



**HAL**  
open science

## Molecular characterization of greek Lettuce mosaic virus isolates

C. Varveri, Martine Peypelut, Olivier O. Le Gall, Thierry T. Candresse

### ► To cite this version:

C. Varveri, Martine Peypelut, Olivier O. Le Gall, Thierry T. Candresse. Molecular characterization of greek Lettuce mosaic virus isolates. *Hellenic Virology*, 2002, 7, pp.50-57. hal-02672655

**HAL Id: hal-02672655**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02672655v1>**

Submitted on 31 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Ερευνητική  
Εργασία

Μοριακός χαρακτηρισμός  
ελληνικών απομονώσεων του ιού του  
μωσαϊκού του μαρουλιού

X. Βαββέρη<sup>1</sup>,  
M. Peyroutet<sup>2</sup>,  
O. Le Gall<sup>2</sup>,  
T. Candresse<sup>2</sup>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός του μωσαϊκού του μαρουλιού (*Lettuce mosaic virus*, γένος *Potyvirus*), είναι σοβαρό παθογόνο της ανίσειοικτης καλλιέργειας και παρουσιάζει σημαντική βιολογική και μοριακή παραλλακικότητα. Παλαιότερη μοριακή ανάλυση που έγινε σε τρεις ελληνικές απομονώσεις της συλλογής του Εργαστηρίου Ιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου έδειξε ότι αποτελούν ιδιαίτερη φυλογενετική ομάδα. Αυτές οι απομονώσεις ήταν έντονης παθογένειας, με δυνατότητα παράκαμψης γονιδίων ανθεκτικότητας, χωρίς όμως να μεταδίδονται με το σπόρο. Τα έτη 1999 και 2000 πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός 21 επί πλέον ελληνικών απομονώσεων του ιού διαφόρου προέλευσης. Έγινε ενίσχυση τμήματος του γενώματος του ιού που περιελάμβανε το 3' άκρο του γονιδίου της πρωτεΐνης NIb και το 5' άκρο του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης του, χρησιμοποιώντας δύο συνδυασμούς εκκινητών και ακολούθησε η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Η σύγκριση των αλληλουχιών έδειξε ότι 7 απομονώσεις ανήκαν στην ελληνική ομάδα, μια αιό τις οποίες αποδείχθηκε ότι είχε ακριβώς τους βιολογικούς χαρακτήρες της ομάδας. Οι υπόλοιπες 14 ανήκαν στην ομάδα στελεκών του υπόλοιπου κόσμου και μάλιστα ήταν συγγενείς με την καλά χαρακτηρισμένη LMV-0 που μεταδίδεται με το σπόρο αλλά δεν προκαλεί παράκαμψη ανθεκτικότητας. Είναι πολύ πιθανό οι απομονώσεις της ομάδας αυτής, που για πρώτη φορά εντοπίστηκαν στη χώρα μας, να εισήλθαν με μολυσμένο σπόρο και από εκεί και πέρα να μεταδίδονται με τον ίδιο τρόπο ή και με τις αφίδες με τάση να κυριαρχήσουν.

<sup>1</sup> Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εργαστήριο Ιολογίας, 14 561 Κιφισιά  
<sup>2</sup> UMR GD22, IBVM, INRA, BP81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

Λέξεις ευρετηρίου: *Lettuce mosaic virus*, LMV

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός του μωσαϊκού του μαρουλιού (*Lettuce mosaic virus*, LMV) προκαλεί μια από τις σημαντικότερες ιολογικές ασθένειες της καλλιέργειας του μαρουλιού διεθνώς<sup>1</sup>. Ανήκει στο γένος *Potyvirus* της οικογένειας *Potyviridae* και μεταδίδεται με αφίδες φορείς με μη έμμονο τρόπο και με το σπόρο. Παρουσιάζει έντονη βιολογική παραλλακτικότητα με στελέχη ποικίλης παθογόνου δύναμης (τέσσερις παθότυποι) και ικανότητας μετάδοσης με το σπόρο<sup>2</sup>. Σε μοριακό επίπεδο, η παραλλακτικότητα των στελεχών οδήγησε στον εντοπισμό τριών φυλογενετικών ομάδων, οι οποίες ανιπροσωπεύουν κυρίως διαφορετική γεωγραφική προέλευση παρά συγκεκριμένους βιολογικούς χαρακτήρες<sup>3</sup>. Η μια από τις τρεις αυτές ομάδες αφορούσε τρία ελληνικά στελέχη της συλλογής του Εργαστηρίου Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, τα οποία μάλιστα χαρακτηρίζονταν από έντονη παθογόνο δύναμη<sup>4,5</sup> και ικανότητα παράκαμψης της ανθεκτικότητας ποικιλιών μαρουλιού που δίνουν τα υποτελή γονίδια ανθεκτικότητας (*moI1* και *moI2*)<sup>3</sup>. Η εμφάνιση τέτοιων στελεχών του ιού στην Ελλάδα αλλά και αλλού<sup>1,6,7</sup> με δυσμενείς επιπτώσεις στην παραγωγή οδήγησε στον περαιτέρω χαρακτηρισμό νέων απομονώσεων του ιού καθώς και στη διερεύνηση της σχέσης ξενιοτή-παθογόνου<sup>3,8,9</sup>. Σ' αυτή την κατεύθυνση, για εμπλουτισμό των δεδομένων της ελληνικής φυλογενετικής ομάδας του LMV, αλλά και τον γενικότερο χαρακτηρισμό των στελεχών που υπάρχουν στην Ελλάδα έγινε και η συγκεκριμένη μελέτη. Παλαιότερες εργασίες έδειξαν ότι η ανάλυση της περιοχής του γονώματος απομονώσεων του LMV μεταξύ των γονιδίων NIb (nuclear inclusion protein b, πρωτεΐνη β των πυρηνικών εγκλείστων) και CP (coat protein, καψιδιακή πρωτεΐνη) αρκεί ως φυλογενετικός μάρτυρας, καθώς όχι μόνο δίνει τα ίδια αποτελέσματα με την ανάλυση άλλων περιοχών, αλλά παρουσιάζει και μεγαλύτερη παραλλακτικότητα<sup>3</sup>. Η αλληλούχηση αυτής της περιοχής επέτρεψε την κατάταξη των ελληνικών απομονώσεων που εξετάστηκαν σε δυο ομάδες

με διαφορετικούς χαρακτήρες. Για μια απομόνωση έγινε επίσης έλεγχος της ικανότητας μετάδοσης με το σπόρο και της παράκαμψης της ανθεκτικότητας ποικιλιών για επιβεβαίωση των χαρακτηριστικών της ομάδας όπου ανήκει. Τα χαρακτηριστικά των διαφόρων στελεχών του ιού που προσδιορίστηκαν θα καθορίσουν και την παραπέρα στρατηγική για την αντιμετώπισή τους.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Απομονώσεις του LMV

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι απομονώσεις που μελετήθηκαν. Οι τρεις πρώτες ανήκαν στη συλλογή του Εργ. Ιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, εκ των οποίων οι δυο έχουν περιγραφεί στο παρελθόν (LMV-Gr5b = LMV-S<sup>10</sup>, και LMV-Gr6 = LMV-L<sup>4</sup>). Οι υπόλοιπες συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια εκτέλεσης της εργασίας. Όλες οι απομονώσεις μεταδόθηκαν και διατηρούνταν σε φυτά του δείκτη *Chenopodium quinoa*.

Για τη διερεύνηση της δυνατότητας παράκαμψης της ανθεκτικότητας και της μετάδοσης με το σπόρο της απομόνωσης LMV-Gr6 έγιναν μολύνσεις φυταρίων μαρουλιού της ανθεκτικής ποικιλίας Mantilia και της ευαίσθητης Trocadero αντίστοιχα. Ο σπόρος που έδωσαν τα φυτά της τελευταίας φυτεύθηκε για να γίνει ιολογικός έλεγχος επί των νέων φυταρίων.

### Μέθοδοι ανίχνευσης

Για τον εντοπισμό του ιού τα συλλεχθέντα δείγματα εξετάζονταν με την ανολογική μέθοδο DAS-ELISA<sup>11</sup> χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια του Εργαστηρίου Ιολογίας του Μ.Φ.Ι. (A/S LMV-S 25). Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο φυταρίων μαρουλιού που είχαν μολυνθεί με την απομόνωση LMV-Gr6 ή που είχαν προέλθει από το σπόρο μολυσμένων φυτών.

Οι απομονώσεις υποβλήθηκαν σε ενίσχυση τμήμα-

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Απομονώσεις του LMV

Α/Α	Απομόνωση	Ξενιστής	Προέλευση	Έτος	Κωδικός Genebank
1	Gr1	Ανίδι	Μέγαρο	1983	AF368975
2	Gr5b	Μαρούλι	Κρυονέρι	1983	AF368974
3	Gr6	<i>Helminthia echioides</i>	Κηφισιά	1983	AF368979
4	Gr8	Μαρούλι	Κρυονέρι	1999	AF368973
5	Gr10	<i>Dimorphotheca sp.</i>	Αθήνα	1999	AF368978
6	Gr17	Μαρούλι	Εύβοια	1999	AF368976
7	Gr18	Μαρούλι	Εύβοια	1999	AF368977
8	GrB7	Μαρούλι	Κρυονέρι	2000	AF368986
9	GrC1	Μαρούλι	Κρυονέρι	2000	AF369000
10	GrC4	Μαρούλι	Κρυονέρι	2000	AF368990
11	GrD2	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368991
12	GrD5	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368992
13	GrE4	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368993
14	GrE6	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368994
15	GrH1	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368987
16	GrH7	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368988
17	GrI1	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368995
18	GrI4	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368996
19	GrJ1	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368997
20	GrJ5	Μαρούλι	Εύβοια	2000	AF368998
21	Κνωσός	<i>Lactuca serriola</i>	Κνωσός	2000	AF368985

τος του γενώματός τους με ανοσοδέσμευση-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (IC-PCR). Οι εκφυλισμένοι εκκινητές, ο ανοδικός N1b [5'-CCG TAC ATA GCI GA(A/G) TGT GCT-3'] και οι καθοδικοί P4 [5'-GCG TTG ATG TCG TCA TC(C/T) TT-3'] ή P4Gr [5'-GCG TTG ATG TCC TCA TC(C/T) TT-3'] εξασφαλίζουν για όλες τις απομονώσεις ενίσχυση της περιοχής μεταξύ των νουκλεοτιδίων 8894 και 9171 σύμφωνα με την αλληλουχία του LMV-0 (κωδικός πρόσβασης GenBank X97704). Η περιοχή αυτή (278 νουκλεοτίδια) κωδικοποιεί το 3' άκρο της πρωτεΐνης N1b και το 5' άκρο της CP· το μεταξύ των εκκινητών τμήμα αυτής (237 νουκλεοτίδια) παρέχει δεδομένα της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων κάθε απομόνωσης.

Η αντίδραση της IC-PCR έγινε ως εξής: κατά το στά-

διο της ανοσοδέσμευσης έγινε προσρόφηση 100 µl ανοσοσφαιρινών (IgG) έναντι του LMV σε κλασικό ανθρακικό διάλυμα και συγκέντρωση 2 µg/ml στους σωληνίσκους της PCR (Perkin Elmer). Μετά από ένα μύλοσιμο σε διάλυμα PBS-Tween (8 g NaCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,2 g KCl, 0,5 ml Tween 20 ανά λίτρο) έγινε ιουοθέτηση 100 µl ομογενοποιημένου δείγματος φυτού 1:10 (w/v) σε διάλυμα PBS-Tween που περιείχε 2% πολυινυλρυγλιτολιδόνη 40 και 20 mM DIECA, το οποίο είχε φυγοκεντρηθεί σε 10.000 rpm για 10 min. Το δείγμα έμεινε στους 4°C για 17 h και ακολούθησαν δυο πλυσίματα με PBS-Tween και ένα με απεσταγμένο νερό. Έγινε ιοποθέτηση 10 µl μίγματος της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής (RT) [50mM Tris-Cl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Tritonx100, 25 mM DTT,

20 U RNase Inhibitor (Life Technologies), 625  $\mu$ M dNTPs, 500 ng ανοδικός εκκινητής, 200 U M-MLV RT (Life Technologies)] και για επώαση 45 min στους 42°C. Ακολούθησε τοποθέτηση 40  $\mu$ l μίγματος της PCR [20 mM Tris-Cl, pH 8.4, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 250  $\mu$ M dNTPs, 500 ng καθοδικός εκκινητής, 2 U Taq DNA polymerase (Life Technologies)]. Οι σωληνίσκοι τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή (MS Research Inc.), ειωάστηκαν για 5 min στους 95°C, ακολούθησαν 40 κύκλοι των 20 sec στους 92°C, 20 sec στους 56°C, 40 sec στους 72°C και τέλος ένας κύκλος για 10 min στους 72°C.

Η ανάλυση των προϊόντων της PCR (10  $\mu$ l) έγινε με ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτρική αгарόζη 1,5% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE (89 mM tris-βορικό, 89 mM βορικό οξύ, 2 mM EDTA). Στην ηλεκτρική προστέθηκε 0,5%  $\mu$ g/ml βρωμιούχο αιθύδιο. Το μέγεθος των ζωνών DNA εκτιμήθηκε βάσει μάρτυρα μοριακού βάρους DNA (1kb, Life Technologies).

#### Αλληλούχηση προϊόντων PCR και σύγκριση ακολουθιών

Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR έγινε σε αυτόματο μηχάνημα αλληλούχησης Perkin Elmer ABI-Prism 377 με τη χρησιμοποίηση του εκκινητή N1b, ενώ και οι εκκινητές P4 ή P4G1 χρησιμοποιήθηκαν σε περιπτώσεις που χρειάστηκε επιβεβαίωση.

Η ευθυγράμμιση και φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα ClustalX<sup>12</sup>. Ο υπολογισμός των φυλογενετικών δένδρων έγινε με τη μέθοδο Neighbor-joining, οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με βάση τους συντελεστές Kimura<sup>13</sup> και η αποτύπωση του δένδρου έγινε με το πρόγραμμα Treeview<sup>14</sup>.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Απομονώσεις του ιού και έλεγχος βιολογικών χαρακτηριστικών της απομόνωσης Gr6

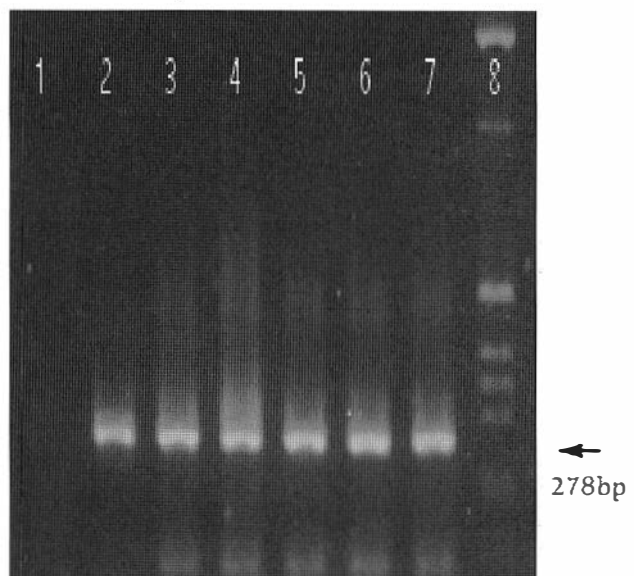
Οι περισσότερες απομονώσεις του ιού προήλθαν από καλλιέργειες μαρουλιού όπου τα προσβεβλημέ-

να φυτά έφεραν συνήθως συμπτώματα διαφάνειας των νευρώσεων και μωσαϊκού, ενώ σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε έντονη χλώρωση και καχεκτική ανάπτυξη (LMV-Gr17). Το καλλωπιστικό είδος *Dimorphotheca* sp., έδειχνε χλωρωτικές κηλίδες και δακτυλίους στα φύλλα σε μεγάλο ποσοστό των φυτών που παρατηρήθηκαν και τέλος, το άγριο μαρούλι (*Lactuca serriola*), από το οποίο απομονώθηκε ο ιός στην Κρήτη, έφερε συμπτώματα ελαφρού μωσαϊκού.

Εξέταση, με τη μέθοδο ELISA, 220 φυταρίων προερχομένων από σπόρο φυτών της ευαίσθητης ποικιλίας Trocadero μολυσμένων με την απομόνωση LMV-Gr6 έδωσε αρνητικά αποτελέσματα. Φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας Mantilia που είχαν μολυνθεί με την ίδια απομόνωση ήταν θετικά στην ELISA και έφεραν χαρακτηριστικά συμπτώματα μωσαϊκού.

### Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων του LMV

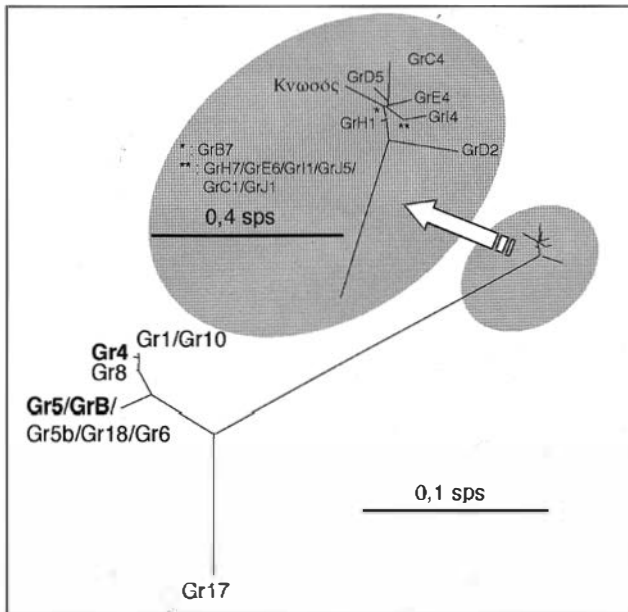
Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται τα προϊόντα της PCR, έξι απομονώσεων του ιού, του αναμενόμενου μεγέθους 278 ζευγών βάσεων που χρησιμοποιήθη-



ΕΙΚΟΝΑ 1. Προϊόντα ενίσχυσης 278 ζευγών βάσεων της περιοχής ένωσης των γονιδίων N1b και CP έξι απομονώσεων του LMV (διαδρομές 2-7). Διαδρομή 1: Υγιής μάρτυρας, διαδρομή 8: Μάρτυρας μοριακού βάρους (1kb DNA ladder, Life Technologies).

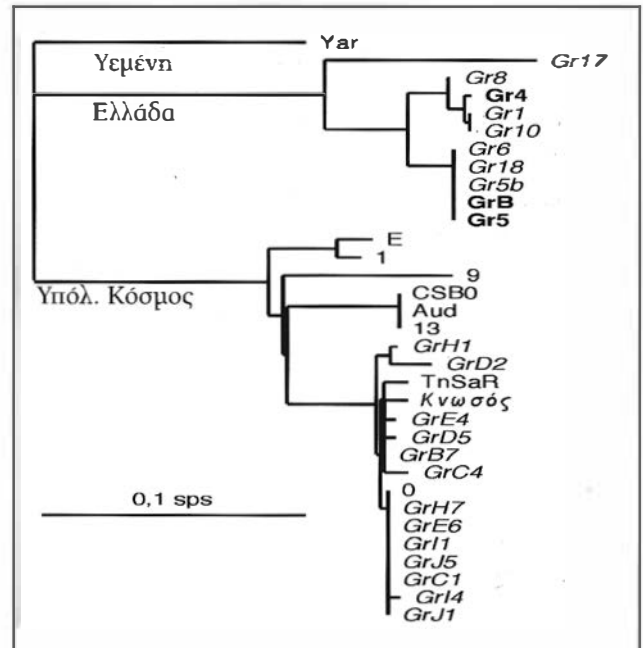
καν για την άμεση αλληλούχηση και στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι κωδικοί πρόσβασης στη βάση GenBank των αλληλουχιών νουκλεοτιδίων όλων των απομονώσεων μεταξύ των θέσεων 8936 και 9151. Όλες είχαν τον ίδιο αριθμό νουκλεοτιδίων εκτός από την απομόνωση GrH1 από την αλληλουχία της οποίας έλειπαν τρία νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν μια ασπαραγίνη (θέση 9011-9013). Όλες όμως οι απομονώσεις έφεραν κοντά στο 5' άκρο της καψιδικής τους πρωτεΐνης την αλληλουχία αμινοξέων Asp-Ala-Gly (DAG) που έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στη μετάδοση των roty-ιών με τις αφίδες-φορείς τους<sup>15</sup>.

Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται το δενδρόγραμμα που σχηματίζουν οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των απομονώσεων και το οποίο δείχνει τη μοριακή τους συγγένεια. Στο σχηματισμό του συμπεριλήφθηκαν οι τρεις ελληνικές απομονώσεις που έχουν περιγραφεί από τον Revers et al.<sup>3</sup> (LMV-Gr4 με κωδικό Z78229,



ΕΙΚΟΝΑ 2. Δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε από φυλογενετική ανάλυση αλληλουχιών της περιοχής ένωσης των γονιδίων NIb και CP ελληνικών απομονώσεων του LMV με τη μέθοδο Neighbor-joining. Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με βάση τους συντελεστές Kimura. Οι κλίμακες αντιπροσωπεύουν απόσταση 0,1 και 0,4 αλλαγών ανά θέση.

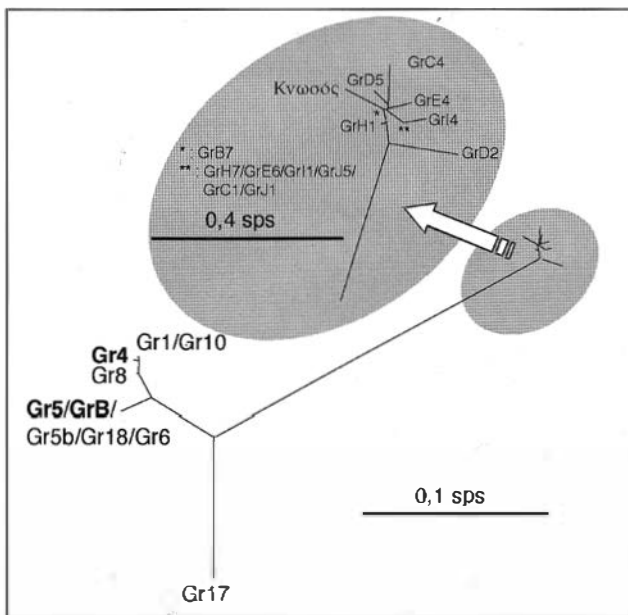
LMV-Gr5 με κωδικό Z78228 και LMV-GrB με κωδικό Z78230). Σχηματίζονται δυο φυλογενετικές ομάδες, επτά ομαδοποιούνται με τις απομονώσεις που προαναφέρθηκαν και μόνο η LMV-Gr17 φαίνεται να διαφοροποιείται κάπως διακλαδίζομενη μόνη της, ενώ οι υπόλοιπες 14 δημιουργούν δική τους ομάδα. Για να βρεθεί η συγγένεια των ελληνικών με τις υπόλοιπες γνωστές απομονώσεις του ιού δημιουργήθηκε ένα δεύτερο δενδρόγραμμα (Εικόνα 3). Οι κωδικοί πρόσβασης των ξένων απομονώσεων στη βάση GenBank ήταν: LMV-0 X907704, LMV-1 Z78225, LMV-13 Z78223, LMV-9 Z78226, LMV-Aud Z78224, LMV-E X97705, LMV-Yar Z78227, LMV-CSBO AF368951, LMV-TnSaR AF368999. Οι 14 απομονώσεις που αναφέρθηκαν πιο πάνω ομαδοποιούνται μαζί με τη γνωστή γαλλική απομόνωση LMV-0, η οποία είναι ήπιας παθογένειας, δεν μολύνει ποικιλίες με τα γονίδια ανθεκτικότητας *mo1*<sup>1</sup> και *mo1*<sup>2</sup>, αλλά έχει την ικανότητα να μεταδίδεται με το σπόρο<sup>1</sup>.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε από φυλογενετική ανάλυση αλληλουχιών της περιοχής ένωσης των γονιδίων NIb και CP ελληνικών και ξένων δημοσιευμένων απομονώσεων του LMV με τη μέθοδο Neighbor-joining. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει απόσταση 0,1 αλλαγών ανά θέση.

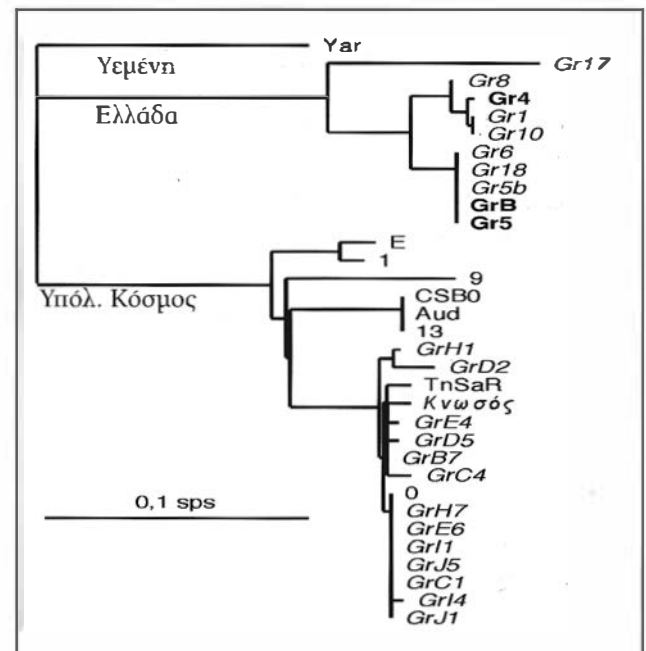
καν για την άμεση αλληλούχηση και στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι κωδικοί πρόσβασης στη βάση GenBank των αλληλουχιών νουκλεοτιδίων όλων των απομονώσεων μεταξύ των θέσεων 8936 και 9151. Όλες είχαν τον ίδιο αριθμό νουκλεοτιδίων εκτός από την απομόνωση GrH1 από την αλληλουχία της οποίας έλειπαν τρία νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν μια ασπαραγγίνη (θέση 9011-9013). Όλες όμως οι απομονώσεις έφεραν κοντά στο 5' άκρο της καψιδικής τους πρωτεΐνης την αλληλουχία αμινοξέων Asp-Ala-Gly (DAG) που έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στη μετάδοση των roty-ιών με τις αφίδες-φορείς τους<sup>15</sup>.

Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται το δενδρόγραμμα που σχηματίζουν οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των απομονώσεων και το οποίο δείχνει τη μοριακή τους συγγένεια. Στο σχηματισμό του συμπεριλήφθηκαν οι τρεις ελληνικές απομονώσεις που έχουν περιγραφεί από τον Revers et al.<sup>3</sup> (LMV-Gr4 με κωδικό Z78229,



ΕΙΚΟΝΑ 2. Δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε από φυλογενετική ανάλυση αλληλουχιών της περιοχής ένωσης των γονιδίων NIb και CP ελληνικών απομονώσεων του LMV με τη μέθοδο Neighbor-joining. Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με βάση τους συντελεστές Kimura. Οι κλίμακες αντιπροσωπεύουν απόσταση 0,1 και 0,4 αλλαγών ανά θέση.

LMV-Gr5 με κωδικό Z78228 και LMV-GrB με κωδικό Z78230). Σχηματίζονται δυο φυλογενετικές ομάδες, επτά ομαδοποιούνται με τις απομονώσεις που προαναφέρθηκαν και μόνο η LMV-Gr17 φαίνεται να διαφοροποιείται κάπως διακλαδίζομενη μόνη της, ενώ οι υπόλοιπες 14 δημιουργούν δική τους ομάδα. Για να βρεθεί η συγγένεια των ελληνικών με τις υπόλοιπες γνωστές απομονώσεις του ιού δημιουργήθηκε ένα δεύτερο δενδρόγραμμα (Εικόνα 3). Οι κωδικοί πρόσβασης των ξένων απομονώσεων στη βάση GenBank ήταν: LMV-0 X907704, LMV-1 Z78225, LMV-13 Z78223, LMV-9 Z78226, LMV-Aud Z78224, LMV-E X97705, LMV-Yar Z78227, LMV-CSBO AF368951, LMV-TnSaR AF368999. Οι 14 απομονώσεις που αναφέρθηκαν πιο πάνω ομαδοποιούνται μαζί με τη γνωστή γαλλική απομόνωση LMV-0, η οποία είναι ήπιας παθογένειας, δεν μολύνει ποικιλίες με τα γονίδια ανθεκτικότητας *mo1*<sup>1</sup> και *mo1*<sup>2</sup>, αλλά έχει την ικανότητα να μεταδίδεται με το σπόρο<sup>1</sup>.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Δενδρόγραμμα που δημιουργήθηκε από φυλογενετική ανάλυση αλληλουχιών της περιοχής ένωσης των γονιδίων NIb και CP ελληνικών και ξένων δημοσιευμένων απομονώσεων του LMV με τη μέθοδο Neighbor-joining. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει απόσταση 0,1 αλλαγών ανά θέση.

## SUMMARY

C. VARVERI<sup>1</sup>, M. PEYPELUT<sup>2</sup>, O. I.E GALL<sup>2</sup>, T. CANDRESSE<sup>2</sup>. Molecular characterization of Greek LMV isolates. *Hellenic Virology* 2002, 7: 50 - 57

<sup>1</sup>Benaki Phytopathological Institute, Laboratory of Virology, 14 561 Kifissia, Greece;

<sup>2</sup>UMR GD2P, IBVM, INRA, BP81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France.

*Lettuce mosaic virus* (genus: *Potyvirus*) causes important disease in lettuce and has been known to exhibit both biological and molecular variability. The three Greek isolates that had already been molecularly analyzed in the past, formed a distinct phylogenetic group. These isolates were also characterized by severe pathogenicity, capability of breaking the resistance conferred by *mo1*<sup>1</sup> and *mo1*<sup>2</sup> genes and inability to be seed transmitted. This last property provides a potential explanation for why they apparently remained restricted to Greece. In 1999 and 2000, 21 more Greek LMV isolates of various origin were characterized. Isolate characterization involved amplification of the 3' part of the *Nlb* and the 5' part of the coat protein regions of the virus genome using two primer combinations and direct sequencing of the products. The sequence comparison revealed that 7 of the isolates belonged to the Greek group of isolates. The biological characteristics of one of these isolates matched those previously identified. The other 14 isolates belonged to the Rest of World group (LMV-RoW) which includes isolates from all parts of the world, like the well characterized LMV-0 that is seed-transmitted but not resistance breaking. The Greek isolates belonging to LMV-RoW branch together with LMV-0. It is very probable that these isolates, for the first time identified in Greece, have been introduced with infected lettuce seed and they are thereafter spreading easily by infected seed or aphids with a tendency to become the dominant ones.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Dinant S, Lot H: Lettuce Mosaic Virus: a review. *Plant Pathology* 1992, 41: 528-542.
- Bos L, Huijberts N, Cuperus C: Further observations on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (*Lactuca sativa*) and a discussion of resistance terminology. *Eur J Plant Pathol* 1994, 100: 293-314.
- Revers F, Lot H, Souche S et al: Biological and molecular variability of Lettuce mosaic virus isolates. *Phytopathology* 1997, 87:397-403.
- Kyriakopoulou PE: A lethal strain of lettuce mosaic virus in Greece. *Phytoparasitica* 1985, 13:271.
- Bem F, Kyriakopoulou PE: Lettuce virus diseases in Greece. In *Proceedings of 6th Congress of Mediterranean Phytopathological Union, Cairo, Egypt 1-6 Oct. 1984*, 16-19.
- Pink DAC, Lot H, Johnson R: Novel pathotypes of lettuce mosaic virus - breakdown of a durable resistance? *Euphytica* 1992, 63:169-174.
- Stangarlin OS, Pavan MA, Silva N: Occurrence of a new pathotype of Lettuce mosaic virus on Lettuce in Brazil. *Plant Disease* 2000, 8: 490.
- German-Retana S, Candresse T, Alias E et al.: Effects of green fluorescent protein or  $\beta$ -glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking Lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol plant-Microbe Interact* 2000, 13: 316-324.
- Redondo E, Krause-Sakate E, Yang S-J et al: Lettuce mosaic virus pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol Plant-Microbe Interact* 2001, 14: 804-810.
- Μημε Φ: Ο ίός του μωσαϊκού του μαρουλιού στην Ελλάδα. Εις Περιλήψεις Ανακοινώσεων Α' Πανελληνίου Συνεδρίου επί των Ασθενειών και Εχθρών των Φυτών, Αθήνα, 5-7 Οκτ. 1983, 29-30.
- Clark MF, Adams AN: Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 1977, 34: 475-483.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids*



Research 1994, 22: 4673-4680.

13. Kimura M: A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980, 16:111-120.
14. Page RDM: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 1996, 12: 357-358.
15. Atreya PL, Atreya CD, Pirone T: Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1991, 88: 7887-7897.
16. Manoussopoulos IN, Chatzivassiliou EK, Smyrnioudis IN et al: Two diseases of *Dimorphotheca* caused by lettuce mosaic potyvirus and tomato spotted wilt tospovirus. *Phytoparasitica* 1999, 27, 3: 227-232.
17. Revers F, van der Vlugt RAA, Souche S et al: Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the genome of four Lettuce mosaic virus isolates from Greece and Yemen. *Archives of Virology* 1999, 144 : 1619-1626.