

IL "VECCHIO - NUOVO" TMV: ALCUNE CONSIDERAZIONI SULL'EVOLUZIONE
DI UN VIRUS

L. BETTI, F. MARANI e A. CANOVA

Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi, Bologna

RIASSUNTO

Vengono presi in esame i principali meccanismi evolutivi che sono alla base della recente classificazione dei virus a RNA a filamento singolo di polarità positiva. Viene anche discussa la nuova definizione di specie, accettata nel 1991 dal ICTV, e delineata una suddivisione del genere Tobamovirus in diverse specie. In particolare si propone che la specie Tabacco mosaic comprenda le sottospecie o tipi tabacco, tomato, pepper e para-tabacco.

SUMMARY

The main mechanisms operating in positive-strand RNA viruses evolution, which are at the basis of their new taxonomy, are considered. The new definition of species, accepted in 1991 by ICTV, is discussed and an arrangement of the Tobamovirus genus into species is outlined. In particular Tobacco mosaic species is proposed to contain tobacco, tomato, pepper and para-tobacco subspecies or types.

Per lungo tempo il concetto di evoluzione riferito ai virus è stato osteggiato da gran parte dei virologi vegetali (Matthews, 1985) e la tendenza a considerare i nuovi isolati come nuovi virus ha reso molto complessa la loro classificazione determinando un'eccessiva proliferazione nella nomenclatura (Hamilton *et al.*, 1981). Le recenti acquisizioni derivate dalle tecniche di sequenziamento degli acidi nucleici e di clonaggio

genico e la possibilità di memorizzare e confrontare tali dati mediante avanzate tecnologie informatiche, hanno messo in luce correlazioni genetiche, con chiare implicazioni evolutive, tra virus delle piante e degli animali, viroidi ed agenti subvirali (Tab. I) (Kingsbury, 1988; Mahy, 1991).

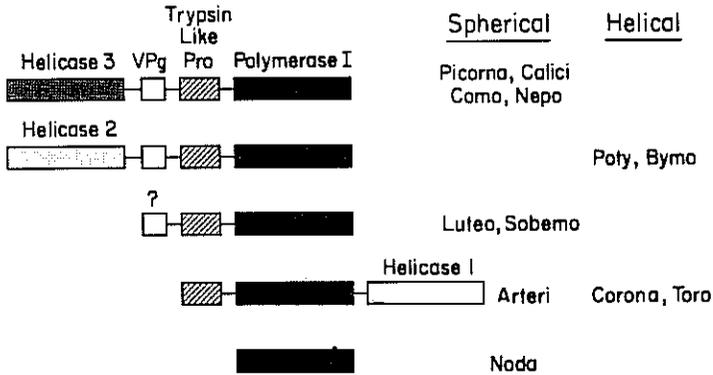
Meccanismi evolutivi dei virus. Nell'ambito dei virus a RNA a filamento singolo di polarità positiva è stata proposta una classificazione, articolata in quattro Supergruppi (Goldbach *et al.*, 1991; Martelli, 1992), basata sulla presenza di sequenze nucleotidiche modulari conservate che codificano per le diverse proteine implicate nella replicazione (polimerasi, proteasi, elicasi e metiltrasferasi). Considerando la polimerasi come il solo elemento genetico unificante, Dolja e Carrington (1992) hanno presentato una classificazione in tre Supergruppi, comprendenti ciascuno virus animali e vegetali sia a simmetria icosaedrica che elicoidale e a genoma sia mono- che multipartito (Tab. II). In particolare è sorprendente notare che il TMV (Tobacco mosaic virus), prototipo dei virus a bastoncino, si trovi nello stesso Supergruppo III (Alphavirus o Sindbisvirus simile) in cui sono compresi anche virus sferici con genoma multipartito (famiglia Bromoviridae). Secondo questo criterio classificativo la forma del capsidio e la ripartizione del genoma, finora considerati come elementi fondamentali della tassonomia, assumono un'importanza secondaria. Un ruolo rilevante è invece associato ai fenomeni di ricombinazione di elementi genomici modulari tra virus e cellule ospiti o tra virus sia omologhi che eterologhi. Un esempio di ciò può essere considerato il Sunn-hemp mosaic virus (SHMV), appartenente al genere Tobamovirus, che sembra essere derivato dalla ricombinazione tra il Cowpea strain del TMV e il Turnip yellow mosaic virus (TYMV) (Meshi *et al.*, 1981). Le mutazioni puntiformi, che avvengono con elevata frequenza a livello dei singoli nucleotidi sia delle regioni codificanti che non codificanti del genoma, intervengono anch'esse nell'interazione ospite-patogeno (Dawson, 1991) e sono all'origine della grande variabilità dei ceppi virali.

Tabella I. Esempi di virus animali e vegetali con struttura genomica simile (modificata da Mahy, 1991)

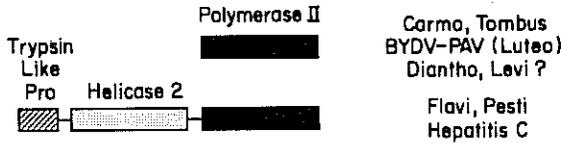
Tipo di genoma	Famiglia	Virus animali	Virus vegetali
RNA a singolo filamento di polarità positiva	Picornaviridae Togaviridae	Poliovirus Sindbisvirus Semliki forest virus	Cowpea mosaic virus Tobacco rattle virus Cucumber mosaic virus
RNA a singolo filamento di polarità negativa	Bunyaviridae Rhabdoviridae	Bunyamwera Rabies virus Vesicular stomatitis virus	Tomato spotted wilt Potato yellow dwarf virus Lettuce necrotic yellows virus
RNA a doppio filamento	Reoviridae	Reovirus Rotavirus	Rice dwarf virus Wound tumor virus
DNA a singolo filamento	Parvoviridae	Parvovirus	Maize streak virus
DNA a doppio filamento	Hepadnaviridae	Hepatitis B virus	Cauliflower mosaic virus
RNA circolare	Agenti subvirali	Hepatitis δ	Potato spindle tuber viroid

Tabella II. Sequenze modulari conservate, che codificano per le proteine associate alla replicazione, nei virus a RNA a filamento singolo di polarità positiva (da Dolja e Carrington, 1992)

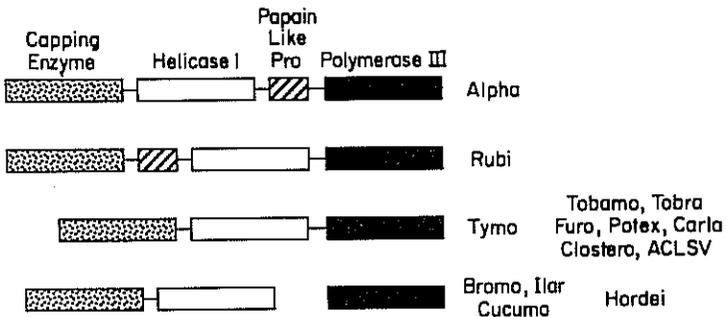
A. Supergroup I (Picornavirus-Like)



B. Supergroup II



C. Supergroup III (Alphavirus-Like)



Pro = proteasi; VPg = proteina genomica 5' terminale; Capping Enzyme = cuffia metilguanossinica

Concetto di specie virale. L'individuazione dei fenomeni di mutazione e ricombinazione genetica ha permesso una nuova definizione di specie virale (Van Regenmortel, 1989; 1990), recentemente accettata dal Comitato Internazionale sulla Tassonomia dei Virus (ICTV) (Martelli, 1993). Secondo tale definizione "una specie virale è una classe 'politetica'¹ di virus che costituisce una linea a replicativa ed occupa una particolare nicchia ecologica".

Il concetto di specie come classe 'politetica', definita da una combinazione di caratteri di cui ciascuno può essere presente anche al di fuori della specie ed assente anche in un membro di quella specie, è molto utile perchè riesce a contenere l'intrinseca variabilità tipica dei virus. Tale definizione di specie include anche le nozioni di genoma, replicazione biologica e selezione naturale (linea a replicativa) e quelle di interazione sia con l'ospite che col vettore (nicchia ecologica): l'insieme di queste caratteristiche è alla base della specializzazione e dell'evoluzione dei virus.

Possibili specie del genere Tobamovirus. Se si considera il genere Tobamovirus, che appartiene al Supergruppo III (Tab. II) e comprende 12 membri definitivi più 2 di incerta classificazione (Tab. III) (Francki *et al.*, 1991) e si applica il concetto di specie come sopra definito, alcuni di tali membri risulterebbero essere specie distinte, mentre altri potrebbero essere raggruppati entro un'unica specie. Considerando infatti le caratteristiche delle proteine strutturali ed accessorie, cioè la composizione aminoacidica del capsidio e le proteine di movimento "30 K" (Gibbs, 1986; Alonso *et al.*, 1991), e le correlazioni sierologiche (Tab. IV) dei diversi membri del

¹ Il termine inglese 'polythetic' non ha corrispettivo italiano. Proponiamo la traduzione 'politetico' in quanto i termini greci da cui deriva (πολύς = molto e τίθημι = porre) indicano correttamente la molteplicità di caratteri tipica della specie.

genere Tobamovirus, si può notare una stretta affinità tra TMV e ToMV (82,5% di omologia del capsidio, 77% di omologia delle proteine "30K" e SDI < 3). Tale affinità tende a ridursi tra TMV e TMGMV o para-tobacco (68,7% di omologia del capsidio e SDI >3) e tra TMV e PMMV (72% di omologia del capsidio, 67,4% di omologia delle proteine "30K" e SDI >5). Se consideriamo però il concetto di nicchia ecologica, che per questi quattro membri è in gran parte sovrapponibile (famiglia *Solanaceae*), si potrebbe proporre il loro raggruppamento in un'unica specie *Tobacco mosaic*. I risultati dell'analisi dell'intero genoma (Alonso *et al.*, 1991) confermano che TMV, ToMV, PMMV e TMGMV possono essere riuniti nello stesso gruppo ed inoltre che PMMV presenta più affinità con ToMV che con TMV, come già precedentemente dimostrato dai saggi sierologici (Tab. IV). Anche i dati ricavati dal sequenziamento della regione non codificante 3' terminale (Avila-Rincon *et al.*, 1989) indicano una maggiore omologia di PMMV con ToMV (64%) che con TMV (61%) e TMGMV (56%). Piccoli cambiamenti in questa regione, la cui struttura è simile a quella del tRNA (tRNA-like structure) e che sembra implicata nel riconoscimento della polimerasi, potrebbero giustificare, unitamente ad altre differenze a livello aminoacidico (polimerasi, proteine "30K" e capsidiarie), il diverso comportamento biologico dei virus da noi riuniti nella specie *Tobacco mosaic*. Recenti dati sperimentali (Rabiti *et al.*, 1993; Betti, dati non pubblicati) fanno inoltre ipotizzare un possibile ruolo delle poliammine nella stabilizzazione e nell'evoluzione di questa struttura.

Per quanto riguarda invece gli altri membri dello stesso genere (Tab. III), le omologie delle proteine strutturali ed accessorie (Gibbs, 1986) e le correlazioni sierologiche (Tab. IV) sono meno strette; essendo inoltre le nicchie ecologiche non sovrapponibili, ciascuno di tali membri potrebbe costituire una specie.

Caratteristiche della specie *Tobacco mosaic*. Riferendoci in particolare a quella che abbiamo indicato come specie *Tobacco mosaic*, il carattere di classe 'politetica' potrebbe risolvere

Tabella III - Membri definitivi e possibili del genere Tobamovirus (modificata, da Francki *et al.*, 1991)

Membro tipo	Tobacco mosaic virus (TMV) (ceppo comune o U1)
-------------	---

Membri definitivi	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) Frangipani mosaic virus (FMV) Kyuri green mottle mosaic virus (KGMV) Odontoglossum ringspot virus (ORSV) Pepper mild mottle virus (PMMV) Ribgrass mosaic virus (RMV) Sammons' Opuntia virus (SOV) Sunn-hemp mosaic virus (SHMV) Tobacco mild green mottle virus (TMGMV) Tomato mosaic virus (ToMV) Ullucus mild mottle virus (UMMV)
-------------------	--

Membri possibili	Chara australis virus Hypochoeris mosaic virus
------------------	---

il contrasto esistente tra gli Autori che considerano il ToMV come ceppo del TMV (Fraser *et al.*, 1989; Dawson e Lehto, 1990) e quelli che invece li considerano virus distinti (Brunt, 1986; Francki *et al.*, 1991). Se si accetta la loro appartenenza ad un'unica specie, la patogenicità dei diversi ceppi potrebbe essere considerata come una delle proprietà che definiscono la classe 'politetica'.

Quanto detto può essere esteso anche al PMMV (Wetter *et al.*, 1984) che, come già espresso in altre occasioni (Betti *et al.*, 1987), noi preferiamo chiamare Pepper mosaic virus (PepMV), comprendente ceppi con diversa virulenza (patotipi P₁, P₁₋₂ e P₁₋₂₋₃) nei confronti di diverse specie di *Capsicum* provviste di geni di resistenza L¹, L² e L³ (Rast, 1979; Boukema *et al.*, 1980;

Tabella IV. Correlazioni sierologiche tra membri del genere Tobamovirus, espresse come indice medio di differenziazione sierologica (SDI)

Antigene	Siero anti-						
	TMV	ToMV	PMNV	TMGMV	ORSV	RMV	GGMVV
TMV	0	1.1 ^a		2.8 ^a		2.1 ^a	7.5 ^a
		2 ^b	7 ^b	3 ^b	5 ^b		
		3.3 ^c	3.5 ^c	5 ^d			

ToMV	1.2 ^a			1.8 ^a		4.3 ^a	7.0 ^a
	2 ^b	0	4 ^b	3 ^b	4 ^b		
	3.0 ^c		1.3 ^c				

PMNV	5 ^b	2 ^b	0	6 ^b	3 ^b		
	6.0 ^c	2.0 ^c		4 ^b			

TMGMV	2.5 ^a	1.9 ^a		0	3 ^b	3.8 ^a	6.7 ^a
	3 ^b	3.2 ^b	5 ^b	0			
	4 ^d						
							>10 ^d

ORSV		3 ^b	4 ^b	3 ^b	0		

RMV	2.1 ^a	3.7 ^a		5.1 ^a	0		

CGMVV	3.8 ^a	6.1 ^a		5.8 ^a		4.6 ^a	0

FMV	3 ^d			7 ^d			0

a) da Van Regenmortel, 1975; b) da Wetter et al, 1984 e 1987; c) da Betti et al, 1988; d) da Francki et al., 1971.

Betti *et al.*, 1986). PMMV diventerebbe in questo modo un ceppo di PepMV capace, come altri ceppi dello stesso patotipo P₁₋₂₋₃ (Boukema *et al.*, 1980; Betti *et al.*, 1988), di superare la resistenza di *Capsicum chinense*, omozigote per il gene L³. PepMV potrebbe comprendere anche tutti gli altri ceppi con diversi gradi di virulenza (patotipi P₁ e P₁₋₂), eliminando la necessità di introdurre nuove denominazioni come ad esempio Bell pepper mottle virus (BPemV) (Wetter *et al.*, 1987).

Questa classificazione è, secondo noi, più in sintonia con il concetto di evoluzione e di specializzazione nei riguardi dell'ospite e potrà permettere anche l'inserimento di futuri nuovi ceppi.

Considerazioni conclusive. La specie *Tobacco mosaic* potrebbe quindi essere suddivisa, considerando la pressione selettiva che l'ospite esercita sul patogeno, nelle sottospecie o tipi *tobacco*, *tomato*, *pepper* e *para-tobacco* ed arricchirsi in futuro di nuovi tipi: ad esempio i ceppi *melanzana* di BPemV (Rast, 1991) potrebbero molto più semplicemente essere indicati come ceppi del tipo *eggplant* della specie *Tobacco mosaic*.

La necessità di riordinare questa complessa materia ha portato altri Autori (Wetter *et al.*, 1987) a proporre nuove forme di raggruppamento: un subgenere comprendente TMV e ToMV ed un altro subgenere comprendente BPemV, PMMV, TMGMV e ORSV. Questo modello di classificazione, forse più semplice da applicare, si rifà, secondo noi, al "vecchio" concetto di specie (Kingsbury, 1985) e non tiene conto di tutte le possibilità offerte dalla "nuova" definizione (Van Regenmortel, 1989), secondo la quale i virus non devono più essere considerati solo come entità biochimiche, ma anche nella loro dinamica interazione sia con l'ospite che con l'eventuale vettore.

LAVORI CITATI

Alonso E., I. Garcia-Luque, A. De La Cruz, B. Wicke, M.J. Avila-Rincòn, M.T. Serra, C. Castresana e J.R. Diaz-Ruiz, 1991. Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance - breaking Tobamovirus in pepper. *Journal of General Virology*, 72, 2875-2884.

- Avila-Rincón M.J., M.L. Ferrero, E. Alonso, I. Garcia-Luque e J.R. Diaz-Ruiz, 1989. Nucleotide sequences of 5' and 3' non-coding regions of pepper mild mottle virus strain S RNA. *Journal of General Virology*, 70, 3025-3031.
- Betti L., M. Tanzi e A. Canova, 1986. Evolutionary changes in TMV pepper strains as a result of repeated host passages. *Phytopathologia Mediterranea*, 25, 39-43.
- Betti L., M. Tanzi e A. Canova, 1987. Biological, serological and morphological properties of several TMV pepper strains: a general picture and a suggestion for a new nomenclature. *Proceedings 7th Congress of Mediterranean Phytopathological Union, Granada, 1987*, 133-134.
- Betti L., M. Tanzi e A. Canova, 1988. Pepper mosaic virus strains and their adaptation to the host. I. Biological and serological behaviour. *Phytopathologia Mediterranea*, 27, 7-17.
- Boukema I.W., K. Jansen e K. Hofman, 1980. Strains of TMV and genes of resistance in *Capsicum*. *Proceeding 4th Meeting Eucarpia Capsicum Working Group, Wageningen, 1980*, 44-48.
- Brunt, A.A., 1986. Tomato mosaic viurs. In: *The Plant Viruses*, Vol. 2 (M.H.V. Van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat Eds.), *Plenum Publishing Corporation, New York, 1986*, 181-204.
- Dawson W.O., 1991. The pathogenicity of tobacco mosaic virus. *Seminars in Virology*, 2, 131-137.
- Dawson W.O. e K.M. Lehto, 1990. Regulation of tobamovirus gene expression. *Advances in Virus Research*, 38, 307-342.
- Dolja V.D. e J.C. Carrington, 1992. Evolution of positive-strand RNA viruses. *Seminars in Virology*, 3, 315-326.
- Francki R.I.B., M. Zaitlin e C.J. Grivell, 1971. An unusual strain of Tobacco mosaic virus from *Plumeria acutifolia*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 24, 815-819.
- Francki R.I.B., C.M. Fauquet, D.L. Knudson e F. Brown, 1991. Classification and nomenclature of viruses. 5th Report of ICGV. *Archives of Virology*, Supplement 2, 357-359.
- Fraser R.S.S., A. Gerwitz e L. Betti, 1989. Deployment of resistance genes: implications from studies on resistance-breaking isolates of tobacco mosaic virus. *4th*

- International Plant Virus Epidemiology Workshop, Montpellier, 1989*, 154-157.
- Gibbs A., 1986. Tobamovirus classification. In: *The Plant Viruses*, Vol. 2 (M.H.V. Van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat Eds.), *Plenum Publishing Corporation, New York, 1986*, 167-180.
- Goldbach R., O. Le Gall e J. Wellink, 1991. Alpha-like viruses in plants. *Seminars in Virology*, 2, 19-25.
- Hamilton R.I., J.R. Edwardson, R.I.B. Francki, H.T. Hsu, R. Hull, R. Koenig e R.G. Milne, 1981. Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. *Journal of General Virology*, 54, 223-241.
- Kingsbury D.W., 1985. Species classification problems in virus taxonomy. *Intervirology*, 24, 62-70.
- Kingsbury D.W., 1988. Biological concepts in virus classification. *Intervirology*, 29, 242-253.
- Mahy B.W.J., 1991. Unity and diversity of viruses. *Seminars in Virology*, 2, 3-9.
- Mans R.M.W., C.W.A. Pleij e L. Bosch, 1991. tRNA-like structures. Structure, function and evolutionary significance. *European Journal of Biochemistry*, 201, 303-324.
- Martelli G.P., 1992. Classification and nomenclature of plant viruses: state of the art. *Plant Disease*, 76, 436-442.
- Martelli G.P., 1993. The new classification of plant viruses. *Petria* 3, in press.
- Matthews R.E.F., 1985. Viral taxonomy for the nonvirologist. *Annual Review of Microbiology*, 39, 451-474.
- Meshi T., T. Ohno, H. Iba e Y. Okada, 1981. Nucleotide sequence of a cloned cDNA copy of TMV (cowpea strain) RNA, including the assembly origin, the coat protein cistron, and the 3' non-coding region. *Molecular and General Genetics*, 184, 20-25.
- Rabiti A.L., L. Betti, P. Torrigiani, N. Bagni, M. Brizzi, F. Marani e A. Canova. 1993. Evaluation of polyamine content in TMV-type particles. *6th International Congress of Plant Pathology, Montreal 1993*, Abst. 17.1.5.
- Rast A. Th.B., 1979. Pepper strains of TMV in the Netherlands. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwweten schappen Rijksuniversiteit Gent*, 44/2, 617-622.

- Rast A.Th.B., 1991. Screening germplasm of *Solanum melongena* for resistance to the eggplant strains of Bell pepper mottle virus (BPMV) and other Tobamoviruses. *Capsicum Newsletter*, 10, 26-32.
- Van Regenmortel M.H.V., 1975. Antigenic relationships between strains of tobacco mosaic virus. *Virology*, 64, 415-420.
- Van Regenmortel M.H.V., 1983. Applying the species concept to plant viruses. *Archives of Virology*, 104, 1-17.
- Van Regenmortel M.H.V., 1990. Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirology*, 31, 241-254.
- Wetter C., M. Conti, D. Altschuh, R. Tabillion e M.H.V. Van Regenmortel, 1984. Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology*, 74, 405-410.
- Wetter C., I. Dore e M. Bernard, 1987. Bell pepper mottle virus, a distinct tobamovirus infecting pepper. *Journal of Phytopathology*, 119, 333-344.