dipl. biokem., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

² mag., Univerzitetni grad Bulevar vojvode Petra Bojovića 1A, B&H-78000 Banjaluka

³ dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

⁴ dr., prav tam

⁵ mag., prav tam

⁶ prof. dr., prav tam

part of the inoculum was tested. Virus infection was monitored by weekly inoculation of *Datura stramonium* test plants and observation of symptoms development together with PepMV lateral flow test and single step real time RT-PCR. Both strains remained infective after being in water for up to 3 weeks. Relatively long virus survival and infectivity in an aqueous non-host environment call for attention to water as a source of infection with PepMV.

Key words: infectivity, PepMV, survival, water

1 UVOD

Virus mozaika pepina (PepMV), ki je bil prvič dokazan na rastlinah pepina (*Solanum muricatum*) v Peruju (Jones in sod., 1980) so v Evropi prvič dokazali leta 1999 v Veliki Britaniji in na Nizozemskem na rastlinah paradižnika (Wright in sod., 1999 ter van der Vlugt in sod., 2000). Od takrat naprej vedno več Evropskih držav poroča o pojavu virusa, in ker povzroča resne težave predvsem pri gojenju paradižnika v rastlinjakih, je danes uvrščen na EPPO (European Plant Protection Organization) opozorilni seznam. PepMV spada v družino *Flexiviridae* in rod *Potexvirusov*. Virus se z lahkoto mehansko prenaša, dokazana je tudi nizka raven prenosa virusa s semeni (projekt Pepeira, 6. okvirni program EU). Mehansko lahko PepMV prenašajo čmrlji (Lacasa in sod., 2003), vendar pa specifični prenašalec virusa ni poznan (Lopez in sod., 2005). Zadnjih trideset let v svetu narašča pridelava paradižnika v hidroponičnih sistemih, saj omogočajo bolj kontrolirane pogoje gojenja. Schwarz in sodelavci (2009) so pokazali, da je v hidroponičnem sistemu možen prenos PepMV preko krožeče hranilne raztopine. Dokazali so prenos virusa iz okuženih na neokužene rastline paradižnika, niso pa uspeli detektirati virusa v hranilni raztopini. Ker je prenos možen, nas je zanimalo, koliko časa PepMV preživi in ostane infektiven v vodnem ne-gostiteljskem okolju. V test preživetja in infektivnosti smo vključili dva različka PepMV, evropski različek (EU) in bolj agresiven različek čile 2 (Ch2).

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Priprava vodnih vzorcev s PepMV

Oba različka PepMV smo ločeno namnožili na testnih rastlinah *Datura stramonium* in nato na sledeč način pripravili vodna vzorca, okužena s posameznim različkom: liste 10 okuženih rastlin *D. stramonium* smo narezali na trakove in jih inkubirali z mešanjem v 1 L vode iz pipe 2 h pri 25 °C. Vodo smo po inkubaciji prefiltrirali skozi gazo in jo 7 tednov hranili na sobni temperaturi.

2.2 Testiranje preživetja in infektivnosti

Takoj po pripravi in nato enkrat tedensko smo s tako pripravljenima vzorcema okužene vode inokulirali po 3 testne rastline *D. stramonium* za vsak vzorec. Inokulum smo pripravili z mešanjem vodnega vzorca s pufrom za mehansko inokulacijo (20 mM natrijev fosfatni puffer z dodanim PVP (Mw10.000), pH 7,4) v razmerju 1:1. Infektivnost smo ugotavljali s spremljanjem pojava simptomov, s pomočjo hitrega testa za detekcijo PepMV (Lateral flow, Forsite diagnostics) in z RT-PCR v realnem času v enem koraku (ss-RT-qPCR) (Ling, 2007). Okužbo rastlin smo preverili 7 dni po njihovi inokulaciji (dpi), v primeru negativnih rezultatov pa tudi kasnejše dpi. Vsak teden smo z RT-PCR v realnem času v enem koraku preverili tudi prisotnost PepMV v obeh vodnih vzorcih.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Iz rezultatov (preglednica 1) je razvidno, da oba različka PepMV, EU in Ch2, ostaneta infektivna vse do 3 tednov po inkubaciji v vodi na sobni temperaturi. Rezultati hitrega testa za detekcijo PepMV (Lateral Flow) sovpadajo z rezultati RT-PCR v realnem času v enem koraku. Poleg tega so tudi okužene rastline *D. stramonium* kazale simptome okužbe v obliki neenakomernega razbarvanja in/ali gubanja listne površine.

Za ugotavljanje infektivnosti PepMV smo uporabili propagacijske rastline *D. stramonium*, saj smo želeli določiti infektivnost tudi v primeru nižjih koncentracij virusa. V primeru, da je virus ostal infektiven po inkubaciji v vodi, se je dobro namnožil v rastlinah *D. stramonium*, saj smo ga v vseh primerih zaznali tudi z manj občutljivim, hitrim diagnostičnim Latelar flow testom.

V vodi smo sicer zaznali prisotnost RNA obeh različkov vseh 7 tednov inkubacije, vendar sklepamo, da zaradi neuspešne inokulacije rastlin po 3 tednu inkubacije virus ni preživel oziroma se je količina infektivnih virusov zmanjšala pod mejo uspešne okužbe rastlin. Možno pa je tudi, da je infektivnih virusnih delcev v vodnem vzorcu tako malo, da jih pri vzorčenju vode za pripravo inokulata nismo zajeli.

Preglednica 1: Rezultati spremljanja prisotnosti in infektivnosti dveh PepMV različkov (EU in Ch2) v vodi. Pozitiven rezultat inokulacije pomeni, da je bila uspešno okužena vsaj ena od treh rastlin *D. stramonium*.

št. tednov po okužbi vode	Detekcija PepMV v okuženi vodi		Infektivnost PepMV (uspešnost inokulacije rastlin <i>Datura stramonium</i>)			
	EU različek	Ch2 različek	EU različek		Ch2 različek	
	ss-RT-qPCR		Lateral flow	ss-RT-qPCR	Lateral flow	ss-RT-qPCR
0	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-

4 SKLEPI

Razmeroma dolgo preživetje in infektivnost PepMV v vodnem ne-gostiteljeskem okolju opozarja na vodo, kot potencialen vir okužbe s PepMV. To je še posebej pomembno v primeru pridelave paradižnika v hidroponičnih namakalnih sistemih.

5 LITERATURA

- Jones RAC, Koenig R, Lesemann DE. 1980. Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino. *Annals of Applied Biology* 94, 61-8.
- Wright D, Mumford R. 1999. Pepino Mosaic Potexvirus (PepMV): First Records in Tomato in the United Kingdom. *Plant Disease Notice No. 89*. York, UK: Central Science Laboratory.
- van der Vlugt RAA, Stijger CCMM, Naaldwijk AA, Verhoeven JTJ, Lesemann DE. 2000. First report of Pepino mosaic virus on tomato. *Plant Disease*, 84, 103.

- Ling K.S. 2007. Molecular characterization of two Pepino mosaic virus variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes*, 34: 1-8
- Schwarz, D., Paschek, U., Bandte, M., Büttner, C. and Obermeier, C. 2009. Detection, Spread and Interactions of Pepino Mosaic Virus and *Pythium Aphanidermatum* in the Root Environment of tomato in hydroponics. *Acta Hort. (ISHS)* 808:163-170
- Lacasa A., Guerrero M.M., Hita I., Martínez M.A., Jordá C., Bielza P., Contreras J., Alcázar A., Cano A. 2003. Implication of bumble bees (*Bombus* spp.) on *Pepino mosaic virus* (PepMV) spread on tomato crops. *Plagas*, 29, 3: 393
- Lopez C., Soler S., Nuez F. 2005. Comparison of the complete sequences of three different isolates of *Pepino mosaic virus*: size variability of the TGBp3 protein between tomato and *L. peruvianum* isolates. *Archives of Virology*, 150: 619–627