

MOLEKULÁRIS VIROLÓGIÁTÓL A GYAKORLATI NÖVÉNYVÉDELEMIG*

Balázs Ervin

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő
H-2100 Gödöllő Pf. 441.

A molekuláris biológia forradalmának köszönhetően a növénykórokozó vírusokról alkotott világgép nagymértékben megváltozott. Fény derült arra, hogy a növényi vírusok genomja nemcsak ribonukleinsav lehet, hanem dezoxiribonukleinsav is. Új kórokozók molekuláris biológiai jellemzése is lehetővé vált. Meghatározásra került a viroidok, szatellit RNS-ek, valamint számos növényi vírus elsődleges szerkezete. A vírusok genomszerveződésének, a gének funkcióinak megismerésével kirajzolódtak a védekezés kidolgozásának alapjai. Az első sikeres növényi génátültetési eredmény felhasználásával, a transzformációs rendszerek bevezetésével lehetővé vált vírusellenálló növény előállítás. Az elmúlt évtizedben vírusgénnel transzformált növényekben vírusellenállóságot alakítottak ki, amely növények már szabadföldi körülmények között is bizonyították a technika hasznosíthatóságát. Az előadás a molekuláris virológia eredményeinek áttekintésén keresztül elemzi a gyakorlati növényvédelelmi vezető utat.

Az elmúlt két évtized tudományos eredményei teljes mértékben megváltoztatták a növényi vírusokról alkotott világgépünket. Egészen a 60-as évek végéig dogmaként hirdették meg, hogy a növényi vírusok kizárólagosan ribonukleinsav (RNS) genommal rendelkeznek, alapvetően különböznek tehát az állatokat, illetve az embert fertőző vírusoktól. A kettős szálú dezoxiribonukleinsav (DNS) genommal bíró karfiol mozaik vírus (CaMV) azonosítása, majd az egyszálú DNS genomú geminivírusok felfedezése új korszakot nyitott a növényi virológia tudományában. Hasonló mérföldkő volt a kis cirkuláris RNS-kórokozók, a viroidok felfedezése, valamint a szatellit RNS-ek betegség tünetet befolyásoló szerepének bizonyítása (1. táblázat).

A molekuláris biológia forradalma is erre az időszakra esett, így a növényi virológia e terület teljes technikai arsenálját hasznosíthatta. Az első kórokozó viroid teljes elsődleges szerkezetének meghatározását követte a növényi vírusok genomszerveződésének feltárása és szerkezetük

1. táblázat

Új víruskórokozók azonosítása

1968	Burgonya orsós gumósodás viroid PSTV (<i>Diener</i>) Citrus kéregrendellenesség viroid CEV (<i>Semancik</i>)
1968	Karfiol mozaik vírus kettős szálú DNS genom CaMV (<i>Shepherd</i>)
1976	Szatellit RNS-ek leírása CARNA 5-satRNA (<i>Kaper</i>)
1977	Bab aranyárga mozaik vírus geminivírus egyszálú DNS genom BGMV (<i>Goodman</i>)
1981	<i>Dohány bársonyos tarkulás vírusoid</i> cirkuláris sat RNS (<i>Francki</i>)
1987	Defektív interferáló részecske <i>DI particle</i> (<i>Morris</i>)

meghatározása. Ma már szinte minden jelentős növényi vírus elsődleges szerkezetét ismerjük és azok genomszerveződésének tanulmányozásával lehetővé vált a gének azonosítása, funkcióik meghatározása is (2. táblázat). A hazai flórából izolált vírusok tanulmányozása is meg-

*A 40. Növényvédelmi Tudományos Napokon (1994. február 22–23., Budapest) elhangzott plenáris előadás rövidített anyaga.

2. táblázat

Különböző típusú nukleinsav genommal rendelkező vírusok első szerkezet adatai

1978	PSTV	viroid
1980	CaMV	ds DNA
1982	TMV	ss RNA
1985	BGMV	ss DNA

ben a munkákban, s nemcsak a magyar flórából izolált vírustörzseket jellemezték, hanem együttműködve amerikai, olasz és francia kutatócsoportokkal egy-egy vírus elsődleges szerkezetét a világon elsőként tárták fel (4. táblázat).

A növények egy sejtéből történő regenerációja, a transzformációs technológiák kidolgozása, a molekuláris technikával kialakított vektorok

3. táblázat

Magyarországon izolált vírusok elsődleges szerkezetének meghatározása

CaMV D/H	Horváth	—	Balázs és mtsai (1982)
PVY H	Beczner	—	Thole és mtsai (1993)
PPV SK 68	V. Németh	—	Palkovics és mtsai (1993)
TMV Ob	Csilléry	—	Padgett és mtsai (1993)
CMV Tkr7 RNA 1,3	Beczner	—	Salánki és mtsai (1994)
TAV pepper RNA 3	Salamon	—	Salánki és mtsai (1994)
TNV DH	Burgyán	—	Molnár és mtsai (1994)

4. táblázat

Magyar virológusok részvétele nem Magyarországról származó vírusok szerkezetmeghatározásában

Balázs	Szegfű tarkulás vírus CarMoV 1985
Burgyán	Cymbidium gyűrűsfoltosság vírus CyRSV 1989
Pogány	Lóbab tarkulás vírus BBMV 1993

kezdődött a 80-as évek elején, s az eredmények nagyban elősegítették a vírusokról alkotott képünk fejlődését (3. táblázat). Kiemelt érdeklődést váltott ki a dohány mozaik vírus magyar izolátuma, mivel eltérően a többi ismert és jól jellemzett vírustörzstől ez az izolátum a dohányokban ismert N gén rezisztenciaformát letöri és ezekben a növényekben a vírus jól szaporodik. Padgett és Beachy (1993) a vírus klónozása és teljes elsődleges szerkezetének meghatározásakor megállapították, hogy a vírus replikáz génjében történt mutációra vezethető vissza ezen új tulajdonság. Ez azért jelentős megállapítás, mert más vírusoknál a vírusok mozgásában bekövetkező változásokat, illetve a növény rezisztenciáját áttörő képességet a köpenyfehérje gén, illetve a mozgásért felelős génekben történt mutációkra, illetve elérésekre vezetnek vissza (Santa Cruz és Baulcombe, 1993). A magyar virológusok is aktívan kivették részüket ezek-

használata sikeres génátültetéshez vezetett. Ezekben a programokban éppen a növénypatogén *Agrobacterium tumefaciens*-ben lévő megaplazmid egyes regulációs szakaszait használják fel leggyakrabban az idegen gén beépítésére. Bizonyos növények esetében alternatív módokon juttatják be az idegen géneket, felhasználva a polietilénlikolos protoplaszt fúziót (1. ábra), az elektroporációt, majd napjainkban egyre többen a génpuska segítségével veszik igénybe (2. ábra). Ezen technikákat a növényvirológia is alkalmazza vírusgének működésének tanulmányozására, valamint olyan víruseredetű nukleinsav-szakaszok növénybe történő beépítésére, amivel betegségellenállóságot lehet indukálni.

Molekuláris módszerrel vírusellenállóságot először a dohány mozaik vírus köpenyfehérje génjének dohány és paradicsom növénybe való beépítésével értek el (5. táblázat). A beépített köpenyfehérje gén megnyilvánulásával a virológiában jól ismert keresztvédettséget lehetett kialakítani. Itt azonban a növény „immunizálását” nem az attenuált vírustörzs indukálja, hanem a beépített köpenyfehérje gén. A technika hatékonysága azonos a biológiai keresztvédettségével, de előnyösebb abban a tekintetben, hogy nem használ fel fertőző vírusokat. Napjainkban több mint húsz országban mintegy száz vírus-növény kapcsolatban alakítottak ki ilyen módon vírusellenállóságot, s ezen növények már szabad-

Köpenyfehérje gén magasrendű növénybe való beépítése által indukált keresztvédettség

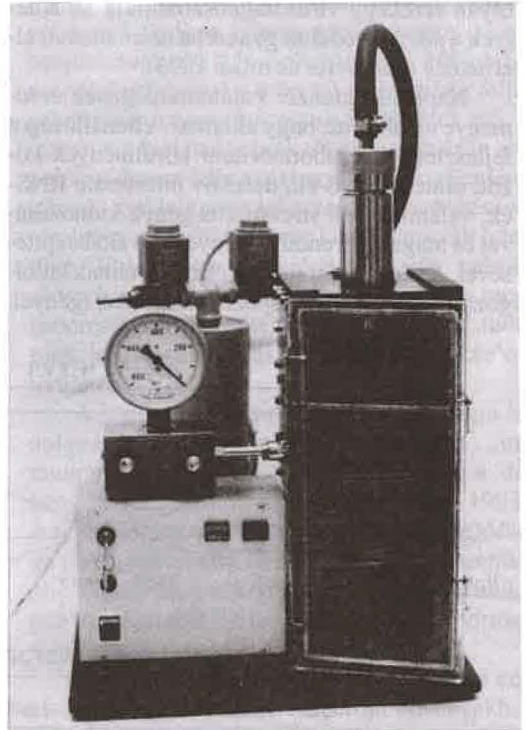
AIMV	dohány	Turner és mtsai 1987
PVS	burgonya	Mckenzie és Tremain 1990
BNYV	cukorrépa	Kallerhoff és mtsai 1990
CMV	dohány	Cuozzo és mtsai 1988
TSV	dohány	van Dun és mtsai 1988
PVX	burgonya	Fehér és mtsai 1992
PLRV	burgonya	Kawchuk és mtsai 1990
CyMV	<i>N. benthamiana</i>	Chia és mtsai 1992
PVY	dohány	Kollár és mtsai 1993
TVMV	dohány	Murphy és mtsai 1990
PRSV	dohány	Ling és mtsai 1991
TEV	dohány	Lindbo és mtsai 1991
TMV	paradicsom	Nelson és mtsai 1987
TRV	dohány	van Dun és mtsai 1987
TSWV	dohány	Gielen és mtsai 1991
PPV	<i>N. benthamiana</i>	Laimer és mtsai 1990

földi kísérletekben bizonyították használhatóságukat. Hazánkban is szabadföldre kerültek már azok a növények, amelyekbe a vázolt módon építettük be a vírusellenállóságot. Mindezt az tette lehetővé, hogy a hazai flórából izolált vírusok molekuláris biológiai jellemzése nagy erőfeszítéssel folyt és folyik. A szilva himlő vírus, valamint

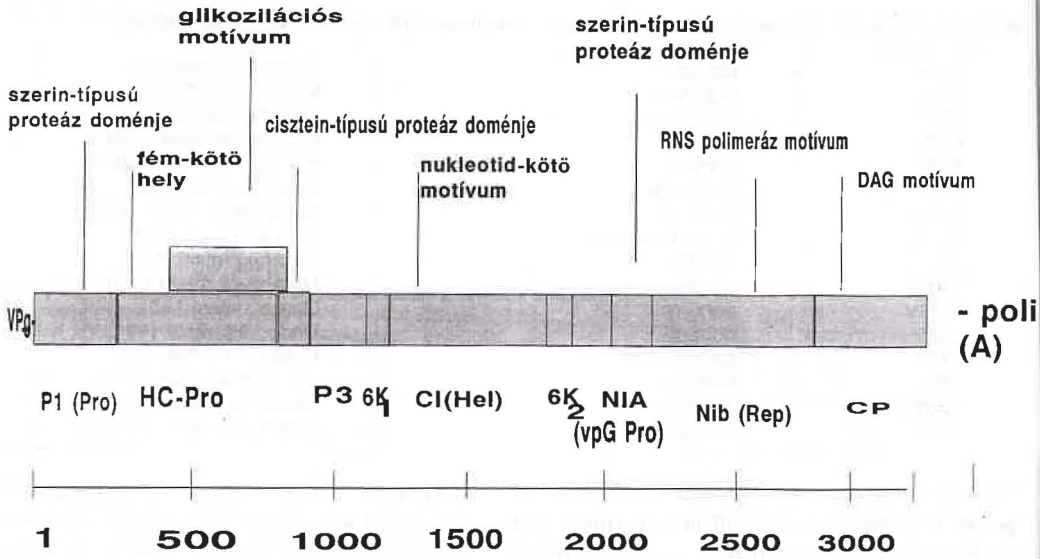
burgonya Y vírus szerkezetének feltárása (3. ábra), majd a köpenyfehérje gének *Agrobacterium*-vektorba építésével (4. ábra) kezdődött meg a gyakorlati növényvédelemben integrálandó első növények előállítására. A burgonya Y vírus köpenyfehérje génnel transzformált dohány első szabadföldi kísérletében kiválóan vizsgázott. A



1. ábra. Polietilén-glikol hatására egymáshoz tapadó dohány protoplasztok



2. ábra. A Magyarországon készült génpuska prototípusa

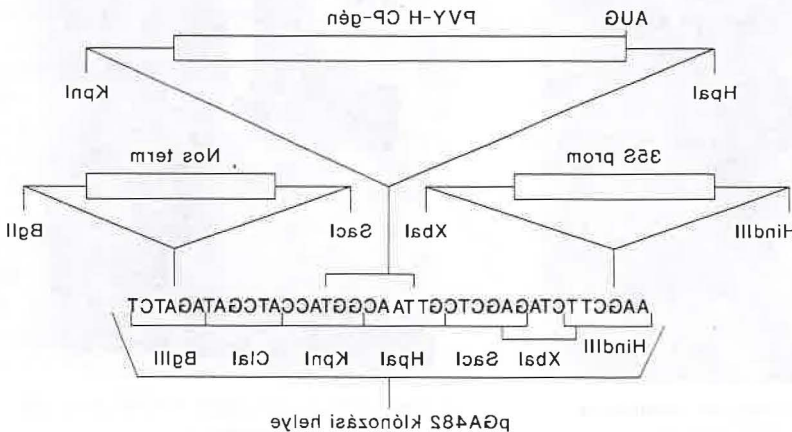


3. ábra. A burgonya Y vírus géntérképe

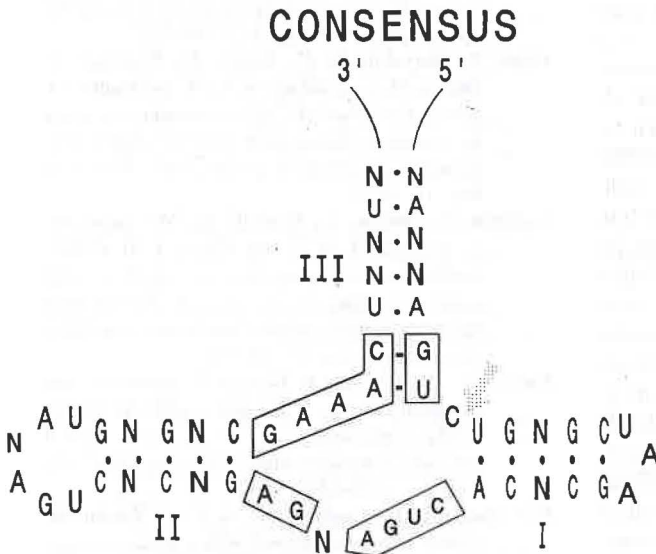
géntérképezés eredményeként készülhettek el olyan érzékeny vírusdiagnosztikumok is, amelyek a növényvédelmi gyakorlat számára már elérhetőek (Palkovics és mtsai 1993).

Napjaink intenzív kutatómunkájának eredménye továbbá az, hogy alternatív ellenállóságot fejlesztettek ki laboratóriumi körülmények között szatellit RNS-ek, defektív interferáló RNS-ek, valamint nem strukturális gének klónozásával és magasabbrendű növényekbe való beépítésével. A védekezési stratégiák e formáinak kidolgozása még további alapozó kutatásokat igényel.

A néhány növényi vírushoz kapcsolódó kis molekulatömegű ribonukleinsav, amely szekvenciájában a vírussal nem homológ de szatellitként a (helper) vírus jelenlétét igényli, jól ismert a betegség tünet kialakulásában játszott gyengítő, illetve néhány vírus-gazdanövény kapcsolatban épp ellenkező letális hatásáról. Számos esetben a paradicsom csúcsnekrozisában megnyilvánuló betegség nagy kiterjedésű járványokat is eredményezett, ami a szatellit ribonukleinsav egyik változatának felszaporodására volt visszavezethető (Gallitelli és mtsai 1990).



4. ábra. A burgonya Y vírus köpenyfehérje génjének Agrobacterium-vektorba klónozása során készített fizikai térkép (Kollár és munkatársai nyomán 1993.)



5. ábra. A kalapácsfej struktúra konszenzus szekvenciája a viroidokban

A Tombusvírus családba tartozó vírusok esetében – az állatokat fertőző vírusokéhoz hasonlóan – defektív interferáló részecskék jelenlétét sikerült bizonyítani. Ezen defektív interferáló részecskék kis molekulatömegű, szekvenciájában a vírussal homológ (a vírusribonukleinsav mozaikjaként tekinthető) ribonukleinsavak a genomiális vírus szaporodását gátolják és így a betegség kialakulásában szerepet játszanak. További génszabályozási manipulálásukkal várhatóan felhasználhatóak lesznek a vírusok elleni védekezésben.

A viroidok és szatellit RNS-ek szaporodásának tanulmányozása során mutatták ki a konkatamer „fej-farok” irányítottaságú ismétlődő RNS-ek szintetizálódását, amely szerkezet olyan másodlagos strukturával rendelkezik, hogy az enzim jelenléte nélkül képes hasadni. Ez a kalapácsfej struktúra, amely célspecifikus nukleinsavszakaszhoz kötve, annak önálló feldarabolódását teszi lehetővé (5. ábra). In vitro modellkísérletekben a kalapácsfej struktúra kialakításával sikerrel hasítottak el dohány mozaik vírus ribonukleinsav szakaszokat.

Szellemes megoldásnak tűnik az az elképzelés, amely esetben a riboszómák kötési helyeit rövid vírussal homológ nukleinsav-darabokkal kívánják kompetitív módon telíteni, s ezáltal

gátolni a vírus replikációját. Ez az úgynevezett „sense gátlás”.

A vírusok nonstrukturális génjeinek funkcióit tanulmányozva Golemboski és munkatársai (1990) meglepve tapasztalták, hogy a vírus replikáz génjének növényi kromoszómába építésével nagyfokú ellenállóképesség alakult ki. A felfedezés külön érdekessége a nagyfokú szekvenszifikusság, ami abban nyilvánul meg, hogy csak a beépített nukleinsavsorrenddel azonos szekvencia szintézisének gátlása érhető el. Így a védekezés csak a beépített vírustörzs vagy ahhoz nagyon közel álló törzs ellen manifesztálódik. Az első vírus-gazdakapcsolatban elért sikert ma már több azonos hatású eredmény követte (Carr és mtsai 1994), ami bizonyítja a védekezési stratégia hatékonyságát.

A növényi gének működését, azok ellentétes irányú beépítésével – „antisense gátlás” – jelentős mértékben sikerült szabályozni. A flavon bioszintézisben résztvevő chalcon szintáz gén ellentétes irányú beépítésével, s a gén működésének különböző mértékű gátlásával a fehértől a sötétliláig teljes színskálában pompázó petuniát állítottak elő. A színyanyag kialakulásának tökéletes gátlásán alapuló módszert felhasználva a vírusok ellentétes irányú nukleinsav-szakaszainak beépítésével részleges vírusellenállóság kialakítása vált lehetővé. E technika kimunkálása során számos olyan biológiai szabályozó mechanizmus megismerését várjuk, amelynek segítségével tudásunk kiszélesíthető lesz a vírusok replikációja területén.

A legújabb sikeres védekezési stratégia kidolgozása eredményeként mesterséges „immunrendszer” működését bizonyították a dohány növényben (Tavladoraki és mtsai, 1993). A *Cymbidium* mozaik vírus antitest képződését az immunoglobulin láncot kódoló gén beépítésével érték el, s a képződött ellenanyag biológiaiailag aktívnak bizonyult, gátolva a vírusos felülfertőzést.

Napjaink, s elsősorban a jövő kutatási célkitűzése a természetbe nem vont növényekben előforduló természetes ellenállóképességért felelős gének azonosítása, jellemzése s azok po-

tenciális felhasználása a kulturműveink gén-állományának kiszélesítésére.

Ezen újabb módszerek gyakorlati alkalmazhatóságát azonban csak további kísérletek elvégzése után értékelhetjük. Az előzőekben ismertett stratégiák, a rekombináns úton előállított transzgenikus élőlények, azonban a technikával kapcsolatosan olyan környezetvédelmi, ökológiai kérdések tisztázását igénylik, ami jelen esetben arra a kérdésre keres választ, vajon a transzgenikus növényben, amely virális szekvenciákat hordoz, nem képződik-e rekombináns vírus? Mivel transzgenikus növények szabadföldi körülmények közötti viselkedéséről megfigyeléseink, adatsoraink nincsenek, így állandó megfigyelés alatt kell egyelőre tartanunk ezeket. Tapasztalataink és eddigi modellkísérleteink szerint a rekombináns vírus kialakulásának nem nagyobb a valószínűsége, mint a természetes állapotok közötti kialakulásának. Ennek ellenére hosszú és alapos megfigyelések, kísérletek kell megelőzzék azt az időszakot, amíg ezeket a transzgenikus növényeket a mindennapok mezőgazdasága számára bevezetjük.

IRODALOM

- Balázs, E., Guilley, H., Jonard, G. and Richards, K. (1982): Nucleotide sequence of DNA from an altered-virulence isolate D/H of the cauliflower mosaic virus. *Gene* 19: 239–249.
- Carr, J. P., Gal-on, A., Palukaitis, P. and Zaitlin M. (1994): Replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants involves suppression of both virus replication in the inoculated leaves and long-distance movement. *Virology* 199: 439–447.
- Chia, T. F., Chan, Y. S. and Chua, N. H. (1992): Characterization of cymbidium mosaic virus coat protein gene and its expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 18: 1091–1099.
- Couzzo, M., O'Connell, K. M., Kanlewski, W., Fang, R.-X., Chaua, N. H. and Tumer, N. E. (1988): Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6: 549–555.
- van Dun, C. M. P. and Bol, J. F. (1988): Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resist infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. *Virology* 167: 649–652.
- van Dun, C. M. P., Bol, J. F. and van Vloten-Doting, L. (1987): Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology* 159: 299–305.
- Fehér, A., Skryabin, K. G., Balázs, E., Preiszner, J., Shulga, O. A., Zakharyev, V. M. and Dudits, D. (1992): Expression of PVX coat protein gene under the control of extensin-gene promoter confers virus resistance on transgenic potato plants. *Plant Cell Rep.* 11: 48–52.
- Gallitelli, D.L., Vovlas, C., Martelli, G., Montasser, M. S., Tousignant, M. E. and Kaper, J. M. (1990): Satellite-mediated protection of vegetable crops against cucumber mosaic virus. II. Tomato field test under natural epidemic conditions in southern Italy. *Plant Disease* 75: 939–944.
- Gielen, J. J. L., de Haan, P., Kool, A. J., Peters, D., van Grinsven, M. Q. J. M. and Goldbach, R. W. (1991): Engineered resistance to tomato spotted wilt virus, a negative-strand RNA virus. *Bio/Technology* 9: 1363–1367.
- Golemboski, D. B., Lomonosoff, G. P. and Zaitlin, M. (1990): Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6311–6315.
- Grieco, R., Burgyn, J. and Russo, M. (1989): The nucleotide sequence of Cymbidium ringspot virus RNA. *Nucleic Acids Res.* 17: 6383.
- Guilley, H., Carrington, J. C., Balázs, E., Jonard, G., Richards, K. and Morris, T. J. (1985): Nucleotide sequence and genome organisation of carnation mottle virus RNA. *Nucleic Acids Research* 13: 6667–6677.
- Kallerhoff, J., Perez, J., Bouzoubaa, S., Bentahar, S. and Perret, J. (1990): Beet necrotic yellow vein virus coat protein-mediated protection in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. *Plant Cell Rep.* 9: 224–228.
- Kawchuk, L. M., Martin, R. R. and McPherson, J. (1990): Resistance in transgenic potato expressing the potato leaf roll virus coat protein gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 301–307.
- Kollár, Á., Thole, V., Dalmay, T., Salamon, P. and Balázs, E. (1993): Efficient pathogen-derived resistance induced by integrated potato virus Y coat protein gene in tobacco. *Biochimie* 75: 623–629.
- Laimer, M., da Camara, Machado, A., Mattanovich, D., Regner, F., Hanzer, V., Steinkellner, H., Durniok, B., Himmler, G. and Katinger, H. (1990): Expression of the plum pox virus coat protein in *Nicotiana glauca*. *Acta Horticulturae* 280: 577–580.
- Lindbo, J. A. and Dougherty, W. G. (1992b): Untranslatable transcripts of tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189: 725–733.

- Ling, K., Namba, S., Gonsalves, C., Slightom, J. L. and Gonsalves, D. (1991): Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. *Bio/Technology* 9: 752–758.
- MacKenzie, D. J. and Tremaine, J. H. (1990): Transgenic *Nicotiana debneyii* expressing viral coat protein are resistant to potato virus S infection. *J. Gen. Virol.* 71: 2167–2170.
- Molnár, A., Dalmay, T. és Burgyán, J. (1994): A dohány nekrozis vírus magyarországi törzsének elsődleges szerkezete (kézirat).
- Murphy, J. F., Rhoads, R. E., Hunt, A. G. and Shaw, J. G. (1990): The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the 24-kDa part of the proteinase. *Virology* 178: 285–288.
- Nelson, R. S., McCormick, S. M., Delannay, X., Dubé, Pl., Layton, J., Anderson, E. J., Kanlewska, M., Proksch, R. K., Horsch, R. B., Rogers, S. G., Fraley, R. T. and Beachy, R. N. (1988): Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Bio/Technology* 6: 403–409.
- Padgett, H. S. and Beachy, R. N. (1993): Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming N gene-mediated resistance. *Plant Cell*, 5: 577–586.
- Palkovics, L., Burgyán, J. és Balázs E. (1993): Új diagnosztikum a szilva himlő vírusára. *Növényvédelem* 5: 211–217.
- Palkovics, L., Burgyán, J. and Balázs, E. (1993): Comparative sequence analysis of four complete primary structures of plum pox virus strains. *Virus Genes* 7: 339–347.
- Romero, J., Huang, Q., Pogány, J. and Bujarski J. J. (1992): Characterization of defective interfering RNA components that increase symptom severity of broad bean mottle virus. *Virology* 194: 576–584.
- Salánki, K., Thole, V. Balázs, E. and Burgyán, J. (1994): Complete nucleotide sequence of the RNA 3 from subgroup II of cucumber mosaic virus (CMV) strain: Trk-7. *Virus Research* 31: 379–384.
- Salánki, K., Balázs, E. and Burgyán, J. (1994): Nucleotide sequence and infectious in vitro transcripts of RNA 3 of tomato aspermy virus pepper isolate. *Virus Research* accepted for publication.
- Santa Cruz, S. and Baulcombe, D. C. (1993): Molecular analysis of potato virus X isolates in relation to the potato hypersensitivity gene Nx. *Molecular Plant Microbe Interaction* 6: 707–714.
- Tabladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. and Galeff, P. (1993): Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus-attack. *Nature*, 366: 469–472.
- Thole, V., Dalmay, T., Burgyán, J. and Balázs E. (1993): Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene* 123: 149–156.
- Tumer, N. E., O'Connell, K. M., Nelson, R. S., Sanders, P. R., Beachy, R. N., Fraley, R. T. and Shah, D. M. (1987): Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J.* 6: 1181–1188.

FROM MOLECULAR VIROLOGY TO PRACTICAL PLANT PROTECTION*

Ervin Balázs

Agricultural Biotechnology Center, 2101 Gödöllő, P. O. Box 411, Hungary

Recent advances in genetic engineering enable the researcher to develop control techniques against plant viruses. The presented lecture summarizes the data on different strategies to control virus diseases including data on interfering particles, on coat protein mediated cross protection, on antisense approach, on the use of nonstructural viral genes as well as data on the protection using viral RNAs as enzymes.

*Lecture presented at 40th Scientific Days for Plant protection (1994. February 22–23. Budapest)

Érkezett: 1994. március 22.