

Received: 24.02.2016 / Accepted: 09.07.2016

## Allexiviruses – pathogens of garlic plants

## Allexiwirusy – patogeny czosnku pospolitego

Maria Bereda\*, Elżbieta Paduch-Cichal

### Summary

Garlic (*Allium sativum* L.) is one of the most important culinary herbs in Poland. Viral diseases are among the most serious threats to garlic cultivation. As garlic is vegetatively propagated, virus infections are transmitted from one crop cycle to another through infected cloves. The most common viruses infecting garlic plants are members of three families: Potyviridae (genus *Potyvirus*), Betaflexiviridae (genus *Carlavirus*) and Alphaflexiviridae (genus *Allexivirus*). These viruses have similar morphological properties and often similar biology, thus it is very difficult to distinguish them. Eight virus species belong to the genus *Allexivirus*: *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D), *Garlic virus E* (GarV-E), *Garlic virus X* (GarV-X) and *Shallot virus X* (ShVX). Infections of allexiviruses can cause severe losses in garlic production fields such as – decrease in bulbs' weight (14–32%) and reduction of their diameter (6–11%). Phylogenetic analysis based on nucleotide, as well as amino acid sequences of different genome fragments, has revealed genetic diversity within populations of allexiviruses. Furthermore, the diagnostic methods used for detection of viruses that belong to the genus *Allexivirus* occurring in garlic plants are described.

**Key words:** garlic; allexiviruses; genom; genetic diversity; diagnostic methods

### Streszczenie

Czosnek pospolity (*Allium sativum* L.) jest jedną z najważniejszych roślin przyprawowych uprawianych w Polsce. Ze względu na to, że jest to roślina rozmnażana jedynie w sposób wegetatywny, wirusy przenoszone są z jednego cyklu uprawy na kolejny wraz z zainfekowanymi cebulami. Czosnek jest porażany przede wszystkim przez wirusy należące do trzech rodzin: Potyviridae (rodzaj *Potyvirus*), Betaflexiviridae (rodzaj *Carlavirus*) i Alphaflexiviridae (rodzaj *Allexivirus*). Są to wirusy o zbliżonej morfologii oraz właściwościach biologicznych, dlatego istnieją trudności w rozdzieleniu kompleksu tych wirusów. Do rodzaju *Allexivirus* należy osiem gatunków wirusów: przenoszony przez szpeciele nitkowaty wirus czosnku (*Garlic mite-borne filamentous virus*, GarMbFV), wirus A czosnku (*Garlic virus A*, GarV-A), wirus B czosnku (*Garlic virus B*, GarV-B), wirus C czosnku (*Garlic virus C*, GarV-C), wirus D czosnku (*Garlic virus D*, GarV-D), wirus E czosnku (*Garlic virus E*, GarV-E), wirus X czosnku (*Garlic virus X*, GarV-X) i wirus X szalotki (*Shallot virus X*, ShVX). Obecność allexiwirusów w roślinach czosnku jest przyczyną spadku plonu – redukcja ciężaru cebul (14–32%) oraz ich średnicy (6–11%). Na podstawie wyników przeprowadzonych analiz filogenetycznych, opartych na budowie sekwencji nukleotydów i aminokwasów różnych fragmentów genomu poszczególnych gatunków ustalono, że allexiwirusy są zróżnicowane genetycznie. Ponadto przedstawiono metody diagnostyczne wykorzystywane do wykrywania i identyfikacji allexiwirusów w roślinach czosnku pospolitego.

**Słowa kluczowe:** czosnek; allexiwirusy; genom; zróżnicowanie genetyczne; diagnostyka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Samodzielny Zakład Fitopatologii  
Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

\*corresponding author: maria\_bereda@sggw.pl

## Wstęp / Introduction

Czosnek pospolity (*Allium sativum* L.) należy do rodziny czosnkowatych (Alliaceae), rzędu amarylkowców (Amaryllidales). Pochodzi z okolicy gór Tien-szan położonych w Azji centralnej. Jest jedną z najstarszych, znanych od około 7 tysięcy lat roślin uprawnych, a ze względu na swoje właściwości nie tylko cenioną i bardzo popularną przyprawą, ale również uznaną rośliną wykorzystywaną w celach leczniczych.

Uprawy czosnku pospolitego zlokalizowane są w różnych rejonach świata, głównie na terenie Chin, Indii i Korei Południowej oraz w krajach basenu Morza Śródziemnego (Hiszpania, Francja, Egipt, Turcja), w Ameryce Południowej (Argentyna, Brazylia), Ameryce Północnej (Meksyk, USA) i Rosji (FAO 2011). W Polsce czosnek pospolity jest uprawiany przede wszystkim na terenie województw: małopolskiego (gminy Radziemice i Słomniki), mazowieckiego (gmina Latowicz), lubuskiego (gmina Chełm) i wielkopolskiego (gminy Dobrzyca i Goleśzów).

Obserwowany w ostatnich latach wzrost zainteresowania czosnkiem pospolitym wynika z jego walorów smakowych i właściwości prozdrowotnych, co wiąże się z koniecznością pozyskiwania wysokiej jakości surowca zarówno dla przemysłu farmaceutycznego, jak i spożywczego. Tymczasem uzyskanie zdrowych, pełnowartościowych cebul nie jest łatwe głównie ze względu na powszechne występowanie chorób wywoływanych przez czynniki infekcyjne, w okresie wegetacji są to grzyby: *Fusarium oxysporum*, *F. avenaceum*, *Pyrenochaeta terrestris*, *P. verrucosum* var. *cyclopium*, *Sclerotium cepivorum*, *Botrytis* sp., a podczas przechowywania bakterie z rodzaju: *Bacillus*, *Erwinia* i *Pseudomonas*.

Szczególne zagrożenie dla czosnku pospolitego stanowią wirusy. Większość uprawianych odmian czosnku pospolitego nie wytwarza nasion, dlatego roślina rozmnażana jest jedynie wegetatywnie przez ząbki i cebulki powietrzne (Etoh 1985; Simon i Jenderek 2003). Powszechnie uważa się, że gatunki roślin rozmnażane wegetatywnie są szczególnie zagrożone przez choroby wirusowe. Przyczyną tego jest nieuchronność przeniesienia wirusa. Z chorej rośliny matecznej zawsze uzyskuje się zawirusowane organy służące do rozmnażania. Drugim czynnikiem jest zjawisko wirusowej degeneracji roślin (Kryczyński 2010). Dodatkowo w trakcie uprawy i przechowywania cebul czosnku pospolitego wirusy mogą być przenoszone przez wektory: owady (mszyce) lub pajęczaki (szpeciele) (King i wsp. 2012). W roślinach czosnku pospolitego wykryto różne gatunki wirusów z rodzajów: *Potyvirus*, *Carlavirus*, *Cucumovirus*, *Tobravirus*, *Tobamovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nepovirus*, *Tospovirus* oraz *Macluravirus*.

Jednym z ważniejszych zagrożeń w uprawie czosnku pospolitego są gatunki wirusów należące do rodzaju *Allexivirus* ze względu na sposób ich rozprzestrzeniania wraz z materiałem rozmnożeniowym oraz przeniesienie w okresie wegetacji.

Poznanie biologii i epidemiologii allexiwirusów ma bardzo istotne znaczenie dla praktyki, zwłaszcza dla służb Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa (PIORiN) oraz polskich producentów i w przyszłości

pozwoli na podjęcie działań zmierzających do poprawy perspektywy uprawy czosnku pospolitego w Polsce.

Niniejszy artykuł jest przeglądem piśmiennictwa dotyczącego wirusów zaliczonych do rodzaju *Allexivirus*. Intencją autorów niniejszej pracy było zaprezentowanie zamieszczonych w literaturze przedmiotu zagadnień związanych z występowaniem, szkodliwością, etiologią, epidemiologią, różnicowaniem genetycznym allexiwirusów oraz możliwościami wykrywania i identyfikacji tej grupy patogenów w roślinach czosnku pospolitego.

## Ogólna charakterystyka wirusów z rodzaju *Allexivirus* / Characterization of viruses of the genus *Allexivirus*

Gatunki należące do rodzaju *Allexivirus* są nową, mało poznaną grupą wirusów porażających rośliny należące do rodzaju *Allium*. Pierwsze doniesienia dotyczące przenoszonych przez szpeciele wirusów porażających rośliny cebuli zwyczajnej pochodzą z 1971 roku z terenów obecnej Rosji (Razvjazkina 1971). W 1991 roku Van Dijk opisał dwa gatunki wirusów na terenie Holandii, których wektorem był szpeciel (*Aceria tulipae*) i nadał im nazwy: przenoszony przez szpeciele utajony wirus cebuli (*Onion mite-borne latent virus*, OMbLV) oraz przenoszony przez szpeciele utajony wirus szalotki (*Shallot mite-borne latent virus*, SMbLV). Na podstawie cech morfologicznych i cytopatologicznych autor zaklasyfikował wyizolowane wirusy do rodzaju *Rymovirus* (rodzina Potyviridae). Późniejsze badania oparte na właściwościach serologicznych wykazały, że uzyskane izolaty są serologicznie podobne do wirusa X szalotki (*Shallot virus X*, ShVX) (Van Dijk i Van der Vlugt 1994). Od tego momentu, kolejnym wykrywanym w roślinach czosnku pospolitego przenoszonym przez szpeciele wirusom nadawano nazwy: wirus A czosnku (*Garlic virus A*, GarV-A), wirus B czosnku (*Garlic virus B*, GarV-B), wirus C czosnku (*Garlic virus C*, GarV-C) oraz wirus D czosnku (*Garlic virus D*, GarV-D) (Sumi i wsp. 1993) i na podstawie podobieństwa sekwencji nukleotydów przyporządkowano do jednego rodzaju – *Allexivirus* (Hillman i Lawrence 1995).

Obecnie do rodzaju *Allexivirus* należą następujące gatunki wirusów (IX Raport ICTV) (King i wsp. 2012): nitkowaty wirus czosnku przenoszony przez szpeciele (*Garlic mite-borne filamentous virus*, GarMbFV), wirus A czosnku (*Garlic virus A*, GarV-A), wirus B czosnku (*Garlic virus B*, GarV-B), wirus C czosnku (*Garlic virus C*, GarV-C), wirus D czosnku (*Garlic virus D*, GarV-D), wirus E czosnku (*Garlic virus E*, GarV-E), wirus X czosnku (*Garlic virus X*, GarV-X) i wirus X szalotki (*Shallot virus X*, ShVX).

Cząstki wirusów z rodzaju *Allexivirus* są nitkowate, mocno powyginane o średnicy około 12 nm i długości około 800 nm (King i wsp. 2012).

Dotychczas sądzono, że gatunki należące do rodzaju *Allexivirus* porażają w naturze jedynie rośliny z rodzaju *Allium* (Van Dijk 1991; Van Dijk i Van der Vlugt 1994). Tymczasem Fidan i wsp. (2015) wykryli GarV-D w 41 próbach urchiny morskiej (*Urginea maritima* L., rodzi-

na Hyacinthaceae) pochodzącej z krajów basenu Morza Śródziemnego.

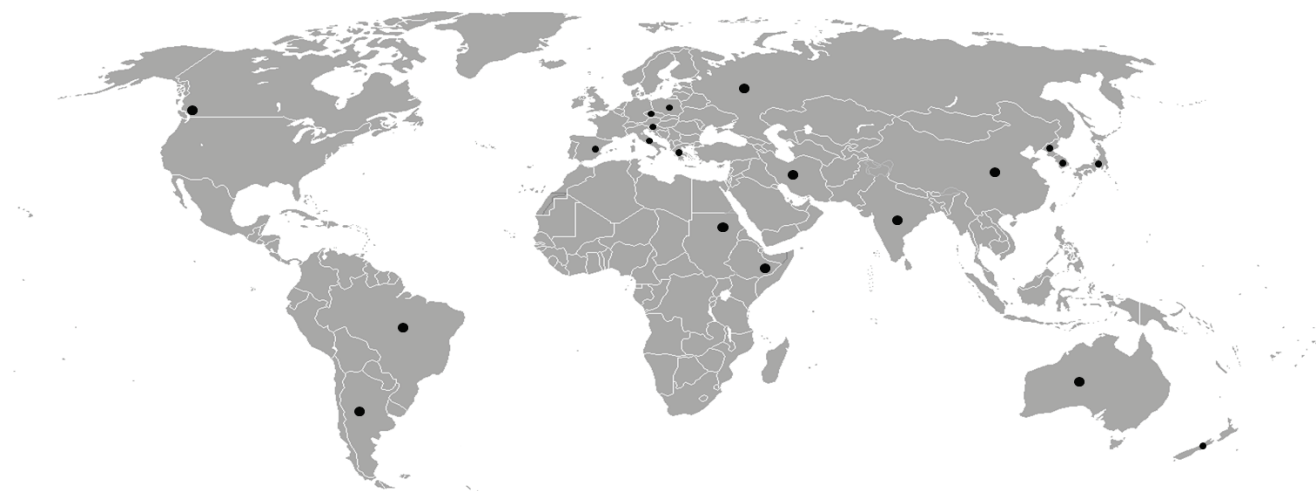
Allexiwirusy są rozprzestrzeniane z materiałem rozmnożeniowym, a w okresie wegetacji i podczas przechowywania cebul ich wektorem jest szpiciel *Aceria tulipae* (Van Dijk 1991).

Gatunki należące do rodzaju *Allexivirus* notowano w roślinach czosnku pospolitego na terenie Argentyny (Conci i wsp. 1992; Cafrune i wsp. 2006), Australii (Wylie i wsp. 2012b), Brazylii (Melo-Filho i wsp. 2004; Mituti i wsp. 2015), Chin (Chen i wsp. 2001), Czech (Klukáčková i wsp. 2007), Etiopii (Jemal i wsp. 2015), Grecji (Dovas i wsp. 2001), Hiszpanii (Tabanelli i wsp. 2004), Indii (Singh i wsp. 2014), Iranu (Shahraeen i wsp. 2008), Japonii (Sumi i wsp. 1993; Yamashita i wsp. 1996; Sumi i wsp. 1999), Korei (Park i wsp. 2005; Lee i wsp. 2007), Nowej Zelandii (Ward i wsp. 2009), Słowenii (Mavric i Ravnikar 2005), Sudanu (Mohammed i wsp. 2013), Rosji (Kanyuka i wsp. 1992), Stanów Zjednoczonych (Gieck i wsp. 2009), Polski (Chodorska i wsp. 2014) oraz Włoch (Dovas i Volvas 2003). Na rysunku 1. zaprezentowano schemat rozmieszczenia allexiwirusów na świecie.

Szkodliwość gatunków wirusów należących do rodzaju *Allexivirus* wiąże się z pogorszeniem jakości uzyskiwanego plonu. Badania przeprowadzone na polach uprawnych w Argentynie wykazały, że porażenie przez GarV-A roślin czosnku pospolitego odmiany Blanco i Morado skutkowało obniżeniem ciężaru cebul (14–32%) oraz redukcją średnicy cebul (6–11%) w stosunku do plonu uzyskanego z roślin zdrowych. W przypadku zakażenia materiału roślinnego przez GarV-C notowano spadek ciężaru cebul wynoszący 15% oraz zmniejszenie ich średnicy o 5% (Cafrune i wsp. 2006). Podobne wyniki badań uzyskali Perotto i wsp. (2010), którzy sprawdzali wpływ porażenia GarV-A i GarV-C na ciężar cebul czosnku pospolitego odmiany Blanco. Wykazali oni również, że w przypadku dodatkowego porażenia materiału roślinnego przez wirus karłowatości cebuli (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) i/lub wirus żółtej pasiastości pora (*Leek yellow stripe virus*, LYSV) spadek ciężaru cebul wynosił od 25 do 43%.

Bardzo rzadko rośliny czosnku pospolitego są porażane przez jeden gatunek wirusa należący do rodzaju *Allexivirus*. Zazwyczaj są to infekcje mieszane na co wskazują dane prezentowane przez Bos (1983), Fujisawa (1989), Walkey i Antill (1989), Walkey (1990), Conci i wsp. (1992, 2010), Van Dijk (1993), Takaichi i wsp. (1998), Majumder i wsp. (2008, 2014) oraz Kumar i wsp. (2010).

W Brazylii dominującymi gatunkami były GarV-D i GarV-A (Oliveira i wsp. 2014; Mituti i wsp. 2015), natomiast GarV-X notowano w 16,55% badanych prób. W Grecji, Dovas i wsp. (2001) wykrywali GarV-D w 67% testowanych prób, zaś GarV-C w 62% prób. Według Jemal i wsp. (2015) w czosnku pochodzącym z Etiopii GarV-B występuje w 17,7% testowanych prób, a GarV-C w 4,8%. W Polsce, Bereda (2015) wykazała, że najczęściej badanych roślin było porażonych przez GarV-X (72,91% prób), GarV-B (71,18% prób) i GarV-D (60,76% prób), podczas gdy GarV-A, GarV-C i GarV-E wykrywano średnio w 18,86% prób. Ponadto autorka wskazała, że cebule czosnku pospolitego importowane z Chin, Egiptu, Hiszpanii i Meksyku znajdujące się w obrocie handlowym na terenie Polski były porażane przez GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E lub GarV-X. Największą liczbę zakażonych prób odnotowywano w materiale pochodzącym z Egiptu (70%) oraz Meksyku (68%), podczas gdy średnio w 37% badanych prób cebul pochodzących z Chin i Hiszpanii wykrywano powyższe patogeny. Najczęściej w testowanych roślinach notowano wirus D czosnku (93% prób), zaś wirus C czosnku był obecny w zaledwie 3% badanych prób. Podobnie Parrano i wsp. (2012) wykrywali wirus X czosnku w materiale z Chin, a Wylie i wsp. (2014) wykrywali GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarV-E i GarV-X w materiale importowanym z Hiszpanii i Meksyku. Zjawisko to potwierdzają Melo-Filho i wsp. (2004) oraz Oliveira i wsp. (2014), którzy podkreślali dużą rolę importu czosnku z Europy, Azji i Argentyny w pojawianiu się zupełnie nowych, dotychczas nieznanymi gatunków wirusów w różnych odległych rejonach świata, w tym przypadku na obszarze Brazylii.



Rys. 1. Rozmieszczenie występowania allexiwirusów na świecie  
Fig. 1. Distribution of allexiviruses occurrence in the world

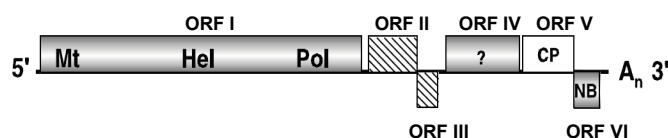
Wydaje się, że obecność poszczególnych gatunków allexiwirusów w badanym materiale jest dość przypadkowa. Nie obserwuje się dominacji jednego określonego gatunku wirusa, na co wskazywali także w swoich badaniach Dovas i wsp. (2001) oraz Fayad-André i wsp. (2011). Najprawdopodobniej jest to związane z przenoszeniem wirusów przez *A. tulipae* głównie podczas przechowywania cebul, co było już wcześniej sugerowane przez Mann i Minges (1958). Przypadkowość dominacji w uprawach czosnku pospolitego określonych gatunków allexiwirusów może być związana z efektywnością przenoszenia przez wektor, co dotychczas nie zostało poparte badaniami naukowymi, podobnie jak mechanizm nabywania allexiwirusów przez *A. tulipae*. Zatem dokładne wyjaśnienie mechanizmu przenoszenia allexiwirusów przez szpeciela oraz korelacji między tymi patogenami i ich wektorem jest w obecnej chwili niemożliwe. Badania potwierdzają jedynie, że w ciele wektora są obecne allexiwirusy (Van Dijk 1991), a także, że po kolonizacji przez *A. tulipae* zdrowych roślin czosnku pospolitego obserwowane są żółte smugi na zdeformowanych liściach (Kang i wsp. 2007).

Występowanie mieszanych infekcji w roślinach czosnku pospolitego jest przyczyną dużych trudności w rozdzieleniu kompleksu wirusów i dokładnej identyfikacji gatunków. Zbyt wąski zakres roślin żywicielskich (rodzaj *Allium*) oraz roślin wskaźnikowych (*Chenopodium murale*) i wspólne ich przenoszenie przez szpeciela (*A. tulipae*) powoduje komplikacje w ustaleniu charakterystyki biologicznych właściwości.

### Budowa genomu allexiwirusów / Construction of allexiviruses genome

Genom wirusów należących do rodzaju *Allexivirus* stanowi liniowa, pojedyncza nić, plus RNA [single stranded RNA, ssRNA (+)]. Wielkość genomu w zależności od gatunku wirusa waha się od 8000 do 9000 nukleotydów (nt) (Chen i Chen 2002; Adams i wsp. 2004). Na końcu 3' znajduje się łańcuch poli(A) zbudowany z kilkudziesięciu nukleotydów adeninowych. Organizacja genomu jest jednakowa dla wszystkich gatunków należących do rodzaju *Allexivirus*.

W genomie allexiwirusów można wyróżnić sześć otwartych ramek odczytu (open reading frame, ORF) (Adams i wsp. 2004) (rys. 2).



Rys. 2. Budowa genomu allexiwirusów  
Fig. 2. Construction of allexiviruses genome

Pierwsza ramka odczytu, ORF I koduje białko enzymatyczne – replikazę RNA (RNA replicase) o masie cząsteczkowej (m. cz.) 174-176 kDa, posiadającą domeny polimerazy RNA zależnej od RNA (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) (S-G-X<sub>3</sub>-T-X<sub>3</sub>-N-T-X<sub>18-37</sub>-G-D-D),

helikazy (G-X-X-G-X-G-K-S) oraz tzw. zamek leucynowy (leucine zipper) (L-X<sub>6</sub>-L-X<sub>6</sub>-L-X<sub>6</sub>-L) (Chen i Chen 2002). Struktura tego białka jest najbardziej zbliżona do struktury replikazy RNA występującej u przedstawicieli rodzaju *Potexvirus* (Kanyuka i wsp. 1992).

ORF II koduje białko (m. cz. 26-27 kDa) analogiczne do białka TGB1 (triple gene block, TGB1) kodowanego przez ORF I obecnego u przedstawicieli rodzaju *Carla*- i *Potexvirus*. Występowanie tej wysoce konserwatywnej domeny wiążącej, tożsamej z domeną występującą w ORF I, sugeruje że może ono pełnić funkcję NTP-zależnej DNA helikazy (NTP-dependent DNA helicase). Ponadto, białko to jest bogate w leucynę (12%) (Zimmermann 1987; Forster i wsp. 1988; Zavriev i wsp. 1991).

ORF III koduje białko (m. cz. 11-12 kDa) homologiczne do białka TGB2 (triple gene block, TGB2) *carla*- i *potex*wirusów. W przypadku wirusa mozaiki koniczyny (*White clover mosaic virus*, WCIMV) należącego do rodzaju *Potexvirus* produkt tej ramki odczytu uczestniczy w przenoszeniu wirionów między komórkami gospodarza (Beck i wsp. 1991).

Białko o masie cząsteczkowej 40 kDa, kodowane przez ORF IV stanowi cechę genomu odróżniającą gatunki należące do rodzaju *Allexivirus* od gatunków należących do rodzaju *Carla*- i *Potexvirus*. Białko o nieznannej funkcji jest bardzo bogate w dwa aminokwasy, tj. serynę (11%) i treoninę (11%) (Chen i Chen 2002).

ORF V koduje białko płaszczą wirusów (coat protein, CP) (m. cz. 28 kDa) (Chen i Chen 2002).

ORF VI koduje białko wiążące kwasy nukleinowe (nucleic acid-binding protein, NABP) (m. cz. 11-15 kDa), które w swojej budowie posiada charakterystyczną dla gatunków należących do rodzaju *Carlavirus*, domenę zawierającą struktury palców cynkowych (zinc finger motif) wiążących kwasy nukleinowe regulujące replikację wirusa (Foster 1992).

Pomiędzy ORF III i ORF IV stwierdzono występowanie dodatkowej otwartej ramki odczytu, nazwanej ORF III-IV, pomimo braku obecności kodonu start (AUG). ORF III-IV koduje białko zawierające konserwatywną domenę (C-V-I-X-I-T-G-E-S-X<sub>2</sub>-G-C) obecną w białku TGB3 (triple gene block, TGB3) u przedstawicieli *carla*- i *potex*wirusów. Przypuszczalnie, translacja ORF III-IV może być inicjowana przez inny kodon (AUU, CUG, UUG), co jest powszechnie występującym zjawiskiem u wirusów roślinnych, np. u wirusa pasiastej mozaiki jęczmienia (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV, rodzina Virgaviridae, rodzaj *Hordeivirus*) i wirusa łagodnej żółtaczkę brzołów liści truskawki (*Strawberry mild yellow edge virus*, SMYEV, rodzina Alphaflexiviridae, rodzaj *Potexvirus*) (Petty i Jackson 1990; Jelkmann i wsp. 1992).

### Zróżnicowanie genetyczne populacji allexiwirusów / Genetic diversity of allexiviruses populations

Dzięki zastosowaniu techniki RT-PCR możliwe było przeprowadzenie molekularnej charakterystyki wirusów z rodzaju *Allexivirus*, która objęła populacje wirusów pochodzących z różnych rejonów świata. Zestawienie danych dotyczących podobieństwa izolatów poszczególnych allexiwirusów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zakres podobieństwa między izolatami poszczególnych gatunków z rodzaju *Allexivirus*  
 Table 1. The range of the similarity between the isolates of each species of the genus *Allexivirus*

Wirus Virus	Identyczność analizowanych sekwencji Identities of analyzed sequences [%]	Analizowany fragment genomu/analizowana sekwencja Analyzed genome fragment/analyzed sequence	Dane literaturowe References
GarMbFV	72–91% 96,6%	białko płaszczka (ORFV)/nt – coat protein (ORFV)/nt białko płaszczka (ORFV)/aa – coat protein (ORFV)/aa	Park i wsp. (2005), Oliveira i wsp. (2014) Melo-Filho i wsp. (2004)
GarV-A	94–96% 81–98% 75–100% 94–99% 99%  91,7%  83,7%	replikaza (ORFI)/aa – replicase (ORFI)/aa TGBI (ORFII)/aa białko płaszczka (ORFV)/nt – coat protein (ORFV)/nt białko płaszczka (ORFV)/aa – coat protein (ORFV)/aa białko wiążące kwasy nukleinowe (ORFVI)/nt – nucleic acid binding protein (ORFVI)/nt białko płaszczka i białko wiążące kwasy nukleinowe (ORFV, ORFVI)/nt – coat protein and nucleic acid binding protein (ORFV, ORFVI)/nt ORFI, ORFII, ORFIII, ORFIV, ORFV i ORFVI/nt – ORFI, ORFII, ORFIII, ORFIV, ORFV and ORFVI/nt	Lee i wsp. (2007) Gawande i wsp. (2015) Koo i wsp. (2002), Oliveira i wsp. (2014) Wylie i wsp. (2012) Koo i wsp. (2002)  Mohammed i wsp. (2013)  Wylie i wsp. (2012)
GarV-B	88–99% 83–100% 95,4%  90–100%  88,8%	białko płaszczka (ORFV)/aa – coat protein (ORFV)/aa białko płaszczka (ORFV)/nt – coat protein (ORFV)/nt białko płaszczka i białko wiążące kwasy nukleinowe (ORFV, ORFVI)/nt – coat protein and nucleic acid binding protein (ORFV, ORFVI)/nt białko wiążące kwasy nukleinowe (ORFVI)/nt – nucleic acid binding protein (ORFVI)/nt ORFI, ORFII, ORFIII, ORFIV, ORFV i ORFVI/nt – ORFI, ORFII, ORFIII, ORFIV, ORFV and ORFVI/nt	Wylie i wsp. (2012) Oliveira i wsp. (2014), Bereda (2015) Mohammed i wsp. (2013)  Bereda (2015)  Wylie i wsp. (2012)
GarV-C	86–92% 69–98% 94–99% 84,1%  70%	replikaza (ORFI)/aa – replicase (ORFI)/aa białko płaszczka (ORFV)/nt – coat protein (ORFV)/nt białko płaszczka (ORFV)/aa – coat protein (ORFV)/aa białko płaszczka i białko wiążące kwasy nukleinowe (ORFV, ORFVI)/nt – coat protein and nucleic acid binding protein (ORFV, ORFVI)/nt ORFI, ORFII, ORFIII, ORFIV, ORFV i ORFVI/nt – ORFI, ORFII, ORFIII, ORFIV, ORFV and ORFVI/nt	Lee i wsp. (2007) Oliveira i wsp. (2014) Melo-Filho i wsp. (2004), Wylie i wsp. (2012) Mohammed i wsp. (2013)  Wylie i wsp. (2012)
GarV-D	85–100%  89–100% 87–100%  87,6%	białko płaszczka (ORFV)/nt – coat protein (ORFV)/nt białko płaszczka (ORFV)/aa – coat protein (ORFV)/aa białko wiążące kwasy nukleinowe (ORFVI)/nt – nucleic acid binding protein (ORFVI)/nt ORFI, ORFII, ORFIII, ORFIV, ORFV i ORFVI/nt – ORFI, ORFII, ORFIII, ORFIV, ORFV and ORFVI/nt	Koo i wsp. (2002), Lanzoni i wsp. (2006), Oliveira i wsp. (2014), Bereda (2015) Melo-Filho i wsp. (2004), Wylie i wsp. (2012) Koo i wsp. (2002), Bereda (2015)  Wylie i wsp. (2012)
GarV-E	95%	replikaza (ORFI)/aa – replicase (ORFI)/aa	Lee i wsp. (2007)
GarV-X	85–93% 80–100% 90,3%  87–100%  90,2%	replikaza (ORFI)/aa – replicase (ORFI)/aa białko płaszczka (ORFV)/nt – coat protein (ORFV)/nt białko płaszczka i białko wiążące kwasy nukleinowe (ORFV, ORFVI)/nt – coat protein and nucleic acid binding protein (ORFV, ORFVI)/nt białko wiążące kwasy nukleinowe (ORFVI)/nt – nucleic acid binding protein (ORFVI)/nt pełen genom/nt – whole genom/nt	Lee i wsp. (2007) Bereda (2015) Mohammed i wsp. (2013)  Bereda (2015)  Chen i wsp. (2001)

Wykonane przez Chen i wsp. (2001) analizy filogenetyczne pełnej sekwencji genomu chińskiego izolatu GarV-X-YH wykazały, że była ona najbardziej podobna do pełnej sekwencji genomu koreańskiego izolatu GarV-X (90,2%), a różniła się o około 200 nt. Zmiana ta na wysokości ORF IV została uznana na podstawie porównania sekwencji nukleotydów genomu powyższych izolatów

wirusa z pełnymi sekwencjami genomu izolatów GarV-X dostępnymi w banku genów za delecję występującą w sekwencji nukleotydów genomu izolatu koreańskiego.

Wyraźnie wyższy procent identyczności otrzymano po analizie filogenetycznej prowadzonej w oparciu o sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe różnych fragmentów genomu poszczególnych gatunków allexiwirusów.

Według Lee i wsp. (2007) poziom identyczności sekwencji aminokwasów ORF I między koreańskimi izolatami GarV-A, GarV-C, GarV-E i GarV-X a izolatami japońskimi i chińskimi wirusów zdeponowanymi w banku genów wahał się od 85 do 96%.

Gawande i wsp. (2015) uzyskali dla indyjskich izolatów wirusa A czosnku od 80 do 88% identyczności na poziomie nt oraz od 81 do 98% identyczności na poziomie aa genu kodującego TGB1 w stosunku do homologicznej sekwencji izolatów wirusa z Australii.

Analizy filogenetyczne przeprowadzone przez Wylie i wsp. (2012a) oparte na sekwencjach nukleotydów genu kodującego: TGB1, TGB2 i białko o masie cząsteczkowej 40 kDa australijskich izolatów GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-D oraz izolatów pochodzących z Azji, Ameryki Południowej i Europy dawały identyczność, odpowiednio 76,8–90,0, 79,5 i 93,8%.

Wśród prac dotyczących zróżnicowania genetycznego populacji allexiwirusów przeważają te dotyczące pokrewieństwa sekwencji nt i aa genu kodującego CP i NABP izolatów pochodzących z Azji (Korea, Chiny, Japonia) oraz izolatów z Europy (Włochy, Polska), Australii, Afryki (Sudan) i Ameryki Południowej (Brazylia).

Jak podaje Lanzoni i wsp. (2006) poziom identyczności sekwencji nukleotydów genu kodującego CP między włoskimi izolatami GarV-D a koreańskim i japońskim izolatem wirusa wyniósł odpowiednio 97,2–99,6 i 95,4%. Wyraźnie wyższy poziom identyczności obserwowali Wylie i wsp. (2014) dla sekwencji aa w tym obszarze między australijskimi a koreańskimi, japońskimi, meksykańskimi oraz argentyńskimi izolatami GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-D, który był w zakresie, odpowiednio 94–99, 88–99, 94–99 i 89–100%.

Brazylijskie izolaty GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-D wykazywały najwyższy stopień identyczności (89–90%) sekwencji nukleotydów genu kodującego CP w stosunku do australijskiego izolatu GarV-A oraz 95–98% identyczności w stosunku do izolatu z Korei, Japonii i Australii. Dla izolatów GarV-B poziom identyczności w omawianym obszarze wynosił 83–90% w stosunku do izolatu z Korei i 90% w stosunku do izolatu z Australii. Brazylijskie izolaty GarV-C tworzyły grupę o wysokiej identyczności (97–98%) z izolatem z Japonii oraz Australii. W przypadku izolatów GarV-D sekwencja nukleotydów genu kodującego CP wykazała 97% identyczności do homologicznej sekwencji australijskiego izolatu oraz 95% identyczności do sekwencji izolatu pochodzącego z Korei (Oliveira i wsp. 2014).

Wyniki analiz filogenetycznych przeprowadzonych przez Melo-Filho i wsp. (2004) wskazywały, że sekwencja aminokwasów CP brazylijskiego izolatu GarV-C była w 95% identyczna z japońskim izolatem GarV-C. Procent identyczności sekwencji aminokwasów CP brazylijskiego izolatu GarMbfV w stosunku do argentyńskiego izolatu oszacowano na 96,6%. Natomiast poziom podobieństwa sekwencji aa w tym obszarze między brazylijskim izolatem GarV-D a sekwencjami aa japońskiego izolatu wynosił 96,8%.

Dla koreańskiego izolatu GarV-A(K) i japońskiego izolatu GarV-A identyczność sekwencji nukleotydów genu kodującego CP i NABP wynosiła, odpowiednio 100 i 99%.

W przypadku koreańskiego izolatu GarV-D(K) sekwencja nt genu kodującego CP była identyczna w 98%, a sekwencja nt genu kodującego NABP w 87% w stosunku do homologicznych sekwencji nt japońskiego izolatu GarV-D (Koo i wsp. 2002).

Mohammed i wsp. (2013) przeprowadzili analizę filogenetyczną sekwencji nukleotydów i aminokwasów genu kodującego CP i genu kodującego NABP między sudańskimi a koreańskimi, chińskimi i australijskimi izolatami GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-X. Identyczność sekwencji nt genu kodującego CP i NABP wyniosła 91,7% dla GarV-A, 95,4% dla GarV-B, 84,1% dla GarV-C i 90,3% dla GarV-X. Analiza sekwencji aminokwasów genu kodującego CP i NABP izolatów GarV-A, GarV-B, GarV-C i GarV-X wskazywała na procent identyczności wahający się od 85 do 98,1%.

W Polsce, Bereda (2015) jako pierwsza wykonała analizę: zmienności genetycznej, występowania miejsc rekombinacji oraz presji selekcyjnej wzdłuż genów kodujących CP i NABP krajowej populacji izolatów GarV-B, GarV-D i GarV-X.

Identyczność kompletnych sekwencji nukleotydów genu kodującego CP i NABP polskich izolatów GarV-B w stosunku do zagranicznych izolatów dostępnych w banku genów wyniosła, odpowiednio 87–100% i 90–100%, a sekwencje aa tych genów były identyczne w zakresie 93–100% (CP) oraz 91–100% (NABP). Polskie izolaty wirusa znalazły się w jednej grupie wraz z izolatami z Azji (Japonia, Korea), Ameryki Południowej (Argentyna, Brazylia) oraz Australii. Analiza presji selekcyjnej wzdłuż genów kodujących CP i NABP izolatów GarV-B z użyciem modeli REL, FEL i SLAC nie wskazała kodonów będących pod działaniem pozytywnej presji dla żadnego z dwóch badanych genów, co świadczyło, że oba geny znajdują się pod działaniem oczyszczającej presji selekcyjnej, warunkującej niezmiennosc łańcucha sekwencji aminokwasów. Stopień identyczności 85–100% dla sekwencji nt oraz 91–100% dla sekwencji aa otrzymano, gdy analizowano sekwencje nt i aa CP polskich izolatów w zestawieniu ze wszystkimi dostępnymi w banku genów izolatami GarV-D. W przypadku genu kodującego NABP wirusa porównanie wykazywało identyczność 89–100% na poziomie nt oraz 88–100% na poziomie aa. Przeprowadzone analizy filogenetyczne oparte na sekwencjach aminokwasów CP izolatów GarV-D wykazały ich podział na dwie grupy filogenetyczne. W jednej grupie znajdowały się izolaty z Polski razem z izolatami z Korei, Argentyny, Japonii i jednym izolatem z Brazylii, natomiast drugą tworzyły izolaty z Brazylii i Australii. Drzewa skonstruowane na podstawie sekwencji aminokwasów NABP izolatów GarV-D również wykazały podział badanych izolatów na dwie grupy: grupa I – izolaty polskie, koreańskie, japońskie i argentyńskie o wysokim pokrewieństwie filogenetycznym, natomiast w grupie II znalazł się tylko jeden izolat z Australii. Analiza występowania miejsc rekombinacji oraz analiza presji selekcyjnej wzdłuż genów kodujących CP i NABP polskich izolatów GarV-D wykazała obecność punktów rekombinacji w obrębie nukleotydów 501–504 w sekwencji genu kodującego CP. W przypadku sekwencji nukleotydów genu kodującego NABP obecność rekombinacji została stwierdzona tylko

przez jeden algorytm – SBP. Przeprowadzona analiza presji selekcyjnej wytypowała, wzdłuż genu kodującego CP, dwa kodony będące pod działaniem pozytywnej presji selekcyjnej. Jednakże przewaga kodonów będących pod wpływem negatywnej presji selekcyjnej świadczy o stabilności genetycznej populacji GarV-D. Analiza presji selekcyjnej wykonana wzdłuż genu kodującego NABP również wskazała, że w sekwencji nukleotydów kodujących białko wiążące kwasy nukleinowe izolatów GarV-D występują kodony, w których większość substytucji nukleotydowych nie wpływa na zmianę sekwencji aminokwasów w tym białku. Wytypowano tylko jeden kodon (kodon 41) będący pod działaniem pozytywnej presji selekcyjnej. Interesującym jest, że kodon 41 stanowi część konserwatywnej domeny wiążącej kwasy nukleinowe o budowie palców cynkowych (zinc finger motif). Występowanie tego motywu jest charakterystyczne dla przedstawicieli rodzaju *Allexivirus* oraz *Carlavirus* (Foster 1992). Domena wiążąca kwasy nukleinowe o budowie palców cynkowych jest strukturą niezwykle stabilną genetycznie. Występowanie pozytywnej selekcji może świadczyć o adaptacji populacji wirusa do zmieniających się warunków. Dalsze prace obejmujące poznanie funkcji kodonu 41 mogłyby być bardzo przydatne w określeniu nowych funkcji białka wiążącego kwasy nukleinowe. Zhou i wsp. (2006) wykazali, że białko wiążące kwasy nukleinowe wirusa A winorośli (*Grapevine virus A*, GVA) odpowiada za hamowanie procesu wyciszania RNA. W przypadku GarV-X ustalono niskie zróżnicowanie populacji polskich izolatów (97–100% dla sekwencji nt CP oraz 98–100% dla sekwencji aa CP; 93–100% dla sekwencji nt NABP oraz 91–100% dla sekwencji aa NABP). Porównanie sekwencji nt i aa CP (80–100% dla sekwencji nt i 89–100% dla sekwencji aa) i NABP (87–100% dla sekwencji nt i aa) między polskimi izolatami wirusa a izolatami zdeponowanymi w banku genów wykazało dużo wyższe zróżnicowanie wśród badanych izolatów. Przeprowadzona analiza drzew filogenetycznych opartych na sekwencjach nt i aa białka płaszczka była zbieżna z analizą zmienności genetycznej, ponieważ wykazała, że polska populacja izolatów GarV-X stanowi odrębną grupę od reszty izolatów wirusa zdeponowanych w banku genów. Oddzielną grupę tworzyły także izolaty pochodzące z Indii, natomiast izolaty pochodzące z Włoch, Chin, USA, Australii, Brazylii, Meksyku i Hiszpanii utworzyły grupę wysoce podobną. Bardzo podobnie skonstruowane drzewo uzyskano w oparciu o sekwencje aminokwasów CP. Badania oparte na sekwencji nukleotydów genu kodującego NABP i na sekwencji aminokwasów NABP wykazały odrębność polskiej populacji izolatów od innych izolatów GarV-X dostępnych w banku genów, jednakże zróżnicowanie między sekwencjami nt i aa izolatów GarV-X było zbyt niskie i nie pozwoliło na powstanie wystarczającej odległości między poszczególnymi topologiami drzew dla utworzenia oddzielnych grup. Wyniki analizy presji selekcyjnej przeprowadzonej wzdłuż genu kodującego białko płaszczka i genu kodującego białko wiążące kwasy nukleinowe izolatów GarV-X wykazały, że presja selekcyjna działająca na te geny ma rolę oczyszczającą, ponieważ jedynie wzdłuż genu kodującego NABP odnotowano negatywną presję selekcyjną działającą na jeden z kodonów.

W przypadku GarMbFV poziom identyczności sekwencji nukleotydów genu kodującego CP izolatu GarMbFV analizowanej sekwencji między japońskim i koreańskim izolatem GarMbFV wyniósł 86% (Park i wsp. 2005). Melo-Filho i wsp. (2004) określili poziom podobieństwa między sekwencją aminokwasów CP izolatu argentyńskiego GarMbFV a sekwencjami aminokwasów CP brazylijskich izolatów na 96,6%.

Wyniki prezentowane przez Chen i wsp. (2001), Koo i wsp. (2002), Melo-Filho i wsp. (2004), Lanzoni i wsp. (2006), Lee i wsp. (2007), Wylie i wsp. (2012a), Mohammed i wsp. (2013), Oliveira i wsp. (2014), Wylie i wsp. (2014), Bereda (2015) oraz Gawande i wsp. (2015) dotyczące zmienności genetycznej w obrębie populacji różnych gatunków allexiwirusów świadczą o braku korelacji między pochodzeniem geograficznym izolatów a ich profilem genetycznym. Zdaniem Koo i wsp. (2002), Melo-Filho i wsp. (2004) oraz Wylie i wsp. (2014) to wegetatywny sposób rozmnażania czosnku pospolitego i jednoczesna wymiana materiału roślinnego przede wszystkim z krajów azjatyckich do Europy może przyczynić się do dużej zmienności obserwowanej w populacji poszczególnych gatunków allexiwirusów pochodzących z tego samego kraju, bądź nawet tego samego pola uprawnego. Przypuszczalnie może to tłumaczyć wysoką zmienność wykazaną wśród populacji różnych gatunków tych wirusów.

Według Chen i wsp. (2001) przyczyn dużej zmienności genetycznej populacji wirusów należy szukać w występowaniu infekcji mieszanych, co sprzyja interakcji między różnymi genotypami izolatów tego samego gatunku wirusa lub izolatów gatunków blisko spokrewnionych, np. gatunków należących do rodzaju *Allexivirus*. Jednakże analizowane przez Beredę (2015) populacje polskich izolatów GarV-X wydają się być stabilne, co może być skutkiem analizy jedynie 14 izolatów wirusa. Z drugiej strony wysoka stabilność genetyczna jest domeną gatunków wirusów posiadających wektor i podyktowana jest koniecznością utrzymania niezmienną budowę struktur w białkach, które uczestniczą w nabywaniu cząstek wirusa przez wektor (García-Arenal i wsp. 2001). Zmiany w sekwencjach aminokwasów tych białek mogłyby doprowadzić do znacznych strat w efektywności przenoszenia wirusa, co zostało udowodnione nawet w przypadku wirusów przenoszonych nietrwale przez mszyce (Power 2000; Matoušek i wsp. 2009). W każdej populacji wirusów obserwuje się występowanie wariantów genetycznych, jednak rzadko stają się one dominujące w stosunku do znanej populacji. Wynika to z faktu, iż każda zmiana w genomie warunkująca zwiększoną patogeniczność powoduje powstanie mutacji przyczyniających się do pogorszenia zdolności adaptacyjnych w polu i/lub u nowych gospodarzy (García-Arenal i McDonald 2003).

### **Diagnostyka roślin porażonych przez allexiwirusy Diagnostic the plants infected with viruses belong to *Allexivirus* genus**

Diagnostyka poszczególnych gatunków wirusów należących do rodzaju *Allexivirus* jest niezwykle trudna ze względu na obecność w roślinach infekcji mieszanych

składających się z różnych gatunków wirusów. Biotesty, w przypadku tej grupy patogenów, nie mają zastosowania ze względu na między innymi zbyt wąski zakres roślin wskaźnikowych (Bos 1983). Wyniki wstępnych prac prowadzonych przez autorów niniejszego artykułu wykazały, że po wykonaniu mechanicznej inokulacji sokiem pochodzącym z roślin porażonych przez allexiwirusy na komosie ryżowej (*Chenopodium quinoa* L.) obserwowano objawy lokalne, a na komosie murowej (*Chenopodium murale* L.) objawy systemiczne. Próba wyizolowania wirusów z tych roślin wskazywała, że sprawcami obserwowanych zmian mogły być także carla- i potyvirusy występujące w roślinach źródłowych.

Mało skuteczne w przypadku allexiwirusów jest również ich wykrywanie i identyfikacja z użyciem technik elektronomikroskopowych. Diekmann (1997) stwierdził, że badania z użyciem mikroskopu elektronowego pozwalają na wyróżnienie cząstek allexiwirusów spośród wirionów gatunków należących do rodzaju *Carla-* i *Potyvirus*, jednakże niemożliwym jest odróżnienie poszczególnych gatunków tych patogenów. Podobnie Koo i wsp. (2002), Cafrune i wsp. (2006), Lee i wsp. (2007) oraz Bereda (2015) wykorzystywali mikroskop elektronowy jedynie jako narzędzie do potwierdzenia obecności w badanych roślinach allexiwirusów bez szczegółowej identyfikacji gatunków.

Testy serologiczne powszechnie stosowane w wirusologii roślin, zwłaszcza test ELISA, bywają również trudne, ze względu na kłopoty z otrzymaniem specyficznych dla danego gatunku surowic (Helguera i wsp. 1997; Lu i wsp. 2008). Obecnie rynek komercyjny oferuje zestawy do wykrywania jedynie trzech spośród ośmiu gatunków

allexiwirusów: GarV-A, GarV-B i GarV-C, dlatego zasadnym jest wykorzystywanie techniki opartej na reakcji łańcuchowej polimerazy (Takaichi i wsp. 1998; Tsuneyoshi i wsp. 1998). Jednakże i ta technika w przypadku allexiwirusów ma pewne ograniczenia. Wysokie podobieństwo sekwencji nukleotydów poszczególnych fragmentów genomu tych wirusów staje się przyczyną trudności w zaprojektowaniu wysoce specyficznych starterów (Adams i wsp. 2004).

Poszukując nowych narzędzi diagnostycznych, Bereda (2015), wprowadzając własne modyfikacje zaproponowała wykorzystanie techniki hybrydyzacji kwasów nukleinowych typu dot-blot, do wykrywania GarV-D, GarV-E i GarV-X w roślinach czosnku pospolitego. Analiza sygnału chemiluminescencji wykazała powinowactwo sondy w stosunku do RNA każdego z sześciu badanych izolatów GarV-D, GarV-E i GarV-X. Dla prób kontroli negatywnej nie obserwowano sygnału chemiluminescencji. Co istotne, metoda ta nie wymaga użycia specjalistycznego sprzętu. Może, więc być z powodzeniem stosowana w większości laboratoriów. Otrzymane wyniki mają bardzo ważny aspekt praktyczny, szczególnie dla diagnostyki GarV-D, GarV-E i GarV-X, dla których nie ma komercyjnie dostępnych zestawów do testu ELISA.

## Podziękowanie / Acknowledgements

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/07/N/NZ9/00037.

## Literatura / References

- Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G., Fauquet C.M. 2004. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149: 1045–1060.
- Beck D.L., Guilford P.J., Voot D.M., Andersen M.T., Forster R.L.S. 1991. Triple gene block proteins of white clover mosaic potyvirus are required for transport. *Virology* 183: 695–702.
- Bereda M. 2015. Charakterystyka allexiwirusów – patogenów roślin czosnku (*Allium sativum* L.). Praca doktorska. Samodzielny Zakład Fitopatologii. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 227 ss.
- Bos L. 1983. Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta Horticulturae* 127: 11–29.
- Cafrune E.E., Balzarini M., Conci V.C. 2006. Changes in the concentration of an *Allexivirus* during the crop cycle of two garlic cultivars. *Plant Disease* 90 (10): 1293–1296.
- Chen J., Chen J. 2002. Genome organization and phylogenetic tree analysis of *Garlic virus E*, a new member of genus *Allexivirus*. *Chinese Science Bulletin* 47 (1): 33–37.
- Chen J., Chen J.P., Adams M.J. 2001. Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Archives of Virology* 146: 1841–1853.
- Chodorska M., Paduch-Cichal E., Kalinowska E., Szyndel M.S. 2014. Assessment of *Allexiviruses* infection in garlic plants in Poland. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 13 (2): 176–186.
- Conci V.C., Canavelli A.E., Balzarini M.G. 2010. The distribution of garlic viruses in leaves and bulbs during the first year of infection. *Journal of Phytopathology* 158: 186–193.
- Conci V.C., Nome S.F., Milne R.G. 1992. Filamentous viruses of garlic in Argentina. *Plant Disease* 76: 594–596.
- Diekmann M. 1997. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm. *Allium* spp. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, p. 18.
- Dovas C.I., Hatziloukas E., Salomon R., Barg E., Shibolet Y., Katis N.I. 2001. Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *Phytopathology* 149: 1–7.
- Dovas C.I., Volvas C. 2003. Viruses infecting *Allium* spp. in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 85, p. 135.
- Etoh T. 1985. Studies on the sterility in garlic *Allium sativum* L. *Memoirs of Faculty of Agriculture Kagawa University* 21: 7–132.
- FAO 2011. FAO Statistical Yearbook 2010. Food and Agriculture Organization (FAO), Rome, Italy.



- Fayad-André M.S., Dusi A.N., Resende R.O. 2011. Spread of viruses in garlic fields cultivated under different agricultural production systems in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 36 (6): 341–349.
- Fidan H., Çağlar B.K., Baloğlu S., Yılmaz M.A. 2015. *Urginea maritime* (L.) is a new host of *Allexivirus* group on onion and garlic plants in Turkey. *Acta Horticulturae* 1002: 309–312.
- Forster R.L.S., Bevan M.W., Harbison S.A., Gardner R.C. 1988. The complete nucleotide sequence of the *Potexvirus* white clover mosaic virus. *Nucleic Acids Research* 16: 291–303.
- Foster G.D. 1992. The structure and expression of the genome of carlaviruses. *Research in Virology* 143: 103–112.
- Fujisawa J. 1989. Loss of garlic yield by double infection of garlic viruses. *Agriculture & Horticulture* 64: 737–741.
- García-Arenal F., Fraile M., Malpica J.M. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39: 157–186.
- García-Arenal F., McDonald B.A. 2003. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology* 93: 941–952.
- Gawande S.J., Gurav V.S., Ingle A.A., Gopal J. 2015. First report of *Garlic virus A* in garlic from India. *Plant Disease* 99 (9), p. 1288.
- Gieck S.L., Hamm P.B., David N.L., Pappu H.R. 2009. First report of *Garlic virus B* and *Garlic virus D* in garlic in the Pacific Northwest. *Plant Disease* 93 (4), p. 431.
- Helguera M., Bravo-Almonacid F., Kobayashi K., Rabinowicz P.D., Conci V., Mentaberry A. 1997. Immunological detection of a GarV-type virus in Argentine garlic cultivars. *Plant Disease* 81: 1005–1010.
- Hillman B.I., Lawrence D.M. 1995. *Carlaviruses*. p. 35–50. In: “Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases. Vol III: Viruses and Viroids” (R.P. Singh, U.S. Singh, K. Kohmoto, eds). Pergamon Press, London.
- Jelkmann W.E., Maiss E., Martin R.R. 1992. The nucleotide sequence and organization of strawberry mild edge-associated potexvirus. *Journal of General Virology* 73: 475–479.
- Jemal K., Abraham A., Feyissa T. 2015. The occurrence and distribution of four viruses on garlic (*Allium sativum* L.) in Ethiopia. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 4 (1): 5–11.
- Kang S.G., Bong J.K., Eun T.L., Moo U.C. 2007. *Allexivirus* transmitted by eriophyoid mites in garlic plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 1833–1840.
- Kanyuka K.V., Vishnichenko V.K., Levay K.E., Kondrikov D.Y., Ryabov E.V., Zavriev S.K. 1992. Nucleotide sequence of *Shallot virus X* RNA reveals a 5-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3-proximal cistrons. *Journal of General Virology* 73: 2553–2560.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. 2012. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 1327 pp.
- Klukáčková J., Navrátil M., Duchoslav M. 2007. Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. *Journal of Plant Diseases Protection* 114 (3): 97–100.
- Koo B.J., Kang S.G., Chang M.U. 2002. Survey of garlic virus disease and phylogenetic characterization of garlic viruses of the genus *Allexivirus* isolated in Korea. *Journal of Plant Pathology* 18: 237–243.
- Kryczyński S. 2010. *Wirusologia roślinna*. PWN, Warszawa, 375 ss.
- Kumar S., Baranwal V.K., Joshi S., Arya M., Majumder S. 2010. Simultaneous detection of mixed infection of *Onion yellow dwarf virus* and an *Allexivirus* in RT-PCR for ensuring virus free onion bulbs. *Indian Journal of Virology* 21: 64–68.
- Lanzoni C., Ratti C., Turina M., Pisi A., Tedeschi P., Autonell C.R. 2006. Molecular characterisation of *Allexiviruses* from garlic in Italy. *Journal of Plant Pathology* 88, p. 47.
- Lee E.T., Koo B.J., Jung J.H., Chang M.U., Kang S.G. 2007. Detection of *Allexiviruses* in the garlic plants in Korea. *Journal of Plant Pathology* 23 (4): 266–271.
- Lu Y.W., Chen J., Zheng H.Y., Adams M.J., Chen J.P. 2008. Serological relationships among the over-expressed coat proteins of *Allexiviruses*. *Journal of Phytopathology* 156: 251–255.
- Majumder S., Baranwal V.K. 2014. Simultaneous detection of four garlic viruses by multiplex reverse transcription PCR and their distribution in Indian garlic accessions. *Journal of Virology Methods* 202: 34–38.
- Majumder S., Baranwal V.K., Joshi S. 2008. Simultaneous detection of *Onion yellow dwarf virus* and *Garlic latent virus* in infected leaves and cloves of garlic by duplex RT-PCR. *Journal of Plant Pathology* 90: 369–372.
- Mann L.K., Minges P.A. 1958. Growth and bulbing of garlic (*Allium sativum* L.) in response to storage temperature of planting day length and planting date. *Hilgardia* 27: 385–419.
- Matoušek J., Schubert J., Džedić P. 2009. Complementation analysis of triple gene block of *Potato virus S* (PVS) revealed its capability to support systemic infection and aphid transmissibility of recombinant *Potato virus X*. *Virus Research* 146: 81–88.
- Mavric I., Ravnkar M. 2005. A carlavirus serologically closely related to *Carnation latent virus* in Slovenian garlic. *Acta Agriculturae of Slovenia* 85: 343–349.
- Melo-Filho P.A., Nagata T., Dusi A.N., Buso J.A., Torres A.C., Eiras M., Resende R.O. 2004. Detection of three *Allexivirus* species infecting garlic in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39 (8): 735–740.
- Mituti T., Moura M.F., Marubayashi J.M., Oliveira M.L., Imaizumi V.M., Sakate R.K., Pavan M.A. 2015. Survey of viruses belonging to different genera and species in noble garlic in Brazil. *Scientia Agricola* 72 (3): 278–281.
- Mohammed H.S., Zicca S., Mangli A., Mohamed M.E., El Siddiq M.A.R., El Hussein A.A., Tomassoli L. 2013. Occurrence and phylogenetic analysis of *Potyviruses*, *Carlaviruses* and *Allexiviruses* in garlic in Sudan. *Journal of Phytopathology* 161 (9): 642–650.
- Oliveira M.L., De Marchi D.R., Mituti T., Pavan M.A., Krause-Sakate R. 2014. Identification and sequence analysis of five allexiviruses species infecting garlic crops in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39 (6): 483–489.
- Park K.S., Bae Y.J., Jung E.J., Kang S.J. 2005. RT-PCR-based detection of six garlic viruses and their phylogenetic relationships. *Journal of Microbiological Biotechnology* 15: 1110–1114.
- Parrano L., Afunian M., Pagliaccia D., Douhan G., Vidalakis G. 2012. Characterization of viruses associated with garlic plants propagated from different reproductive tissues from Italy and other geographic regions. *Phytopathologia Mediterranea* 51 (3): 549–565.
- Perotto M.C., Cafrune E.E., Conci V.C. 2010. The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with *Allexiviruses*. *European Journal of Plant Pathology* 126 (4): 489–495.

- Petty I.T.D., Jackson A.O. 1990. Two forms of the major barley stripe mosaic virus nonstructural protein are synthesized *in vivo* from alternative initiation codons. *Virology* 177: 829–832.
- Power A.G. 2000. Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 336–340.
- Razvjazkina G.M. 1971. Das Zwiebelmosaikvirus und seine Verbreitung im Freiland. *Tagungs-Berichte der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften (Berlin)* 115: 69–76.
- Shahraeen N., Lesemann D.E., Ghotbi T. 2008. Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crop in Iran. *EPP0 Bulletin* 38 (1): 131–135.
- Simon P.W., Jenderek M.M. 2003. Flowering, seed production and the genesis of garlic breeding. *Plant Breeding Reviews* 32: 211–244.
- Singh P., Prabha K., Jain R.K., Baranwal V.K. 2014. N-terminal in coat protein of *Garlic virus X* is indispensable for its serological detection. *Virus Genes* 48 (1): 128–132.
- Sumi S., Matsumi T., Tsuneyoshi T. 1999. Complete nucleotide sequences of *Garlic viruses A* and *C*, members of the newly ratified genus *Allexivirus*. *Archives of Virology* 144: 1819–1826.
- Sumi S., Tsuneyoshi T., Furutani H. 1993. Novel rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization. *Journal of General Virology* 74: 1879–1885.
- Tabanelli D., Bertaccini A., Bellardi M.G. 2004. Molecular detection of filamentous viruses infecting garlic from different geographic origins. *Journal of Plant Pathology* 86 (4), p. 335.
- Takaichi M., Yamamoto M., Nagakubo T., Oeda K. 1998. Four garlic viruses identified by reverse transcription-polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan. *Plant Disease* 82: 694–698.
- Tsuneyoshi T., Matsumi T., Natsuaki K.T., Sumi S. 1998. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three *Potyvirus* species in *Allium* plants. *Archives of Virology* 143: 97–113.
- Van Dijk P. 1991. Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species and their classification into two new rymoviruses in the family *Potyviridae*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97: 381–399.
- Van Dijk P. 1993. Survey and characterization of potyviruses and their strains in *Allium* species. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99: 1–48.
- Van Dijk P., Van der Vlugt R.A.A. 1994. New mite-borne virus isolates from rakkyo, shallot and wild leek species. *European Journal of Plant Pathology* 100: 269–277.
- Walkey D.G.A. 1990. Virus diseases. p. 191–212. In: “Onions and Allied Crops”, Vol. II (H.D. Rabinowitch, J.L. Brewster, eds.). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Walkey D.G.A., Antill D.N. 1989. Agronomic evaluation of virus-free and virus infected garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Horticultural Science* 64: 53–60.
- Ward L.I., Perez-Egusquiza Z., Fletcher J.D., Clover G.R.G. 2009. A survey of viral diseases of *Allium* crops in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 38: 533–539.
- Wylie S.J., Li H., Jones M.G.K. 2012a. Phylogenetic analysis of allexiviruses identified on garlic from Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 7: 23–27.
- Wylie S.J., Li H., Saqib M., Jones M.G.K. 2014. The global trade in fresh produce and the vagility of plant viruses: a case study in garlic. *PLoS ONE* 9 (8): e105044.
- Wylie S.J., Luo H., Li H., Jones M.G. 2012b. Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Archives of Virology* 157 (2): 271–284.
- Yamashita K., Sakai J., Hanada K. 1996. Characterization of a new virus from garlic (*Allium sativum* L.), garlic mite borne mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 62: 483–489.
- Zavriev S.K., Kanyuka K.V., Levay K.E. 1991. The genome organization of *Potato virus MRNA*. *Journal of General Virology* 72: 9–14.
- Zhou Z.Sh., Dell’Orco M., Saldarelli P., Turturo C., Minafra A., Martelli G.P. 2006. Identification of an RNA silencing suppressor in the genome of *Grapevine virus A*. *Journal of General Virology* 87: 2387–2395.
- Zimmern D. 1987. Evolution of RNA viruses. p. 211–240. In: “RNA Genetics” (J. Holland, E.R. Domingo, P. Ahlquist, eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, 365 pp.