

A KABAKOSOKON SÚLYOS KÁROKAT OKOZÓ CUKKINI SÁRGA MOZAIK VÍRUS EGYIK HAZAI TÖRZSÉNEK JELLEMZÉSE

Tóbiás István¹, Palkovics László² és Balázs Ervin²

¹MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, 1525 Budapest, Pf. 102.

²Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, 2101 Gödöllő, Pf. 411.

Az előzetes vizsgálatok során a cukkini sárga mozaik vírus izolátumait hasonlítottuk össze, és azokat jól reprezentáló ZYMV-10 törzset választottuk ki további vizsgálatokra. A ZYMV-10 törzs 2. patotípusba tartozik, és biológiai tulajdonságait tekintve nagy hasonlóságot mutat az eddig leírt ZYMV-törzsekkel. Az Ammi majus tesztnövény a ZYMV-10 törzs új, eddig nem ismert szisztemikus gazdanövénye. A hazai izolátumokat reprezentáló ZYMV-10 törzs köpenyfehérjéjén nukleotid- és aminosavsorrendjét hasonlítottuk össze a különböző földrajzi helyekről (Kalifornia, Florida, Connecticut, Szingapur, Izrael) származó cukkini sárga mozaik vírusokkal. A hazai izolátum a nukleotid sorrendje alapján a legnagyobb hasonlóságot (98,6%) az Izraelben izolált törzssel, a legnagyobb aminosav-homológiát (98,2%) a Kaliforniában jellemzett törzssel mutat.

A cukkini sárga mozaik vírust (zucchini yellow mosaic potyvirus, ZYMV) elsőként Olaszországban írták le (Lisa és mtsai 1981), de a világon mindenütt elterjedt kórokozó, mely kabakosokon igen súlyos termésvesztéseket okoz.

Magyarországon először Szarvas környékén találtuk meg és izoláltuk uborka-, cukkini- és patisszonnövényekről (Tóbiás és mtsai 1996). A következő években az Alföld több körzetében azonosítottuk a kórokozót uborka-, cukkini-, patisszon-, sárgadinnye-, görög-dinnye-, olajtök-, főzőtök- és salátatöknövényekről, amelyekben súlyos károkat okozott (Tóbiás, nem közölt adat).

A cukkini sárga mozaik vírus az egyik legnagyobb víruscsoportba – potyvírus csoport – tartozik, amelyre jellemző a kb. 750 nm hosszú, rugalmas fonal alakú partikulum, melyben kb. 10 000 bázisból álló pozitív, egyszálú RNS található. Az eddig azonosított ZYMV-izolátumok nagy genetikai variabilitást mutatnak a gazdanövénykört, a tünetek megjelenését, a levéltetűvel való terjedést és a nuk-

leinsav-szekvenciájukat tekintve (Lecoq és Pitrat 1981, Desbiez és mtsai 1996).

Vizsgálataink célja az volt, hogy a hazánkban izolált ZYMV biológiai tulajdonságait és köpenyfehérjéjén szekvenciai adatait összehasonlítsuk ismert, jól jellemzett ZYMV-törzsek adataival.

Anyag és módszer

Vírus

A vizsgálatokat a Szarvason gyűjtött és azonosított ZYMV-10 izolátumával végeztük, melyet *Chenopodium quinoa* L. tesztnövény eglyéziós kultúrájából szaporítottuk fel és tartottuk fenn *Cucumis sativus* L. növényen.

Gazdanövénykör

A ZYMV biológiai tulajdonságait az 1. táblázatban felsorolt tesztnövényeken vizsgáltuk. A mechanikai inokulációt követően rendszeresen vizuálisan értékeltük a tüneteket. Azokat a növényeket, melyeknél látható tünet nem volt,

ELISA-vizsgálattal, illetve *C. sativus* teszt-növényre történő visszafertőzéssel ellenőriztük.

Vírus tisztítás és RNS-kivonás

A ZYMV-10-izolátumot *C. sativus* növényen szaporítottuk fel. A vírus tisztításhoz a leveleket 2–3 héttel az inokulációt követően szedtük és azonnal felhasználtuk. A vírust Huang és mtsai (1989) módszerének módosításával – cézium-szulfát sűrűséggrádiens helyett cukorsűrűség-grádiens centrifugálást alkalmaztuk – tisztítottuk. A víruszuszpenzió tisztaságát és koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg.

A vírus-RNS-t a tisztított víusból Robaglia és mtsai (1989) által leírt módon vontuk ki. Az ultracentrifugálás után csövenként 15–15 frakciót szedtünk (300 µl), majd 1%-os agarózgélben választottuk el a mintákat. Az RNS-frakciókat alkoholos kicsapás után steril vízben oldottuk vissza.

A köpenyfehérjéjén izolálása, klónozása és elsődleges szerkezetének meghatározása

A vírus-RNS-ről a cDNS-t a 'cDNA Synthesis System Plus Kit' (Amersham) felhasználásával és a gyártó által előírt utasítás alapján készítettük. A cDNS szintéziséhez oligo (dT) primert használtunk fel. A szintetizált cDNS elegyet Biogel P 30 oszlopon tisztítottuk tovább. Az így nyert cDNS-eket az EcoRV-enzimmel emésztett pBSK+plazmidba ligáltuk, és a rekombináns klónokat *E. coli* DH 5α törzs kompetens sejtjeibe transzformáltuk (Sambrook és mtsai 1989).

A kapott klónokat kolóniahibridizáció és a fizikai térképezés segítségével jellemeztük. A kiválasztott klón szekvenciáját dideoxinukleotid (ddNTP) láncterminációs módszerrel határoztuk meg Sanger és munkatársai (1977) szerint.

A nukleotid és aminosavszekvenciákat számítógépes feldolgozással a „Wisconsin package Version 9.1 GCG Madison, Wisc.” DISTANCES, GAP, GROWTREE, SEQED, MAP, TRANSLATE, PILUP programok felhasználásával analizáltuk.

Eredmények

A hazánkban izolált ZYMV-10-izolátum különböző teszt-növényeken mutatott tüneteit az 1. táblázat mutatja. A ZYMV elsősorban kabakos növényeket fertőz, melyeken általában igen erős mozaikfoltosodást és levéldeformációt okoz. Jellemző a kabaktermés deformációja, torzulása és néhány esetben a mozaikfoltosság (1. ábra). A hazai ZYMV-10-izolátum a *C. melo* cv. Doublon és *C. melo* cv. PI 414723 teszt-növényeken mutatott tünetek alapján a 2. patotípusba tartozik. A *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* és *C. murale* növények inokulált levelein jól látható klorotikus lokális léziót okozott. Ez utóbbi két növényen a klorotikus lézió később nekrotizálódott. A *C. foetidum* inokulált levelén nem látható lézió, de a vírus kimutatható a levélből (látens fertőzés). A ZYMV-10-izolátum –

1. táblázat

A hazai cukkini sárga mozaik vírus izolátum tünetei néhány teszt-növényen

Teszt-növények	Tünetek*
Ammi majus	I/S
Chenopodium quinoa	L/-
Chenopodium amaranticolor	L/-
Chenopodium murale	L/-
Chenopodium foetidum	I/-
Citrus lanatus	I/S
Cucumis melo ssp. melo conv. cassaata	I/S
conv. chardelek	I/S
conv. cantalup	I/S
Cucumis melo cv. Doublon	I/S
cv. PI 414723	I/S
Cucumis sativus	I/S
Cucurbita pepo cv. ginomontiana	I/S
cv. patissoniana	I/S
cv. pepo provar oblonga	I/S
Cucurbita maxima cv. maxima	I/S
Cucurbita ficifolia	I/S
Echinocitis lobata	I/S
Cucurbita moschata	L/S
Datura stramonium	-/-
Nicotiana clevelandii	-/-
Nicotiana benthamiana	I/-
Pisum sativum	-/-
Phaseolus vulgaris	-/-
Vicia faba	-/-
Vigna unguiculata	-/-

*A tünetek jelölése: I – látens fertőzés az inokulált levélen, L – klorotikus vagy nekrotikus foltok az inokulált levélen, S – szisztemikus tünetek (klorózis, mozaik, nekrotikus foltok, levéldeformáció), – nincs fertőzés, a vírus nem mutatható ki.

hasonlóan az eddig ismert izolátumokhoz – nem fertőzi a *D. stramonium*, *N. clevelandii*, *Vicia faba*, *Vigna unguiculata* növényeket. A hazai izolátum nem fertőzte a borsót, ami eltér az eddigi adatoktól (látens lokális fertőzés ismert) (Wang és munkatársai 1992). Ez magyarázható a vírustörzsek közötti különbséggel, de azzal is, hogy más borsófajtát használtunk a teszteléskor. A ZYMV-10-izolátum látens lokális fertőzést okozott a *N. benthamiana* dohányon csakúgy, mint a Connecticutban és a Tajvanban izolált törzsek (Wang és munkatársai 1992). Új adatnak tekinthető, hogy a hazai ZYMV-izolátum szisztemikusan fertőzi az *Ammi majus* tesztnövényt, amelyet az eddigi irodalmi adatok nem említenek a ZYMV gazdanövényei között (Brunt és munkatársai 1996).

Az alkalmazott vírustisztítási és RNS-kivonási módszerekkel nagy hatékonysággal

```

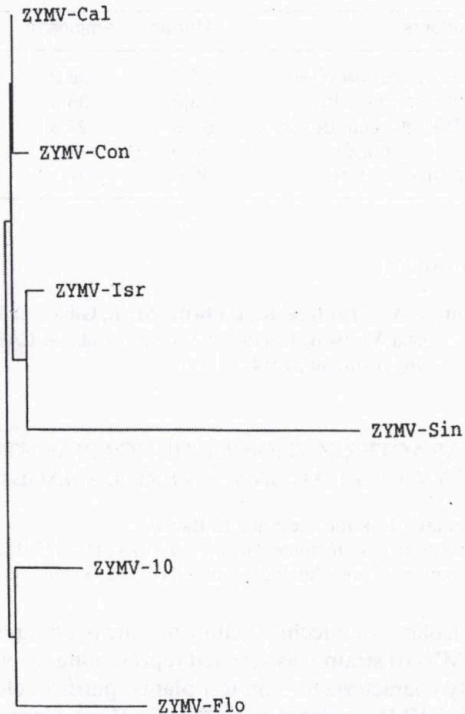
1  TCAGGCACTC AGCCAACGTG GGCAGACGCT GGAACCACAA AGAAAAACAA
51  CGAAGATGAC AAAGGGAAAA ACAAGGATGC TACAGGCTCC GGCTCAGGTG
101 AGAAAACAAT GGCAGCTGTC ACGAAGGACA AGGATGTAAA TGCTGTTTCT
151 CATGGGAAAA TTGTGCCCGG TCTTTCGAAG ATAACAAGA AGATGTCACT
201 GCCACCGCTG AAAGGAAATG TGATACTCGA CATTGATCAC TTGTGGAGT
251 ATAAGCCGGA TCAAATTGAG TTATAACAAC CACGAGCGTC TCATCAGCAA
301 TTCGCTCTTT GGTTCACCCA AGTAAAACT GAATATGATC TGAATGAACA
351 ACAGATGGGA GTTGTAAATGA ATGGTTTCAT GGTITGGTGC ATTGAAAATG
401 GCACGTCAAC CGACATTAAAC GGAGTATGGG TTATGATGGA CGGTAATGAG
451 CAGGTTGAAT ATCCTTTGAA ACCAATAGTT GAAAATGCAA AGCCAACGCT
501 GCGACAAATA ATGCATCACT TTTGAGATGC AGCGGAGGCA TATATAGAGA
551 TGAGAAATGC AGAGGCACCA TACATCCGGA GGTATGGTTT GCTTCGAAAC
601 TTACGGGATA GGAGTTTGGC ACGATATGCT TTCGACTTCT ACGAAGTCAA
651 TTCCAAAACCT CCGGAGAGAG CCCGCGAAGC TGTTGCGCAG ATGAAAAGCAG
701 CAGCCCTTAG CAATGTTTCT TCAAGTGTGT TTGGCCTTGA TGGAAATGTT
751 GCCACCACCTA GCGAAGACAC TGAACGGCAC ACTGCACGCTG ATGTTAATAG
801 GAACATGCAC ACCTTGCTAG GTGTGAATAC AATGCAG
    
```

2. ábra. A ZYMV-10-törzs köpenyfehérjéjén nukleinsavsorrendje

tudtunk tiszta vírus RNS-t izolálni. A cukor-sűrűség-grádiensről szedett 15 frakció közül a 2. frakció tartalmazta az intakt vírus RNS-t, amelyet a cDNS szintéziséhez használtunk fel.

A ZYMV-10 RNS 3' végéről szintetizált leghosszabb cDNS-t tartalmazó klónt (p247) kiválasztottuk. A p247 klón 1392 nt hosszú, tartalmazta a vírusgenom 8238–9593 szakaszát és 36 adeninből álló poly A véget. A klón magába foglalja a ZYMV 3' vég nem kódoló részét, a teljes köpenyfehérjéjét (2. ábra) és a N1b fehérje karboxi terminális részét.

A hazai izolátum és a különböző ZYMV-izolátumok köpenyfehérjéjén aminosavsorrendjének ismeretében elkészítettük annak filogenetikai törzsfáját (3. ábra).



3. ábra. A különböző cukkini sárga mozaik vírus izolátumok köpenyfehérjéjén aminosavsorrendjén alapuló filogenetikai törzsfa. Az adatok saját eredmények, illetve a GenEMBL adatbankból származnak.

(ZYMV-Cal accession No L 31350, ZYMV-Con: accession No D 00692, ZYMV-Flo: accession No D 00593, ZYMV-Sin: accession No X 62662 és ZYMV-Isr: accession No M35095)

A ZYMV-10-izolátum köpenyfehérjéjén nukleotid- és aminosavsorrendjét összehasonlítottuk az eddig ismert ZYMV-izolátumokkal (2. táblázat). Jól látható, hogy az aminosavhomológia nagyobb (91,7–98,2%), mint a nukleotid-homológia (86,0–98,6%). Az aminosavhomológia alapján a hazai izolátum legközelebbi rokonságban a Kaliforniában izolált cukkini sárga mozaik vírussal van, a nukleotid-sorrend alapján egyértelműen az Izraelben leírt törzssel mutatja a legnagyobb hasonlóságot.

2. táblázat

A hazai cukkini sárga mozaik vírus (ZYMV-10) köpenyfehérjéjén nukleotid- és aminosavsorrendjének homológiája ismert ZYMV-izolátumokkal
(adatok a 2. ábra magyarázatában)

Vírustörzs	nukleotid	aminosav
ZYMV-Kalifornia (Cal)	94,3	98,2
ZYMV-Florida (Flo)	93,3	96,0
ZYMV-Connecticut (Con)	94,6	97,8
ZYMV-Szingapúr	36,0	91,7
ZYMV-Izrael (Isr)	98,6	97,5

IRODALOM

Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. and Watson, L. (1966): Viruses of plants. CAB International., 1414–1417.

CHARACTERIZATION OF HUNGARIAN STRAIN OF ZUCCHINI YELLOW MOSAIC POTYVIRUS CAUSING SEVERE DAMAGE ON CUCURBIT PLANTS

I. Tóbiás¹, L. Palkovics² and E. Balázs²

¹Plant Protection Institute, Hung. Acad. Sci., H-1525 Budapest, P. O. Box 102.

²Agricultural Biotechnology Center, H-2102 Gödöllő, P. O. Box 411.

Isolates of zucchini yellow mosaic potyvirus collected from different cucurbit crops were compared. ZYMV-10 strain was selected representing the virus population in Hungary. ZYMV-10 strain was partially characterized – on test plants, purified, cloned and sequenced the 3' end region – and compared with ZYMV isolated in California (Cal), Connecticut (Con), Florida (Flo), Israel (Isr) and Singapore (Sin).

Biological properties of zucchini yellow mosaic potyvirus strains are very similar but they differed in the ability to infect hosts. ZYMV-10 strain belong to pathotype 2. *Ammi majus* is a new systemic host plant for ZYMV-10 and most likely to other ZYMV strains, too. Nucleotid sequence of coat protein region of ZYMV-10 showed 86–98.6% homology with other ZYMV strains, while amino acid homology are between 91.7–98.2%. ZYMV-10 strain has the highest nucleotid sequence homology with strain isolated in Israel (98.6%) and amino acid homology with California strain (98.2%).

Érkezett: 1998. szeptember 25.

- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Granier, F., Robaglia, C., Delaunay, T. and Lecoq, H. (1996): Biological and molecular variability of zucchini yellow mosaic virus on the Island of Martinique. *Plant Disease*, 80: 203–207.
- Huang, C. H., Hseu, S. H. and Tsai, J. H. (1989): Purification, serology and properties of five zucchini yellow mosaic virus isolates. *Plant Pathol.*, 38: 414–420.
- Lecoq, H. and Pitrat, M. (1984): Strains of zucchini yellow mosaic virus in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Phytopathol. Z.*, 111: 165–173.
- Lisa, V., Boccardo, G., D'Agostino, G., Delavalle, G. and D'Aquilio, M. (1981): Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopatology*, 71: 667–672.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S. and Casse-Delbart, F. (1989): Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.*, 70: 935–947.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463–5469.
- Tóbiás I., Basky Zs. és Ruskó J. (1966): A cukkini sárga mozaik vírus – a kabakosokon előforduló új kórokozó Magyarországon. *Növényvédelem*, 32: 77–79.
- Wang, H. L., Gonsalves, D., Provvidenti, R. and Zitter, T. A. (1992): Comparative biological and serological properties of four strains of zucchini yellow mosaic virus. *Plant Disease*, 76: 530–535.