

2. 7. Az árpa csíkos mozaik - barley stripe mosaic hordeivirus (BSMV)

I. A betegség

Földrajzi elterjedés, kártétel: A betegséget először Mc Kinney 1953-ban írta le az Egyesült Államokban, később az árpa termesztő területeken jórészt mindenhol fellelték. A tüneteket már a század tizes éveiben ismerték. A korábban fiziológias elváltozásnak tartott (false stripe) betegség főleg az árpát fertőzi, de néha búzán is előfordul. Montana államban alig 9%-os fertőzés mellett is mintegy 55 %-os termés kiesést észleltek, s nem egyszer abba kellett hagyni a termesztést a fertőzés miatt. Bár már toleráns fajtákat termesztenek, a termésveszteség még ma is jelentős. A termésveszteség a fajtától is, a fertőzés idejétől is függ.

Tünetek: Az árpán az alsó levelek általában tünetmentesek, míg a fiatal, újonnan kifejlődött leveleken hosszú sárga csíkozottság figyelhető meg (29. ábra). Néha, az alkalmazott fajtától vagy a törzstől függően ezek a klorotikus sárga csíkok el is halnak, a korai fertőzés a növény teljes pusztulását is eredményezheti. A sárgulás gyakran az egész növényre kiterjed. Zabon hasonló tüneteket kapunk (30. ábra). A fertőzött növények növekedése lassú, a növények törpülnek, rosszul bokrosodnak, a kalászképzés elmarad. Latens fertőzés is előfordul. A Magyarország-i izolátum (BSMV-H) tünetei gyengék, alig láthatók (31. ábra).

29. ábra

A BSMV fertőzés tünete
árpán



30. ábra

A BSMV fertőzés tünete
zabon





31. ábra

A BSMV orosz (Ru) és magyar (H) törzs fertőzése árpán (MV7) eltérő tüneteket okoz



32. ábra.

A BSMV-H törzs
a kukoricát fertőzi

33. ábra

A BSMV fertőzése
Chenopodium quinoa-n
lokális léziókat okoz



Tesztnövényein okozott tünet: Árpa (Hordeum vulgare): Erős csíkos mozaik foltosságot okoz az MV7-es fajtán. Ugyanez a fajta a vírus felszaporítására is alkalmas gazdanövény (31. ábra).

Búza (Triticum aestivum): tünetmentes szisztémikus fertőzés, vagy igen enyhe tarkulás. Kukorica: Általában a BSMV törzsek eltérnek a tekintetben, hogy a csemegekukoricát fertőzik-e (pl. az Argentina mild törzs erős tüneteket ad, az orosz (Ru) törzs nem). Szisztémikus fertőzése komoly "aberrációkat" okoz a kukoricán, a gazda genomba épülve torzulásokat, kinövéseket okoz, amelyek öröklődnek. E tulajdonságuk miatt a genetikai kutatás objektumai is. A magyar izolátumok (BSMV-H) fertőzése a csemegekukoricán sárgás foltokat, csíkos mozaikot gyenge torzulásokat okoz (32. ábra). A BSMV törzseket az árpán okozott tünetei alapján csoportosítják erős, gyenge vagy közepes patogenitású törzsekre. Az erős tüneteket adó törzsek az árpát is, a búzát is fertőzik, a zabot nem, vagy rosszul. Cukorrépa Beta vulgaris sárga helyi klorotikus foltokkal válaszol a fertőzésre. Lokális léziós gazda a Chenopodium amaranticolor ill. a C. quinoa (33. ábra).

Gazdanövénykör, rezisztenciaforrások: A BSMV ellen igazi rezisztenciaforrást eddig nem találtak, minden törzs ellen valóban rezisztens fajtát nem állítottak elő. A BSMV gazdanövényköre igen tág. Bár néhány kétszikű növényt is fertőz, mégis az egyszikűek jelentősége kiemelhető. Főleg a gyomfajok játszanak fontos szerepet. A kísérletekben fogékonynak talált fajok listájából (Jackson és Lane,

1981) csak néhányat sorolok itt fel: (Agrostidae) Agrostis alba, Apera spica venti, Phleum pratense, Stipa capillata, (Andropogonae) Sorghum halepense, (Avenae) Avena abyssinica, A. byzantina, (Festucae) Brachypodium silvaticum, Briza media, Bromus inermis, B. mollis, B. ramosus, B. sterilis, B. tectorum, Dactylis glomerata, Festuca pratensis, F. rubra, Melica altissima, Poa annua, P. pratensis, (Hordeae) Aegilops bicornis, Agropyron caninum, A. repens, Hordeum bulbosum, H. jubatum, H. leporium, H. murinum, H. vulgare, Lolium perenne, Secale cereale, Triticum aestivum, T. dicoccum, T. durum, T. sativum, T. vulgare, (Oryzeae) Oryza sativa, (Paniceae) Digitaria sanguinalis, Echinochloa crus-galli, Panicum miliaceum, Setaria glauca, S. italica, (Phlarideae) Anthoxanthum odoratum, (Tripsaceae) Zea mays.

Rezisztencia nemesítés szempontjából igen fontos, hogy csak az Agropyron trachyaculum rezisztensnek tartott faj, a többi fogékony. A világ más tájain, ha nem is minden törzsrre, de rezisztens fajtákat már előállítottak. Ilyen a Modjo és a Moreval néhány genotípusa, ahol a rezisztenciát minimum két recesszív gén működése szabályozza, míg Inouye (1962) szerint egyes fajtákban a rezisztencia öröklődése domináns génhez kötött. Vasquez et al. (1974) a Modjo és a Moreval fajták keresztezései során megállapították, hogy az ellenállóképesség a virustörzsek virulenciájától nagymértékben függ. Carroll et al. (1979) szerint a mechanikai fertőzésre kevésbé fogékony fajták (Modjo x Vantage) maggal sem terjednek, s ez recesszív génhez kötött.

A rezisztencia-nemesítés egy új lehetőségét, a szomaklonális variációk

felhasználása adja ez esetben. Anthera kultúrából felnevelt növényekből magunk is megkíséreltünk BSMV fertőzésre rezisztens új búzanövényeket előállítani (Sági, et al., 1989, nem közölt).

Természetes terjedés, járványtani vonatkozások: BSMV-vel fertőzött növények pollenjéből virionokat mutattak ki, a pollenátvitelt és a belső magátvitelt kísérletileg is bizonyították (Bennett, 1969). A magátvitel mértéke a gazda genotípusától, a fertőzés idejétől és körülményeitől függ. Mértéke meghaladja az 50%-ot is, de elérheti a 87 %-ot is.

Mechanikai úton könnyen terjed. Azok a fajták, amelyek a mechanikai fertőzésnek ellenállóbbak voltak, kevésbé vitték át a kórokozót maggal is. A betegség főleg árpán fordul elő, de az Egyesült Államokban Avena fatua-n is megtalálták (Chiko, 1975). A természetes fennmaradást a magfertőzések biztosítják, míg a világméretű elterjedését a nemesítők közötti magcserék biztosítják. A hazai BSMV izolátumokat is nemesítő telepekről gyűjtöttük be, míg a nagyüzemi termesztésben a betegséget (eddig) nem találtuk meg. Adott területen tovább szaporított beteg vetőmag a járvány kialakulását is elősegíti. Az egyes növények mechanikai úton (sebzés, agrotechnikai műveletek) fertőződnek. A fogékony fajok felsorolásából is adódik az a következtetés is, ha e vírusbetegség megjelenik évelő fűféléinken, már lehetetlen lesz megvédeni kultúránkat a járványoktól. Az évelő fűvek vírusfertőzöttségének rendszeres felmérése hazánkban még nem történt meg, véleményem szerint ezek csak mint feltételes vírusforrások

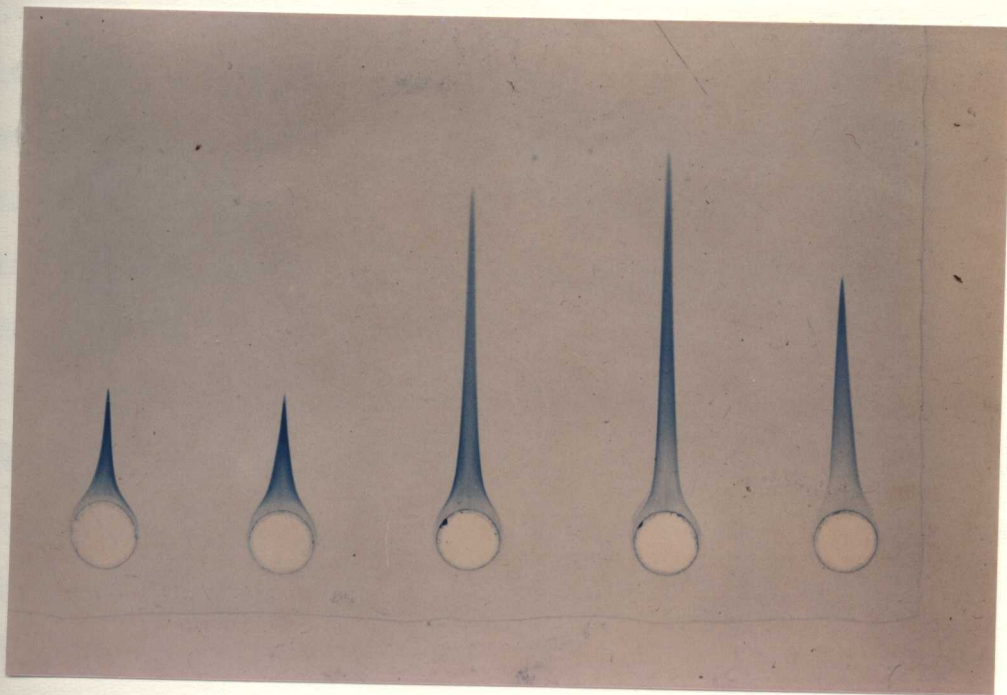
(potenciális vírusrezervoárok) szerepelnek.

Védekezés: Legfontosabb eleme a vetőmag fertőzöttségének ellenőrzése. E módszerrel az Egyesült Államokban komoly sikereket értek el. A magfertőzöttség elbírálása a rendelkezésre álló antiszérumokkal és az érzékeny enzimhez kötött immunológiai vizsgálattal (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) megoldható. Lister (1978) szerint e módszerrel ezer mag közül egy fertőzése is kimutatható. Ennek alsó határa kb. 50 ng/ml. Magvak fertőzöttség vizsgálatára a rocket immuno-elektroforézist (34. ábra) is sikerrel lehet alkalmazni (Gáborjányi és Tóbiás, 1984). Újabbán a BSMV kimutatására alkalmassá tett és dot immunoblot assay (DIA) néven ismertté vált szerológiai folt-reakcióval (Nagy és Gáborjányi, 1990) igen alacsony (50 ng BSMV) is kimutatható.

Főleg a vetőmagtermesztő vállalatoknál és növénynemesítési intézetekben a vetőmag rendszeres ellenőrzése elengedhetetlen követelmény lenne. Tekintettel arra, hogy a betegség hazánkban még nem okozott jelentős kárt, nagyüzemi táblákon még nem jelentkezett, az évelő gyomok még nem fertőződtek meg, még sikeresen védekezhetünk a betegség tömeges elterjedése ellen a karantén rendszabályok betartásával.

II. A kórokozó

A BSMV hazai izolátumai főbb tulajdonságaikban (főbb tünetei alapján, szerológiai reakcióiban, a köpenyfehérje molekulatömegében stb.)



34. ábra

A BSMV immunoelektroforézise mennyiségi meghatározásra

megegyeztek egymással, azokat egységesnek tekintettük és BSMV-H-ként jelöltük. Tulajdonságait kezdetben avval az izolátummal hasonlítottuk össze, amelyet Dr. W. Huth bocsájtott rendelkezésemre. Tekintettel arra, hogy mindkét izolátum rendkívüli tulajdonságokkal rendelkezik, ezért azokat közösen tárgyalom Nagy és Gáborjányi (1990) kézírata alapján.

Anyag és módszer

Vírus izolátumok és törzsek. A BSMV magyar izolátumai (BSMV-H) szabadföldről gyűjtött tavaszi árpáról származtak. A Braunschweig-i izolátumot (BSMV-Br) Dr. W. Huth bocsátotta rendelkezésünkre. A BSMV összehasonlító törzsei közül az orosz törzs (BSMV-Ru) Dr. J.G. Atabekov, a Montana törzs (BSMV-Mo) és az Argentina mild (AmIII) Dr. Beczner L., a Norwich törzs (BSMV-Nw) Dr. Bisztray Gy., a walesi (BSMV-W), Dr. P. Catheral, a North Dakota törzs (BSMV-Nd-18) Dr. Jackson, A.O. vírusbankjából származott. Az BSMV-vel rokon Poa szemi-látens vírus (PSLV) erős tüneteket okozó törzsét még néhai Dr. Beczner L. bocsájtotta rendelkezésünkre.

Inokuláció. Az árpa (Hordeum vulgare cv. GK. Omega) és a búza (Triticum aestivum cv. Martonvásári 8) növényeket üvegházban neveltük fel. A növényeket kétleveles állapotban mechanikai úton inokuláltuk fertőzött árpa növények 0,1 M -os Sörensen foszfát pufferrel (pH 7,0) 1:2 arányban hígított szövetnedvével, vagy egyes esetekben tisztított vírusoldattal. Abrázívumként Celite-t használtunk.

Vírustisztítás. Minden vírustörzs vagy izolátum tisztításához szisztemikusan fertőzött növények leveleit használtuk fel két, vagy három héttel az inokuláció után. A vírusok tisztítását Lane (1974) leírása alapján végeztük. Az első, magas fordulatszámú centrifugálást követően a mintákat 10-40 %-os 1xTE-vel (10 mM TRIS; 1 mM EDTA; pH 7,2) pufferolt lineáris cukorgrádiensre rétegeztük. Az ultracentrifugálást Beckman SW 27-es rotorban 21 000 fordulatszámon 105 percig végeztük 5 C⁰-on. Cukorgrádiens centrifugálás után a BSMV rendszerint két zónában különül el. Tekintve, hogy a BSMV virionok könnyen összezapódnak (aggregálódnak), a két elkülönülő zóna gyorsabban ülepedő része feltehetően aggregált virionokat tartalmaz (Brakke és Palomar, 1976). Ezzel szemben a BSMV-Br törzs tisztítása során a cukorgrádiensben öt elkülönülő zónát ismerthettünk fel. A kísérletek egy részében ezt az öt frakciót egyesítettük, magas fordulatszámú centrifugálással ülepitettük, majd 1xTE pufferrben oldottuk. Más esetekben ISCO grádiens leszedővel elkülönítettük a leglassabban ülepedő két csúcsi (top 1 és top 2), a középső- (middle 3) és a leggyorsabban ülepedő alsó (bottom 4 és 5 egyesített zóna) részekre. Minden elválasztott frakciót elkülönítve cukorgrádiens centrifugálással tovább tisztítottuk. Végül az üledékeket 1xTE pufferben oldottuk fel. Az AmIII törzs tisztítása során a két, virionokat tartalmazó sávot szintén elválasztottuk és összehasonlítottuk a Br törzs elkülönített zónáival. Egy másik kísérletben a Br törzs cukor grádiens centrifugálása után a grádiens 1 ml-es mintáinak fertőzőképességét vizsgáltuk.

Elektronmikroszkópia. A BSMV-H és BSMV-Br izolátumok tisztított mintáit desztillált vizes hígítás után vittük fel a formvar hárttyával fedett elektronmikroszkópos rácsokra, egy percig 2%-os uranil acetát oldattal festettük, majd JEOL 100XL elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Szerológia. A BSMV és PSLV antiszérumokat ujjéländi fehér nyulakban termeltük Hunter et al. (1986) szerint. Az antiszérumból az immunoglobulint (IgG) Steinbuch és Audran (1969) alapján tisztítottuk. A H és Br izolátumok, valamint az összehasonlító törzsek (Ru és AmIII), valamint a PSLV szerológiai rokonságát két módszerrel állapítottuk meg. Az egyik lehetőség a rocket-immunoelektroforézis volt (Gáborjányi - Tóbiás, 1984). Ezt az eljárást egyben a víruskoncentráció mérésére is felhasználtuk. A másik, szerológiai rokonság kimutatására alkalmas módszer a dot immunobinding analízis (DIA) volt. A közvetett DIA-t Powell (1987) leírása alapján alkalmaztuk némi módosítással. A reakcióhoz 200 szoros hígítású peroxidáz enzimmel konjugált disznó-antinyúl IgG-t használtunk. A szubsztrátként alkalmazott 0,01 g 3-amino-9-etil-karbazol-t 6 ml dimetil-szulfoxidban oldottuk, majd a reakcióelegyhez 50 ml 0,02 M nátrium acetát (pH 5,1) oldatot és 0,4 ml tömény hidrogén peroxidot adtunk. A nitrocellulóz membránokat öt percig sötétben inkubáltuk.

A vírus köpeny-fehérjék gélelektroforézise. A tisztított virionokat Laemmlí (1970) féle disszociációs pufferben forraltuk vízfürdőn 2 percig. A minták fehérjéit 12,5 %-os, nátrium dodecil szulfátot tartalmazó poliakrilamid gélben (SDS-PAGE) választottuk el Larkins és

Hurkman (1978) szerint. Az elektroforézis után a fehérjéket Coomassie BB R-250-el festettük meg. Molekulatömeg standardként a BSMV-Nd 18 és a PSLV és a dohány mozaik vírus köpenyfehérje szerepeltek.

A virionok egyszálú RNS-einek izolálása. A tisztított virionokból a nukleinsavakat az SDS-fenol-kloroform kivonási módszerrel tártuk fel (Swinghammer és Symons, 1977). Etanolos kicsapás után a nukleinsavakat TE pufferben oldottuk, majd 1,5 %-os TBE-vel (90 mM TRIS, 90 mM bórsav, 10 mM EDTA, pH 8,3) pufferelt, nem denaturáló agaróz gélben elektroforetizáltuk. Az RNS csíkokat etidium bromidos festéssel tettük láthatóvá, és ultraibolya fényben fényképeztük.

RNS hibridizálás. Az RNS kivonatokat formaldehiddel és formamiddal denaturáltuk majd MAE pufferben (0,04 MOPS; 10 mM nátrium acetát és 1 mM EDTA, pH 7,0) oldott, 2,2 M formaldehidet tartalmazó 1,5 %-os agaróz gélben elektroforetizáltuk Maniatis et al. (1982) szerint, majd a nukleinsav sávokat nitrocellulóz membránon megkötöttük (nitrocellulose blotting). Az előhibridizációt és a hibridizációt Wahl et al. (1979) szerint végeztük. A membrán szűrőt négyszer mostuk, minden esteben 10-10 percig, 65 C⁰-on 0,1 % SDS-t tartalmazó 2xSSC-ben (0,3 M NaCl és 0,03 M nátrium citrát, pH 7,0), majd autoradiografáltuk. A ³²P-vel jelölt DNS kópiát (cDNA-t) az AmIII egyfonalú RNS-ből készítettük reverz transzkriptáz enzimel, véletlen kezdésű, ún. "random priming" módszerrel Taylor et al. (1976) szerint. A be nem épült nukleotidokat kétszeri etanolos kicsapással távolítottuk el.

Kettősfonalú RNS kivonása .A BSMV törzsek és a PSLV kettősfonalú RNS-einek kivonását Morris és Dodds (1979) módszerének módosításával végeztük. Szisztémikusan fertőzött növények öt-tíz grammos mintáit folyékony nitrogénben homogenáltuk majd 20 ml kétszeres töménységű STE-ben (20 mM TRIS, 200 mM NaCl és 2mM EDTA, pH 7,0) tártuk fel. A nukleinsavakat fenolos módszerrel vontuk ki (20 ml STE-el telített 0,1% 8-hidroxikinolint tartalmazó fenollal, 20 ml kloroform-pentanol 24:1 arányú elegyével 2 ml 10 %-os SDS-el és 0,2 ml 2-merkaptó etanollal). A CF-11 cellulóz oszlop kromatográfia után a mintákat 1 µg RNáz-A-val 30 percig kezeltük 37 C⁰-on, majd 10 µg/ul DNáz-I-el 20 percig 30 C⁰-on emésztettük 0,03 M MgCl₂ jelenlétében. A kettősfonalú RNS-eket 1,1 %-os nem denaturáló agaróz gélben elektroforetizáltuk a korábban leírtak szerint.

Eredmények

Vírus izolátumok. Mind a BSMV-Br, mind a -H izolátum mechanikailag könnyen átvihető volt. A H izolátum fertőzése árpán apró, sárgás foltokkal tarkított gyenge szisztémikus mozaik tüneteket okozott, míg a búzán a fertőzés tünetmentes maradt. A Br izolátum fertőzése árpán erős csíkozottságot idézett elő, búzán súlyos sárgulást és szövetelhalást eredményezett. A Br izolátummal két-három leveles állapotban fertőződött növények egyharmada az inokulációt követő három hét múlva elpusztult.

Elektronmikroszkópia .A BSMV-Br vagy -H izolátummal fertőzött növények

nyers szövetnedvében rövid, merev, pálcika alakú virionok mutathatók ki, (35. ábra), amelyek mérete megegyezik a különböző szerzők által leírtakkal (Brakke és Palomar, 1976; Hunter et al., 1986). A virionok végeinek aggregálódása miatt az egyes virionok méretének megállapítása nem könnyű, s e miatt a mért értékek is kisebb eltéréseket mutatnak.

Szerológia . A Br és H izolátumok mintái a rocket immunoelektroforézis során pozitív reakciót (precipitációs csúcsot) adtak az antiBSMV immunoglobulinnal, de az antiPSLV-IgG-vel nem fajlagosan (aspecifikusan) reagáltak. A dohány mozaik vírus U1 törzse sem az antiBSMV- sem az antiPSLV-IgG-vel nem reagált. A rocket immunoelektroforézis megfelelő módszernek bizonyult a PSLV és BSMV fertőzések megkülönböztetésére.

Az immunkötési pont vizsgálat (dot immunobinding analysis) szintén azt mutatta, hogy a Br és a H izolátumok szerológiai tulajdonságaikban azonosak a többi BSMV törzsszel és különböznek a PSLV-től. A BSMV és PSLV szerológiai tulajdonságaival kapcsolatos eredményeink megegyeznek Hunter és munkatársai által (1986) leírtakkal.

A köpenyfehérjék gélelektroforézise

A BSMV-Br és -H izolátumok köpenyfehérjéinek SDS-PAGE vizsgálata során csak egy-egy fehérje jelenlétét mutattuk ki. A BSMV-H köpenyfehérje molekulatömege kb. 25 kD volt, hasonlóan a Ru és Nd 18 törzsekéhez, míg a Br izolátum köpenyfehérje molekulatömege 23.5 kD volt. A BSMV-Br törzs köpenyfehérjéje tehát kisebb, mint a többi BSMV törzs fehérjéje,

de nagyobb, mit a PSLV (23 kD) köpenyfehérje (36. ábra).

A virion egyszálú RNS vizsgálata. A BSMV-H izolátum tisztított virionjaiból kivont nukleinsavak agaróz gél elektroforézise során négy, elkülönülő csíkot kaptunk, míg a Br törzs esetén csak hármat. A H izolátum három leghosszabb RNS-e és a Br izolátum két hosszú RNS-e azonos mozgású volt a többi összehasonlító BSMV izolátum genomikus RNS-eivel, de különböző a PSLV genomikus RNS-eitől. Mind a H, mind a Br izolátum kis RNS-ének molekulatömege 27000 volt, hasonlóan ahhoz a 800 nukleotida hosszúságú szubgenomikus RNS-hez, amit Jackson et al. (1983) és Dolja et al. (1983) már korábban leírtak más vírustörzseknel. A ^{32}P -al jelölt cDNS hibridizálási kísérletek, amelyekben az AmIII törzs genomikus RNS-éről készítettünk másolatot rokonságot állapítottunk meg a BSMV más törzsei és a Br valamint a H izolátumok között. A PSLV RNS nem hibridizált a kísérletek során. A 37. ábra azt is mutatja, hogy a H és Br izolátumok kis nukleinsav komponense virion eredetű volt.

A kettősfonalú RNS-ek vizsgálata. A BSMV-H és -Br törzs RNS-einek megfelelő kettősfonalú, replikatív RNS-eket lehetett kivonni a BSMV-H és a -Br izolátummal fertőzött növényekből (38. ábra). Két másik kettősfonalú nukleinsav eredete és szerepe tisztázatlan.

Következtetések. Az árpa csíkos mozaik vírus számos törzse ismert. E törzsek nagyrészt már korábban jól jellemezték (Lane, 1974, Jackson és Lane, 1981). Bár a BSMV jól megkülönböztethető a hozzá hasonló PSLV-től, és a többi, nem rokon növényi vírustól, mégis a BSMV egyes

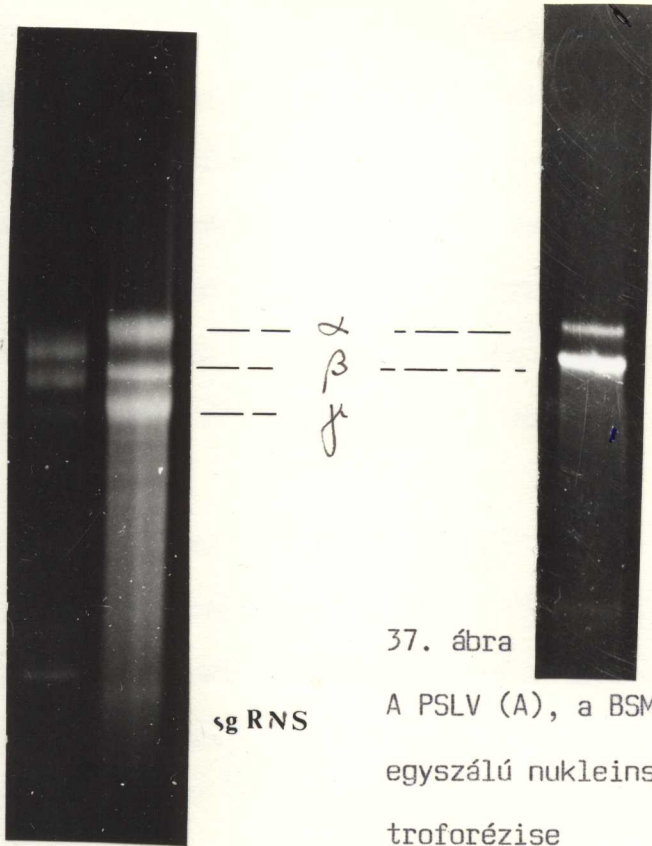


35. ábra. A BSMV elektronmikroszkópos képe (BSMV-H)

A jel 100 nm hosszúságnak felel meg.



36. ábra. A BSMV izolátumok köpenyfehérjéinek molekulatömeg különbségei poliakrilamid gél elektroforézisben



sg RNS

A B

C

37. ábra

A PSLV (A), a BSMV-H (B) és a BSMV-Br (C) egyszálú nukleinsavainak agaróz gél elektroforézise



A B

38. ábra

A BSMV-Br (A) és a BSMV-H (B) kettősszálú nukleinsavainak agaróz gél elektroforézise

törzsei között a fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján nehéz különbséget tenni (Hunter et al., 1986). Egyedüli érdekes kivétel ez alól a virion RNS-ek elektroforézise (Jackson és Brakke 1973; Lane, 1974). A két-, három- és négykomponensű BSMV törzseket Jackson és Lane írták le 1981-ben a virion nukleinsavainak eltérő elektroforetikus mintázata alapján. Ennek ellenére ma már tudott, hogy minden BSMV törzs genomja három komponensű (Atabekov és Dolja, 1981).

A H és Br izolátumok pálcika alakú virionjai nagyon hasonlóak egymáshoz és a többi BSMV törzshöz, illetve a PSLV-hoz. A DIA során, valamint a rocket immunoelektroforézisben azonban mindkét izolátum különbözött a PSLV-től, de hasonló volt a többi BSMV törzshöz.

Az egyszálú és kettős fonalú RNS-ek mintázata alapján a Br izolátum az álkétkomponensű (pseudobipartite) vírusok közé tartozik, míg a H izolátum a valódi háromkomponensű (orthotripartite) BSMV törzsek közé sorolható (Jackson et al. 1983). Virionjaik egyszálú nukleinsava hibridizált az AmIII törzs RNS-ével készített ^{32}P jelölt cDNS-hez, ami magasfokú szekvencia-homológiát tételez fel.

Irodalom:

- Atabekov, J.G. and Dolja, V.V. (1986): Hordeiviruses. Structure and replication. In: van Regenmortel M.H.V. and Fraenkel Conrat, H.(Eds.): The Plant Viruses. Plenum Publ. Co. Vol. 2. pp. 3997-420.
- Brakke, M. K. and Palomar, M.K. (1976): Separation of components of

barley stripe mosaic virions by density gradient centrifugation.

Virology 71: 255-261.

Bennett, C.W. (1969): Seed transmission of plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 14: 221-261.

Caroll, T.W. Gossel, P.L. and Batchelor, D.L. (1979): Inheritance of resistance to seed transmission of barley stripe mosaic virus in barley. *Phytopathology*, 69 431-433.

Chico, A.W. (1975): Evidence of multiple virion components in leaf dip preparations of barley stripe mosaic virus. *Virology*, 63: 115-122.

Dolja, V.V., Lunina, N.A. Leiser, R.M., Stanarius, T., Belzhelarskaya, S.N., Kozlov, Y.V. and Atabekov, J.G. (1983): A comparative study on the in vitro translation products of individual RNAs from two-, three, and four-component strains of barley stripe mosaic virus. *Virology* 127: 1-14.

Gáborjányi, R. and Tóbiás, I. (1984): Rocket electrophoresis: a novel method for quantitative detection of barley stripe mosaic virus from infected barley and wheat plants. *Cereal Res. Commun.* 12: 263-264.

Hunter, B.G., Heaton, L.A., Bracker, C.E. and Jackson, A.O. (1986): Structural comparison of poa semilatifolius virus and barley stripe mosaic virus. *Phytopathol.* 75: 322-326.

Inouye, T. (1962): Studies on barley stripe mosaic in Japan. *Ber. Ohara Inst.* 11:415-510.

Jackson, A.O. and Brakke, M.K. (1973): Multicomponent properties of barley stripe mosaic virus ribonucleic acid. *Virology* 55: 483-494.

Jackson, A.O. and Lane, L.C. (1981): Hordeiviruses. In: Kurstak, E. (Ed.) *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*,

Elsevier/North Holland. pp. 565-625.

- Jackson, A.O., Dawson, J.R.O., Covey, S.N., Hull, R., Davies, J.W., McFarland, J.E. and Gustafson, G.D. (1983): Sequence relations and coding properties of a subgenomic RNA isolated from barley stripe mosaic virus. *Virology* 127: 37-44.
- Lane, L.C. (1974): The components of barley stripe mosaic and related viruses. *Virology*, 58: 323-333.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 . *Nature* 227: 680-685.
- Larkins, B.A. and Hurkmann, W.J. (1978): Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.* 62: 256-263.
- Lister, R.M., Wright, S.E. and Kloots, J.M. (1978): *Phytopathol. News.* 12 198.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour, N.Y.
- Nagy, P.D. and Gáborjányi, R. (1990): Az árpa csíkos mozaik vírus két különleges törzsének jellemzése. *Növénytermelés.* (megjelenés alatt).
- McKinney, H.H. (1953): New evidence on virus diseases in barley. *Plant Dis. Repr.* 37: 292.
- Morris, T.J. and Dodds, J.A. (1979): Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69: 854-858.
- Powell, C.A. (1978): Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay . *Phytopathology* 69, 854-858.

- Steinbuch, M. and Audran, A. (1969): The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 134: 279-284.
- Swinghamer, M.W. and Simons, R.H. (1977): Translation of the four major RNA species of cucumber mosaic virus in plant and animal cell-free systems and in toad oocytes. *Virology* 79: 88-108.
- Taylor, J.M., Illmensee, R. and Summers, J. (1976): Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. *Biochem. Biophys. Acta* 442: 324-330.
- Vazquez, G., Peterson, G.A. and Timian, R.G. (1974): Inheritance of barley stripe mosaic reaction in crosses among three barley varieties. *Crop Sci.* 14: 429-432.
- Wahl, G.M., Stern, M and Stark, G.R. (1979): Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3683-3687.

2. 8. Az árpa sárga törpülés - barley yellow dwarf luteovirus (BYDV)

I.A betegség

Földrajzi elterjedés, kártétel: Általános vélemény szerint a világon a legelterjedtebb és egyben a legfontosabb árpát fertőző vírusbetegség. Oswald és Houston (1951) fedezték fel először Kaliforniában. Az Egyesült Államokban, Kanadában és Angliában járványszerűen fordult elő több évben is. A termésveszteség korai fertőzéskor elérheti a 100 %-ot is. Negyven-ötven százalékos veszteségekről gyakran esik szó, az őszi árpa termesztését helyenként megghiúsíthatja a vírusfertőzés. A kártétel a környezeti tényezőktől, a fertőzés idejétől és a genotípustól egyaránt függ.

Tünetek: Az árpa sárga törpülés tünetei igen változékonyak, más vírusbetegségekkel, vagy mikoplazmás fertőzésekkel könnyen összetéveszthetők. Az inokulációt követő 7-20. napon indul meg a levelek sárgulása. Az víruscsoport, amelybe a BYDV is tartozik nevét - luteovirus - is erről a tünetről kapta. Az idősebb levelek is elsárgulnak. A sárgulás a levél apikális részén kezdődik, s halad a levélalap felé. A levélerek melletti szövetrészek kezdetben még zöldek maradnak, majd csak később világosodnak ki. Ha a fertőzés a növényeket korai fejlődési állapotba érte, az egész növény elsárgul, míg kései fertőzés csak a zászlólevelek sárgulását eredményezi (39. ábra).Az általános sárgulás mellett jellemző a csúcsi levelek vöröses sárga



39. ábra
A BYDV fertőzés
tünetei árpán

40. ábra
A BYDV fertőzése
búzán a zászlóle-
velek eszineződését
okozza



elszineződése is (40. ábra). A növekedés erős gátlást szenved. A levelek keskenyebbek lesznek, kisebbek a megszokottnál. A szártagok megrövidülése bokros külsőt eredményez, ugyanakkor a gyökérzet feltűnően rosszul fejlődik. Ha a fertőzés koraősszel éri a növényeket, azok hamar legyengülnek, s a téli fagyok hatására kipusztulnak. A várható termésveszteség a tünetek súlyossága alapján becsülhető (Doodson and Saunders, 1970). A fertőzött növények kevés kalászt hoznak, gyakran meddők maradnak. A beteg növényről kelt magvak csírázóképesége kisebb (Panayotou, 1970). A betegség fellépesét és kártételét rendszerint szemrevételezéssel állapítják meg, amely módszer már csak azért sem használható, mert jórészt a termelők toleráns fajtákat igyekeznek használni.

Tesztnövényeken okozott tünetek: Avena sativa: sárgulás, Avena byzantina: sárgulás, a csúcsi levelek vörösödése (41. ábra). Hordeum vulgare: a levélcsúcstól kiinduló sárgulás.

Rezisztenciaforrások: A rezisztens (toleráns) fajták etióp eredetűek (Bruehl és Damsteegt, 1964). A toleranciát a Yd2 gén szabályozza a vírus replikáción keresztül. Két rezisztencia gén is ismert. Az Yd2 a 3. kromoszómán van, mint nem teljesen domináns gén, de egyes kombinációkban recesszív génként szerepel. Homozygota formájában csaknem teljesen tolerálja a vírusfertőzést. Faj- és nemek közötti keresztezések eredményeképp vad, Hordeum ill. Elymus fajokkal is BYDV toleráns hibrideket állítottak elő. Az Yd2 gént már búzába is sikerült bejuttatni.

41. ábra

A BYDV fertőzése

zabon vörösödést

idéz elő



Gazdanövénykör: Több, mint száz egyszikű gyom és kultúrfaj, javarésziük változik a vírustörzsek változatossága és a levéltetvek táplálkozási szokásai miatt.

Természetes terjedés, járványtani vonatkozások: Sebzéssel (mechanikai inokulációval), maggal nem terjed. A betegség terjesztésében több, mint húsz levéltetű faj vesz részt. Az átvitel formája a cirkulatív, perzisztens típusba tartozik. A levéltetvek a kórokozót harminc perces szívás után már felvehetik, de általánosabb a 12-30 órás felvételi idő. Hosszabb táplálkozás a fertőzés eredményességét növeli. Bár a kórokozó a vektorban nem szaporodik, az első fertőző szívásig egy-négy napos lappangási idő telik el. Mintegy négyórás fertőző táplálkozás elég a fertőzés eredményességéhez.

A luteovírusoknak jelenleg mintegy harmincöt tagját ill. feltételezett képviselőjét tartják számon (Matthews, 1979). Ezek az önálló vírusok, vagy vírustörzsek egymáshoz hasonlítanak (cf. Rochow és Duffus, 1981). Az árpa sárga törpeség vírus törzsei a levéltetű vektor szeint csoportosíthatók (Rochow, 1969a,b). Az RM izolátumok Rhopalosiphum maidis-sal, ritkán R. padi-val, Macrosiphum avenae-val és Sitobium graminum-mal is terjednek. Az RPV törzs általában R. padi-val, néha S. graminum-mal, de ritkán R. maidis-sel és M. avenae-vel is átvihetők. A MAV izolátumok fő vektora a M. avenae, de ritkán a R. maidis, R. padi és a S. graminum is. A legerősebb tüneteket a PAV izolátumok adják, általában a R. padi és a M. avenae terjeszti, a S. graminum és a R.

maidis csak ritkán (10. táblázat). A Gill által (1969) leírt SGV izolátum a S. graminum-al, R. padi-val, vagy a R. maidis-sal is terjed. Az öt izolátum típus két szerológiai csoportba osztható. Az RPV és a MAV izolátumok antigénjei különböznek a MAV és PAV izolátumoktól, amelyek hasonlósága szorosabb. Az SGV izolátumok a PAV csoporttal hasonló antigéneket tartalmaznak (Rochow és Carmichael, 1979). Természetesen az egyes izolátumok nem elkülönültek, hanem keverten is fertőzik a növényeket (Rochow és Muller, 1974).

10. táblázat.

Az árpa sárga törpeség vírus átviteli lehetőségei törzstípustól függően (Rochow 1969a szerint)

Vírus törzs	<u>Rhopalosiphon padi</u>	<u>Macrosiphum avenae</u>	<u>Rhopalosiphon maidis</u>
PAV	+	+	-
RPV	+	+	-
MAV	-	+	-
RMV	-	-	+

Egyes levéltetvek vektor tevékenységét a magas hőmérséklet nem befolyásolja, (pl. Rhopalosiphon padi, vagy Sitobium avenae), míg más vektorok (Shizapis graminum) alacsonyabb hőmérsékleten aktívabbak. A vedlés nem befolyásolja a vektor tevékenységét, de az utódokba a kórokozó nem kerül be.

A vírus éves körforgása szempontjából a vadon élő, évelő fűfélék kiemelt jelentőségűek, fontosabbak, mint a kultúrnövények (Plumb, 1983). Jelentős az őszi árpa, őszi búza, mint áttelelő növény különösen akkor, ha azt korán vetették, s ha a tél enyhe. A füveken és őszi vetéseken áttelenek a vektorok, tavasszal már közvetlenül fertőzik a kultúrnövényeket. Hazai tapasztalatok szerint (Nagy és Milinkó, 1986) az árpa sárga törpülés járványviszonyai a Nyugat-Európában megszokottaktól némileg eltér. Hazánkban mind a kemény, hideg tél, mind az erős nyári meleg és szárazság határt szab a kórokozó járványszerű elterjedésének. Nyáron a kukorica ültetvények biztosíthatják a kórokozó, illetve a levéltetvek fennmaradását. A járványok kialakulásának legkedvezőbb a hűvös 10-18 C⁰ hőmérséklet, a magas páratartalom. A levéltevek vagy a táblán fertőznek, nagy sárga foltokat okozva, vagy a szelek útján többszáz kilométer távolságot is bejárhatnak. Járványtani szempontból ez utóbbi a veszélyesebb, annak ellenére, hogy a vírusterjesztő egyedek száma kicsi. A beteg levelek sárga színe miatt a repülő tetvek szívesbben keresik fel először a beteg növényeket, evvel is növelve a fertőzés esélyeit. A másodlagos terjedésben főleg a szárnyatlan tetvek vesznek részt. A fertőző gócban középen a legsúlyosabbak a tünetek, mert itt történt az első fertőzés. A gócot körülölelő növényeken már enyhébbek a tünetek.

Védekezés: Legfontosabb a levéltetvek elleni védekezés. Kora őszi és késő tavaszi vetéseket kerülni kell. Felszívódó rovarölőszerek alkalmazásával védekezhetünk a másodlagos terjedés ellen. A kémiai

védelemre alkalmas a vetés utáni szisztemikus inszekticid granulátum, a másodlagos terjedés piretroid rovarölőszerekkel végezhető el, ha azt a levéltetvek nagy száma szükségessé teszi (Plumb, 1983).

Nálunk fejlettebb mezőgazdasággal rendelkező országokban a BYDV fertőzte sárga foltokat légi fényképezéssel derítik fel (Bayon et al. 1983). A legeredményesebb védekezési mód a rezisztens ill. toleráns fajták termesztése.

A beteg növényekben a vírus koncentráció igen alacsony. A betegség kimutatására ezért legalkalmasabb az ELISA módszer (Rochow, 1979; Hu et al., 1985; Lister et al., 1985). A fertőzés kimutatására, alkalmazható hazai antiszérum BYDV ellen még nem készült. A törzsek jól elkülöníthetők monoklonális ellenanyagok készítésével (Lister és Rochow, 1979; Diaco et al. 1986; Torrance et al., 1986).

Immunspecifikus elektronmikroszkópos módszerrel a törzsek is jól elkülöníthetők (Paliwal, 1977; Diaco et al., 1986), de a módszer költséges és sok időt igénylő volta határt szab alkalmazhatóságának. Dot blot nukleinsav hibridizálással igen alacsony (1 ng) vírus mutatható ki. A módszert nem tömegvizsgálatok céljára dolgozták ki.

II. A kórokozó

A BYDV és a luteovírusok általános tulajdonságai

A BYDV a luteovírusok jellemző képviselője. A csoport az ICTV 1975. évi tanácskozásán nyert önállóságot, csak három taggal képviselve a csoportot. Jelenleg mintegy 15 más kórokozót állandó tagként tartanak számon, míg a csoportnak három feltételes és további 16 lehetséges tagja van (cf. Casper, 1985). Az állandó tagokat, így a beet western yellows virust, (BWYV), a burgonya levélsodródás vírust (potato leaf roll virus, PLRV) is a legfontosabb, jelentős gazdasági kárt okozó szántóföldi víruskórokozók között tartják számon. A rendszerezés, főleg módszertani nehézségek miatt nem teljes, nem általánosan elfogadott. A kórokozó-csoport tagjaira ugyanis jellemző, hogy csak levéltetvekkel terjednek, mechanikai inokulációval nem. Jelenlétük főleg a floemre korlátozódik, a floemben a víruskoncentráció alacsony, ezért tisztítási nehézségekkel kell megküzdeni. Gyakran a vektorátvitel fajlagossága, vektor-specifikus törzsek jelenléte is bonyolítja, gyakran megghiúsítja a vizsgálatokat. Különösen érvényes mindez a BYDV-ra, amely esetben a kórokozó jelenléte évtizedek óta ismert hazánkban, mégis nem eldöntött, milyen törzsek fordulnak elő. Mindezek okán a BYDV csoport további felosztása inkább szerológiai tulajdonságok alapján történik. A BWYV típusba tartoznak a BYDV RPV és RMV törzsei, (mint BWYV-törzsek) míg a típusos BYDV csoportba a PAV, MAV és SGV törzsek (Burnett, 1984;

Rochow, 1984). A szerológiai rokonság meghatározására legalkalmasabbnak a kettős ELISA bizonyult a módszer érzékenysége miatt. Rochow (1984) szerint a BYDV csoport felosztása az alábbiak szerint módosul:

1. MAV átvitel kizárólag *Sitobium avenae*-val,
2. PAV átvitel főleg *Rhopalosiphum padi*-val és *Sitobium avenae*-val,
3. RPV átvitel kizárólag *R. padi*-val;
4. RMV átvitel kizárólag *R. maidis*-sal;
5. SGV átvitel kizárólag *Sitobium graminum*-mal.

Tekintettel a RPV és RMV BWYV rokonságra igazán csak a MAV, SGV és PAV tekinthető "igazi" BYDV törzseknek. A törzsek elkülönítésére legalkalmasabb módszer a monoklón antiszérumokkal végzett immunpecifikus elektronmikroszkópia módszere (Diacó et al., 1986a,b). A módszerrel akár 7,5 pg vírus is kimutatható, kevert fertőzések bizonyítására is alkalmas. Az eltérő szerotípusú izolátumokkal készített monoklón antiszérumokkal kimutatható volt, hogy a MAV az RPV és a PAV közös epitóppal is rendelkezik.

A virion tulajdonságai

A luteovirusok egykomponensűek. A BYDV centrifugálásakor néha egy felső (top) komponenst is megfigyeltek, de ez csak üres fehérjeburok volt. A virionok hexagonálisak, kb. 24-27 nm nagyságrendűek. A luteovírus RNS-ek egyszálúak, kb. $1,8-2,4 \times 10^6$ molekulatömegűek. A BYDV RNS molekulatömege $1,85 \times 10^6$ (Brakke és Rochow, 1974). A köpenyfehérje kb.

23 kD nagyságrendű. (A feltételezett molekulatömeg 22,074, míg a MAV és az RPV típusokét rendre 23,50 és 24,45 kD -ban határozta meg Miller et al., 1988).

Replikáció

A luteovirusok replikációs menete kevésbé ismert, legtöbb ismeret a PLRV-al kapcsolatos. A PLRV RNS egyszálú, nem poliadenilált. A kódolt fehérje termékek között csak egy (71 kD) ismeretes, de ez nem a köpenyfehérje. Protoplasztokon találtak ugyan a köpenyfehérje nagyságrendjének megfelelő polipeptidet, de ez sem mutatott szerológiai rokonságot a köpenyfehérjével.

Barker és munkatársai (1984) a BYDV-nál kis-, talán szubgenomikus RNS-eket figyeltek meg. Ezek szerepe ismeretlen. A köpenyfehérje gén egy 17 kD-os nagyságrendű nyitott leolvasási szakasszal (open reading frame) van átfedésben. Ez is működőképes szakasznak felel meg, valószínűleg a vírus RNS 5' végén található fehérjét (VPg-t) kódolja.

A levéltetű-átvitel fajlagossága és a szerológiai tulajdonságok elkülönülése közötti azonosság arra utal, hogy az egyes törzsek közötti különbség a köpenyfehérje génben van. Miller és munkatársai (Miller et al., 1988) az RNS köpenyfehérje génjét (CP) klónozták (cDNA formájában), majd meghatározták a gén által kódolt aminosav sorrendet is. A CP gén a MAV izolátum esetében az RNS 5' végétől számítva kb. a genom hosszának felénél (50% és 60% távolság között) foglal helyet.

Nagy hasonlóságot mutattak ki ugyanakkor más ikozaéderes vírusok (tomato bushy stunt, turnip crinkle, carnation mottle) köpenyfehérjéinek bázissorrendjével is. A köpenyfehérje génen (PAV és RPV+PAV) csak egy bázis különbség (a 157. ill. 158. helyen) már azt eredményezi, hogy fenilalanin helyett prolin szerepel a köpenyfehérjében. Az egyes luteovírusok közötti epitóp hasonlóság szerepe igen fontos abból a szempontból, hogy a termelt köpenyfehérje blokkolhatja más (luteo) vírustörzsek fertőzését. Keresztvédettség kialakítása azért lenne oly fontos a biotechnológiai úton előállított (transzgenikus) növényekkel, mert sikeresen lenne kivédhető egy természetes fertőzés.

A replikáció kettősfonalú RNS (dsRNA) képzésén keresztül valósul meg. Gildow és munkatársai (1983) az öt ismert BYDV (illetve BWYMV) dsRNA elemzésekor az izolátumokat két csoportba osztották. A MAV, PAV és a SGV csoportban öt nukleinsav szálat különítettek el, ezek molekulatömege rendre 3,6; 2,0; 1,2; 0,55 és $0,50 \times 10^6$ dalton volt. A másik csoportban (RPV és RMV) csak négy dsRNS-t mutattak ki, 3,8; 1,6; 1,2 és $0,55 \times 10^6$ molekulatömegekkel. A 3,6-3,8 nagyságú hosszabb nukleinsavszálak hozzávetőlegesen megfelelnek a genom egyszálú nukleinsav ($1,85 \times 10^6$) replikatív formájának. A kisebbek feltételezetten a szubgenomikus nukleinsavak kettősfonalú formái. Mennyiségét tekintve a két hosszabb szál volt túlsúlyban. A kettősfonalú RNS-ek összetételében mutatkozó különbségek is alátámasztják az un. "BYDV" csoport szerológiai, illetve az átviteli tulajdonságokon alapuló megosztását.

Tisztítás

A luteovírusok viszonylag ellenállóak, de az alacsony víruskoncentráció miatt a tisztítás nem egyszerű, többnyire a szövetek enzimes kezelését igényli. Casper (1985) ajánlata szerint az alábbi módszert követhetjük:

1. Fiatal, friss leveleket és szárazakat késes homogenálóban aprítjuk, kétszeres mennyiségű 0,5 % merkapto-etanol tartalmazó 0,1 M Na-citrát pufferrel (pH 6,0).
2. A feltárt anyaghoz 2% technikai minőségű pektin glükozidázt (D'Arcy et al., 1983 cellulázt és Driselase-t ajánl) adunk, az enzimmel mintegy 3-7 órán át kezeljük a roncsolt szöveteket (rázás közben, 37 C⁰ -on).
3. Szűrés gézen. (Célszerű a szárazanyagot újra felhasználni, fagyasztással feltárni, folyékony nitrogénben elporítani).
4. A szűrlethez 0,67 térfogat kloroform : butanol 1:1 arányú keveréket adunk, 15-30 percen keresztül kevertetjük szobahőmérsékleten, majd 6000 alacsony fordulatszám (6000 ford/pec) mellett centrifugáljuk 10 percig.
5. Szűrés szűrőpapíron.
6. A virionokat 8% PEG 6000-el és 2% konyhasóval kicsapjuk, négy órán át pihenni hagyjuk 4 C⁰ -on.
7. A kiülepedett virionokat 8000 fordulatszámú centrifugálással (20 perc) gyűjtjük össze.
8. A felülúszót eltávolítva az üledéket kevés , 1% Triton-X-100-at tartalmazó 0,02 M foszfát pufferrel (pH 7,5) szuszpendáljuk.
9. Ultracentrifugálás 30.000 fordulaton 4 óráig 20 %-os cukorpárnára.

Néha a szobahőmérséklet kedvezőbb, mint a 4 C⁰. D' Arcy et al. (1983) szerint a gyökerekben a legmagasabb a víruskoncentráció, ezért érdemes a gyökereket is folyékony nitrogénben feldolgozni.

Nukleinsav vizsgálat

A fenolos módszer BYDV esetén nukleinsav kivonásra nem volt alkalmas. Brakke és Rochow (1974) által leírtak irányadók lehetnek. A nukleinsavat vagy 16 órán át 1% SDS-t 0,001 M EDTA-t és 200 µg bentonitot tartalmazó 0,1 M ammónium karbonát oldatban (pH 9,0) tartjuk 2 C⁰-on, vagy 5 percig hatvan fokon melegítjük 1% SDS, 0,5% merkaptó etanol és 0.05 M Na-hidrofoszfát oldat keverékében, 1mM EDTA 10% cukor jelenlétében pH 7,4-en. A virionokat centrifugálással lehet eltávolítani, nitrogén árammal szárítani.

A BYDV vírus fajlagos levéltetű vektorok tenyésztésének feltételeit csak napjainkra tudtuk megteremteni. Pályázatot adtunk be a levéltetű átvitel vizsgálatára és az egyes izolált vírustörzsek tulajdonságainak meghatározására. Eddigi eredményeink nem jogosítanak fel azok közreadására, ezért e vírus legfontosabb tulajdonságainak ismertetését csak pályatársaim munkái alapján foglaltam össze.

Irodalom:

Barker, H, Mayo, M.A. and Robinson, D.J. (1984): Poligenic resistance to

transmittible by aphids. *Plant Dis. Repr.* 35: 471-475.

Paliwal, Y.C. (1977): Rapid diagnosis of barley yellow dwarf virus in plants using serologically specific electron microscopy. *Phytopathol. Z.* 89: 25-36.

Panayotou, P.C. (1970): Effect of barley yellow dwarf virus infection on the germinability of seeds and establishment of seedlings. *Plant Dis Repr.* 62: 243-246.

Plumb, R.T. (1983): Barley yellow dwarf virus - a global problem. In: Plumb, R.T. and Thresh, J.M. *Plant Virus Epidemiology*. Blackwell Sci. Publ. Oxford. pp. 185-198.

Rochow, W.F. (1969a): Biological properties of four isolates of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* 59: 1580-1589.

Rochow, W.F. (1969b): Specificity in aphid transmission of a circulative plant virus. In: Maramorosch, K. (Ed.) *Viruses, Vectors and Vegetation*. Intersci. Publ. New York. pp. 157-198.

Rochow, W.F. (1979): Comparative diagnosis of barley yellow dwarf by serological and aphid transmission test. *Plant Dis. Repr.* 63: 426-430.

Rochow, W.E. (1984): Appendix I. Barley yellow dwarf. A proceedings of the Workshop CIMMYT Mexico pp. 204.

Rochow, W.F. and Carmichael, L.E. (1979): Specificity among Barley yellow dwarf viruses in enzyme immunosorbent assay. *Virology* 95: 415-420.

Rochow, W.F. and Duffus, J.E. (1981): Luteoviruses and yellows diseases. in: Kurstak, E. (Ed.) *Handbook of Plant Virus Infections*. Elsevier/North Holland, Inc. New York. pp. 147-170.

Rochow, W.F. and Muller, I. (1974): Mixed infections of barley yellow dwarf virus isolates in winter grains. *Plant Dis. Repr.* 58: 472-475.

Phytopathology 76: 225-230.

Doodson, J.K. and Saunders, P.J. (1970): Some effects of barley yellow dwarf virus on spring and winter cereals in field trials. *Ann. Appl. Biol.* 66: 361-374.

Gill, C.C. (1969): Annual variation in strains of barley yellow dwarf virus in Manitoba and the occurrence of greenbug-specific isolates. *Can. J. Bot.* 47: 1277-1283.

Gildow, F.E., Ballinger, M.E. and Rochow, W.F. (1983): Identification of double stranded RNAs associated with barley yellow dwarf virus infection of oats. *Phytopathology* 73: 1570-1572.

Hu, J.S., Rochow, W.F. and Dietert, R.R. (1985): Production and use of antibodies from hen eggs for the SGV isolate of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* 75:914-919.

Lister, R.M., Clement, D. and Skaria, M. and Mc Fatridge, J.A. (1985): Stability of ELISA activity of barley yellow dwarf virus. *Plant Dis.* 69: 854-857.

Lister, R.M. and Rochow, W.F. (1979): Detection of barley yellow dwarf virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 69: 649-654.

Matthews, R.E.F. (1979): Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 12: 132-296.

Miller, W.A., Waterhouse, P.M., Kortt, A.A. and Gerlach, W.L. (1988): Sequence and identification of barley yellow dwarf virus coat protein gene. *Virology*, 165: 306-309.

Nagy, P. és Milinkó, I. (1986): Adatok az árpa sárga törpeségvírus hazai járványtanához. *Növénytermelés*, 35: 493-500.

Oswald, J.W. and Houston, B.R. (1951): A new disease of cereals

potato leafroll virus. Rep. Scott. Crop. Res. Inst. 1983. p. 194.

Burnett, C.W. (1984): Preface, Barley Yellow Dwarf. Proceedings of the Workshop, CIMMYT, Mexico, 6.

Bayon, F., Ayrault, J.P. and Pichon, P. (1983): Role of aerial colour photography in detecting reservoirs of *R. padi* vectors of BYDV in autumn in Poitou-Charentes. Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent. 48: 813-821.

Brakke, M.K. and Rochow, W.F. (1974): Ribonucleic acid of barley yellow dwarf virus. Virology 61: 240-248.

Bruehl, G.W. and Darmteegt, V.D. (1964): Degree of resistance to barley yellow dwarf in selected Ethiopian barleys. Plant Dis. Reprtr. 48: 470-472.

Casper, R. (1985): Luteoviruses. In: Koenig R. (Ed.) The Plant Viruses. Vol. 3. Polyhedral Virions with Monopartite RNA Genomes. Plenum Press, New York and London, pp. 235-258.

D'Arcy, C.J., Hewings, A.D., Burnett, P.A. and Jedlinski, H. (1983): Comparative purification of two luteoviruses. Phytopathology 73: 755-759.

Diaco, R., Lister, R.M., Hill, J.H. and Durand, D.P. (1986a): Demonstration of serological relationships among isolates of barley yellow dwarf virus by using polyclonal and monoclonal antibodies. J. gen. Virol. 67: 353-362.

Diaco, R., Lister, R.M., Hill, J.H. and Durand, D.P. (1986b): Detection of homologous and heterologous barley yellow dwarf virus isolates with monoclonal antibodies in serologically specific electron microscopy.

Torrance, L., Pead, M.T. Larkins, A.P. and Butcher, G.W. (:986):

Characterization of monoclonal antibodies to UK isolate of barley yellow dwarf virus. J. gen. Virol. 67:549-556.

2. 9. Az ebír tarkulás betegség - Cocsfoot mottle sobemovirus (CfMV)

I. A betegség

Földrajzi elterjedés, kártétel: Általában a csomós ebíren fordul elő, de ritkán a búzát is fertőzi (Serjeant, 1964; Benigno és A'Brook, 1972). Tünetei gabonán nagyon hasonlóak a BMV, vagy a WSMV fertőzéséhez, ezért a kártétel pontos felmérése szinte sehol sem történt meg. Csak mesterséges fertőzésekre hagyatkozhatunk, ha a kórokozó termésre gyakorolt hatását fel kívánjuk mérni. Előfordulásának mértéke Magyarországon sem ismert. Martonvásárról, a nemesítő telepről izoláltam Szirmai 1986-ban. (Bár a vírus tulajdonságainak leírását nem adta meg, azt vírusbankban tartjuk fenn jelenleg is). A többi hazai izolátumot mind Dactylis glomerata-ról izoláltam 1989-ben. Az izolátumok közül a kórokozó jellemzésére a D1 izolátumot használtam, eredményeit összevetve Szirmai korábbi izolátumával.

Tünetek: Csomós ebíren tavasszal és ősszel jól láthatók a világos tarkulások vagy mozaik foltok, gyakran csíkok (42. ábra). A fertőzött növények kisebbek, satnyábbak, mint az egészségesek. Angliában tőpusztulást és ritkulást okoz a természetett táblákon.

Tesztnövényein okozott tünetek: Avena sativa: Sárga foltok, néha nekrotizálnak. Dactylis glomerata: Sárgás csíkozottság, tarkulás. Egyes fajták alig mutatnak tüneteket. Triticum aestivum: Fogékony. Egyes

42. ábra.

A CfMV fertőzés

tünetei csomós ebíren



43. ábra.

A CfMV fertőzés

tünetei búzán



fajták CfMV fogékonysági viszonyait a 11. táblázatban foglaltuk össze. A tarkulás, orsó alakú klorotikus foltok már az inokuláció után egy héttel jelentkeznek. Kísérleteinkben kiválóan használtuk a Kincső fajtát (43. ábra).

Gazdanövénykör, rezisztenciaforrások: Viszonylag kevés egyszikű növényt fertőz, nem fertőzi többek között az Agropyron repenst, Anthoxanthum odoratum-ot, Bromus arvensist és B. mollis-t, Chenopodium fajokat, Cucumis sativus-t, Datura stramonium-ot, a Lolium perenne-t, Nicotiana fajokat, Sorghum halepense-t és a S. vulgare var. saccharatum-ot, Zea mays-t (Serjeant, 1967).

Természetes terjedés, járványtani vonatkozások: A betegség mechanikai inokulációval könnyen átvihető. Ez az oka a sikeres Lema átviteleknek is. A veresnyakú árpabogarat (Lema melanopus), és a kéknyakú árpabogarat (Lema lichenis) a kórokozó vektorai között tartják számon (Serjeant, 1967, Catherall, 1970 a). Kísérleteik szerint az imágók hatékonyabb vektorok, mint a lárvák. Magátvitele nem ismert.

Védekezés: Kétségtelenül a Dactylis glomerata tekinthető a CFMV áttelelésére legalkalmasabb évelő növénynek, amely nemcsak gyomként, de természetett növényként is tömegesen fordul elő. Tekintettel arra, hogy a vetésfehérítő bogak alkalmasak az átvitelre, a védekezés legkézenfekvőbb módja a lárvaállapotban végzett vegyszeres kezelés. Előnye, hogy megakadályozza a bogarak közvetlen kártételét is. A vegyszeres védekezés lehetőségeit bővebben a BMV tulajdonságainak

ismertetésekor (2.10) tárgyalom. A védekezés alkalmas a BMV fertőzések elkerülésére is. Angliában rezisztenciára nemesítéssel is védekeznek a náluk jelentősebb patogén ellen. A vegyszeres védekezés lehetőségeit bővebben a BMV ismertetésekor tárgyalom (2.10).

A CFMV jelenlétének kimutatása, vírusátviteli kísérletek

Anyag és módszer

A CfMV jellemzésére a Keszthelyen, 1989-ben Dactylis glomerata-ról származó D1 izolátumot választottuk ki. Az izolátumokat szisztemikus fertőzöttségű növényekből nyertük mechanikai átvitelekkel. Az átvitelekhez, és a kórokozó felszaporításához őszi búzát (Triticum aestivum cv. Kincső) használtunk, kétleveles állapotban. Az inokulációhoz a tünetes leveleket 0.1 M Sørensen féle foszfát puffert (pH 7,2), abrazívumként Celite-t (500 mesh) alkalmazva. A levélmintákat az inokuláció után 14 nappal szedtük, amikor a szisztemikus fertőzés tünetei már jól láthatók voltak. Az új vírusforrások felhasználásával kezdtük meg tesztnövényeken a tünetek ellenőrzését.

Tesztnövényeken okozott tünetek: Mechanikai úton inokuláltunk Agropyron repens, Avena sativa, Bromus erectus, B. mollis, Chenopodium vulgare, Ch. quinoa, Echinochloa crus-galli, Hordeum vulgare, Lolium perenne, Lolium multiflorum, Nicotiana tabacum cv. Samsun és cv. Xanthi -nc, Panicum miliaceum, Sorghum bicolor, S. halepense, S. sudanense, Triticum aestivum és Zea mays tesztnövényeket, amelyeket üvegházi

körülmények között tartottunk fenn. A tüneteket kb. három hét múlva értékeltük. Visszafertőzéseket nem végeztünk. Teljes fajlistát a 12. táblázat tartalmaz.

Vektorátvitel: Dr Szabolcs Jánossal (Pannon Agrártudományi Egyetem, Keszthely) 1989-ben végzett kísérletek eredményei (Gáborjányi és Szabolcs, 1990) szerint nemcsak az említett két Lema faj, de a L. septentrionis és a L. rufocyanea is alkalmas vírusátvitelre. A kísérletet június hónapban végeztük, szabadföldről gyűjtött imágók (44. és 45. ábra) faj szerinti válogatása után. Az éheztetett rovarokat tíznapos egészséges búza növényekre tettük, egy napos táplálkozás után ellenőriztük az esetleg áthurcolt fertőzést. Az átvitel előtt a vetésfehérítő bogarak egy napig éheztek, majd azután került sor az ugyancsak egynapos felvételi táplálkozásra. Vírusforrásul a CFMV D1 izolátumát használtuk. Az izolátumot korábban ugyancsak Keszthely térségében gyűjtöttem csomós ebírről. Egy nap fertőző táplálkozás elteltével az állatokat minden nap új gabonára tettük, hét napig. Az átvitel eredményességét kb. két hét múlva a tünetek alapján értékeltük.

Eredmények

Tesztnövényeken okozott tünetek: A CfMV D1 izolátuma nem fertőzte az Agropyron repens-t, a Bromus erectust és a B. mollist, a Chenopodium fajokat, a Lolium perennét és a L. multiflorumot, a dohány fajtákat, a Sorghum-okat és a kukoricát. Eredményes volt a fertőzés zabon (Avena sativán), bár a tünetek alig látszóttak, árpán (Hordeum vulgare), és



44-45. ábra. A CfMV természetes elterjedéséért a veresnyakú (44. ábra.) (*Lema melanopus*, *Lema septentrionis*) és a kéknyakú (45. ábra.) (*Lema lychenis* és *Lema rufociana*) vetésfehérítő bogarak egyaránt felelősek (Fotó Dr Szabolcs J.)

búzán (Triticum aestivum). E tesztnövényeken okozott tünetek (lásd 12. tábl.) megfelelnek a CfMV gazdakör vizsgálat eredményeivel (Cf. Benigno és A'Brook (1972)). Igen fontos az a körülmény, hogy a kukoricát e vírus nem fertőzi, ugyanis a rozsnok mozaik vírus (brome mosaic virus, BMV) fertőzésére a kukoricák gyors elhalással válaszolnak, amit más, ugyancsak ebírről származó (BMV) izolátumainkkal gyakran tapasztalhattunk.

Vektorátvitel: Mind a négy vetésfehérítő bogár faj (Lema melanopus; L. septentrionis; L. lichenis és L. rufocyanea) a kórokozót sikeresen átvitte. A fertőzőképességüket a vektorok a kísérlet ideje alatt megtartották, szemben a BMV kísérletekkel, ahol a Lema fajok egy nap után elvesztették vírushordozó képességüket. A Lema kísérletek eredményeként két új Lema fajról (L. rufocyanea és L. septentrionis) bizonyosodott be azok vektor szerepe.

II. A kórokozó

A CfMV a sobemovirus csoport tagja. A csoport nevét a déli babmozaik vírusról (southern bean mosaic virus, SBMV) kapta. Az izometrikus virionok 30 nm átmérőjűek, az egytípusú alegységből álló köpenyfehérje molekulatömege 30 kd körüli, a nukleinsav egyszálú pozitív RNS fonal, kb. 1.4×10^6 nagyságú (Francki et al., 1985).

A sobemovirus csoportnak eddig csak két állandó tagja van, az említett SBMV és a turnip rosette virus (ToRV). A CfMV más három vírussal

(blueberry shoestring-, rice yellow mottle- és sowbane mosaic virusokkal) csak a csoport feltételezett tagjai. A csoportosítás jelenleg is vita tárgya. Különösen érdekes, hogy a csoport egyes (feltételezett) tagjainál a genom RNS mellett kis molekulatömegű viroidszerű RNS-eket is megfigyeltek (Hull, 1985).

A CfMV RNS molekulatömege $1-1,4 \times 10^6$, a köpenyfehérje a virion tömegének mintegy 75-80%-a, a nukleinsav tartalom 25-20 %-ot tesz ki (Catherall, 1970; Mohamed és Moshop, 1981; Sehgal, 1981).

A hazai CfMV izolátum tulajdonságai

Anyag és módszer

Szerológiai vizsgálat: A CfMV azonosításához ismert forrásból származó CfMV antiszérum hiányában nem kerülhetett sor. A csomós ebírről származó izolátumokat azonban brome mosaic virus antiszérumával kettős agar gél diffúziós tesztben ellenőriztük (von Wechmar és Regenmortel, 1968) alapján, azért, hogy a tünetileg hasonló BMV fertőzéseket az izolátumok közül kizárhassuk. A szerológiai ellenőrzéshez pH 6,0-s, 0,05 M -os Na EDTA-t tartalmazó 0,04 M -os Na-acetát puffert használtunk, 1,5%-os agaróz gélben. A gélek tartósítására 0,01 % mennyiségű mertiolátot adtunk a feloldott gélekhez. Az antigént 0,03 M-os acetát pufferrel hígítottuk. Az eredményeket egy nap után értékeltük.

Tisztítás: A CfMV virionjai viszonylag ellenállóak. Tisztításukra új módszert dolgoztunk ki Sehgal (1981) a SBMV tisztítására tett ajánlásai alapján. Ezt a módszert az eredmények között tárgyaljuk.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok: A vizsgálatokhoz részint a kiindulási anyagokból "dip" módszerrel vettünk gyors mintákat, részben pedig a szaporítás után a tisztított anyagból készítettünk hígítási sorozatot, a korábban leírtak szerint (Hill, 1984). Árnyékolás 2%-os uranil acetáttal történt. A gyors, PEG-es tisztítási eljárást is felhasználtuk az elektronmikroszkópos minták készítése során.

Nukleinsavak vizsgálata. Az egyszálú RNS-ek kivonását és elektroforézisét Maniatis et al., 1982 leírása alapján végeztük. A módszer részletes ismertetésére a 2.10. fejezetben kerül sor.

Eredmények

Tesztnövények tünetei A CfMV D1 izolátuma tesztnövényeken a 11. táblázatban felsorolt tüneteket adta. Ezek közül legfontosabb, hogy a D1 izolátum eredményesen fertőzte a búzát, a zabot és a csomós ebírt, de nem fertőzte az árpát és a kukoricát. Néhány búza fajta CfMV fogékonyságával tájékoztató jellegű felmérést végeztünk. Ezeket az eredményeket a 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat

Néhány búzafajta CfMV fogékonysága

Fajta	Tünetes/Összes	Fertőzési %
Jubilénaja	32/92	29
Örzse	17/59	30
Szőke	56/91	62
Ságvári	39/62	63
MV 16	58/88	65
MV 17	56/79	71

Tisztítás: Az új tisztítási módszert az alábbiakban közöljük:

1. Friss, (nem fagyasztott) kb. 200-300 g 10-14 napos fertőzésű búza (pl. cv. Kincső) anyagból indulunk ki.
2. A leveleket apróra vágjuk, majd késes homogenálóban (Waring blender) homogenáljuk. Extraháló puffer, az eredeti súly kétszerese, (pH 7.0) 0,1 M foszfát puffer 0,1% aszkorbinsav tartalommal.
3. A nedvet gézen szűrjük.
4. A szűrletet 1:8 térfogatnyi butanol:kloroform 1:1 arányú keverékével kirázzuk, fél órán át kevertetjük.
5. Centrifugálás alacsony fordulatszám mellett (6000 ford./perc, 10

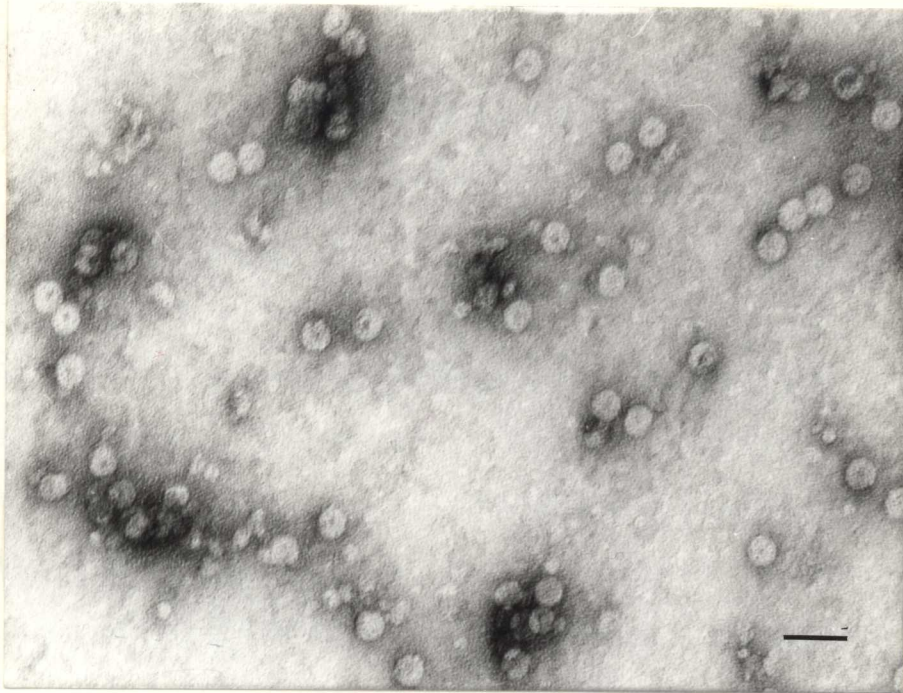
percig).

6. A felülúszóból a virionokat kicsapjuk 10% PEG és 1% NaCl végkoncentrációban. Az oldatot fél órán át keverjük, egy órán át pihentetjük.

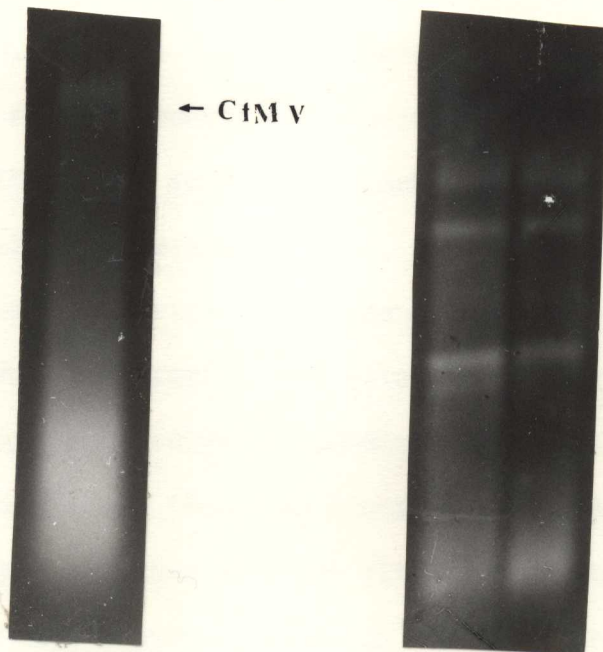
Szerológiai vizsgálatok: A brome mosaic virus gyakran fertőzi a Dactylis glomerata-t, hasonló tüneteket okozva azon, mint a CfMV. A szerológiai vizsgálat azt mutatta, hogy a csomós ebírről származó izolátumok nagyobb része BMV-el fertőzött, és csak kevés izolátum mentes ettől a kórokozótól. Vizsgálatainkhoz azért használtuk a D1 izolátumot, mert kétségtelen volt ez esetben a BMV szennyeződés elmaradása. Így a szerológiai vizsgálatok eredményei egyedül nem meghatározó, de kizáró jellegűek, különösen azért, mert a Dactylis csak e két izometrikus vírus fertőzi. Szirmai, korábbi Dactylis-ről származó izolátuma a BMV fertőzés jelenlétét is bizonyította, feltehetően kettős fertőzésben.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok: A D1 izolátum mind tisztított, mind a nyers készítményekben izometrikus, kb. 30 nm átmérőjű virionok jelenlétét bizonyította (46. ábra). Az elektronmikroszkópos kép nem alkalmas pontos vírus-meghatározásra, mert a BMV virionjai is hasonló nagyságúak és alakúak.

Nukleinsav vizsgálatok A fertőzött növényekből a tisztított virionok nukleinsav kivonása után egy nagy molekulatömegű ribonukleinsav jelenlétét lehetett kimutatni, amelynek nagyságrendje megfelel az



46. ábra. A CfMV elektronmikroszkópos képe. A jelölés 50 nm hosszának megfelelő.



47. ábra. A CfMV-RNS elektroforézise. Kontroll BMV-RNS

irodalomban közölt értékeknek. Pontos molekulatömeg mérést nem végeztünk, csak összehasonlításként a BMV nukleinsavakat is párhuzamosan elektroforetizáltuk a CfMV mintákkal (47. ábra).

Következtetések:

A szerológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a Dactylis glomata-ról származó kiindulási anyag egy része BMV fertőzött volt, de a vírus jellemzésére kiválasztott D1 izolátum mentes volt attól. A tesztnövény vizsgálatok eredményei is ezt a tényt bizonyították, s megerősítették azt a feltevésünket, hogy a vizsgált kórokozó azonos a CfMV-al. A D1 izolátum tünetei megfeleltek az irodalomban ismert reakcióknak (lásd a függelékben). Az elektronmikroszkópos vizsgálatokkal kizárható volt a D1 izolátumban minden más, nem izometrikus vírus, így a coxsfoot streak virus (Smith, 1952) és a ryegrass mosaic virus (Mulligan, 1960) fertőzésének jelenléte. Az izometrikus graminea - vírusoktól a gazdanövényköre különbözteti meg az ugyancsak Lema fajokkal terjedő Phleum mottle virustól (Catherall, 1970 b), ami sem a csomós ebírt, sem a búzát, sem az árpát nem fertőzi. Hasonlóan különbözik az Ohmann-Kreutzberg és munkatársai (1960) által leírt ryegrass streak virustól is, ami tág gazdanövényköre (dohány, libatop fajok) alapján a BMV egy törzsének tekinthető (Proll és Richter, 1965). Az egyes búzafajták CfMV fogékonyságában lényeges eltéréseket mutattunk ki. A nukleinsav vizsgálat egy nagymolekulatömegű RNS jelenlétét igazolta, de nem kizárt egy rövid nukleinsav létezését sem. E kérdés tisztázása további vizsgálatot igényel.

Irodalom:

- Benigno, D.A. and A'Brook, J. (1972): Infection of cereals by cocksfoot mottle and phleum mottle virus. *Ann. appl. Biol.* 72: 43-52.
- Catherall, P.L. (1970 a): Cocksfoot mottle virus. *CMI/AAB Description of Plant Viruses No 23.*
- Catherall, P.L. (1970 b): Phleum mottle virus. *Pl. Path.* 19: 101-103
- Francki, R.I.B.; Milne, R.G. and Hatta, T. (1985): *Atlas of Plant Viruses.* Vol. II. CRC Press Inc., Boca Raton. pp. 183-217.
- Hill, J. (1984): *Methods in Plant Virology.* In: *Methods in Plant Pathology.* Serie (ed.) T.F. Preece. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 167.
- Hull, R. (1985): The sobemovirus group. In: Koenig, R. (ed.) *The Plant Viruses.* Vol. 3. Plenum Press, New York and London, pp. 113-146.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, I. (1982): *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Mohamed, N.A. and Mossop, D.W. (1981): Cynosurus and cocksfoot mottle viruses: a comparison. *J. gen. Virol.* 55: 63-68.
- Mulligan, T.E. (1960): The transmission by mites, host range and properties of ryegrass mosaic virus. *Ann. appl. Biol.* 48:575-579.
- Jhmann-Kreutzberg, G. Pawlitschek, W. and Smith, H.B. (1960): Eigenschaften des Weidelgrasmosaik-Virus. *Phytopath. Z.* 38: 13-17.
- Roll, E. and Richter, J. (1965): Nachweis der Verwandtschaft zwischen dem Bromegrass Mosaik Virus und dem Weidelgrasmosaikvirus. *Naturwissenschaften* 52: 145-146.

- Sehgal, O.P. (1981): Southern mosaic virus group. In: Kurstak, E. (ed.): Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Elsevier/North Holland pp. 91-121.
- Serjeant, E.P. (1967): Some properties of cocksfoot mottle virus. Ann. appl. Biol. 59: 31-38.
- Smith, K.M. (1952): A virus disease of cocksfoot. Pl. Path. 1. 118.
- Szirmai, J. (1986): Dactylis glomerátáról izolált, hazánkban még nem jelzett, két graminea vírus előfordulása gabonaállományunkban. Növényvédelem 20: 353.
- Vacke, J., Zacha, V. and Jokes, M. (1986): Identification of virus in wheat new to Czechoslovakia. Proc. X. Czechoslovak Plant Protec. Conf. Brno. Abstr. 209-210.
- von Wechmar, M.B. and Regenmortel, M.H.V. (1968): Serological studies on bromegrass mosaic virus and its protein fragments. Virology 34: 36-45.

2. 10.: A rozsnok mozaik - brome mosaic bromovirus (BMV)

I. A betegség

Tünetek: A fertőzést követő néhány (3-4) nap múlva a búza és az árpa levelein szabálytalan, ellipszis alakú sárgászöld foltok alakulnak ki, amelyek néha súlyosan károsítják a leveleket, a foltok elhalnak. Az idős, fertőzött levelek sárgulnak, mozaikfoltosak lesznek (48. és 49. ábra), az ilyen tövek gyenge növekedésűek, kevés kalászt hoznak, hamar elhalnak. A tünetek eltérő erősségűek is lehetnek, pl. búzán nekrotikus és nem nekrotikus tünetekkel egyaránt találkozhatunk (50. ábra).

Földrajzi elterjedés, kártétel: A betegséget Mc Kinney és munkatársai fedezték fel 1942-ben. Később más nevek alatt újból leírásra került. Európában, Afrikában és Amerikában egyaránt közönségesen előfordul. A környező országokban Németországból (Ohmann-Kreutzberg, 1963), Romániában (Jiláveanu és Ittu, 1986); Jugoszláviában (Tosič, 1971); Csehszlovákiában (Vacke, 1989) írták le Bromus inermis-ről, Dactylis glomerata-ról, Lolium multiflorum-ról, Hordeum murinum-ról, búzáról és rozsról.

A hazai és nemzetközi (Lane, 1981) irodalom szerint jelentős gazdasági kárt nem okoz. Ennek ellenére, hazánkban egyre több esetben fordul elő, egyre nagyobb károkat okozva. A betegséget Szirmai csak 1986 -ban



48 ábra.
A BMV természetes
fertőzése búzán

49. ábra
A BMV fertőzés
tünetei árpan



jelezte Magyarországról. Az 1978. évben végzett reprezentatív felmérésünk szerint (Gáborjányi és Nagy, 1988) mozaikos tüneteket mutató, több, mint száz minta több, mint 75 %-a BMV fertőzését mutatta. A gyors, járványszerű hazai elterjedés véleményem szerint egybeesik a vetésfehérítő bogárfajok utóbbi években tapasztalt tömeges megjelenésével. Tekintettel arra, hogy a Lema fajok tömeges rajzása május végére esik, s a tünetek megjelenéséig még egy-két hétre lehet számítani, ezért a kifejezett kártétel a jól fejlődő táblákon nem szembetűnő, azt inkább a bogár rágásának tulajdonítják. A bogarak táplálkozásából adódó komoly kártételre már Sajó 1894 -ben felhívta a figyelmet.

Tesztnövényeken okozott tünet: A gabonafélék más vírusbetegségeitől a BMV-t igen jól megkülönbözteti a kukoricán okozott tünet (51. ábra). Főleg a csemegekukoricák érzékenyek a korai fertőzésre. Az inokulációt követő tíz nap múlva a levelek szélüknél kezdődően fokozatosan hervadnak, a csúcs elhal, néhány napon belül a teljes növény epusztul. Búzán, árán a tünetek nagymértékben hasonlítanak más vírusbetegségekére, így a szabadföldi felismertése meglehetősen bizonytalan (von Wechmar és Rybicki, 1985).

Az árpa és a búza igen alkalmas a kórokozó fenntartására, felszaporítására. A legtöbb hazai fajta fogékony. Mintegy százötven árpafajtán és fajtajelölten végzett felméréseink szerint a genotípusok között csak fogékonyágbeni eltérések voltak (Murányi és Gáborjányi, 1988, nem közölt). Chenopodium fajokon (C. amaranticolor, C. hybridum)

50. ábra.

A BMV F1 és F3 törzs
fertőzése búzán



51. ábra.

A BMV fertőzés
csemegekukoricán
teljes pusztulást
okoz



a fertőzés lokális léziókat okoz.

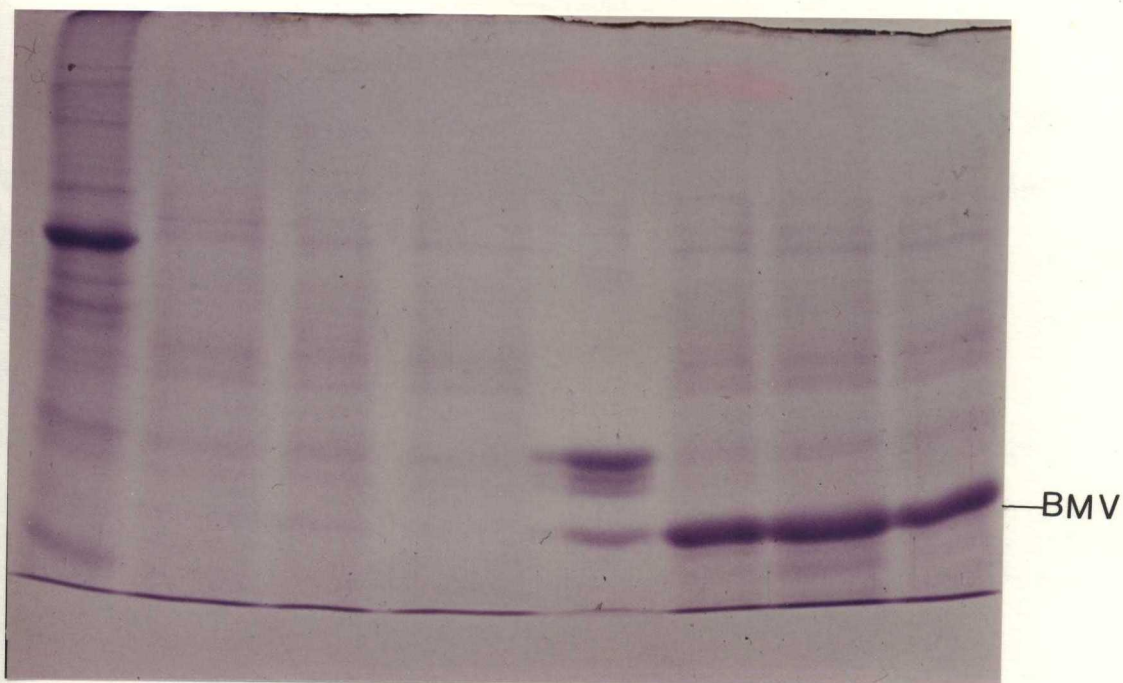
Gazdanövénykör, rezisztenciaforrások: Gazdanövényköre tág, a Gramineae család mintegy ötven nemzetségét fertőzi. Néhány kétszíkű gazdanövénye is van, így a Chenopodiumok, Taraxacum, vagy Comelina diffusa és C. communis (Valverde, 1983) a dohány stb. (Lásd még a függelékben). Több helyről izolált törzse is ismert, azonban ezek tulajdonságaikban hasonlóak. Lane (1974) természetes mutánsokat, és kémiai úton előállított mesterséges variációkat különített el egymástól.

Természetes terjedés, járványtani vonatkozások: Schmidt et al. (1963) talajlakó Xyphynema fonalférgekkel laboratóriumi körülmények között a BMV-t átvitték, de ezen fonalférgék természetes szerepe nem ismert. A levéltetvekkal végzett kísérletek eredménytelenek maradtak. Előzetes kísérletek adatai szerint (Proesler, 1978) a Lema melanopus (Coleoptera, Chrysomelidae) terjeszti, míg Rydén (1989) szerint a Phyllotreta vittula is eredményesen vitte át a fertőzést.

Kísérleteink (Szabolcs és Gáborjányi, 1988; Gáborjányi és Szabolcs, 1987) a hazai vetésfehérítő bogarak (Lema melanopus, L. rufocyanea, L. lichenis és L. septentrionis, sorrend szerint: vörösnyakú árpabogár, vörösnyakú zabbogár, kéknnyakú árpabogár, kéknnyakú búzabogár) mind eredményesen vehetnek részt a kórokozó terjesztésében. Megjelenésüket a kártétel jól jelzi (52. ábra). Egynapos éheztetési időszak után a kifejlett rovarok már egynapos felvételi táplálkozása elegendő volt a kórokozó eredményes átviteléhez (53. ábra), ugyanakkor, ha az állatok



52. ábra. A BMV fertőzés a vetésfehérítő bogarak kártétele nyomán jelenik meg az árpa vetésekben



53. ábra. Lema fajok átvitelének igazolása. Magyarázat a szövegben

egészséges növényen táplálkoztak egy napig, úgy elvesztették vektor jellegüket. Lárvákkal nem végeztünk kísérleteket, de ezek a helyben táplálkozó rovarok, ha át is viszik a kórokozót, a járvány kialakítása szempontjából nem annyira lényegesek, mint a nagy távolságok megtételére alkalmas szárnyas kifejlett formák. A betegséget az érő gabonákról a rovarok a kukoricára hurcolhatják, de végül is a fertőzési lánc nyáron megszakad, s csak az évelő füvekre korlátozódik. Az évelő füvek, amelyek a Lema fajok fontos táplálékát képezik és természetes búvóhelyül szolgálnak, alkotják a fertőzések kindulási forrását, s az állatok téli menedékét. A talajrepedésekben áttelelt első imágók a füvekről tavasszal, április végén a gabonatóblákra viszik a kórokozót, majd a lárvákból kikelt utódok gondoskodnak a betegség gyors elterjesztéséről. Az imágók rajzása május közepére éri el a csúcst (Szabolcs, 1974). Ennek megfelelően igazi BMV fertőzésekkel főleg június elején találkozhatunk.

Lane (1974) szerint a magvak nem terjesztik, azok a leírások, amelyek mintegy 30 %-os magátvitelről számolnak be (von Wechmar és munkatársai (1984) azok a mag felületi kontaminációjából erednek. A magvak felületére tapadt vírionokat szerológiai módszerekkel, például sérummal kezelt agar lemezben közvetlenül is ki tudták mutatni. Arankaátvitel lehetősége nem ismert. Érdekességként említhető, hogy a búza szárrozsa (Puccinia graminis f. sp. tritici uredospóráinak felületéről a BMV-t izolálták (Erasmus et al., 1983), így e szokatlan vírusátvitel lehetősége sem kizárt.

Védekezés: A magfertőzések, lévén azok felületi jellegűek, könnyen megszüntethetők csávázással. A legfontosabb védekezési mód a vektorok elleni küzdelem, ezt egyrészt a koratavaszi imágók megjelenése, illetve a lárvák kifejlődése idején lehet legjobban elvégezni (Gáborjányi és Szabolcs, 1990). A négy vetésfehérítő bogárfaj életmódja igen hasonló (cf: Szabolcs, 1974). A kémiai védekezésben eredményesek általában a foszforsav észterek és azok analógjai, a piretroid származékok. Környezetkímélési szempontból legalkalmasabb a Bancol 50 WP, mert ez nem károsítja a Lema fajok természetes rovarellenségeit (Szabolcs, 1987). Ezek: a petéket károsító petefürkész (Anaphes flaviceps), vagy a lárvákat és az imágókat pusztító Necremnus leucartros fémfürkész, a Bathytryx maculatus fürkész, a Pteromalus ribulens fürkészdarázs, vagy a Lemophagus curtus. Pókok (karolópók), tolvaj poloskák (Nabis ferus), rablólegyek (Asilidae) vagy a Chysopa perla fátyolka lárva is a Lema fajok (lárvák) természetes ellenségei. Felhasználásukkal kapcsolatos biológiai védekezési módszereket dolgoztak ki, amelyek hazai megvalósítása folyamatban van (Szabolcs, 1990, személyes közlés).

II. A kúrokozó

A brome mosaic virus (BMV, rozsok mozaik vírus), a broad bean mottle virus (BBMV; lóbab tarkulás vírus) valamint a cowpea chlorotic mottle virus (CCMV, tehénborsó klorótikus tarkulás vírus) alkotják jelenleg a

bromovirusok csoportját. A csoport nem állandó-, de feltételezett tagjai még a Melandrium yellow fleck virus (MYFV, melandrium sárga foltosság vírus), valamint a spring beauty latent virus (SBLV) is. Ez utóbbi két kórokozó tulajdonságait még nem vizsgálták olyan részletességgel, hogy azokat a bromovirus csoport állandó tagjai közé sorolják.

A bromovirusok nevüket típus képviselőjükről a BMV-ről kapták. A bromovirusok izometrikus virionjai kb. 25-28 nm nagyságúak, a multikomponens RNS genom molekulatömegei egymillió dalton körüli értékek, a köpenyfehérje kb. 20 kd molekulatömegű, 180 aminosavból álló protein alegységekből felépített (Francki et al., 1985).

A virionok pH 3 és 6 értékek között stabilak, a fertőzött növényekben nagy mennyiségben halmozódnak fel, onnan viszonylag jól tisztíthatók. Az osztott genom nukleinsav komponensei egymástól jól elkülöníthetők. Az egyes RNS-ek jó messenger aktivitásúak, a megfelelő RNS szálak a bromovirus csoporton belül egymással egyes esetekben felcserélhetők. Mindezek a tulajdonságok a BMV-t és a CCMV-t alkalmassá tették arra, hogy a molekuláris virológiai és genetikai kutatások kedvelt tárgyai legyenek.

A bromovirusok másik két képviselője a BBMV és a CCMV nem fordulnak elő hazánkban, az előbbit Angliában, az utóbbit az Egyesült Államokban izolálták lóbabról, illetve tehénborsóról és szójáról. A csoport feltételes tagjaként számontartott MYFV-t Dr. Horváth J. izolálta

először Keszhely környékén, tulajdonságait Hollings és Horváth (1981) írták le, míg a Claytonia virginica bromovírusokhoz hasonló kórokozóját Valverde (1985) írta le az Egyesült Államokban.

A köpenyfehérje tulajdonságai

A bromovírusok, különösen a BMV, főleg savas közegben állandó virionokat alkotnak, de már 1 mólos kalcium klorid oldatban a BMV illetve a BMV fehérjeburka eltávolítható az RNS kicsapódása mellett (Yamazaki és Kaesberg, 1963).

A bromovírusok köpenyfehérjéi mind 180 alegységből épülnek fel, a protein alegységek molekulatömegét 20 kd körüli értékben határozták meg. Az adott molekulatömegek nagy mértékben függenek a meghatározás módjától. A köpenyfehérje magas ionerősség esetén (1 M kalcium klorid vagy 1,5 M konyhasó oldatban) pH 4,5 és 5,5 között aggregálódik.

A virion labilitása miatt az antiszérum előállítása is nehézségbe ütközik, a protein burok a vér semleges kémhatása miatt lebomlik. Formaldehides kezeléssel (Hollings és Stone, 1962; Rybicki és von Wechmar, 1981) azonban a virion-fehérje stabilizálható a szerológiai tulajdonságok megváltozása nélkül is.

A bromovírusok nukleinsav komponensei

A bromovírusok genomja osztott (többkomponensű). Az egyes nukleinsav

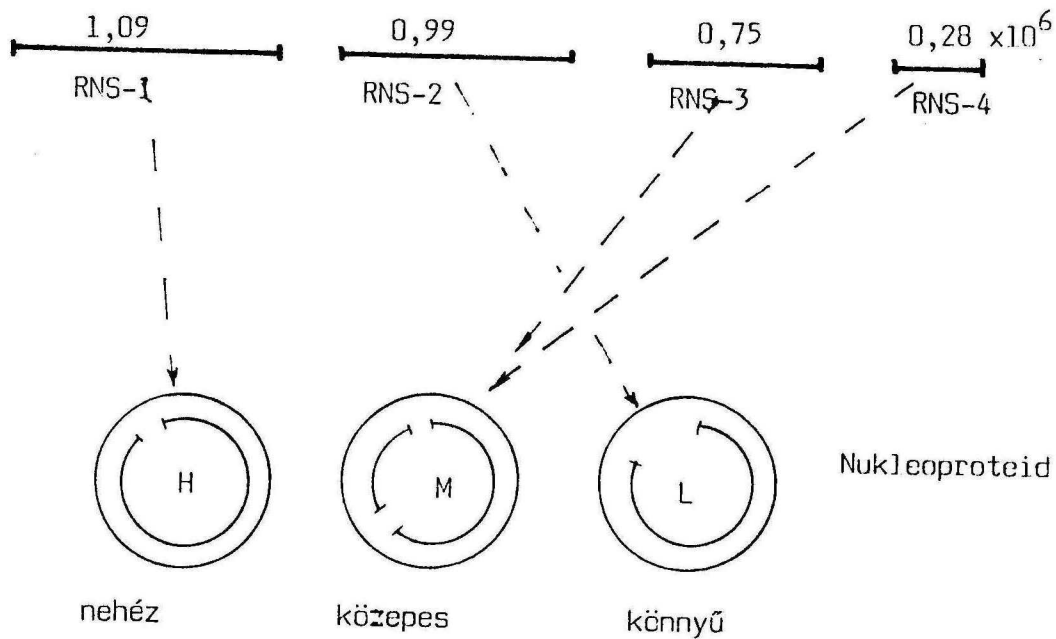
összetevők jól elkülöníthetők. Mind a BMV-, mind a CCMV-al fertőzött növényekből négy nukleinsav szál mutatható ki. A BMV (Lane és Kaesberg, 1971) és a CCMV (Bancroft, 1971) hasonló nukleinsav összetételű. A fertőzőképességhez a három leghosszabb szál együttes jelenléte szükséges, a negyedik nem. A negyedik szál, az RNS 4 is stabil képződmény, amely a fertőzött növényekből mindig kimutatható, jelenléte bizonyíthatólag a másik három szál működésének eredménye.

A tisztított virionokban hozzávetőlegesen azonos nagyságú nukleinsav szálak burkolódnak be (enkapszidálódnak). A legnehezebb komponens (heavy, H) a leghosszabb RNS-t foglalja magában (RNS-1), a középső (middle, M) komponens az RNS-3-at és az RNS 4-et együtt, míg a könnyű (light, L) frakció az RNS 2-t tartalmazza. Az 54. ábra ezt az enkapszidálódási elrendezést mutatja (Lane és Kaesberg, 1971 alapján).

A BMV-hez hasonlóan a CCMV RNS-ek közül is a három leghosszabb szálra van szükség a fertőzőképesség fenntartásához, míg a BBMV esetén a két leghosszabb szál elegendő (Hull, 1972).

A BMV nukleinsavai

A BMV genom három részből áll (RNS 1,2,3), míg az RNS 4 szubgenomikus jellegű és a köpenyfehérje képzésében kap szerepet. Mindhárom (mind a négy) nukleinsav 5' végén metilált guanozin sapka (cap) foglal helyet, míg a nukleinsavak 3' vége a tRNS-ekre jellemző "lóhere" alakzatú másodlagos szerkezetet mutat (cf. Balázs és Gáborjányi, 1985). Minden

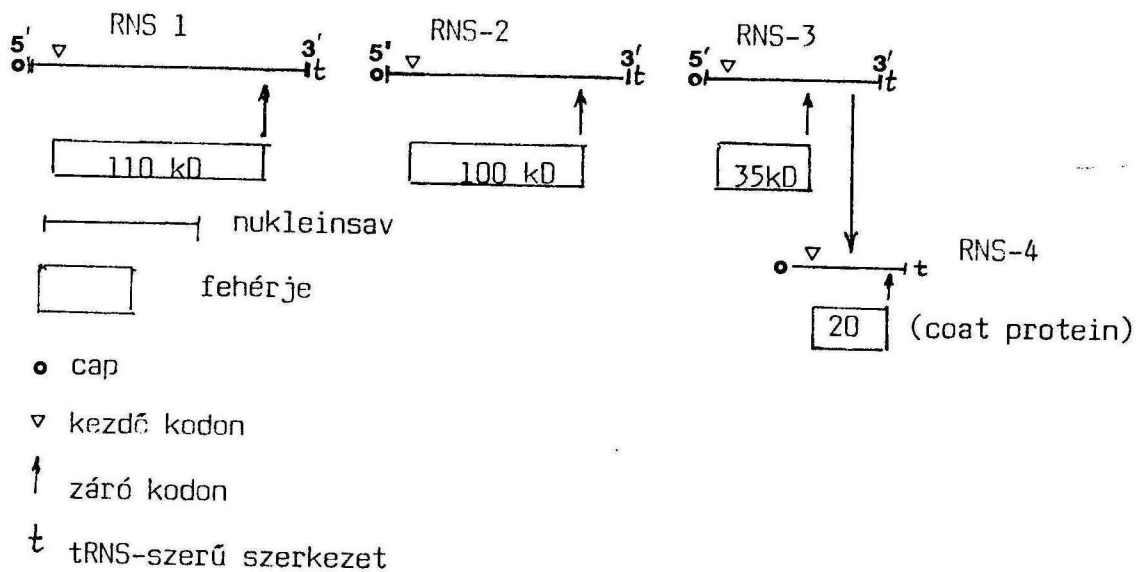


54. ábra

A BMV-RNS-ek enkapszidálási rendje (Lane és Kaesberg, 1971 alapján)

55. ábra

A rozsnok mozaik vírus génszerveződése (Ahluquist et al., 1984 alapján)



RNS szál utolsó 193 bázisa nagyfokú (97-99%) homológiát mutat egymással (Ahlquist et al, 1981), aminoacilálható. A tRNS-ekhez hasonlóan ez is alkalmas aminosav megkötésére, a BMV nukleinsavai esetében ez a tirozin. A "cap" szerepe a riboszómák felületén való megtapadásban van, eltávolításával a messenger aktivitás jelentősen csökken.

Az RNS 1 molekulatömege 1,09; az RNS 2 = 0,99; az RNS 3 = 0,75; végül az RNS 4 = 0,26 millió dalton (5⁵. ábra), ezek rendre 3234, 2865, 2114 és 8200 bázis nagyságúak (Ahlquist et al., 1984). A BMV RNS-ek nukleinsav szekvenciáit az utóbbi években határozták meg a cDNS technika segítségével (Ahlquist et al., 1984).

A BMV génszerveződése

A BMV multikomponens jellege lehetővé teszi az egyes RNS-ek önálló megsokszorozódását (replikációját). A replikációhoz szükséges enzimet, az RNS-től függő RNS polimeráz enzimet kimutatták a fertőzött növényekből. Ez az enzim nem a genomhoz kötött, hanem a gazdanövény terméke (Quadt et al., 1988).

A BMV RNS 1 és 2 monocisztronikus messengerként szolgál, tehát csak egy polipeptid szintézisét kódolja. Ez a fehérje 109 kd, illetve 94 kd nagyságú. Bár a köpenyfehérje cisztron az RNS 3-ban is előfordul, mégis in vitro sejtmentes fehérjét kódoló (transzlációs) rendszerekben csak köpenyfehérje darabokat termel, egy másik fehérje mellett, amelynek molekulatömege 32 kd (3a), és amely nem rokon a köpenyfehérjével,

szerepében és felépítésében hasonló a dohány mozaik vírus replikációjában ismert 30 kD fehérjéhez. Az RNS 3 és RNS 4 keverékéből az utóbbi jobban kötődik a riboszómákhoz. Az RNS 3 és az RNS 4 nagyfokú szekvencia azonosságot mutatnak. Az RNS 4 szubgenomikus jellegű, azaz az RNS 3-ról, valószínűleg annak negatív száláról íródik le, és a köpenyfehérjét (20 kD) kódolja. Ez a szubgenomikus RNS keletkezését feltételezhetően azok a poliadenilsav darabok segítik elő, amelyek az RNS 3 szál közepén találhatóak.

A bromovírusok felépítése és kifejeződési rendszere (transzlációs stratégiája) hasonlít a BMV-re, ugyanakkor rokon vonásokat mutat a cucumovírusokkal is, replikációs stratégiájában hasonlóság mutatható ki egyes állatpatogén vírusokkal is. A CCMV és a BBMV RNS-ek 3' végei is tirozin megkötésére alkalmasak, magasfokú homológiát mutatva a BMV RNS-ekkel és az uborka mozaik vírussal (Lane, 1981).

A bromovírusok genetikai vizsgálata

A bromovírusok genetikai analízisét megkönnyítette a pszeudorekombináció lehetősége, az a jelenség, hogy a rokon vírusok egyes-, (de megfelelő szerepű) nukleinsav komponenseit kicserélik. Így került sor arra a kísérletre, hogy a BMV RNS 3 helyébe a CCMV RNS 3 került. A cserével fertőző rekombinánt kaptak (Bancroft, 1972), míg a fordított kombináció (CCMV RNS 1,2 és BMV RNS 3) nem volt életképes. E kísérletekből adódott az a felismerés is, hogy a köpenyfehérje gén az RNS 3-ban lokalizált, s ugyanitt helyezkedik el az a gén is, amely a

hiperszenzitivitásért, illetve a fertőzés szisztemizálódásáért felelős.

A bromovírusok génműködésének feltárásában a rekombinációs nukleinsav (cDNA) technika bevezetése jelentett fordulópontot. A BMV RNS-ekből is DNS-másolatot lehetett készíteni, s bár ez nem volt fertőzőképes, de fertőző RNS-eket eredményezett (Ahluquist, 1986). Az in vitro transzkriptek közül csak az RNS-1 és az RNS 2 volt szükséges az árpa protoplasztok fertőzéséhez. Az új BMV törzsek készítésével lehetővé vált a gének működésének vizsgálata is. Így pl. az 5' vég megváltoztatása a fertőzőképességet is jelentékenyen módosította. A cap struktúra eltávolítása például csökkentette a fertőzőképességet, de új-, nem vírus eredetű cap behelyezésével is ugyanezt az eredményt érték el.

A génműködés ellenőrzésének másik lehetősége a deléziós (hiány) analízisek alkalmazásában rejlett. Bujarsky és Kaesberg (1986) olyan szekvencia hiányokat (deléciókat) alkalmazott a BMV RNS 3' végein, amelyek természetes helyreállítását (reparálódását) figyelhették meg kettős fertőzések esetén, először bizonyítva a növénypatogén vírusoknál a rekombinálódás lehetőségét. Ez a kérdés azért fontos, mert rávilágít a multikomponens vírusok gazdanövényhez történő nagyfokú alkalmazkodó- és helyreállító képesség molekuláris biológiai folyamataira.

A hazai BMV izolátumok jellemzése

Anyag és módszer

A hazai BMV izolátumok jellemzésére azt a két izolátumot (M12 és F3) használtam fel, amelyet 1987-ben Martonvásáron, illetve 1989-ben Nagyvázsony környékén izoláltam búzáról ill. Bromus erectus-ról. A kísérletek megkezdése előtt az izolátumokat pozitív szerológiai reakció alapján azonosítottam ismert, kereskedelmi (Ashcersleben) BMV antiszérummal. A két izolátum összehasonlításának szükségességét az adta, hogy az F3 izolátum a természetes gazdanövényén elhalásos csíkokat is okozott, míg az M12 nem (50. ábra)

Tisztítás A búzán vagy árpán felszaporított kórokozó tisztítását Hull (1985) alapján végeztük 4 C⁰-on, csekély módosítással az alábbiak szerint:

1. Inokuláció után 10-12 nappal a leszedett leveleket felvágtuk, lemértük.
2. Homogenálás kétszeres mennyiségű 0,1 M Na-acetát pufferben (pH 4,8).
3. Centrifugálás K23 centrifugában (6000 ford, 15 perc).
3. A felülúszót összegyűjtjük, PEG 6000-t és NaCl-t adunk hozzá 10% ill. 0,1 M végkoncentrációkban. Egy órán át kevertetjük.
4. Centrifugálással (6000 ford/perc, 15 perc) összegyűjtjük a csapadékot.

5. Oldás 0,1 M acetát pufferben (pH 4,8), az eredeti térfogat tized részében.
5. A folyadékból CsCl-al 1,36 g/cm töménységű oldatot készítünk, majd Beckman R40 rotorban ultracentrifugáljuk 18 órán át 36 000 fordulatszám mellett.
6. A virionokat tartalmazó csíkot leszedjük (ISCO), majd legkevesebb 100x térfogatú 0,1 M Na-acetát pufferrel (pH 5,0) dializáljuk 3-4 órán át.
7. A 4. és 5 lépéseket ismételjük, majd a maradék virionokat 0,1 M acetát pufferben oldjuk, az eredeti súly század részének megfelelő térfogatban.

Hasonlóan jó eredményt érhetünk el cukor sűrűség gradiens ultracentrifugálással is (5. pont).

Elektronmikroszkópia: A tisztított vírusoldatból hígítási sorozatot készítettünk desztillált vízzel, árnyékolás uranil acetáttal történt, a korábbiakban leírtak szerint.

Szerológia: A kiindulási mintákat ismert (Ashersleben-i ill., Prága-Ruzyne-i antiszérumokkal, valamint saját BMV-antiszérumainkkal kettős agar gél diffúziós módszerrel (Ouchterlony, 1958) ellenőriztük. A mintákat pH 4,8 -as 0,1 M-os acetát pufferrel készítettük. A vizsgálathoz 0,01 % mertiolát tartalmú 1%-os agaróz gél használtunk, amit szintén acetát pufferben oldottunk.

Az antiszérum készítéséhez cukorgradiens centrifugálás után kapott tisztított vírusokat használtunk antigénként. A virionok épségének megőrzésére a vírusoldatot formaldehiddel kezeltük, kb. 2% formaldehid végkoncentráció beállításával. A felesleget PBS oldattal (foszfát pufferben oldott fiziológiás sóoldat) szemben dialízissel távolítottuk el Rybicki és von Wechmar (1981) szerint. Az immunizálást újjélandi fehér nyulakban végeztük, Freud féle nem teljes ásványolaj adalék (inkomplet adjuváns) felhasználásával. Az oltásokat kb. 20 mg antigénnel végeztük 1-2 ml-es adagokban, hetente, összesen négy alkalommal. Az első vérvétel az első oltást követő negyedik héten történt.

A köpenyfehrje molekulatömege: Meghatározását Laemmlí (1970)

módszerével 12 %-os, SDS denaturáló gélben végeztük. A molekulatömeg összehasonlítására dohány mozaik vírus-, BSMV- és PSLV köpenyfehérjét használtuk. A vírusfertőzés kimutatására vírusfertőzött és egészséges növények présnedvét is felhasználtuk azokat Weber és Osborn (1969) pufferrel 1-1 arányban hígítva. Az Eppendorf centrifugálás (2 perc) után a felülúszót tartalmazó csöveket három percig forró vízfürdőn tartottuk. Elektroforézis után a géleket Comassie BB-250-el festettük a korábban leírtak (2.1) szerint.

Nukleinsav komponensek vizsgálata.

Egyszálú nukleinsavak kivonása és elektroforézise A tisztított

vírusoldatból az egyszálú nukleinsavakat fenolos módszerrel vontuk ki

Maniatis et al. (1982) alapján, az alábbiak szerint:

1. 200 μ l virion oldathoz 200 μ l RNS puffert és 400 μ l 0,1% 8-hidrokinolint tartalmazó STE-vel telített fenolt adunk, (STE = 0,04 M Trisz-HCl, 0,4 M NaCl, 4 mM EDTA, 0,4 % SDS).
2. Vortex-ben keverjük két percig.
3. Centrifugálás (Eppendorf centrifugában) 3 percig (10 000 ford/perc).
4. A vizes fázist új csövekbe pipettázzuk, majd 200 μ l fenolt és 200 μ l kloroform amilalkoholt (24:1) adunk hozzá.
5. Keverés 2 percig.
6. Centrifugálás 3 percig (10 000 ford/perc).
7. Ha az interfázisban fehér csapadék van, akkor új fenolt és kloroform-alkoholt adunk hozzá (4.5 és 6. pont szerint).
8. A vizes fázishoz 400 μ l kloroform-i amilalkoholt adunk.
9. Centrifugálás egy percig (10 000 ford/perc).
10. A vizes fázishoz új amilalkoholt adunk, megismételve a 8. és 9. pontokat.
11. A vizes fázishoz 1 ml 95 %-os etanolt adunk. Fagyasztás mélyhűtőben 18 órán keresztül $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.
12. Kilenc perc centrifugálás (10 000 ford/perc).
13. A csapadékot másfél két percig szárítjuk vákuumon.
14. Oldás 50 μ l TE pufferben ((0,2 M Trisz, 0,01 M EDTA, pH 7,0). A mintákat formamiddal kezeljük, 5 percig $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on denaturáljuk.
15. Elektroforézis 100 V feszültség mellett kb. 1 órán át.
16. Festés etidium bromiddal, mosás 2x desztillált vízzel. Fényképezés UV fényben.

A kettősfonalú RNS-ek kivonása A kivonás szintén fenol-SDS módszerrel történik az alábbiak szerint:

1. Húsz g fertőzött levelet folyékony nitrogénben elporítunk, hozzáadva kétszeres mennyiségű (40 ml) 2xSTE puffert (100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,1), 0,4 ml 2-merkaptó etanolt, 0,5 tf (10 ml) 10%-os SDS-t és 1,5 tf (30 ml) STEvel telített fenolt, valamint 30 ml kloroformot.
2. Rázás 30 percig.
3. Centrifugálás 7-8 000 fordulatszámon 30 percig, hidegen.
4. A vizes fázist összegyűjtjük és 16 %-os etanol koncentrációt állítunk be 0,2 tf 95 %-os etanollal.
5. Két és fél g CF-11 cellulózt 16 %-os alkoholos STE-vel telítünk, majd az elegyet kromatografáló oszlopra öntjük.
6. A mintát a cellulóz oszlop tetejére öntjük, annak átfolyása után még 80 ml etanolosSTE vel mossuk.
7. Az oszlopot átfűjjük levegővel, majd a kettősszálú RNS-eket 3x5 nm alkoholmentes STE-vel leoldjuk.
8. Az összegyűjtött mintákat jól záródó műanyag csőben felfogjuk és ml-enként egy egységnyi T1 RNÁzzal kezeljük fél órán át 37 C⁰-on.
9. Az oldathoz 1/30 tf 1 M MgCl₂-et adunk, majd ml-enként egy egység DNÁzt. Az enzimes bontás 30 percig tart, 37⁰-on.
10. Az enzimes emésztés után a mintákhoz egyharmad tf 0,5 M EDTA-t, 20 % etanolt és 0,5 g Calex-N-1 -et (Biorad) adunk. Rázatás szobahőmérsékleten 20 percig.

11. A mintákat az oszlopra öntjük, 20-40 ml etanolos STE-vel mossuk. Az oszlopot levegővel átfújjuk.

12. Eluálás 2,5 ml STE-vel (0,5 + 1ml + 1 ml adagokban). Az egyes adagok között az oszlopot levegővel átfújjuk, vagy az oszlop tartalmát az eluáló mennyiséggel kémcsőrázón összerázzuk.

13. A felfogott eluátumot egy percig centrifugáljuk (Eppendorf) a Celex N-1 eltávolítására.

13. A mintákhoz 0,1 M Na acetátot (3 M, pH 5,0) adunk, összekeverjük, és hat Eppendorf csőben elosztjuk. Csövenként 1 ml 95%-os etanolt adva hozzá, a csöveket $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ra, vagy $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra helyezzük, egy éjszakára.

Kettősfonalú RNS-ek agaróz gélelektroforézise

1. Az Eppendorf csövekben levő kifagyasztott mintákat centrifugáljuk 5-10 percig. A felülúszót pipettával eltávolítjuk, az üledéket vákuum alatt szárítjuk (exiccatorban vagy liofilező készülékben).

2. Szárítás (30 perc) után a csapadékot steril bidesztvízben, vagy a minta (loading) pufferben oldjuk. Molekulasúly jelzőként e kísérletekben ismert vírus RNSeket használtunk (CMV és MRS).

2. TAE pufferben (40 ml Tris, 40 mM jégecet, 2 mM EDTA, pH 8,0) forralással 20 ml 1% agarózt készítünk.

3. A gélhez 1 $\mu\text{g/ml}$ etidium bromidot adunk (10 $\mu\text{g/ml}$ oldatból 2 μl). A géleket kiöntjük a ragasztószalaggaal lezárt tálcákra. A fésűket a gél szilárdulása előtt elhelyezzük.

4. Az elektroforézishez TAE puffert alkalmazunk. Minta puffer: 6x indító puffer, 0,25 % xylene cyanol, 30% glicerin. Minta 14 μl , ebből 6 μl az indító puffer, 8 μl maga a minta. Az elektroforézis ideje 2-3

óra, 40 V állandó feszültség mellett. Az áramerősség általában 25-65 mA között volt.

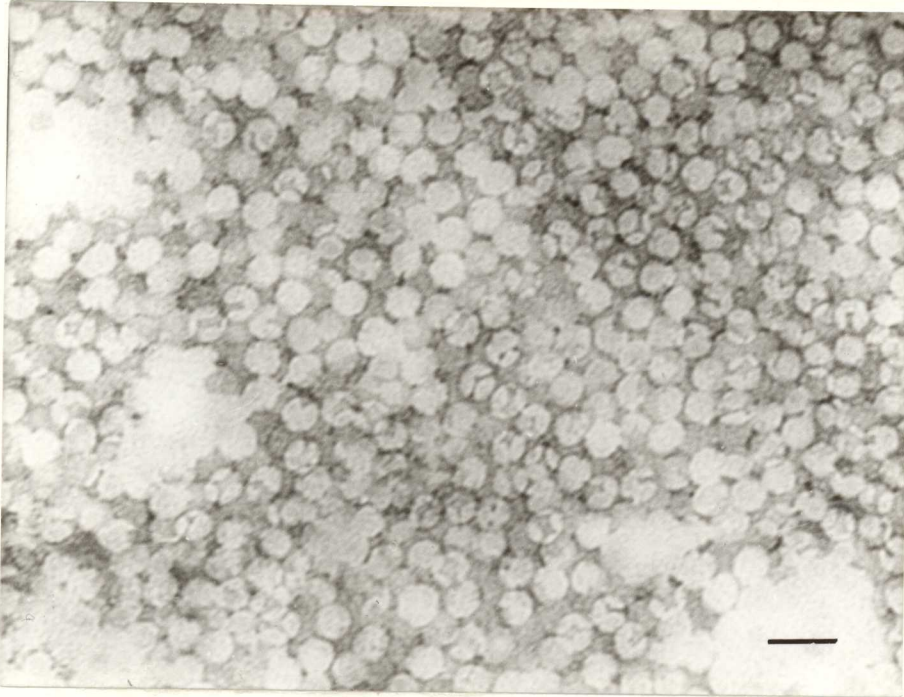
5. A gélek öblítése TAE pufferben, értékelése UV fény alatt történt (LKB 2011 transzilluminátorban). Fényképezés Fortepan 200 24 Din, 50-60 mp. expozíciós időekkel.

Eredmények

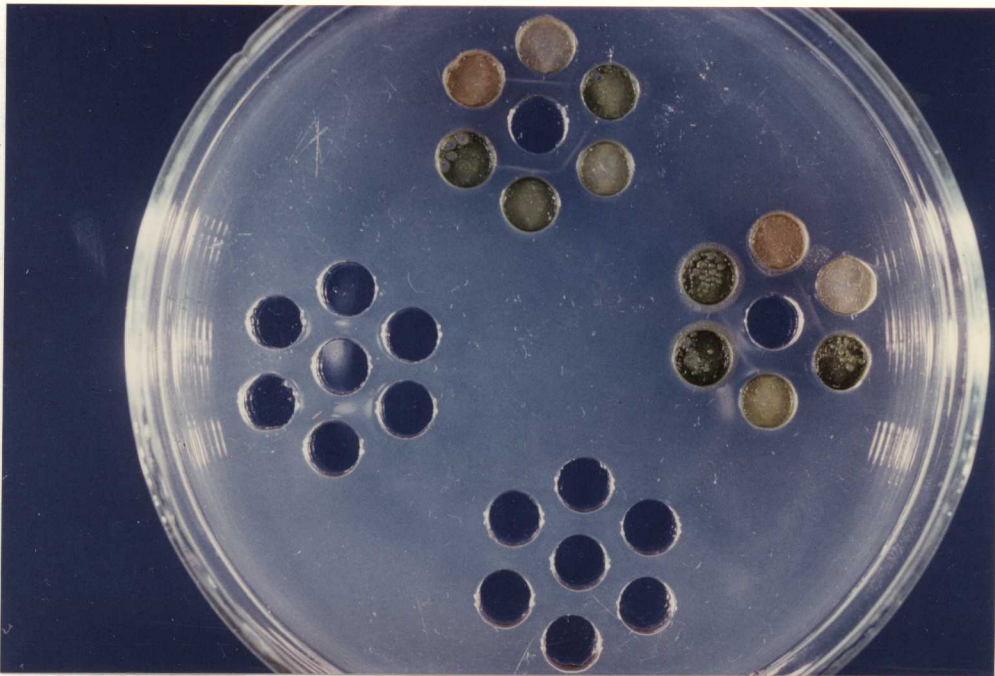
Tisztítás: A tisztítási módszer alkalmas volt jó minőségű és megfelelő mennyiségű virion elkülönítésére. A cézium kloridos centrifugálás nem roncsolta a virionokat, mint az a cucumovirusok esetén ismert (Cf. Lane, 1981). A centrifugálás, mint ahogy az várható is volt, nem eredményezte a virion frakciók szétválását sem, ami pl. a szintén összetett genomú cucumo- vagy comovirusoknál bekövetkezett volna.

Elektronmikroszkópia: A tisztított vírusoldatból készített minta elektronmikroszkópos képe nagytömegű, izometrikus virion jelenlétét mutatta 50 000 ill. 100 000 x nagyításban (56. ábra). Ez a nagyságrend megfelel a bromovirusok méretének (Francki et al., 1985).

Szerológia Kiindulási anyagaink agar géldiffúziós tesztben egyrészt az Aschersleben-i, majd a saját-, a martonvásári izolátummal korábban készített BMV-antiszérummal is pozitív eredményeket adott. Az F3 izolátumot Vacke BMV antiszérumával is azonosítottuk, szerológiai különbségeket az egyes izolátumok nem mutattak. A savas közegben történő (pH 4,8) kimutathatóság a virionok stabilitására utal, ami a



56. ábra. A BMV elektronmikroszkópos képe. Jel 50 nm hosszúság-
nak felel meg.



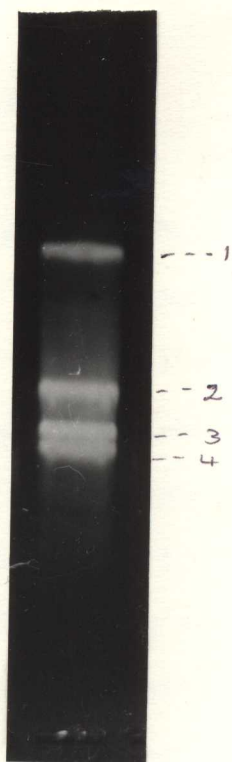
57. ábra. Szerológiai reakciók hazai BMV izolátumokkal

bromovírusok jellemző tulajdonsága.

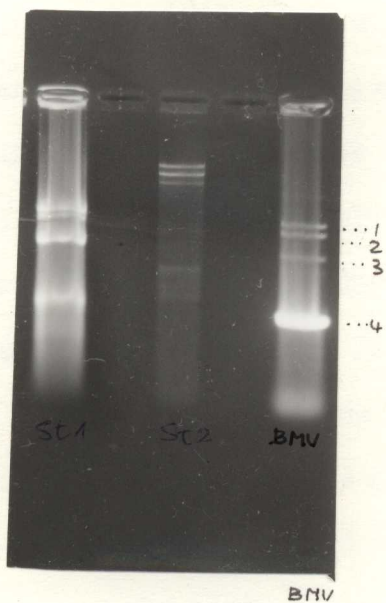
A köpenyfehérje vizsgálata: A BMV köpenyfehérje molekulatömege SDS-poliakrilamid gélben kb. 20 kD-nak felelt meg, ami egyezik az irodalomból megismert értékekkel (Bockstahler és Kaesberg, 1962). A vírus köpenyfehérje olyan mennyiségben szaporodott fel a fertőzött növényekben, hogy az a fertőzés kimutatására alkalmas módszer alapjául is szolgálhat, s jól elkülöníthető a BSMV fertőzésektől (Gáborjányi és Nagy, 1987).

Egyszálú nukleinsavak vizsgálata BMV izolátumaink tisztított virionjaiból kivont egyszálú RNS-ek elektroforézise négy, egymástól jól elkülönülő RNS jelenlétét bizonyította (58 ábra). Eredményeink jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal. Nukleinsavak molekulatömegeinek eloszlásában nem találtunk különbségeket az izolátumok között (F1 és F3).

Kettősfonalú nukleinsavak vizsgálata. Az F1 izolátum fertőzéséből származó mintákban a kettősfonalú RNS-ek elektroforézisének eredményét az 59. ábra mutatja. Mind a négy egyszálú RNS replikációs formája kimutatható kettősfonalú (double stranded RNA, dsRNA) formájában is. Különös, hogy a szubgenomikus RNS replikációs formája relatíve milyen nagy mennyiségben volt jelen a mintában. Valószínű, hogy a mintavétel idején (inokuláció utáni 10. napon) a köpenyfehérje termeléshez szükséges RNS szál replikációja túlsúlyban van a többi, genomikus RNS-ek replikációjához képest.



58. ábra. A BMV egyszálú RNS-ek elválasztása agaróz gél elektroforézissel



59. ábra. A BMV kettősfonalú RNS-ek elválasztása agaróz gél elektroforézissel

Következtetések

A rozsok mozaik vírus hazánkban új, elterjedőben levő gazdaságilag igen jelentős vírus betegségnek tűnik. Fellépésére a korábbiakban részint azért nem figyeltek fel, mert tünetei megegyeznek más vírusbetegségek tüneteivel, másrészt azért maradhatott rejtve, mert a tünetek főleg május végén, június elején kezdtek megjelenni, amikor is már más gombás eredetű levélbetegségek miatt a BMV fertőzés tünete nem látszanak. Valószínűleg ezért is tartja az irodalom a BMV-t gazdaságilag kevésbé jelentős kórokozónak. Tapasztalataink szerint azonban egy, a növényeket kora fejlődési állapotában ért fertőzés fejlődésében teljesen visszaveti, a súlyos mozaik tünetek mellett törpenövésessel kell számolnunk, a kalászképzés teljesen elmaradhat. A betegség gyors terjedésének több oka is lehetséges: egyrészt a kórokozó maggal is terjed, a nemesítési anyagok cseréjével több esetben is behurcolhatták. A kórokozó maga is igen virulens, osztott genomú volta nagy evolúciós előnyt ad, hamar alkalmazkodik új gazdanövényeihez. Gazdanövényköre tág, fennmaradásában részint az őszi gabonabetétek, részben az évelő gyomok játszanak fő szerepet. Az árpa és a búza genotípusok jó része igen fogékony, ezek közül nem egy nagyüzemi termesztésben is van. Végezetül a Lema fajok évjáratonkinti tömeges elterjedése biztosítja a kórokozó nagy távolságokra (olykor országhatárokon kívülre is) való elterjesztését. A BMV tulajdonságainak leírásakor a tüneti különbségektől eltekintve nem találtunk eddig izolátumaink között lényeges különbségeket.

Trodalom

- Ahlquist, P.; Dasgupta, R. and Kaesberg, P. (1984): Nucleotide sequence of brome mosaic virus genom and its implications for replication. *J. Mol. Biol.* 172: 369-382.
- Ahlquist, P., Luckow, V. and Kaesberg, P. (1981): Complete nucleic acid sequence of brome mosaic virus RNA 3. *J. Mol. Biol.* 103: 737-745.
- Balázs E. és Gáborjányi, R. (1985): A vírusgenom szerkezete és megnyilvánulása a magasabbrendű növényekben. In: Érsek, T. és Hornok, L.(Eds.) *Kórokozók és a Fertőzött Növény*, Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 12-32.
- Bancroft, J.B. (1971): The multicomponent nature of cowpea chlorotic mottle virus. *Virology* 45: 830-834.
- Bancroft, J.B. (1972): A virus made from parts of the genomes of brome mosaic and cowpea chlorotic mottle viruses. *J. gen. Virol.* 14: 223-228.
- Bockstahler, L. E. and Kaesberg, P. (1962): The molecular weight and other biophysical properties of bromegrass mosaic virus. *Biophys. J.* 2: 1-9.
- Bujarski, J.J. and Kaesberg, P. (1986): Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. *Nature*, 321: 528-531.
- Erasmus, D.S. Rybicki, E.P. and von Wechmar, M.B. (1983): The association of brome mosaic virus and wheat rusts. II. Detection of BMV in/on uredospores of wheat stem rust. (1983): *Phytopath. Z.* 108: 34-40.
- Francki, R.I.B., Milne, R.G. and Hatta, T. (1985): *Atlas of Plant Viruses*. Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Gáborjányi, R. és Nagy, P. (1988): A búza csíkos mozaik vírusbetegség

Magyarországon. Növénytermelés 37: 391-395.

Gáborjányi, R. and Szabolcs, J. (1987): Brome mosaic virus transmission by cereal leaf beetle (Oulema melanopus, Col. Chrysomelidae). Cercal Res. Commun. 15: 259-264.

Gáborjányi, R. és Szabolcs, J. (1990): A vetésfehérítő bogarak szerepe a gabonapatogén vírusok terjesztésében. Szántóföldi Növénytermesztés VII. Orsz. Tanácsok. Budapest. Abstr. 75.-78.

Hollings, M. and Horváth, J. (1981): Melandrium yellow fleck virus. CMI/AAB description of Plant Viruses. No 236.

Hull, R. (1972): The multicomponent nature of broad bean mottle virus and its nucleic acid. J. gen. Virol. 17: 111-117.

Hull, R. (1975): Purification, biophysical and biochemical characterisation of viruses with special reference to plant viruses. In: Mahy, B.W. (Ed.): Virology a Practical Approach. IRL Press, Oxford-Washington, pp. 1-24.

Jiláveanu, A. and Ittu, M. (1986): Identification of brome mosaic virus on forage grasses in Romania. Buletinul de Protectia Plantelor 1: 3-7.

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lane, L.C. (1974): The bromoviruses. Adv. Virus Res. 19: 151-220.

Lane, (1981): Bromoviruses. In: Kurstak, E. (Ed.): Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Elsevier/North Holland. p. 333-376.

Lane, L.C. and Kaesberg, P. (1971): Multiple genetic components in bromegrass mosaic virus. Nature New Biology 232: 40-43.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, I. (1982): Molecular Cloning. A

- Laboratory Manual. Cold Spring Harbour pp. 545.
- McKinney, H.H., Fellows, H. and Johnston, C.O. (1942): A mosaic disease of Bromus inermis. *Phytopathology* 32: 331.
- Ohmann-Kreutzberg, G. (1963): Ein Beitrag zur Analyse der Gramineenvirose. II. Weidelgrasmosaikvirus. *Phytopathol. Z.* 47: 1-18.
- Proesler, G. (1978): Übertragung des Trespenmosaik-Virus durch Getreidänchen (Coleoptera, Chrysomelidae). *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* 14: 267-268.
- Rydén, K. (1989): Brome mosaic virus, transmission and effect on yield in greenhouse trials. *J. Phytopathol.* 124: 256-258.
- Sajó, K. (1894): A vetésfehérítő bogár (Lema melanopus L.): A Magyar Kir. Áll. Rovartani Állomás Közl. I. 10: 1-31.
- Schmidt, H.B. Fritzsche, R. und Lehmann, E. (1963): Die Übertragung des Weidelgrasmosaikvirus durch Nematoden. *Naturwissenschaften* 50: 386.
- Szabolcs, J. (1974): Vizsgálatok a gabonaféléket károsító Lema (Col: Chrysomelidae) fajokkal kapcsolatban. *Növényvédelem* 10: 389-392.
- Szabolcs, J., Nádasy, M. es Horn, A. (1989): Környezetkímélő védekezési lehetőségek az őszi búza tavaszi kártevői ellen. *Növényvédelem* 25: 268-269.
- Szabolcs, J. and Gáborjányi, R. (1988): Brome mosaic virus transmission by cereal leaf beetles. 5th Confer. Gramineaviruses in Europe, Budapest.
- Szirmai, J. (1986): Dactylis glomerata-ról izolált, hazánkban még nem jelzett, két graminea vírus előfordulása gabonaállományunkban. *Növényvédelem* 20: 353.
- Tosić, M. (1971): Virus diseases of wheat in Serbia. II. Some changes in

wheat plants infected with wheat streak mosaic virus (WSMV) and brome mosaic virus (BMV). *Phytopath. Z.* 71: 327-340.

Vacke, J. (1989): Szóbeli közlés

Valverde, R.A. (1983): Brome mosaic virus isolates naturally infecting *Comelina diffusa* and *C. communis*. *Plant Disease* 67: 1194-1196.

Valverde, R.A. (1985): Spring beauty latent virus: a new member of bromovirus group. *Phytopathology* 74: 395-398

von Wechmar, M.B. and Rybicki, E.P. (1985): Brome mosaic virus infection mimics barley yellow dwarf virus disease symptoms in small grains. *Phytopath. Z.* 114: 332-337.

von Wechmar, M.B., Kaufmann, A., Desmarais, F. and Rybicki, E.P. (1984): Detection of seed-transmitted brome mosaic virus by ELISA, radial immunodiffusion and immunoelectroblotting tests. *Phytopath.Z.* 109: 341-352.

Weber, K. and Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.

3. A GABONAVÍRUSOK ELLENI KÉMIAI VÉDEKEZÉS LEHETŐSÉGEI



3. A GABONAVÍRUSOK ELLENI KÉMIAI VÉDEKEZÉS LEHETŐSÉGEI

A vírusbetegségek ellen kémiai úton elvileg két formában is védekezhetünk. Vagy a fertőzés folyamatát gátoljuk, vagy a kórokozó replikációját akadályozzuk meg a gazdanövényen belül. Ennek megfelelően a vírúsellenes anyagokat hatásuk módja alapján csoportosíthatjuk az alábbiak szerint: a. a vírusfertőzés in vitro gátló anyagai (inhibitorok), b. a fertőzést in vivo gátló anyagok, c. indukált antivirális anyagok és d. antivirális anyagok, kemoterápiás szerek.

A vírusfertőzés in vitro gátló anyagaina az jellemző, hogy a fertőzés folyamatát közvetlenül gátolják. Hatásuk nem specifikus, közvetlenül a virionok inaktiválódását és denaturálódását idézik elő. Eredményességük a fertőzőképesség gátlásában nyilvánul meg, amely a lokális léziók számának csökkenésében jut kifejezésre.

A fertőzés in vivo inhibitorai a fertőzés folyamatát gátolják a virionok közvetlen destrukciója nélkül. Hatásuk visszafordítható, csak a fertőzés előtt alkalmazva eredményes, hatékonyságuk az inkompatibilis gazada-parazita kapcsolatban mérhető le, a lokális léziók számának változásából (Gáborjányi és Tóbiás, 1986a).

Az indukált antivirális anyagokra az jellemző, hogy a vírus-replikációt in vivo gátolják. Olyan természetes anyagok, amelyek keletkezését természetes hatások (stressz vagy fertőzés) váltják ki, a virionokat közvetlenül nem károsítják, de a növény rezisztenciáját fokozzák.

Hatásuk nem érvényesül azonnal, de néhány napon belül termelődnek. Főleg inkompatibilis gaza-parazita kapcsolatban mutathatók ki és kemoterápiás hatásuk nincs (Gáborjányi és Tóbiás, 1986b).

Az antivirális anyagok vagy kemoterápiás szerek, olyan aktív vírusgátlók, amelyek vagy a vírusreplikáció folyamatát gátolják, vagy megakadályozzák a kórokozó elterjedését a növényen belül. Gátolják a tünetek megjelenését, vagy a növényeket a betegségből kigyógyítják, a termés kiesést megszüntetik. A fertőzés után alkalmazva is hatásosak. Antivirális aktivitásukat a fogékony gazadóvényben is kifejtik a növény jelentősebb károsítása nélkül.

E követelményrendszernek napjainkig nem tudtunk mindenben eleget tenni. Az első olyan anyagok, amelyeket tág értelemben antivirális hatásúaknak tekinthetünk (Commoner és Mercer, 1951; Matthews, 1951) nukleinsav származékok voltak, annak a logikus megfontolásnak eredményeként, hogy az analógok vírus-nukleinsavba is beépülhetnek, és így megváltoztathatják annak információit. A növényi vírusbetegségek ellen legsikeresebben használt antivirális anyagokról korábban készítettünk áttekintő dolgozatot (Gáborjányi és Tóbiás, 1986b). Természetesen a vírusgátló anyagok felosztásában nem teljes az egyetértés, ami számos esetben fogalmi zavart eredményez.

3. 1. Az L333, az azadihidrouracil (DHT) és acianoguanidin (CG) gátló hatása az árpa csíkos mozaik vírus (BSMV) ellen

Az antivirális szerek között a legismertebbek a triazinok. Ezek egyik fontos képviselője az 5-azahidrouracil (2,4-dioxo-hexahidroxo-1,3,4-triazin = DHT), amely jelentős mértékben gátolja, de nem akadályozza meg teljesen a vírusreplikációt. A DHT és származékainak antivirális hatását Schuster és munkatársai (1979) fedezték fel. Eddigi kísérleteiket csupán kétszikű növényeken, főleg burgonyán végezték, a burgonya X-, Y- és levélsodródás vírusok ellen. Más gazda-vírus kapcsolatokban a DHT gátolta az arabis mozaik vírust, az uborka mozaik vírust és a dohány gyűrűsfoltosság vírust is. A kezelés akkor volt igazán hatásos, ha a fertőzést megelőző időben, vagy nem sokkal az után alkalmazták a DHT-t (Schuster és Byhan, 1981).

Schuster és munkatársai (Schuster, 1983; Schuster és Vassiliev, 1983) felfigyeltek arra is, hogy eredményesebb vírusgátlást érhetnek el akkor, ha a DHT-t más szerekkel, így guanidin származékokkal egészítik ki. A növényi vírusok ellen először Schuster és Vassiliev (1980, 1983) alkalmazták a guanidin származékokat, így a cianoguanidint (CG) is, miután antivirális hatást tapasztaltak a humánpatogén vírusokkal szemben. Kísérleteikben a burgonya X vírus replikációjának gátlását tapasztalták. A gátlás mértéke a szubsztituensektől függött.

Az említett antivirális anyagokon kívül még más vegyülettípusok is

ismeretesekek, de ezektől eltekintünk, mert ilyenek kísérleteinkben sem szerepeltek. Általánosságban azonban elmondható, hogy minden vírus ellen egyformán hatékony antivirális anyagot még nem találtak, de ilyen nem is várható, hiszen az egyes vírusok replikációja is igen eltérő utakat követ.

Az antivirális anyagok sorában korábban a DHT-t és a CG-t kétszíkű gazadanövényeket fertőző vírusok ellen használták, de nem születtek eredmények az egyszíkű növényekkel, így elsősorban gazdaságilag fontos gabonafélékkel kapcsolatban. Itt ismerttetendő kísérletünk (Tallóczy és Gáborjányi, 1990) célja elsősorban az volt, hogy megismerjük e két korábban alkalmazott, antivirális anyagként ismertté vált vegyület hatását egyszíkű növényeken; másrészt az, hogy számot adhassunk a hatás módjáról is. A vírusellenes hatást árpa csíkos mozaik vírus (barley stripe mosaic virus, BSMV) fertőzéssel szemben alkalmaztuk árpán, mint szisztemikus gazdán. A fertőzésfogékonyság alakulását lokális gazda-parazita kapcsolatban ellenőriztük. Erre a dohány mozaik vírussal (tobacco mosaic virus, TMV) fertőzött dohány növények mutatkoztak alkalmasnak. Kísérleteinket az L333 jelű szerrel is kiegészítettük, de ennek ismeretlen összetétele miatt nem tudunk beszámolni. Mindhárom anyagot Prof. Dr. Gottfried Schuster (Martin Luther Universität, Halle) bocsájtotta rendelkezésünkre, amiért köszönetünket fejezzük ki.

Anyag és módszer

Növények és vírusok. A BSMV kísérletekhez őszi árpa (Hordeum vulgare cv. MV 7) növényeket használtunk fel. A növények előnevelése átlagos üvegházi körülmények között történt. Egy ládába kb. 100-120 magot vetettünk el. A növényeket kéthetes korban inokuláltuk. A TMV kísérletek során a dohány mozaik vírus fertőzésre 6-8 leveles állapotban lévő hiperszenzitív dohányfajtát (Nicotiana tabacum cv. Xanthi-nc) használtunk, kb. 6-8 leveles állapotban. Az üvegházi kísérleteket télen végeztük, amikor a hőmérséklet nem haladta meg a 25°C-ot.

A BSMV kísérletekben a vírus orosz törzsét (Atabekov és Novikov, 1970) használtuk fel, amely az inokulációt követő két hét múlva erős csíkos mozaikos tüneteket okozott a fogékony árpa leveleken. A kórokozót inokulum vagy tisztítás céljára az MV 7-es árpa növényeken tartattuk fenn.

A vírusinokulumot a fogékony növények szisztemikus mozaikfoltosságot mutató leveleinek 1: 4 arányú 0,1 M Sørensen féle foszfát pufferes (pH 7,0) hígításával készítettük. Az inokuláció eredményességét Celite (diatomaföld) adagolással fokoztuk. A növények minden kifejlett levelét mechanikai úton inokuláltuk.

A TMV fertőzések során a vírus tisztított U1 törzsét használtuk kb. 100



60. ábra

A dohány mozaik vírus fertőzés hatására kifejlődő lokális léziók alkalmasak a fertőzésfogékonyság mennyiségi jellemzésére

$\mu\text{g/ml}$ töménységben. A hiperszenzitív dohány növények kezelt füllevelein a kifejlődött lokális léziókat az inokulációt követő harmadik napon akkor számoltuk meg, amikor azok teljes fejlettségüket elérték (60. ábra).

Kezelések. A BSMV vizsgálatokhoz a kezeléseket emelkedő koncentrációt alkalmazva az előnevelt növényeken végeztük. A TMV-vel végzett kísérletekben a dohánynövényeken csak a fülleveleket kezeltük, a másik féllevél csak csapvízes kezelést kapott és kontrollként szerepelt.

A 5-azadihidouracilt (2,4-dioxo-hexahidroxo-1,3,4,-triazin, DHT) és a cianoguanidint (diciandiamid, CG) 10^{-2} mólos desztillált vizes oldatban használtuk. Az L333 -jelű készítményt kezdetben 6, 3 és 1,5% -os (g/100 ml) oldatban alkalmaztuk, majd miután ezek a koncentráció értékek fitotoxikusnak bizonyultak, a hatóanyag koncentrációt 1,5; 0,75 és 0,36 %-ra csökkentettük. Ezek az értékek már kevésbé voltak toxikusak az árpán. A dohány érzékenyebb volt, így végül csak a leghígabb oldatokat (0,36 %) használtuk. A kezeléseket naponta egy, illetve az inokuláció napján két alkalommal végeztük, kb. 25 ml-es oldat (levélpermet formájában történő) kijuttatásával. A kezelések ideje alatt a növényeket alulról öntöztük. A hatóanyaggal történő kezeléseket a fertőzést (inokulációt) megelőző három, és az inokulációt követő három napon keresztül végeztük, napi egy alkalommal. A fertőzés-fogékonyság ellenőrzéséhez csak előkezeléseket végeztünk.

Az in vitro hatás vizsgálata. A szercek in vitro hatásának elbírálásához

tisztított TMV inokulumot használtunk 200 µg/ml töménységben, amelyet a vizsgált anyagok 2×10^2 M koncentrációjú oldatával 1:1 arányban kevertünk, és egy napig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, hűtőszekrényben tároltuk. Egy nap elteltével a fertőzőképesség változásait Xanthi-nc dohányokon értékeltük a lokális léziók száma alapján. Kontrollként az inokulumot foszfát pufferrel hígítottuk megfelelő arányban.

Az in vitro vírusgátlás és a fertőzésfogékonyság mérésére a lokális léziók számának változását tekintettük alapul. Kleczkowski (1949) rámutatott arra, hogy sem a léziószám, sem annak logaritmusai nem alkalmas közvetlenül statisztikai analízisre. A léziószám ugyanis elvileg nem korlátozott és a középértékek eltérései a középérték növekedésével együtt nőnek. Kleczkowski-tól származik az az összefüggés, amely akkor alkalmazható, ha a léziószám tíznél nagyobb. Mérésre a féllevél módszert választottuk, ahol a két, kezelt és kontroll féllevél biológiailag azonos, és így összehasonlítható.

A léziós tesztek matematikai statisztikai vizsgálata. A léziószámok, mint normális eloszlású valószínűségi változók matematikai statisztikai analízisére a Student-féle két mintás t-próbát használtuk.

A Kleczkowski-féle összefüggés ismeretében a valószínűségi változó nem a léziószám, hanem az

$$x_i = \log_{10} (y_i + c) \quad , \text{ ahol}$$

y_i = a léziószám féllevelenként (i-edik levélre)

$$c = 5$$

c-t azért választottuk ötnek, mert bár értéke 5-20 között szabadon becsülhető, de így x_i -k relatív eltérése nagyobb. Ez pedig szigorítja a vizsgálatot.

A módszer lényege az, hogy a kezelt és kezeletlen féllevelekre kapott valószínűségi változók különbségeit képezzük levelenként, majd a kapott különbségek szórását számítjuk az

$$S(\Delta x_i) = \sqrt{\frac{(\Delta x_i - \Delta x)^2}{n-1}}$$

képlettel, melyben

Δx_i = az egy levélre kapott különbség

Δx = a különbség értékek átlaga

n = a parallel kísérletek száma (levélszám)

Az ebből számított Student-faktor

$$t = \frac{x \cdot n}{S(\Delta x_i)}$$

értékét összehasonlítva a táblázatból (Kemény, 1983) vett, megfelelő (n-1) szabadsági fokhoz és különböző szignifikancia szintekhez tartozó értékekkel, megmondhatjuk, milyen szignifikancia szinten (azaz milyen valószínűséggel) következetes az eredmény. A kísérletek mindig 3 levélen folytak, innen n=3 minden esetben.

Az antivirális hatás vizsgálata. A BSMV-vel fertőzött árpán a felszaporodott vírus köpenyfehérje mennyisége alapján mértük a kezelt és kontroll növények mintáiban a szerek antivirális hatását. A mintákat az inokulációt követő két hét múlva szedtük. A leveleket a feldolgozásig -20 C⁰-on mélyhűtőben tároltuk. Minden esetben a sarjából fejlődő levelekből is mintát vettünk, a fertőzést követő négy hét elteltével.

A vírusreplikáció változásainak jellemzése a köpenyfehérje mennyiségének mérésre alkalmas rocket-immunoelektroforézis módszerével történt. E módszert a BSMV mennyiségi meghatározására már korábban átalakítottuk (Gáborjányi és Tóbiás, 1984).

A BSMV tisztításához két héttel az inokuláció után szisztemikusan fertőzött növények leveleit használtuk fel. A vírus tisztítását Lane (1974) leírása alapján végeztük. A BSMV antiszérumokat új-zélandi fehér nyulakban termeltük. Az immunoglobulint (IgG) kapronsavas kicsapással tisztítottuk. Az immunoelektroforézishez a Weeke (1973) horizontális készülékét használtuk kb. 0,5 mm vastag 1%-os agaróz rétegen. Az agarózt 0.02 M Veronál pufferben (pH 8,0) oldottuk. Az immunoglobulint 53 C⁰-on kevertük az agaróz oldatba négyzetcentiméterenként kb. 2 µl-t számolva. Standardként 3,6 mg/ml vírus oldatból lineáris hígítási sorozatot készítettünk. A standard hígítási értékekkel készített géleket használtuk fel később a vírustartalom abszolút értékének meghatározására. Mintáinkat 1 ml/g extrakciós pufferrel homogenáltuk, majd a homogenátumot Eppendorf centrifugában üleptítettük 3 percig. A tiszta felülúszó 15 µl-ét használtuk fel a vírustartalom meghatározására. A géleket 20 V állandó feszültségen futtattuk egy éjszakán keresztül. Másnap a gélekből a nem precipitált immunoglobulint fiziológiás sóoldattal mostuk és desztillált vizes öblítés után a fehérjéket Coomassie Brilliant Blue metanolos oldatával festettük, majd metanol-ecetsav-víz keverékben a nem kötött festéket kimostuk. A lemezek szárítása után a vírustartalom értékét a precipitációs csúcsok magasságából állapítottuk meg. Minden esetben a lapokon hígítási értékeket is használtunk tisztított vírus-szuszpenzióból.

Eredmények és értékelés

a. In vitro vírusgátló hatás elbírálása lokális léziós tesztben. A virionokra gyakorolt közvetlen gátló hatás a vírusszuspenzió fertőzőképességének változásával volt mérhető. A féllévélteszt alapján kapott eredményeket a 13. táblázat foglalja össze. Ez tartalmazza a kezelt és kezeletlen féllévélén mért átlag léziószámokat, a vírusinokulum lokális léziók számával mért fertőzőképességének százalékos csökkenését. A virionok L 333-al történt egy napos kezelése már átlag 40 %-ra csökkentette a léziószámot, illetve a biológiailag aktív virionok számát. Az inokulumhoz kevert 10^2 M azahidouracil (DHT) a fertőzőképességet mintegy 78 %-ra csökkentette. Azonos körülmények között a 10^2 M-os cianoguanidin még hatásosabb volt. Az átlagos fertőzőképesség a cianoguanidin kezelés hatására átlag 55 %-ra csökkent.

A kísérleti eredmények alapján úgy tűnik, hogy mindhárom szernek közvetlen hatása van a virionok stabilitására. Ez nem tekinthető valódi antivirális hatásnak, hiszen az alkalmazott szerek a virionok közvetlen pusztulását okozzák. Az L333 különösen kitűnik az alkalmazott anyagok közül, tekintve, hogy mintegy harmadára csökkentette a fertőzőképes vírusok mennyiségét. Ilyen csekély számú adat alapján nem szabad mélyreható következtetéseket levonni, tekintettel arra, hogy az in vivo kísérlet nem ad felvilágosítást a vegyszer közvetlen fertőzésfogékonyságra gyakorolt hatásáról, amit elülönített kísérletben tisztázni kellett.

13. táblázat

Az L333, az azadihidouracil (DHT) és a cianoguanidin (CG) közvetlen hatása a dohány mozaik vírus inokulum fertőzőképességére hiperszenzitív dohányokon (Nicotiana tabacum cv. Xanthi-nc), levélemeletek szerint (lézió/féllevél)

Kezelések (koncentr.)	Kezeletlen féllevél	Kezelt féllevél	Kezelt/ kezeletlen (%)	Szignifikancia szint (%)
L333 (0,36%)	31,1	12,7	40	10
DHT (10 ² M)	37	29	78	20
CG	22,7	12,7	56	0,5

b. Fertőzésfogékonyság mérése hiperszenzitív gazdában in vivo körülmények között. Az alkalmazott anyagok fertőzésfogékonyságot okozó csökkenését TMV -vel fertőzött dohány növények eltérő korú fellevelein teszteltük. A kezeléseket mindig a vírusinokulációt megelőzően alkalmaztuk. A lokális-léziós teszt eredményeiből kapott értékeket, mindhárom kezelés adatait tartalmazva a 14. táblázat szemlélteti.

A 14. táblázat adatai alapján megállapíthatjuk, hogy mindhárom anyagnak in vivo fertőzésfogékonyságot csökkentő hatása volt, ha az anyagokat a fertőzés (inokuláció) előtt alkalmaztuk. Ez a csökkenés L333 használatakor 26, DHT kezelésre 16, CG kezelésre 11 % leziószám csökkenésnek felelt meg. Észrevehető, hogy az in vitro gátlás a fertőzésfogékonyságra gyakorolt hatással közel azonos volt az L333 és a DHT esetében, míg a cianoguanidinnél az előbbi (in vitro gátlás) tűnt nagyobbnak. A két érték hasonlósága arra utal, hogy az alkalmazott kezeléseknél nem a növényeken keresztül csökkent a fertőzésfogékonyság, hanem az anyagok voltak közvetlen kontakt gátló hatásúak. DHT előkezelésekor azonban több esetben megfigyelhető volt a léziók átmérőjének csökkenése is, ami korábbi megfigyeléseink szerint (Gáborjányi és El Hammady, 1969) a léziók aktív vírustartalmának csökkenésével áll összefüggésben.

c. A vírus replikációt gátló hatás elbírálása in vivo rendszerben. A 15. táblázatban az különböző koncentrációjú szerrel kezelt növényminták precipitációs csúcs-magasságából számított abszolút vírustartalom, a

14. ábra

Antivirális anyagok hatása a dohány mozaik vírus lézióképzésre
 Xanthi-nc dohányokon (öt növény összes levélszintjén levő felleveleken
 mért léziószámok átlaga

Kezelés (konc.)	Kezeletlen féllevél	Kezelt féllevél	Kezelt/ kezeletlen (%)	Szignifikancia szint (%)
L333 0,36	36,4	27,8	74	0,1
DHT $10^{-2}M$	43,2	34,8	84	0,1
CG $10^{-2}M$	30,5	26,9	89	- *

* nem szignifikáns

15. táblázat

Az L333, az azadihidrouracil (DHT) és a cianoguanidin (CG) különböző oldatainak hatása az árpa csíkos mozaik vírus köpenyfehérje felhalmozódására és az árpa növényeken okozott károsítás mértékére

Kezelések	Átlagos abszolút vírustartalom (mg vírus/ml)	Átlagos relatív vírustartalom (%)	Fitotoxicitás
L333 1,5 %	-	-	erős
L333 0,75%	-	-	erős
L333 0,36%	0,013	22	közepes
DHT 10^{-4} M	0,053	89	-
DHT 10^{-3} M	0,063	106	-
DHT 10^{-2} M	0,052	87	gyenge
CG 10^{-4} M	0,065	109	-
CG 10^{-3} M	0,058	96	-
CG 10^{-2} M	0,043	72	-

kezelt és a kezeletlen, kontroll növényi minta vírustartalmának hányadosa szerepel. A kezelt minták szerológiai vizsgálatokor a precipitációs csúcsok magasságaiból ismert koncentrációjú standard segítségével lehet abszolút víruskoncentrációt számolni. Az antivirális hatás összehasonlíthatósága végett számítottunk a kontroll növény abszolút vírustartalmára vonatkoztatott relatív vírustartalmat. Feltüntettük a kísérletek során tett vizuális megfigyeléseinket is az anyagok fitotoxicitására vonatkozólag.

Az L333-mal kezelt növények vizsgálatokor az 1,5 és 0,75 %-os koncentrációhoz tartozó értékek meghatározását az erős fitotoxikus hatás lehetetlenné tette. Bár a 0,36 %-os töménység esetén is tapasztaltunk gyengébb károsító hatást, ez nem akadályozta meg a vizsgálat kivitelezését. A kapott eredményekből kérdésessé válik, az L333 -mal kezelt minták standarddal való összehasonlításának jogossága, tekintve, hogy az abszolút vírustartalom értékek az előkísérletek során megállapított érvényességi határ alatt vannak (standard hígítási sor).

A 15. táblázatra visszatérve, érdekes a DHT oldatok koncentrációjának és vírusgátlásának kapcsolata. Egyelőre ismeretlen okból a DHT, a várákosok ellenére a középű, 10^{-3} M-os koncentrációban mutatta a leggyengébb antivirális hatást. A két másik koncentrációban alkalmazva hatása közel azonos volt. E tény értelmezése további kísérleteket igényel.

A cianoguanidinnel végzett kezelés eredményeit tekintve kézzelfogható

összefüggést mutatott: a növekvő vegyszer koncentrációval párhuzamosan a vírustartalom csökkent. Az L333-ra kapott adatokat megvizsgálva mondhatjuk, ez tűnik a legradikálisabb hatásúnak, a három vizsgált szer közül. Sajnos ez a kezelés erős fitotoxikus hatással is párosul. Az optimálisan hatásos és a fitotoxikus koncentrációk meghatározása minden antivirális anyag legnehezebb pontja, hiszen a hatékony koncentráció és a fitotoxikus érték gyakran egybeesik (Dawson, 1984).

Az L333 és DHT kezelés esetében a gyakorlatban sűrűn előforduló 10-20 % szignifikancia szintet kaptunk, mely azt mutatja, hogy 80-90 %-os valószínűséggel volt a bekövetkező változás a kezelés eredménye. A cianoguanidin esetében ez a valószínűség az ilyen kísérletekben megszokottnál jóval magasabb, 99,5 % .

Egyes anyagok vírusgátló hatásának elbírálásában nem egységes a vélemény. Korábban megfogalmazott véleményünk (Gáborjányi et al, 1984) szerint azonban a vírusgátlóknak szigorú értelemben véve csak azokat az anyagokat tekinthetjük, amelyeknek kuratív, azaz gyógyító hatásuk van. Gyakorlati megfontolásból sem lehet közömbös, hogy egy adott vírusgátló anyag csak a fertőzés eredményességét csökkenti, vagy alkalmas a már megbetegedett növények gyógyítására is. Ilyen megfontolások alapján felül kell vizsgálni az ún. "antivirális" anyagokkal kapott korábbi eredményeket is. A kísérleteinkben szereplő anyagokkal kapcsolatban is meg lehetett állapítani, hogy azok alapvetően a vírusfertőzés in vitro inhibitorai, s a további vírusfertőzést és vírusreplikációt gátló hatásuk is ebből az elsődleges virionokat inaktiváló hatásából

vezethetők le.

Összefoglalás

Három, antivirális hatású ismert anyag árpa csíkos mozaik vírus (BSMV) replikációt gátló hatását mértük árpa növényeken. Megállapítottuk, hogy mind az L333 jelű anyag, mind az azadihidouracil (DHT) a vírus köpenyfehérje felhalmozódását csökkentette. Ezt a vizsgálatot kiegészítettük ugyanezen anyagok in vitro vírusgátló hatásának vizsgálatával és a dohány mozaik vírus fertőzés-fogékonyságra gyakorolt hatásának mérésével hiperszenzitív dohánynövényeken. Megállapítottuk, hogy a BSMV-árpa kapcsolatban tapasztalt vírus-felhalmozódás csökkenése inkább az in vitro (közvetlen inhibítor) hatással és a fertőzésfogékonyság in vivo csökkentésével magyarázható, mintsem a replikációt gátló in vivo hatással.

Irodalom

- Atabekov, J.G. and Novikov, V.K. (1970): A study of the mechanisms controlling the host range of plant viruses. *Virology* 41: 108-115.
- Commoner, B. and Mercer, F. (1951): Inhibition of biosynthesis by thiouracil. *Nature* 168: 113-114.
- Dawson, W.O. (1984): Effects of antiviral chemicals on plant viruses. *Phytopathology* 74: 212-213.
- Gáborjányi, R. and El Hammady, M. (1979): Effect of temperature on size of local lesions induced by TMV in tobacco plants. *Acta Phytopathol.*

Hung. 4: 125-129.

Gáborjányi, R. and Tóbiás, I. (1984): Rocket immunoelectrophoresis: a novel method for quantitative detection of barley stripe mosaic virus from infected barley and wheat plants. *Cereal Res. Commun.* 12: 263-264.

Gáborjányi, R. és Tóbiás, I. (1986a): A vírusfertőzés inhibitorai és a vírusbioszintézist gátló anyagok. *Növénytermelés* 35: 139-146.

Gáborjányi, R. és Tóbiás, I. (1986b): A növényi vírusok elleni kémiai védekezés lehetőségei: Indukált antivirális anyagok és kemoterápiás szerek. *Növénytermelés* 35: 341-350.

Gáborjányi, R., Tyihák, E. and Tóbiás, I. (1984): Comparison of antiviral substances in compatible and incompatible host-virus combinations. *Leipziger Biotechnologiesymposium*. p. 25. Abstr.

Kemény, S. (1983): Kísérletek tervezése és értékelése. Tankönyvkiadó, Budapest, 34-39.

Kleczkowski, A. (1949): The transformation of local lesion counts for statistical analysis. *Ann. appl. Biol.* 36: 139-152.

Lane, L.C. (1974): The bromoviruses. *Adv. Virus Res.* 19: 151-220.

Matthews, R.E.F. (1951): Effect of some substituted purines on the development of plant virus infection. *Nature* 167: 892-893.

Schuster, G. (1983): Verstärkung der antiphytoviralen Wirkung von 2,4-Dioxyhexahydroxo, 1,3,5 Triazin durch Kombination mit Verbindungen mit Guanidinstruktur. *Phytopath. Z.* 106: 262- 271.

Schuster, G. und Byhan, O. (1981): Virusbekämpfung durch Antimetaboliten des Nucleinsäurestoffwechsels. Tag.-Ber. Akad. Landwirtsch.Wiss. Berlin DDR. 184: 125-136.

Schuster, G. and Vassiliev, G. (1980): Structurally dependent

antiphytoviral activities of aryl-N-substituted N-methyl, ethyl, alkyl and phenyl thioureas. 4th. Int. Congr. Soc. Countries, Szeged, 51-52. Abstr. 16.

Schuster, G. and Vassiliev, G. (1983): Antiphytoviral activities of N-alkyl-N-aryl substituted thioureas. Z. Pfl.Krank. und Pfl.schutz 90, 194-199.

Schuster, G., Hornigklec, W., Winter, H., Esser, G., Steinke, V., Kochmann, W., Kramer, W. and Steinke, W. (1979): Antiphytoviral activity of 2,4 dioxohexahydroxo triazine. Acta Virol. 23: 412-420.

Tallóczy, Zs. és Gáborjányi, R. (1990): Az L333, az azadihidrouracil (DHT) és a cianoguanidin (CG) gátló hatása az árpa csíkos mozaik vírus (BSMV) ellen. Növénytermelés (Megjelenés alatt).

Weeke, B. (1973): Humane serumproteiner identificeret og kvantiteret med Laurell's immunoelktroforeser-metodologiske og kliniske studier. Thesis. Copenhagen.

3. 2. A tiazofurin antivirális hatása az árpa csíkos mozaik vírusra

Bevezetés

Korábbi meghatározásunk (Gáborjányi és Tóbiás, 1986 a,b) szerint antivirális anyagoknak csak azokat az aktív vírusgátlókat tekintjük, amelyek a vírus replikációt in vivo gátolják; vagy megakadályozzák a vírusok elterjedését a növényekben. Ezek az anyagok vagy gátolják a tünetek megjelenését, vagy a növényeket a betegségből kigyógyítják. A fertőzés után alkalmazva is hatásosak és aktivitásukat fogékony gazdanövényeken is kifejtik a növény jelentősebb károsítása nélkül. A növényi vírusokat gátló anyagok irodalmát áttekintve megállapítható, hogy szinte lehetetlen olyan anyagot találni, amely adott koncentrációban a kórokozó szaporodását eredményesen gátolja fitotoxikus hatás nélkül (Dawson 1983). Jó kivételt képeznek ez alól a Virazol (ribavirin, 1,- β -D-ribofuranozil -1,2,4-triazol -4-karboxamid) és analógjaik, amelyek megfelelő, gyakorlatban is alkalmazható antivirális anyagokként jöhetnek számításba (Byhan et al., 1978; Dawson, 1983; Dawson és Lozoya-Saldana, 1987; Leerch, 1987).

tiazofurin (2- β -D-ribofuranozil-tiazol-4-karboxamid) a ribavirinhez szerkezetileg hasonló szintetikus származék, amelyet eredményesen használtak mind a növényi, mind humánpatogén vírusokkal szemben (Dawson, 1983; Streissle et al., 1985). Eddig csak egy növényi vírusra korolt gátló hatásáról számoltak be (Caner et al., 1984). Ez a

kórokozó a paradicsom foltos hervadás vírusa (tomato spotted wilt virus) volt. A kísérlet megállapításai szerint a fertőzés után az ismételt tiazofurin kezelések visszaszorították a tünetek megjelenését és csökkentették a betegség okozta kártételt is.

Kísérleteink célja egyrészt az volt, hogy kiderítsük, alkalmas e a tiazofurin egy rendszertanilag teljesen különböző kórokozó, nevezetesen az árpa csíkos mozaik vírus, (BSMV) elleni kémiai védekezésre. Másrészt azt vizsgáltuk, hogy a tiazofurin antivirális hatását kifejti e egyszikű növényeken, esetünkben árpán és búzán. E kísérleti rendszerben (BSMV-árpa) a tiazofurin antivirális hatásának elbírálását a vírusreplikáció gátlásával tudtuk jellemezni.

Az árpa csíkos mozaik vírus pálcika alakú, többkomponensű vírus három genomikus RNS-t tartalmaz, mindhárom RNS szál 7-metil guanozil "cap" struktúrát hord az RNS 5' végén, poli(A) szekvenciákat és tRNS-szerű struktúrát az RNS szálak 3' végén (Agranovsky et al., 1982; Gustafson et al., 1982). A kísérleteket Nagy et al., 1988, valamint Nagy et al., 1989 alapján ismertetem.

Anyag és módszer

A növény és a vírus. Az árpa csíkos mozaik vírus fertőzésére fogékony árpa (Hordeum vulgare cv. GK Omega és búza (Triticum aestivum) cv. Martonvásári 8 fajtákat használtunk a kísérletek során. A tiazofurinnal kezelt és kezeletlen (kontroll) növényeket kétleveles

fejlődési állapotban inokuláltuk. Inokulum forrásként szisztemikusan fertőzött növények 0,1 M Sörensen féle foszfát pufferrel (pH 7,0) 1:1 arányban hígított présnedve szolgált. Abrázívumként Celitet használtunk. A tiazofurint soha sem kevertük közvetlenül az inokulumhoz. Általában a BSMV Braunschweig-i törzsét (BSMV-Br) használtuk, amely erős csíkos mozaikfoltosságot és levélnekrózist okoz. Egy esetben a tiazofurin vírusgátló hatását a magyarországi törzssel (BSMV-H) szemben is vizsgáltuk. Ez utóbbi törzs kétszer-háromszor olyan mennyiségben szaporodik fel a fertőzött növényekben, mint más törzsek, ugyanakkor a fertőzés igen enyhe tünetekkel jár (Nagy és Gáborjányi, 1988).

Anyagok és kezelések. A tiazofurint 5×10^{-3} , 10^{-3} , 10^{-4} és 10^{-5} koncentrációjú desztillált vizes oldatban, egy csepp Triton-X100 nedvesítőszer hozzáadása után alkalmaztuk levél permet formájában (kb. 1 ml/10 növény). A kezeléseket az inokuláció előtt és az inokuláció után különböző időpontokban végeztük. Minden kísérletet háromszor, illetve négyszer ismételtünk meg normál üvegházi körülmények között. Minden kezelésben 15-20 növényt tartalmazó blokkokat használtunk.

A tünetek megjelenésének és a vírus replikációjának gátlása. A betegségtünetek kialakulását a fertőzést követő 12.-napon értékeltük. A tünetek kialakulásának gátlását a tünetes növények százalékos arányának megváltozásával jellemeztük. Ugyanebben az időben (amikor a vírus replikáció tetőzik) vettünk mintákat a vírusszaporodás gátlásának megállapítására. A vírusreplikáció gátlását a BSMV köpenyfehérje

felszaporodása alapján bíráltuk el. Tüneteket mutató növények leveleinek fél grammos mintáit 1 ml 0,1 M Sörensen féle foszfát pufferrel (pH 7,0) homogenáltuk. A mintákat alacsony fordulátú (Eppendorf) centrifúgában üleptítettük, és a felülúszók 5 μ l-es mintáit használtuk fel a vírustartalom meghatározására. A köpenyfehérjék mennyiségét az általunk korábban (Gáborjányi és Tóbiás, 1984) BSMV-re kidolgozott rocket immunoelektroforézis módszerével mértük. A vírus koncentrációk meghatározásához standardként tisztított vírus szuszpenziót használtunk.

Eredmények

A kezelések optimális ideje. A kezelések legkedvezőbb időpontját a fertőzés előtti- és utáni különböző időpontokban 10^{-3} M tiazofurin oldattal végzett kezelésekkel állapítottuk meg. Ezeket a kezelési időpontokat a 16. táblázatban foglaltuk össze. A betegség tünetek kialakulásának gátlása és a vírusreplikáció leghatásosabb visszaszorítását akkor kaptuk, ha a kezeléseket az inokulációt megelőzőleg és azt követőleg végeztük. Hasonló eredményt kaptunk akkor is, ha csak fertőzés utáni időben alkalmaztuk a tiazofurint (inokuláció után három órával, majd két és négy nap elteltével). Mindkét esetben azonban a növények jelentős károsítást figyelhattunk meg. Ha az inokulációt követő kezelések számát megnöveltük, fokozatosan csökkent a tünetes növények száma. Azok a kezelések, amelyeket csak az inokuláció előtt alkalmaztunk, hatástalannak bizonyultak. Hasonlóképpen, a betegség megtelepedése után négy nappal végzett kezelések csak gyenge

16. táblázat

A tiazófurin hatása az árpa csíkos mozaik vírus (BSMV-Br) fertőzés tüneteinek megjelenésére és a vírus replikációjára árpa növényeken. (Kezelések az inokulációt megelőző és azt követő időpontokban 10^{-3} M koncentrációban.)

Inokuláció és kezelés közti időszak	Tünetes növények %- ban	Vírus tartalom (μg BSMV/g)	Vírus tartalom kontroll %-ában
-2,-1,0(+3 óra) +2 és +4 nap	37,8	83	30,0
-2, és -1 nap	80,8	304	109,6
0 nap (+3 óra)	72,4	242	87,5
0 (+3 óra) és +1 nap	57,4	139	50,3
0 (+3 óra), +2 és +4 nap	56,2	90	32,4
+2 és +4 nap	60,0	169	61,2
+4 nap	86,2	204	73,5
Kezeletlen (Kontroll)	84,0	277	100,0

+

++

+++ fitotoxikus tünetek erőssége

hatásúak voltak.

A legmegfelelőbb eredményeket a fertőzés utáni időszakban kaptunk (a fertőzés után három órával és egy nappal végzett időpontokban).

A tiazofurin optimális koncentrációja. A tiazofurin legmegfelelőbb kezelési töménységét koncentráció sorozat készítésével állapítottuk meg. A 17. táblázat szerint a 10^{-3} M érték felelt meg legjobban a követelményeknek. Ez esetben a fertőzött növények durván fele mutatott csak betegség tüneteket, és ezekben a beteg növényekben a vírus-koncentráció is csak a fele volt azoknak az értékeknek, amelyeket a kezeletlen (kontroll) növényekben mértünk.

A búza rezisztensebbnek bizonyult tiazofurin kezelésekkel szemben, így annak koncentrációját 5×10^{-3} M értékre növelhettük anélkül, hogy a növények jelentős károsodást szenvedtek volna (18. tábl.). Így a vírus koncentráció mintegy 70%-os gátlására nyílt lehetőség.

A tiazofurin hatása a BSMV-H törzsrre. A BSMV magyar törzse (Nagy és Gáborjányi, 1988) meglehetősen eltérő tulajdonságokat mutat a többi BSMV törzshöz hasonlítva. Optimális kezelési feltételek mellett a tiazofurin kevésbé gátolta a BSMV-H szaporodását (19. tábl.), mint az a BSMV-Br esetén megfigyelhető volt. Tekintve, hogy a hazai törzs fertőzése csak igen gyenge mozaikfoltosságot okoz a táblázat eredményei a teljes blokkot reprezentálják.

17. táblázat

A tiazofurin gátló hatása az árpa csíkos mozaik vírus (BSMV-Br) fertőzés tüneteinek kialakulására és a vírus replikációjára. (Kezelések három órával és egy nappal az inokuláció után.)

Tiazofurin koncentráció	Tünetes növények %- ban	Vírus tartalom (ug BSMV/g)	Vírus tartalom a kontroll %-ában
5×10^{-3} M	12,0	67	23,8
10^{-3} M	55,5	140	49,3
10^{-4} M	95,0	204	71,9
10^{-5} M	91,7	218	77,1
0 (Kontroll)	96,1	283	100,0

+

++

+++ fitotoxikus tünetek erőssége

Következtetések

A ribavirin széles hatásspektrumú, mind DNS, mind RNS vírusok ellen eredményesen alkalmazott, jól ismert nukleozid analóg. Nagyszámú növényi vírus ellen is kipróbálták (Byhan et al., 1978; Caner et al., 1984; Streissle et al., 1985). Jelenleg általánosan elfogadott elmélet szerint (Leerch, 1987) az RNS szál "cap" struktúrájának kialakulását gátolja. Ismerve valamely vírus RNS 5' végének szerkezetét, hozzávetőlegesen megjósolható, milyen lesz a ribavirin gátló hatása az adott vírusra.

A tiazofurin a ribavirinhez szerkezetében hasonló anyag kisebb aktivitású a DNS és az RNS vírusokkal szemben, mint a ribavirin (Streissle et al., 1985). Feltételezik, hogy a ribavirinhez hasonlóan fejti ki gátló hatását. Ismereteink szerint növényi vírusok ellen csak egy esetben használták. Caner és munkatársai (1984) a paradicsom foltos hervadás betegség tüneteit eredményesen szorították vissza az inokuláció után végzett többszöri tiazofurin kezeléssel, és a betegség okozta kártételt is sikerült csökkenteni, ugyanakkor -feltehetően módszertani nehézségek miatt- nem vizsgálták a kórokozó szaporodásának változását. A kísérletben szereplő vírus gazdaságilag jelentős ugyan, de rendszertanilag meglehetősen távol helyezkedik el az ismert növényvírusoktól, leginkább azokkal a mixovírusokkal rokon, amelyek a gerinceseket fertőzik.

Vizsgálatainkban a tiazofurin nem mutatott teljes vírusgátló hatást.

19. táblázat

A tiazofurin gátló hatása az árpa csíkos mozaik vírus magyar törzs (BSMV-H) fertőzési tüneteinek megjelenésére és a vírus replikációjára. (Kezelések 10^{-3} M koncentrációban.)

Inokuláció és kezelés közti- időszak	Tünetes növények %-ban	Vírus tartalom (μg BSMV/g)	Vírus tartalom kontrol %-ában
-2,-1,0(+3 óra), +2 és +4 nap	+++ -	661	68,9
0(+3 óra) és +1 nap	69,2	699	72,9
Kezeletlen (Kontroll)	92,9	958	100,0

+

++

+++ fitotoxikus tünetek

gyenge mozaikos tünetek, értékelhetetlen

18. táblázat

A tiazofurin gátló hatása az árpa csíkos mozaik vírus (BSMV-Br) fertőzési tüneteinek megjelenésére és a vírus replikációjára búza növényeken. (Kezelések három órával és egy nappal az inokuláció után.

Tiazofurin koncentráció	Tünetes növények Vírus tartalom		Vírus tartalom a kontroll %-ában
	%-ban	(μg BSMV/g)	
10^{-3} M	44,8	111	47,1
5×10^{-3} M	47,8	71	30,2
0 (Kontroll)	88,5	235	100,0

Mindazonáltal a tünetek kialakulásának gátlása és a vírus replikáció mintegy 50-70 %-os gátlása jelentős eredménynek mondható. A tiazofurint sohasem infiltrálva juttattuk a növényekbe, talán ez lehetett (egyik) oka annak, hogy eredményeink elmaradnak a korábbi vizsgálatokban tapasztaltaktól. Meggyőződésünk azonban, hogy az antivirális anyagok kijuttatásának természetesebb módja a levelek kezelése, mint az infiltrálás.

A BSMV mindhárom genomikus RNS-e "cap" struktúrát hordoz. A tiazofurin vírusreplikációt gátló hatása arra utal, hogy valószínűleg e jellegzetes szerkezet kialakulása a gátlás (egyik) célpontja. Azok a kísérletek, amelyeket a fertőzés ideje és a hatékony kezelések időpontjának megválasztására végeztünk is arra utalnak, hogy hasonlóság van a tiazofurin és a ribavirin hatásmódja között. Meglepő különbséget találtunk azonban a két vizsgált BSMV törzs replikációjának gátlásában. Ez eltérés teljes magyarázatát még nem tudjuk megadni.

A betegség tüneteinek visszaszorítása sem volt soha teljes. A kezelések megszüntetése után három héttel a fertőzött növények újonnan kifejlődő csúcsi levelein megjelentek a betegség jellegzetes tünetei. A tünetek megjelenése arra utal, hogy a tiazofurin antivirális hatása csak időleges és csak a kezelt levelekre terjed ki. Más aciklikus tiazofurin analógok hazai szintézise (Kovács et al., 1987) és antivirális hatásuk elbírálása most van folyamatban.

Irodalom

- Agranovsky, A.A., Dolja, V.V. and Atabekov, J.G. (1982): Structure of the 3' extremity of barley stripe mosaic virus RNA'. Evidence for internal poly(A) and 3' terminal tRNA like structure. *Virology* 119: 51-58.
- Byhan, O., Kluge, S., Pustowoit, W., und Schuster, G. (1978): Einfluß von 1- β -D-Ribofuranosyl-1,2,4- triazol- 3- carboxamid (Virazol) auf die Bildung und Konzentration von Tabakmosaikvirus- und Wirts- RNA sowie auf Virusproteine. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 173: 521-535.
- Caner, J., Alexandre, M.A.V. and Vicente, M. (1984): Effect of tiazofurin on tomato plants infected with tomato spotted wilt virus. *Antiviral Res.* 4: 325-331.
- Dawson, W.O. (1983): Effects of animal antiviral chemicals on plant viruses. *Phytopathology* 74: 211-213.
- Dawson, W.O. and Lozoya-Saldana, H.:(1984): Examination of the mode of action of ribavirin against tobacco mosaic virus. *Intervirology* 22: 77-84.
- Francki, R.I.B. and Hatta, T. (1981): Tomato spotted wilt virus. In: *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. E. Kurstak (Ed.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 491-512.
- Gáborjányi, R. and Tóbiás, I.:(1984): Rocket immunoelectrophoresis: a novel method quantitative detection of barley stripe mosaic virus from infected barley and wheat plants. *Cereal Res. Commun.* 12: 263-264.
- Gáborjányi, R. és Tóbiás, I. (1986a): A vírusfertőzés inhibitorai és a vírusbioszintézist gátló anyagok. *Növénytermelés* 35: 139-146.
- Gáborjányi, R. és Tóbiás, I. (1986b): A növényi vírusok elleni kémiai védekezés lehetőségei: Indukált antivirális anyagok és kemoterápiás

szerek. Növénytermelés 35: 341-350.

Gustafson, G.D., Milner, J.J., McFarland, J.E., Pedersen, K., Larkins, B.A. and Jackson, A.O. (1982): Investigation of the complexity of barley stripe mosaic virus RNAs with recombinant DNA clones. *Virology* 120: 182-193.

Kovács, L., Herczegh, P., Batta, G. and Farkas, I. (1987): Two cyclic analogues of 2- β -D-ribofuranosylthiazole-4-carboxamide (Tiazofurin). *Heterocycles* 26: 947-960.

Leerch, B. (1987): On the inhibition of plant virus multiplication by ribavirin. *Antiviral Res.* 7: 257-270.

Nagy, D.P. and Gáborjányi, R. (1988): Characterisation of barley stripe mosaic virus Hungarian strain. 5th. Conf. of Virus Diseases of Gramineae in Europe, Budapest.

Nagy, P., Gáborjányi, R., Kovács, I. and Farkas, I. (1988): A tiazofurin antivirális hatása az árpa csíkos mozaik vírusra. *Növénytermelés*, 37: 313-319.

Nagy, P.D., Gáborjányi, R., Kovács, L. and Farkas, I. (1989): Antiviral activity of tiazofurine against barley stripe mosaic virus. *Antiviral Research* 11: 41-46.

Streissle, G., Paessens, A. and Oediger, H. (1985): New antiviral compounds. *Adv. Virus Res.* 30: 83-138.

ÖSSZEFOGLALÁS



I. A GABONAVÍRUS KUTATÁS HEYZETE ÉS IRÁNYAI

A gabonafélék vírusbetegségeinek kutatása és a kórokozók tulajdonságainak vizsgálata Magyarországon hosszú ideig elhanyagolt terület volt. Mindössze az árpa sárga törpülés vírus és a kukorica csíkos mozaik vírus előfordulása volt ismert. Eredményeink e téren messze elmaradtak még a szomszédos országok virológiai kutatásának eredményeitől is, hiszen mintegy húsz év alatt egyetlen új gabonavírus sem került leírásra, vagy jellemzésre. Lényeges változást csak az 1980-as évek második felétől tapasztalhatunk, amikor is felismerve e kérdéscsoport elméleti fontosságát és gazdasági jelentőségét rendre jelentek meg dolgozatok új vírusbetegségek fellépéséről (Milinkó és Remete, 1984; Szirmai, 1986; Pocsai és Barabás, 1986; Gáborjányi és Nagy, 1988; Nyitrai és Gáborjányi, 1988; Gáborjányi et al., 1988; Bisztrai et al., 1989) vagy a gabonavírusokkal kapcsolatos új kísérleti eredményekről (Nagy és Milinkó, 1984; Pocsai et al., 1985; Gáborjányi és Szabolcs, 1987; Szabolcs és Gáborjányi, 1988; Nagy et al., 1989).

Ezek az örvendetes eredmények adták meg feltételét annak, hogy már ne csak az új vírusok előfordulására vagy a kártételére összpontosítsuk figyelmünket, de a kórokozók főbb tulajdonságai is leírásra kerülhessenek, s lehetőségeink szerint felkutassuk azokat a fontos részleteket is, amelyek eddig módszertani okok vagy egyéb nehézségek miatt ismeretlenek maradtak. A gabonafélék vírusbetegségeiről írt monográfia jellegű dolgozatomban ezt a hiányt igyekeztem pótolni,

összefoglalva az utóbbi években a betegségekről és a kórokozókról összegyűjtött ismereteket, és új eredményeket azért, hogy ezek kiindulópontként szolgálhassanak a további vizsgálatok számára és hiányosságaival rámutassanak a legfontosabb feladatainkra.

Napjainkra a hazánkban ismertté vált gabonapatogén vírusok száma az utóbbi években kettőről tízre emelkedett, s igen valószínű, hogy ez a szám a közeljövőben más vírusbetegségek felismerésével bővülni is fog. E téren elsősorban az árpa sárga mozaik vírus előfordulásának bizonyítása és más-, főleg a kabócákkal terjedő vírusok tulajdonságainak leírása várható.

Disszertációmban részben azokat az eredményeket foglalom össze, amelyeket az elmúlt öt esztendő során szerzőtársaimal együtt már közöltem, de azokat az új eredményeket is, amelyek eddig még nem jelentek meg.

II. A GABONAFÉLÉK VÍRUSBETEGSÉGEI - GABONAVÍRUSOK

1. A hazánkban eddig fellelt gabonavírusok a jelenleg használatos konzervatív víruscsoportosítás szerint hét rendszertani egységbe sorolhatók. Egy esetben a vírusgenom két egyszálú DNS-t tartalmaz. Ez a geminivírus csoport képviselőjeként ismert búza törpülés vírus (wheat dwarf virus, WDV). A többi gabonavírus genomja mind egyszálú RNS.

Az egykomponensű RNS vírusok között a legismertebb a kukorica csíkos

mozaik vírus, vagy más nevén kukorica törpe mozaik vírus (maize dwarf mosaic virus, MDMV), mint jelenleg a potyvirus csoport egyetlen (gabonapatogén) képviselője.

A volt potyvirusok új rendszertani csoportjába a levélatkákkal terjedő vírusok oszthatók. E csoport (wheat streak mosaic virus group) három képviselővel is jelen van a hazai vírusflórában. Ezek a búza csíkos mozaik vírus (wheat streak mosaic virus, WSMV); az Agropyron mozaik vírus (Agropyron mosaic virus, AgMV); és a vadóc mozaik vírus (ryegrass mosaic virus, RYMV).

Az osztott genomú vírusok közül a hordeivírusok típus képviselője az árpa csíkos mozaik vírus (barley stripe mosaic virus, BSMV) fordul elő hazánkban, míg az árpa sárga mozaik vírus (barley yellow mosaic virus, BYMV) jelenlétének bizonyítása még további kísérleteket igényel.

Az izometrikus vírusok közül egykomponensű a már korán felismert luteovírus, az árpa sárga törpülés vírusa (barley yellow dwarf vírus, BYDV), illetve az e néven ismert víruscsoport tagjai. Ugyancsak egykomponensű a sobemovírusokhoz sorolható ebír tarkulás vírus (cocksfoot mottle virus, CFMV) is.

Az izometrikus rozsnok mozaik vírus (brome mosaic virus, BMV) az osztott genomú vírusok egyetlen gabonapatogén képviselője.

A felsoroltakból kitűnik, hogy szinte minden fontos rendszertani

csoport képviselteti magát a gabonafélék kórokozói között, így a gabonavírusok fogalma nem virológiai, hanem agronómiai csoportosítás eredménye.

2. A hazánkban újon^{án} felismert vírusos eredetű kórokozók közül első helyen a búza törpülés vírust kell említeni. E mechanikai úton nem terjedő betegség felismerésével és vektorátviteivel először sikerült hazánkban hitelt érdemlően geminivírusok jelenlétét igazolni. Eredményeinket alátámasztja az elektronmikroszkópos felvétel, illetve a nukleinsav DNS jellegének bizonyítása is. Ez az első kabócákkal terjedő vírus kórokozó, amellyel Magyarországon eddig átviteli kísérleteket végeztek. Kabócákkal terjedő betegségekkel kapcsolatos korábbi kísérletünk mind mikoplazmás eredetű fertőzésekkel voltak kapcsolatosak.

A kórokozó fertőzésének tünetei igen hasonlatosak más, vírus fertőzések okozta tünetekre, így elsősorban az árpa sárga törpülés betegség szimptomáira. E körülmény, valamint a mechanikai átvitel hiánya megnehezíti a gyakorlatban a kórokozó felismerését, elterjedésének ismeretét és az okozott kár felmérését is. Vektorátviteli kísérleteink rávilágítottak arra a különbözőségekre is, amely a búza- és az árpa törpülés között voltak, feltételezve azt a már valószínűsíthető tény, hogy a kórokozónak két eltérő biotípusa (törzse) is van. A búza törpülés vírusa nehezen (vagy nem) vihető át árpára, míg az árpa törzs csak az árpát fertőzi. Ez utóbbi törzs előfordulását is bizonyítottuk Magyarországon. A geminivírusok megismerésének jelentőségét az adja

meg, hogy általa olyan, mesterségesen kifejleszthető génvektorhoz juthatunk, amelyet az egyszíkű növények biotechnológiai megváltoztatásához lehet felhasználni.

3. A kukorica csíkos mozaik vírus a legelterjedtebb gabonapatogén vírus Magyarországon. Szinte mindenütt fellelhető szántóföldi kórokozó. Elterjedtsége ellenére a kórokozó tulajdonságairól korábban alig tudtunk bármit is. Utóbbi években feltételezték, hogy ez a vírus is egy tulajdonságaiban közel azonos víruscsoportot jelent. Szerológiai felmérésünk szerint a vírus komplexnek legalább három szerotípusa is előfordul hazánkban. Ezek az elektronmikroszkópos kép alapján nem különíthetők el.

Az első és egyben kukoricán a legközönségesebb az MDMV-A típus, amely a Sorghum halepense-t fertőzi, természetes gazdanövénye az Echinochloa crus-galli és a termesztett cirok fajták. A kakaslábfű, mint természetes vírusforrás járványtani szerepére eddig még nem figyeltek fel.

A második, szerológiailag rokon, de az A törzssel nem azonos típus tulajdonságaiban leginkább az MDMV-B törzssel azonosítható. Tesztnövényein okozott tünetei az MDMV-A hoz igen hasonlóak, a kivétellel, hogy a Sorghum halepenset és a kakaslábfűvet nem fertőzik.

Legkülönösebb az ún. "T" szerotípus előfordulása, amely szerológiailag nem hasonló a korábbi típusokkal, ugyanakkor nagyfokú tüneti hasonlóság

jellemzi a már említett két típushoz. Tüneti elkülönítésre legalkalmasabb a Sorghum halepense (A csoport), valamint egyes Sorghum fajták (S. bicolor cv. Honey vagy Sorghum dochna cv. technicum Nagykállói). E ritkább szerotípus kukoricán okozott tünetei alapján nem azonosítható, leginkább a cukornád mozaik vírussal mutat hasonlóságot. Egyes beltenyésztett kukorica vonalak azonban e típus elkülönítését is lehetővé teszik. További feladatot jelent a levéltetű vektorok fajlagosságának bizonyítása, a genomban a segítő (helper) fehérjék jelenlétének kísérletes kimutatása és sikeres bizonyítás esetén a megfelelő nukleinsav szakasz felhasználása biotechnológiai célra.

Az MDMV csoport összetett volta részben magyarázatot adhat azokra az eltérésekre is, amelyeket a nemesítők korábbi kísérleteikben tapasztaltak, részben pedig ösztönzést adnak rezisztencianemesítésben közös feladatok megoldására is.

4. A potyvirusok-tól elválasztott új rendszertani egység, a levélatkákkal terjedő wheat streak mosaic virus csoport három taggal is képviselteti magát a hazai vírusflórában. Típus képviselőjük, a búza csíkos mozaik vírus először nemesítő telep üvegházaiban fordult elő és került közlésre a kórokozó jellemzése nélkül. Szabadszíriai előfordulását búzán is, árpan is mi bizonyítottuk. A szabadszíriáról gyűjtött mintákból tesztnövény vizsgálatokkal, szerológiai módszerrel és elektronmikroszkópos felvételek alapján azonosítottuk és jellemeztük a kórokozót. A búza csíkos mozaik vírust eddig csak két helyről izoláltuk, ami azonban nem jelenti előfordulásuk korlátozott voltát,

csupán arra utal, hogy tünetei alapján más vírusokkal (elsősorban a rozsnok mozaik vírussal) könnyen összetéveszthető. Üvegházi kísérletekben a hazai búzafajták nagyfokú fogékonysággal tűnnek ki, szemben azokkal a szabadföldi megfigyelésekkel, ahol a fajták nagy fogékonyságbeli eltéréseket tükröztek. Ennek az eltérésnek oka elsősorban a szántóföldi (atka) rezisztenciában keresendő. A növénynemesítés nagy lehetőségét adja az Agropyron repens extrém rezisztenciája (immunitása), amely vadon élő fajjal más országokban már sikerrel állítottak elő vírusellenálló fajtahibrideket.

5. A tarackbúza mozaik vírus (Agropyron mosaic virus) és a vadóc mozaik vírus (ryegrass mosaic virus) két olyan vírusbetegség amely Magyarországon még nem került leírásra. Mindkét kórokozót a wheat streak mosaic virus csoport tagjaként tartják számon. Előfordulásuk közönséges, főleg tavaszi időszakban jól látható tünetekkel jellemezhető fő gazdanövényeiken (Agropyron repens és Lolium perenne ill. Lolium multiflorum). Gazdasági kártételük vitatható, pontos felmérések csak a RyMV- al készültek. Az AgMV azonban fertőzi a búzát és egyes árpa és rozs fajtákat is, a RyMV pedig szűk gazdanövényköre ellenére a zabon okoz szisztemikus fertőzést, amelynek kártételét nem ismerjük. Mindkét vírusbetegség tünetei lassan fejlődnek ki, és fő gazdanövényeiken okozott tüneti alapján nem különíthetők el más fertőzésektől. Mindkét kórokozó elektronmikroszkópos képe hasonló, csak a szűk gazdanövénykör alapján lehet azonosítani őket. Gazdanövénykörük és tesztnövényeken okozott tünetek alapján azonban jól meghatározhatók. Mindkét kórokozó gazdanövénykörét új fajokkal is

kiegészítettük. Kiemelendő fő gazdanövényeik mellett a Dactylis glomerata vírusrezervoár szerepe, amely élő lénem csak az említett vírusok, de a CfMV és a BMV természetes gazdanövénye is.

6. A helikális többkomponensű vírusoknak Magyarországon egyetlen képviselője fordul elő bizonyítottan, ez az árpa csíkos mozaik vírus. A régebben két-, három-, illetve négy komponensűnek megismert vírus törzseinek nemzetközi összehasonlítása bebizonyította a törzsek hasonlóságát és a komponensek számának eredetét. A hazai BSMV izolátumok -eltérően a nemzetközi irodalomban ismertektől- több új tulajdonságukkal is kitűnnek az összehasonlító törzsek közül. A magyar törzs (BSMV-H) tünetei enyhék, ennek ellenére nagyobb mennyiségben halmozódnak fel a beteg növényekben, mint a többi (pl. BSMV-Br) törzs. A magyar törzs patogenitása ugyanakkor szélesebb, eredményesen fertőzi pl. a kukoricát is, amelyet a hasonló (pl. orosz) törzs nem fertőz. A maggal és mechanikai úton terjedő kórokozót tesztnövény kísérletekkel, szerológiai módszerekkel és elektronmikroszkópos felvételekkel azonosítottuk ill. jellemeztük. Az egyszálú nukleinsavak összetétele bizonyította a magyar törzs háromkomponensű (orthotripartite) voltát, ami természetesen már magyarázatot nyert a nemzetközi irodalomban. A három nukleinsav komponens mellett a növényekben még egy negyedik, szubgenomikus eredetű nukleinsav frakció is kimutatható volt. A kettősfonalú RNS-ek elválasztása során a replikatív formák kimutathatóak voltak. A magyar törzs köpenyfehérje molekulatömege egyezett más (pl. az orosz) törzs köpenyfehérje molekulatömegével, míg a Braunschweig-i izolátumnál e téren eltéréseket

tapasztaltunk. Vizsgálataink azt bizonyítják, hogy a hazai izolátum új törzset képvisel. E törzs jelentősége szintén biotechnológiai felhasználhatóságában rejlik, ugyanis a kórokozó a sejtmagban replikálódik, alkalmas lehet egyszíkűek génátvitelére. Az a tény, hogy a magyar törzs fertőzi a kukoricát alkalmassá teheti arra, hogy génevktorként lehessen alkalmazni kukoricán is.

7. Az ebír tarkulás vírus szintén azok közé a vírusbetegségek közé tartozik, amelyeket ugyan leírtak hazánkban, de a kórokozó jellemzésére nem került sor. Dactylis glomerataról származó több izolátum összehasonlításával tesztnövény tünetek, és elektronmikroszkópos vizsgálat alapján ez a vírus is jellemezhetővé vált. A vírus hatékony vektoraként ismert Lema melanopussal és Lema lichenissel is eredményes átviteli kísérleteket végeztünk, kiegészítve az aktív vektorok sorát két másik vetésfehérítő bogárfajjal, a Lema septentrionis-sal és a Lema rufocyanea-val is. A virion magas nukleinsav tartalma lehetővé tette az egyszálú nukleinsav jellemzését is. A CfMV nukleinsava egykomposnsű, az egyes sobemovirusokra jellemző viroid szerű nukleinsav feltételezett jelenléte előzetes kísérleteinkben nem volt bizonyítható.

8. Egyik legelterjedtebb és gazdasági szempontból is egyre jelentősebb gabonavírusunk a rozsnok mozaik vírus. Ez az izometrikus többkomponensű vírus 1986 óta ismert hazánkban, jellemzésére azonban eddig nem került sor. Izolátumaink tesztnövény vizsgálata, szerológiai jellemzése és elektronmikroszkópos vizsgálata lehetővé tette a kórokozó virológiai leírását, a nukleinsavak elválasztását és jellemzését, a kettősfonalú

nukleinsav formák kimutatását. Vektorátviteli kísérleteinkben igazoltuk a Lema melanopus és Lema lichenis vetésfehérítő bogarak vírusvektor szerepét, és először sikerült eredményes átviteli kísérleteket végezni a Lema rufocyanea és a Lema septentrionis fajokkal is. Megállapítottuk, hogy a vírus megtartó képesség szempontjából a két vírus (CFMV és BMV) különbözik egymástól, ami aktív vírus-vektor kapcsolatot tételez fel az egyszerű mechanikai átvitel helyett. Ismereteink szerint a vetésfehérítő bogarakkal végzett kísérleteink az első hazai rovarátviteli kísérletek voltak.

III. A GABONAVÍRUSOK ELLENI KÉMIAI VÉDEKEZÉS LEHETŐSÉGEI

A vírusbetegségek ellen kémiai úton elvileg két formában is védekezhetünk. Vagy a fertőzés folyamatát gátoljuk, vagy a kórokozó replikációját akadályozzuk meg. Ennek megfelelően a vírusellenes anyagokat úgy is csoportosíthatjuk, hogy azok: a. a vírúsfertőzést közvetlen (in vitro) inhibítorai vagy, b. a fertőzést in vivo gátló anyagok, c. a vírus replikációt gátló indukált antivirális anyagok vagy d. kemoterápiás szerek.

Ez az új felosztás felvetette annak szükségét, hogy egyes, eddíg antivirálisnak ismert anyagokról kiderítsük hatásuk módját, és lehetőség szerint alkalmazzuk azokat a gabonavírusok elleni kémiai védekezésben.

Az antivirális szerek között legismertebbek a triazinok. Ezek egyik

fontos képviselője az 5-azadihidrouracil (2,4-dioxo-hexahidroxo-1,3,4-triazin, DHT), amely jelentős mértékben, de nem teljesen gátolja a vírusreplikációt. Eddig csak kétszikű növényeken alkalmazták. Az ún. "antivirális anyagok" másik, jelentős csoportját a guanidin származékok képviselik. E vegyületcsoportból a cianoguanidint alkalmaztuk először gabonavírusok elleni védekezésben. Kísérleteinket kiegészítettük az L333 jelű (védett nevű) ugyancsak antivirális hatásáról ismert anyaggal. Az említett vegyületek fertőzésfogékonyságra gyakorolt *in vitro* és *in vivo* gátló hatását dohány mozaik vírus ellen vizsgáltuk (inkompatibilis gazda-parazita kapcsolatban), a fogékonyság változásait a dohányon fejlődött lokális léziók számával jellemeztük. Az antivirális - tehát vírus replikációt gátló hatást - BSMV-vel fertőzött árpa leveleken mértük (kompatibilis gazda-parazita kapcsolatban).

Megállapítottuk, hogy mindhárom anyagnak közvetlen vírus-inhibitor hatása van. Hasonlóan *in vivo* fertőzésfogékonyságot csökkentő hatás is kimutatható mindhárom kezelés esetén. Az L333 és a DHT kezelések a köpenyfehérje felhalmozódását is csökkentették. Mindez ellenére a BSMV - árpa gazda parazita kapcsolatban tapasztalt antivirális hatás inkább a közvetlen inhibitor jellegel és a fertőzésfogékonyság csökkentésével magyarázható mintsem a replikációt gátló *in vivo* hatással.

A virazolhoz hasonló kémiai szerkezetű tiazofurint (2-3 -
D-ri^bofuranoziltiazol-4-karboxamid) a humánpatológiából ismert antivirális anyag, amit eddig csak egy növényi vírus ellen próbáltak

ki. A tiazofurin BSMV replikáció gátlását bizonyítottuk árpa növényeken. Vizsgálatainkban a tiazofurin jelentős -de nem teljes- vírusreplikációt gátló hatást mutatott. A gátló hatás mértéke a kezelés idejétől is függött, de a fertőzés után alkalmazva is kimutatható volt a vírusreplikáció gátlása. A BSMV-H és -Br törzs között az antivirális hatás mértékében is különbségeket tapasztaltunk. A hatás ugyanakkor csak időleges, és csak a kezelt levelekre terjed ki.

Kísérleteink, annak ellenére, hogy gyakorlati célra használható antivirális anyagot nem szolgáltatottak, rámutattak az antivirálisnak ismert anyagok hatásának módjára. Ezek a kísérletek tudomásunk szerint az első-, a gabonavírusokkal kapcsolatos kémiai védekezési kísérletek.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok két tanítómesteremnek, Dr. Szirmai Jánosnak, a hazai növényvirológia úttörőjének és Dr. Király Zoltánnak, a kóréletteni iskola megalapítójának, hogy pályámon elindítottak, bátorítottak, segítettek;



szerezőtársaimnak:
Ádám Attilának,
Bisztray Györgynek,
Nagy Péternek,
Nyitrai Ágnesnek,
Tallóczy Zsoltnak,
Tóbiás Isvának
Szabolcs Jánosnak,
Josef Vackénak,
Ngoc Hoang Duongnak
akiknek szakmai
lelkesedése és
baráti közreműködése
nélkül munkám nem
tudtam volna meg-
valósítani;

a Növényvédelmi Kutató Intézetben volt munkatársamnak Pogány Juditnak;
valamint Kézdy Annának, a virológiai csoportban Aranyiné Rehák Margit,
Csiháné Pintér Éva, Fritsch Ottóné, Harangozó Margit, Kiss Gyuláné és
Varga Pál munkatársaimnak lelkiismeretes segítségükért, szorgalmas
munkájukért.

FÜGGELÉK

Függelék

Tesztnövény táblázatok

Az összehasonlító táblázatok (A = Mechanikai inokulációval átvihető, hajlékony (egykomponensű) helikális; B = mechanikai inokulációval átvihető, merev (többkomponensű); C = mechanikai inokulációval átvihető, izometrikus (egy- és többkomponensű-) elsősorban az Európában honos fontosabb vírusbetegségek fontosabb gazda- és tesztnövényeinek vírus-fogékonyságait foglalják össze. Az irodalmi hivatkozások rövidítettek, azok jórészt a megfelelő fejezetekben is megtalálhatók.

Irodalom

1. A'Brook and Benigno 1972: Ann. appl. Biol. 72: 169.
2. Bancroft 1970: Descr. 3.
3. Benigno and A'Brook 1972: Ann. appl. Biol. 72: 43.
4. Bremer 1973: Phytopath. Med. 12: 67.
5. Catherall 1970: Pl. Pathol. 19: 101.
6. Catherall and Chamberlain 1975: Plant Pathol. 24: 217.
7. Catherall and Wilkins 1977: Ann. Phytopathol. 9: 254
8. Catherall et al. 1977: Ann. appl. Biol. 87: 233.
9. Ford and Josle 1972: Phytopath. Z. 75: 315.
10. Gáborjányi 1990. Thesis. Budapest
11. Gill 1967. Phytopathol. 57: 302.
12. Huth 1968: Phytopath. Z. 62: 300.
13. Huth 1974: Mikrobiologija, Beograd 11: 195.
14. Huth and Paul 1972: Descr. 107.
15. Huth et al., 1970: Phytopath. Z. 68: 367.
16. Jilaveanu 1987: Pr. Prot. Plant. Bucuresti 15:126.
17. Jilaveanu and Ittu 1986 Bul. Prot. Plant. Bucuresti 1:3.
18. Jackson and Lane: Hordeiviruses In: Kurstak: Handbook of Plant Viruses 565.
19. Juretic 1979: Acta Bot. Croat. 38: 13.
20. Kerlan et al. 1974: Ann. Phytopathol. 6: 455.
21. Lovisolo 1957: Boll. Sta. Path. Veget. Roma 14: 261.
22. Markov, 1975: Pl. Prot. Sci. Sofia 1/2 14.
23. Markov et al. 1975: Plant Sci. Sofia 12: 130.
24. Markov et al. 1977: Ann. Phytopath. 9:321.

25. Mulligan 1960: *Ann. appl. Biol.* 48:575.
26. Ohmann-Kreutzberg 19 : *Phytopath. Z.* 47: 1.
27. Paul 1974: *Mikrobiologija* 11: 193.
28. Paul and Huth 1970: *Phytopath. Z.* 69: 1
29. Raben
stein und Stanarius 1981: *Nachr. Pfl. Schutz.* 35: 190.
30. Richter et al. 1966. *Z. Bl. Bakter.* 11 120: 467.
31. Schmidt et al. 1963: *Phytopath Z.* 47: 660.
32. Schumann 1967: *Plant Virology Conf. Olomuc* 197.
33. Schumann 1969: *Arch. PflSch.* 5: 381.
34. Schumann 1969: *Phytopath. Z.* 64: 258.
35. Shepard 1965: *Phytopathol.* 55 1250.
36. Shepard 1968: *Pl. Dis. Reprt.* 52: 139.
37. Sehgal 1966 *Pl. Dis Repr.* 50: 862
38. Serjeant 1964: *Pl. Pathol.* 13: 23.
39. Serjeant 1967: *Ann. appl. Biol.* 59: 31.
40. Slykhuis 1961: *Can. J. Pl. Sci.* 41: 304.
41. Slykhuis 1967: *FAO Pl. Prot. Bull.* 15: 749.
42. Sutić i Tosić 1964: *Plant Prot. Beograd* 79: 308
43. Szirmai 1986: *Növényvédelem* 20:353.
44. Szirmai és Paizsné 1963: *Növényterm.* 12 43.
45. Toriyama 1982: *Ann Phytopath. Japan* 48: 514
46. Tosić 1971 *Phytopath Z.* 70: 145.
47. Tosić 1973: *Zastita Bilja, Beograd* 24: 317.
48. Tosić and Ford 1972: *Phytopathol.* 62: 1466.
49. Vacke and Klir 1972: *Vedeckych Prace, Bratislava* 183.
50. Vacke and Jokes 1986: *Proc. Czechosl. Pl. Vir. Brno.* 215.
51. Vacke et al. 1986: *Proc. Czechosl. Pl. Vir. Brno.* 209.

Mechanikai inokulációval átvihető helikális graminea vírusok fo

Tesztnövények	Wheat streak mosaic virus (WSMV)	Maize dwarf mosaic virus (MDMV)	Agropyron mosaic virus (AgMV)
<i>Agropyron repens</i>	-19,46,51	-20,48,+9	+22,34,36,40
<i>Avena sativa</i>	+4,19,46,51	-9	-36 +22,
<i>bizanthyna</i>	+47	?	?
<i>Bromus arvensis</i>	+20,29,	+9	+22
<i>erectus</i>	+47	-9	?
<i>inermis</i>	?	?	+22
<i>mollis</i>	?	+20	+22
<i>Echinochloa crus-galli</i>	+47	+9,35,37	+22,34
<i>Dactylis glomerata</i>	-21	-9,+20	-36,+22
<i>Hordeum vulgare</i>	+20,29,46,51	-9,48	+22
<i>Lolium multiflorum</i>	+4,51	+9	+22,34
<i>perenne</i>	-4	-9	+22
<i>Poa pratensis</i>	-20	-9	?
<i>Panicum miliaceum</i>	+46,47,51	+9,37	-22
<i>Phleum pratense</i>	-20	-9	+22
<i>Sorghum bicolor</i>	+47	+20,21,37,44	+22
<i>capillare</i>	+40	+9	?
<i>halepense</i>	-20	törzstől függő	?
<i>Secale cereale</i>	+19,42,47	-9	+34
<i>Setaria sp.</i>	+46,47	-9,+20,21,37	+22
<i>Triticum aestivum</i>	+4,19,46,47,51	-9,-20,-48	+22,34,36.40
<i>Zea mays</i>	-20,+19,+47,51	+9,21,37,44,48	+22

: fogékonyasága tesztnövényeken

Ryegrass mosaic virus (RyMV)	Oat necrotic motle virus (ONMV)	Cocksfoot streak virus (CfSV)
?	-11	+34
+25,50	+11	+34,49
?	+11	?
+25	?	+34
?	?	-34
?	-11	+34
?	?	-34
?	?	-34
+7,50	-11	+32,34,38,49
-25	?	-34
+25,50	+11	+32,34
+25	-11	+32,34
+25	+11	-34
?	?	-34
-25	-11	+34
?	?	?
?	?	?
?	?	?
-25	-11	-34
?	-11	-6,34
-25	-11	+34
-25	-11	-34

Merev, helikális, mechanikai inokulációval átvihető gramineavírusok
fogékonysága tesztnövényeken

Természetes és mester- séges gazdanövények	Barley stripe mosaic virus (BSMV)	Poa semilatent virus (PSLV)	Barley yellow mosaic virus (BYMV)
<i>Agropyron repens</i>	?	?	?
<i>intermedium</i>	51	-51	?
<i>Avena sativa</i>	51	51	?
<i>fatua</i>	10,51	51	?
<i>Bromus inermis</i>	51	-51	?
<i>mollis</i>	51	51	?
<i>tectorum</i>	51	?	?
<i>Dactylis glomerata</i>	10,51	51	?
<i>Echinochloa crus-galli</i>	51	?	?
<i>Festuca pratensis</i>	51	51	?
<i>rubra</i>	(lat.) 51	?	?
<i>Hordeum vulgare</i>	10,51	51	52
<i>Lolium multiflorum</i>	10,51	51	?
<i>perenne</i>	10,51	-51	?
<i>Panicum miliaceum</i>	10,51	?	?
<i>Poa pratensis</i>	51	?	?
<i>Phleum sp.</i>	51	51	?
<i>Secale cereale</i>	51	51	?
<i>Setaria glauca</i>	(lat.) 51	?	?
<i>viridis</i>	51	?	?
<i>Sorghum halepense</i>	(lat.) 51	?	?
<i>vulgare</i>	51	?	?
<i>Triticum aestivum</i>	10,(lat.)51	51	?
<i>Zea mays</i>	10,51	51	?

Mechanikai inokulációval átvihető izometrikus graminea vírusok

Természetes és mesterséges gazdanövények	Cocksfoot mottle virus (CfMV)	Cocksfoot mild mosaic (CfMMV)	Phleum mottle virus (PMV)	Cyn mot (Cy)
<i>Agropyron repens</i>	-8,10,39	?	8	
<i>Avena sativa</i>	8,10,12,28,38,43,45	-14,28+12	-5	
<i>Bromus arvensis</i>	-12	12,14	?	
<i>inermis</i>	-8	?	?	
<i>erectus</i>	?	12,28	?	
<i>mollis</i>	-12	-12	?	
<i>Dactylis glomerata</i>	10,12,39	6,12,14,27	-5,+6	
<i>Echinochloa crus-galli</i>	-8	?	8	
<i>Festuca arundinacea</i>	+39,-45	?	?	
<i>heterophylla</i>	?	-6	?	
<i>pratensis</i>	-8,28	14,28	-6	
<i>Hordeum vulgare</i>	10	-14,28	?	
<i>murinum</i>	1,8,28,39,45	28	+3,-5	
<i>Lolium multiflorum</i>	-10,28,45	12,14,28	-11	
<i>perenne</i>	-10,28,39,45	-6,12,14,28	-6	
<i>Panicum miliaceum</i>	-8,10	+14	?	
<i>bulbosa</i>	?	?	?	
<i>Poa annua</i>	-8	14	?	
<i>pratensis</i>	-39	14	?	
<i>Phleum pratensis</i>	-5,28,39	+6,12,27,-14	1,3,5,6,28	
<i>Secale cereaale</i>	8,12,45	14	?	
<i>Setaria glauca</i>	-8,45	?	?	
<i>italica</i>	-6,8,45	+6,16	?	
<i>viridis</i>	+45,-8	16	?	
<i>Sorghum halepense</i>	-10,39	?	? /	
<i>vulgare</i>	-8,10,39	?	?	
<i>dochna</i>	?	?	+8	
<i>Triticum aestivum</i>	8,10,12,28,38,39,45	+6,-14,28	5,8	
<i>Zea mays</i>	-8,10,12,39,45	12,14,28	?	

a vírusok fogékonysága tesztnövényeken

Cynosorus mottle virus (CyMV)	Brome mosaic virus (BMV)	Ryegrass necrosis virus (RyNV)
-8	10,30,41	26
+8	10,16,17,24,41	26
?	?	26
-8	17,30,41,10,16,24	26
?	?	?
?	?	-26
-8	10,16,17	26
-8	16	26
?	16,17	?
?	?	?
-8	17,41	26
?	2,10,16,17,24,41	26
+8	?	26
-8	16,17,24,30,41	26
-8	16,17,41,	26
-8	?	26
?	41	?
-8	?	?
?	41	?
?	24,41	26
8	16,24	26
-8	16	?
-8	16	(lat.) 26
-8	?	26
?	?	(lat.) 26
?	?	26
-8	10	?
1,8	10,14,16,29	26
-8	2,10,41	26