

József Attila Tudományegyetem Természettudományi Kar

Mikrobiológiai Tanszék

BURGONYA VIROID BETEGSÉG ELŐFORDULÁSA

MAGYARORSZÁGON

Doktori értekezés

Készítette:

Khan Mohamed /Afganisztán/

S z e g e d

1 9 8 1

TARTALOMJEGYZÉK

1/ BEVEZETÉS	1
2/ IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Burgonya szimptomatológiai és gazdasági jelentősége	3
2.2. Diagnosztikai módszerek	6
2.3. Viroid fertőzés élettana	8
3/ ANYAG ÉS MÓDSZER	11
3.1. Viroid izolátumok eredete és fenntartásuk	11
3.2. Viroid kimutatása biológiai teszteléssel	11
3.3. Viroidban gazdag nukleinsav preparátum előállítása	12
3.4. Viroid kimutatás poliakrilamid gél elektroforézissel	14
4/ KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	14
4.1. Az ismert diagnosztikai módszerek értékelése, ill. adaptációja	14
4.2. Új diagnosztikai módszer kidolgozása	17
4.3. Magyarországi burgonya minták vizsgálata	26
4.4. A hazai izolátumok viroid természetének bizonyítása	29
4.5. Burgonyáról izolált PSTV által okozott termés csökkenés	30
5 / ÖSSZEFOGLALÁS	34
6 / IRODALOMJEGYZÉK	35



1/ B E V E Z E T É S

Mintegy három évvel kezdődtek meg Afganisztánban azok a társadalmi változások, amelyek fokozatosan lehetővé teszik, hogy az afgán nép megkezdhesse azt a kitartó és nagy munkát, amellyel behozhatja évszázados lemaradását. A gazdaságépítés területén nincs fontosabb feladat az elkövetkező években, mint a különböző szakterületeken szakmájukat magas szinten művelő szakemberek kiképzése. A jelen időszakban több száz fiatal afgán egyetemista kezdte meg tanulmányait a különböző szocialista országok egyetemlein. Egy ilyen oktatási program keretében kaptam lehetőséget arra, hogy a Szegedi Biológiai Központ Növényélettani Intézetében folytassam tanulmányaimat.

Szerencsésnek itélem a magam szempontjából azt a helyzetet, hogy az SzBK Növényélettani Intézetében ahhoz a kutatócsoporthoz kerültem, amely a növényvirológia gyakorlati problémáinak megoldására fordítja a legtöbb energiát. Két és fél éves tanulmányutam nyomán teljesen nyilvánvaló számomra, hogy hazautazásom után, - amennyiben lehetőséget kapok rá - ezt a munkát kell folytatnom.

Tanulmányutam első felében általános ismereteket szereztem a növényvirológiából, majd megkezdtem kísérleteimet a burgonya leromlás tüneteit mutató burgonyatövek virológiai analízisében.

Kísérleteim során azt tapasztaltam - és doktori értekezésemben ezeket a megfigyeléseket fejtem ki,- hogy a le-
romlott burgonya tövek között igen nagy számban vannak olyanok, amelyek a burgonya már Magyarországon ismer virusbetegségei mellett, Magyarországon még nem ismert kórokozóval, viroiddal is fertőzöttek.

2/ I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

Számos növényi betegséget, amelyekről a későbbiek során kiderült, hogy viroidok okozzák, a növénykórtannal foglalkozó kutatók mintegy 50 éve ismerik. Másokat viszont néhány éve fedeztek fel, A mai napig hét különböző viroidot sikerült meghatározni és izolálni. Valószínűleg a viroid betegségek száma a jövőben növekedni fog, ahogy egyre több kutató figyelmé fordul a viroidkutatások felé. Doktori értekezésemben elsősorban azokat az eredményeket foglalom össze, amelyek a burgonyát fertőző potato spindle tuber viroiddal /PSTV/ kapcsolatosak. Továbbá részletesen tárgyalom azokat a tüneteket, amelyeket a PSTV okoz a különböző gazdanövényeken. Ezek közül is elsősorban azokkal foglalkozom, amelyeknek diagnosztikai jelentőségük van.

2.1. A burgonya spindle tuber betegség szimptomológiai és gazdasági jelentősége

A burgonya spindle tuber betegségét először Martin /1922/ írta le az amerikai Main-ben. A későbbiek során több amerikai államból is beszámoltak arról, hogy ez az újonnan felismert betegség jelentős károkat okoz a burgonyatermesztőknek. Így ismeretessé vált, hogy a burgonya spindle tuber betegsége az

U.S.A észak, észak-keleti részén, valamint Kanadában elterjedt /Diener és Raymer, 1971/. Hosszu időn keresztül a burgonya spindle tuber betegségét, mint potato spindle tuber virus /PSTV/ ismerték és együtt emlegették azokkal a burgonya leromlását okozó kórokozókkal, amelyek virustermészete nyilvánvaló volt. A PSTV földrajzi elterjedtségére vonatkozóan még nagyon keveset tudunk. Ez elsősorban azzal magyarázható, hogy viroidkutatással még nem sok országban foglalkoznak és felmérések nem történtek meg. Így pl. a nyugat-európai országokban nincs közlemény a PSTV előfordulásáról. A szocialista országok közül azonban a Szovjetunióban /Leontieva, 1969/ és Magyarországon /Föglein, 1979/ ismeretes a PSTV előfordulása. Magyarországon először paradicsomon találtak viroid betegséget. A burgonyamintákban saját vizsgálataim eredményeképpen mondhatjuk, hogy az országban a PSTV fertőzés jelen van /Khan Mohamed és Föglein, 1980/.

A PSTV burgonya tövek törpeségét, a levelek felállóságát és a levélszélek sodródását okozza. A gumón pedig a gumók súlycsökkenésén kívül a gumók elnyulását, ill a rügyek kidorodását idézi elő /Diener és Reymer, 1971/. A tünetek nagyon ritkán jelennek meg tipikus formában és a tünetek megjelenése függ a környezeti körülményektől /Goss, 1930/a; Gratz és Schultz, 1931/.

Mivel a viroid fertőzöttséget legkönnyebben paradicsom növényre fertőzve lehet felismerni, fontos a paradicsomon oko-



zott tünet leírása. Dél-Afrikában találtak egy un. tomato bunchey top betegséget /McClellan, 1948/, amelynek tünete teljesen megegyezik a PSTV paradicsomon okozott tünetével, és ezért a két helyről izolált kórokozót azonosnak tekintik /Diener, 1979/. Ezt azonban kémiai módszerekkel még nem támasztották alá. A jelenség azonban alátámasztja azt, hogy a PSTV-nek a paradicsom is természetes gazdája lehet.

A PSTV erős törzse egyes paradicsomfajtákon /Rutgers, K-700/ erős törpülést okoz. Ezzel egyidőben a hónaljgyegek kifakadnak és a növény habitusát rozettássá, seprüssé teszik üvegházban. Ismeretes továbbá, hogy a PSTV fertőzött paradicsomnövények folytonos megvilágítás esetén kifehérednek /Yang és Hooker, 1977/.

Más paradicsomfajták, mint pl. a Hilda, az erős PSTV törzsszel fertőzve is gyenge, alig felismerhető tünetet mutat /Mühlbach és Slinger, 1977/. A viroid tünetek felismerését nehezíti, hogy a tipikus tünetet okozó törzsek mellett olyan viroidtörzseket is találtak, amelyek fogékony gazdanövényeken a tipikusnál erősebb, ill. gyengébb tüneteket mutatnak /Fennow, 1967; Sing, 1970a; Singh és mtsai, 1970/. A gyenge törzsek a tesztelt burgonyatáblákon általában nagyobb gyakorisággal fordulnak elő /Singh és mtsai, 1970/.

Mivel a viroid betegségek szabadföldön leginkább mechanikus úton terjednek /gépek, művelő eszközök, ill. munkások

révén; Manzer és Merriam, 1961/, gazdasági kártételük igen jelentős. Erre vonatkozóan elsősorban amerikai, ill. kanadai adatokra támaszkodhatunk.

A viroid fertőzöttség esetén a gazdasági kár a tövenkénti gumószám csökkenésében, ill. a gumók méretének csökkenésében, valamint torzulásában jelentkezik /Werner, 1926/. A gazdasági kár mértéke nagy mértékben függ a vizsgált terület fertőzöttségétől. Mintegy 4 %-os fertőzöttség esetén 2,6 %-os termés csökkenést tapasztaltak /Le Clerg és mtsai, 1944/. 100 %-os fertőzöttség esetén azonban a termés kiesés 60-70 %-os is lehet /Le Clerg, 1944; Singh és mtsai, 1971/. Ezek a dolgozatok erősen hangsúlyozzák az ellenőrző intézkedések fontosságát. Megfelelő óvintézkedések segítségével a kár minimálisra csökkenthető, ezek elmaradása azonban kataszrofális helyzetet teremthet rövid időn belül.

2.2. Diagnosztikai módszerek

Mivel a viroid fertőzés felismerése a szabadföldön igen nehézkes, gyakran lehetetlen a tünetek maszkírozása miatt, ezért a kórokozó felismerése ún. indikátornövények segítségével vált lehetővé. A PSTV vonatkozásában legmegfelelőbb indikátornövénynek a *Lycopersicum esculantum* Mill. cv. Rutgers paradicsomfajta bizonyult /Fernow és mtsai, 1969; Singh és

O'Brien /1970/, valamint Singh /1971/ mintegy 100 növényfajt megvizsgálva, 31 növény családból local léziós gazdanövényt /*Scopolia sinensi*/ találtak a PSTV-fertőzésre. A legutóbbi időkig a viroid fertőzöttség tesztelésére ezt a két indikátornövényt alkalmazták. Mivel a *Scopolia sinensis*-en local léziók megjelenése nem mindig reprodukálható, ezért viroid tesztelésre leginkább a korábban említett Rutgers paradicsomot használták.

Viroidmentes burgonya törzsállomány előállítására azonban igen nagy számú gumót kellett megvizsgálni. Ezek letesztelése indikátor növényen igen munka- és helyigényes tevékenység. Miután azonban magát a viroid BNS-t tisztítás után poliakrilamid gélen láthatóvá lehetett tenni /Diener, 1971; Semanchik és Weathers, 1972/. Morris és Wright /1975/ egy poliakrilamid gél-elektroforézisen alapuló viroid meghatározási eljárást dolgozott ki. Később ezt a módszert Morris és Smith /1977/ továbbfejlesztette a burgonyanövények viroid tesztelésére és egy tesztelési programot javasoltak a burgonya viroid betegség kiküszöbölésére. Schumann és mtsai /1978/ poliakrilamid gélelektroforézist alkalmaztak, amelynek során több mint 20 burgonya minta tesztelhető le egy slab gélen. Kísérleteik azt mutatták, hogy a viroidok tesztelése gél-elektroforézis segítségével sokkal gyorsabb és megbízhatóbb mint indikátornövények alkalmazásával.

2.3. A viroid fertőzés élettana

A viroidok az eddig felfedezett legérdekesebb kórokozói a növényvilágnak. T.O.Diener, Semanchik amerikai és H.L. Sängér nyugat-német kutatók úttörő munkái révén ismeretessé vált, hogy a viroidok a magasabbrendű növényekben, mint saját replikációval rendelkező meztelen nukleinsavmolekulák fordulnak elő /Diener, 1969; Semanchik és Weathers, 1971, Sängér, 1972/. A viroid molekula szerkezeti felépítésének feltárásában az utóbbi 3-4 évben igen jelentős előrehaladás történt. Előbb elektronmikroszkópos vizsgálatokkal /McClements és Kaesberg, 1977/, majd biokémiai módszerekkel /Sängér és mtsai 1976/ sikerült bebizonyítani, hogy a viroidok kovalensen zárt cirkuláris egyszáлу RNS molekulák. A viroid részecskék természetes környezetükben a nagy számú komplementer régiók miatt önmagukban csavarodottak, és ezért tulajdonképpen pálcika alakúak.

Miután a viroidokat megfelelő mennyiségben és tisztaságban lehetett elválasztani, lehetővé vált a bázis sorrend és a másodlagos szerkezet meghatározása /Gross és mtsai, 1978/. Ezek a vizsgálatok bebizonyították, hogy a PSTV 359 bázisból áll, és a bázis sorrend alapján azt is meg lehetett állapítani, hogy a viroid molekulán belül hol vannak a párosodott részek és hol azok a helyek, ahol a nem párosodott hurkok találhatóak.

Míg a viroid molekula szerkezetének feltárásában jelen-

tős előrehaladás történt; a viroid szintézis, valamint a patogenézis mechanizmusának tisztázása lassan halad.

Diener /1971/ és Sängér /1972/ munkái alapján bizonyítottak tünik, hogy a viroidok a sejtmagban szintetizálódnak és valamilyen formában a kromatinhoz kötöttek.

A viroidszintézis mechanizmusa még nem tisztázódott. Több dolgozat jelent meg, amelyik azt mutatja, hogy a viroidszintézisben a gazda DNS-nek, mint templátnak szerepe van /Semancik és Weathers, /1972/, Mühlbach és Sängér, /1979/, azonban az utóbbi években még hatékonyabb módszerek alkalmazásával ennek bizonyítása nem sikerült /Zaitlin és mtsai, 1980; Branch és Dickson, 1980/. Sängér legfrissebb, még nem közölt adatai szerint a gazda RNS-től függő RNS polimeráz segítségével megy végbe a viroid szintézis.

Mivel a viroid molekula in vitro körülmények között, mint messenger RNS nem működik /Diener, 1974/ és semmilyen viroid specifikus /esetleg enzim/ fehérje szintézisét a viroid-fertőzött növényekben nem sikerült felfedezni, nyilvánvalónak tünik az a feltételezés, hogy a viroid szintézise elsősorban gazda enzimek segítségével történik. Sängér /még nem közölt eredmény/.

Az előbbieknél még kevésbé tanulmányozott terület a viroidkutatóásban a viroid betegség tüneteinek biokémiai magyarázata. /Ez érvényes más vírusbetegségekre is; Rodrigues



és García Martínez; /1978/ számolt be olyan kísérleti eredményekről, amelyek szerint a viroid-fertőzött növényekben felbomlik a növény hormonháztartása. E szerint abscissin sav halmozódik fel a giberellin sav rovására a fertőzött növényekben. Ezt a jelenséget talán összefüggésbe lehet hozni a viroid-fertőzött növények törpeségével. Más vizsgálatok /Wahn és mtsai, 1980/ szerint a membrán- és sejtfalszintézisben is változások állnak be, amire az elektronmikroszkópos felvételeken a sejtfal és a membrán deformáció utal.

A viroid patogenezise vonatkozásában az adatok nagyon szerények még és ezen a területen igen sok ismeretnek kell felhalmozódnia ahhoz, hogy a viroid betegség tüneteit megértsük.

3/ ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Viroid izolátumok eredete és fenntartásuk

Kísérleteink során az összehasonlítás céljára a potato spindle tuber viroidot /PSTV/ használtuk. A viroid törzs eredetileg T.O.Diener professzor laboratóriumából származik, de a törzset Horst professzortól kaptuk /Cornell University, Ithaca, N.Y./. A viroid izolátumot *Lycopersicum esculantum* Mill.C.V. K-700-as paradicsom fajtán /kecskeméti fajta/ szaporítottuk és tartottuk fenn. Ez a fajta a magyar paradicsom fajták között bizonyult a legfogékonyabbnak. A paradicsom növényeket antomotikusan szabályzott üvegházban 27°C nappali és 24°C éjszakai hőmérsékleten, 16 órás megvilágítás mellett /téle pótvilágítást alkalmaztunk/ 10.000 lux fényintenzitáson neveltük.

3.2. Viroid kimutatása biológiai teszteléssel

A viroid fertőzések biológiai tesztelésére a *Lycopersicum esculantum* Mill.cv. K-700, valamint a /Utgers amerikai paradicsom fajtát használtuk, mint olyan indikátor növényeket, amelyekben a viroidok szisztematikusan elterjednek és törpességet, levéldeformációt okoznak /Diener és Raymur, 1971; Farnow, 1967/.

Lokál léziós indikátor növényként *Scopolia sinensis* növényeket használtunk. A *Scopolia* növényeket fitotronban tartottuk 4000 lux fényintenzitáson, napi 16 órás megvilágítás mellett 22°C hőmérsékleten /Singh, 19 / . Az egészséges indikátor növényeket a virológiában általában alkalmazott mechanikai dörzsöléssel fertőztük. A fertőző inokulumhoz diatómaföldet /Hyflo Super Cell/ adagoltunk. Az inokulum elkészítéséhez 0.01 M-os foszfát puffert /pH 7,2/ használtunk.

3.3. Viroidban gazdag nukleinsav preparátum előállítása

A viroid-fertőzött paradicsom növényeket a fertőzés után 3-4 héttel később learattuk. Mérés után fóliazacskóba helyezve -20°C-on tároltuk. Hajtatott burgonya gumók esetében a mintákat akkor kezdtük megszedni, amikor a burgonyahajtások elérték a 25-30 cm-es hosszúságot. A burgonyamintákat mérés után ugyancsak fóliazacskóban fagyasztva tároltuk a nukleinsavak kivonásáig. A viroidban gazdag nukleinsav preparátumot Morris és Smith /1977/, valamint Schumann és mtsai. /1978/ által kidolgozott módszer szerint állítottuk elő. A nukleinsav kivonás menete a következő:

1. 1 g hajtáscsucsot 0,5 ml kivonó pufferben /0,2 M glicin, 0,1 M Na_2HPO_4 , 0,6 M NaCl, 1% Na-laurilszulfát, 10 mM 2-merkaptóetanol; pH 9,5/, 2 ml vízzel telített fenolban, ami

0,1% 8-hidroxiquinolint tartalmaz és 2 ml kloroform-butanolban /1:1/ homogenizáltunk. A homogenizálást Vir Tis homogenizátorral végeztük /45.000 rpm/ 30 sec.-ig/ szobahőmérsékleten.

2. A homogenizátumot 12.000 g-n centrifugáltuk 15 percig. A vizes fázist Pasteur pipettával szedtük le.

3. Az így kapott felüluszóhoz 1/2 résznyi 10 M LiCl-ot csepegtettünk úgy, hogy a végkoncentráció 2 M LiCl legyen. Ennek következtében a nagy molekulásulyu rRNS-ek kapcsolódtak. Ezt az oldatot 2 óráig hagytuk állni jégen.

4. Az oldatot 8000 g-n /4°C/ 15 percig centrifugáltuk, majd a felüluszót desztillált vízzel szemben egy éjszakán át dializáltuk 4°C-on.

5. Dialízis után a mintákat 2,5-szeres mennyiségű alkoholban - ami 0,2 M Na-acetátot tartalmaz - kicsaptuk és felhasználásig mélyhűtőben tároltuk.

3.4. Viroid kámutatás poliakrilamid gél-elektroforézissel

Erre a célra a Schumann és mtsai /1978/ által kidolgozott gél-technikát használtuk.

A tárolt nukleinsavakat az alkoholból kicentrifugáltuk /10.000 g, 4°C, 15 perc/, és a csapadékot feloldottuk 50 ul hideg forralt desztillált vízben, majd egy csepp 75%-os RNáz-

mentes cukoroldatot adtunk hozzá, ami brómfenolkék festéket /0,5 mg/ml/ is tartalmazott.

A mintákat 5%-os poliakrilamid slab géltre /11,5 cm x 14 cm x 0,4 cm/ vittük fel. Egy gélen 10 mintahelyet képeztünk ki. Az elektroforézis puffer 0,12 M Tris, 0,06 M Na-acetát és 0,3 Na EDTA /pH 7,6/ összetételű volt. A slab géleket konstans áramerősség /100 mA/ mellett futtattuk addig, amíg a brómfenolkék a gélek aljára nem ért /általában 2,5 óra/.

A géleket az elektroforézis után 30 percre festékoldatba helyeztük /0,4 M Na-acetát, 0,4 M ecetsav, 0,025% metilénkék/. Festés után folyó vízben mostuk, majd fényképeztük és kiértékeljük a géleket.

4. A kísérleti eredmények és azok megvitatása

4.1. Az ismert diagnosztikai módszerek értékelése, ill. adaptációja

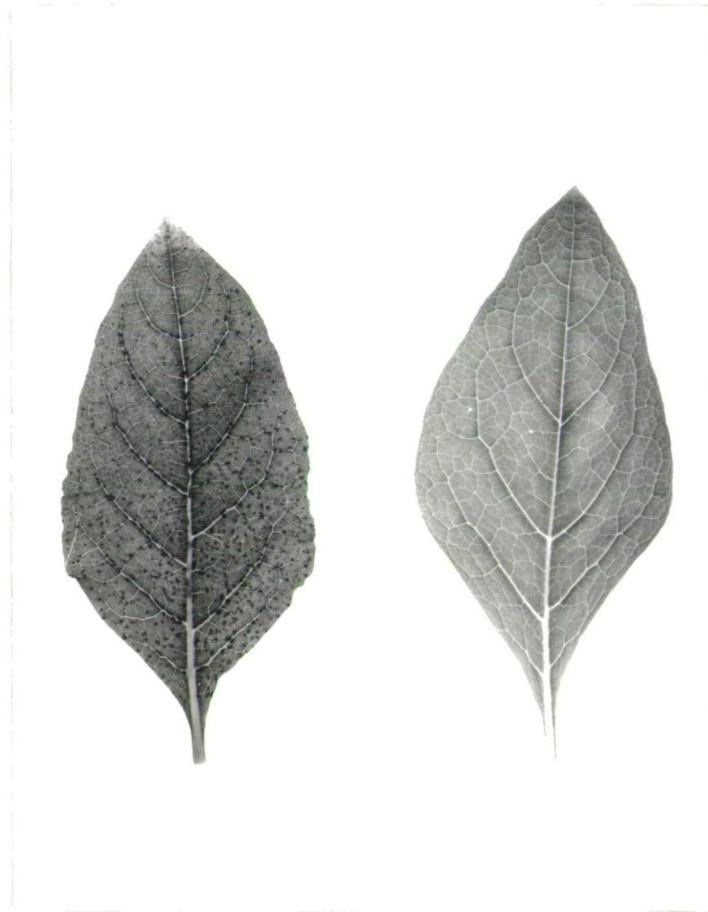
Kísérleteink során az egyes diagnosztikai módszereket két fő szempont szerint értékeltük: a/ megbízhatóság, b/ gyorsaság szerint. Mindkét szempontnak igen nagy gyakorlati jelentősége van, különösen akkor, amikor nagy számú mintát kell megvizsgálni.

4.1.1. A viroid fertőzések biológiai teszteléssel történő kimutatása lehetséges, azonban az általunk vizsgált burgonya minták a tipikus erős PSTV törzstől eltérő törzseket is találtunk, így az általunk használt paradicsom fajtákon a tünetek gyakran nem jelentek meg még az optimálisra beállított üvegházi körülmények között sem. Tapasztalataink szerint a paradicsom teszt csupán az erős viroid törzsek kimutatására alkalmazható megfelelő biztonsággal.

A *Scopolia sciensis* lokál léziós gazdanövény vizsgálata során több olyan hátrányos tulajdonságával ismerkedtünk meg, amely a *Scopolia* növény alkalmazhatóságát kérdőjelezi meg. Azt tapasztaltuk ugyanis, hogy a lokális léziók megjelenése a viroiddal történő fertőzés után nem megbízható. Az esetek nagy többségében azt találtuk, hogynem a bedörzsölt leveleken /1.ábra/ jelennek meg a nekrotikus foltok, hanem a viroidok szisztémikusan fertőzik a növényt és a felső leveleken esetlegesen megjelennek a lokális léziók. Így viroidok tesztelésére a *Scopolia sciensis* a mi körülményeink között nem alkalmas. Tudomásunk szerint más viroid laboratóriumokban is nehézkes a *Scopolia* tesztnövényként való használata /Zaitlin, személyes közlés/.

4.1.2. A poliakrilamid gél-elektroforézises tesztelés reprodukálhatóságát és a vizsgálat gyorsaságát az eddig ismert





1.ábra. Burgonya spindle tuber viroid által indukált nekrotikus léziók *Scopolia simensis* levélen /balról fertőzött, jobbról egészséges növények/.

módszerek közül a legjobbnak ítéljük. A poliakrilamid gélek gyors kiértékelésére gyakran fluoreszcencia /PEI/ anyagot tartalmazó vékonyréteg kromatográfiás lemezeket használtunk. A festetlen géleket erre a lemezre helyezve UV fényben vizuálisan néhány másodperc alatt kiértékelhetők. /Ugyanis a nukleinsav sávok elnyelik az UV sugarakat és így a fluoreszcencia lapon a sávok árnyékát látjuk./ Sőt, ez a módszer azt is lehetővé teszi, hogy UV fényben a viroidcsíkokat a gélekből kivághassuk. /2.ábra/

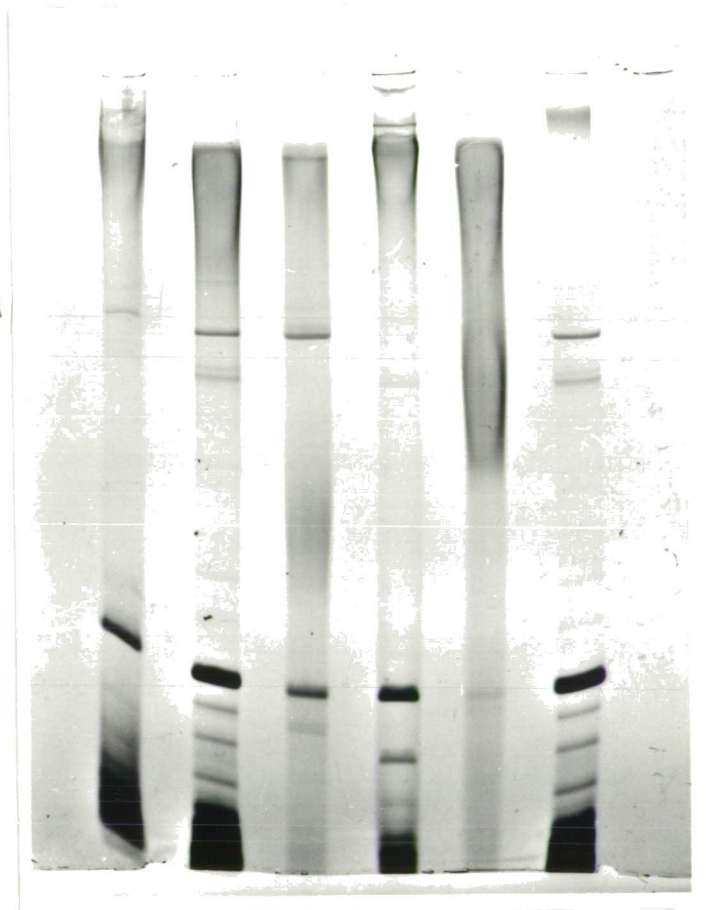
A poliakrilamid gél-elektroforézises viroid teszt elvégzéséhez szükséges idő mintegy két nap, ellentétben a paradicsom tesztel, amely 18-21 napot vesz igénybe. A poliakrilamid gél-elektroforézises /PAGE/ teszt további előnye a megbízhatóságon és gyorsaságon felül, hogy kizárja más növényi vírusok zavaró hatását a tünetek megjelenésében. Ugyanis amikor burgonya homogenizátummal fertőzzük a paradicsom teszt-növényeket, előfordulhat, hogy más burgonya vírusokkal /burgonya X vírusok/ is fertőzzünk. Ezek azonban az 5 %-os poliakrilamid gélen nem láthatók.

Továbbá a viroid RNS sávok gélből történő kivágása és a géldarab eldörzsölése lehetővé teszi, hogy a viroid sáv fertőzőképességét bizonyítsuk. Ezzel egyuttal a betegség viroidtermészetét is bizonyítani lehet.

4.2. Új diagnosztikai módszer kidolgozása

A poliakrilamid gél-elektroforézis technika a viroidok

viroid



2.ábra. Viroid fertőzött és egészséges paradicsom 2 M LiCl-ban oldható nukleinsavainak elektroforézises képe, 5%-os poliakrilamid gélen. Az 1., 2., 6. csatornán viroid fertőzött, a 4.csatornán egészséges paradicsom, minták láthatók, a 3.csatornán a gélből izolált viroid újra elektroforézise látható.

kimutatására nagyon alkalmasnak bizonyult, azonban gyakorlati szempontból több problémát vet fel:

a/ A teszt kivitelezéséhez bizonyos foku jártasság kell a nukleinsav izolálás és a nukleinsavakkal történő munka területén. Ezekkel az ismeretekkel általában a burgonyanemesítők nem rendelkeznek még Magyarországon sem, és különösen nem Afganisztánban.

b/ Továbbá ehhez a módszerhez bizonyos foku technikai feltételek is szükségesek /homogenizátorok, centrifugák és elektroforézis berendezések/. Ilyen eszközökkel széleskörű vizsgálatok elvégzésére az egyébként igen jól felszerelt magyarországi növényvédő állomások sincsenek még felkészülve.

A fenti okok miatt szükséges volt egy olyan eljárást kidolgozni, amelynek segítségével viszonylag egyszerű körülmények között a viroidfertőzés biztosan kimutatható.

Yang és Hooker 1977-ben beszámoltak egy olyan jelenségről, amely szerint a viroidfertőzött növények folytonos megvilágítás esetén kifehérednek, albinizmus lép fel. Erre a jelenségre a nagy viroidkutató laboratóriumokban nem fordítottak elég nagy figyelmet. Jellemző erre az is, hogy T.O.Diener /1979/ most megjelent összefoglaló munkájában ezt a dolgot meg sem említette. A viroid indukált albinizmus jelensége azonban több figyelmet érdemelne.

Megismételve ezeket a kísérleteket azt tapasztaltuk, hogy a paradicsom növények kisárgulása nagyon specifikus a

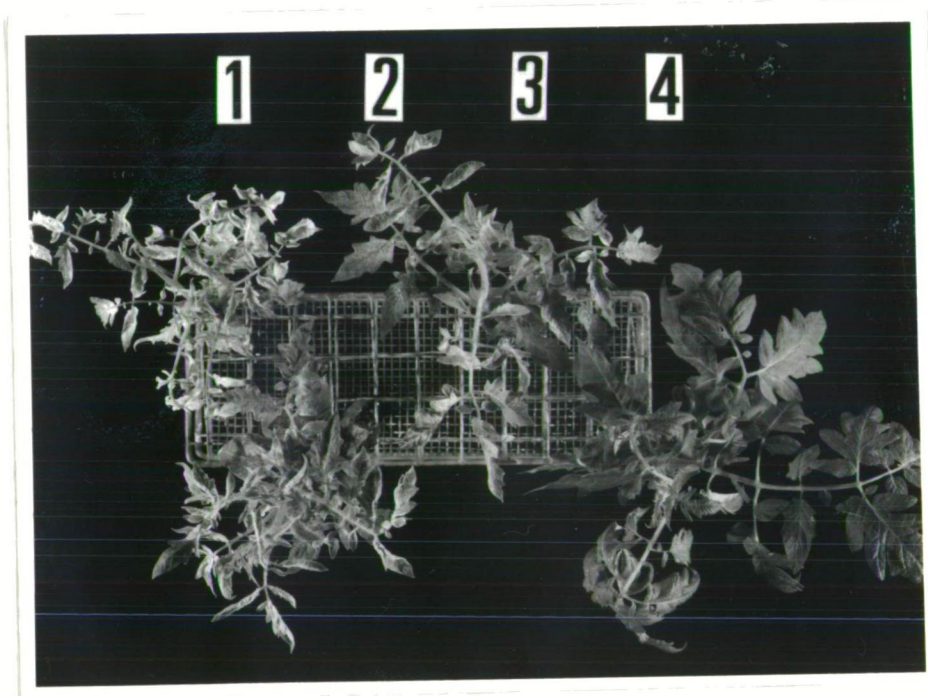
viroid fertőzésre /3.ábra/. A jelenség diagnosztikai célra történő alkalmazására létrehoztunk egy olyan klimatizált fülkét, amelyben kevert színű fény segítségével 8-10.000 lux folytonos megvilágítást tudunk biztosítani. Tapasztalataink szerint 28-30°C-on a leggyorsabb a sárgulás megjelenése. A sárgulás elsősorban a fiatal leveleken jelenik meg /4.ábra/. A sárgulásos tünet viroid-specifikusságára több paradicsomot fertőző virussal fertőztünk paradicsom növényeket és folytonos megvilágítás mellett vizsgáltuk a tünetek megjelenését /1.táblázat/.

1.táblázat. Különböző viroid és virussal fertőzött paradicsom növények tünetei folytonos megvilágítás mellett
/14 nappal a fertőzés után/

Vírus	Tünetek
Dohány mozaik vírus	mozaik és szalagosodás
burgonya X vírus	enyhe mozaik
uborka mozaik vírus	enyhe mozaik
PSTV erős törzs	erős sárgulás
PSTV gyenge törzs	erős sárgulás

A sárgulás megjelenése a viroid-fertőzött paradicsomokon folytonos megvilágítás mellett összefüggést mutat a hőmérséklettel /2.táblázat/.





3.ábra. Viroid indukált albinizmus paradicsom növényen: 1. 15 nappal, 2. 8 nappal, 3. 4 nappal a folytonos megvilágításra helyezés után. 4. Kontrol, egészséges növény 15 nappal a folytonos megvilágítás után.



4. ábra. A viroid indukált albinizmus megjelenése a fiatal hajtáscsúcsokon.

2.táblázat. Viroid indukált sárgulás megjelenése különböző hőmérsékleten

Hőmérséklet	Tünetmegjelenés ideje a fertőzés után
22°C	18 nap
25°C	14 nap
27°C	12 nap
30°C	8 nap
35°C	5 nap

3.táblázat. Viroid indukált sárgulás megjelenése különböző fényintenzitáson folytonos megvilágítás mellett 30°C-on

Fényintenzitás	Tünetmegjelenés ideje a fertőzés után
1000 lux	10 nap
3000 lux	8 nap
6000 lux	8 nap
10000 lux	2-8 nap
10000 lux /16 órás megvilágítás/	nincs sárgulás

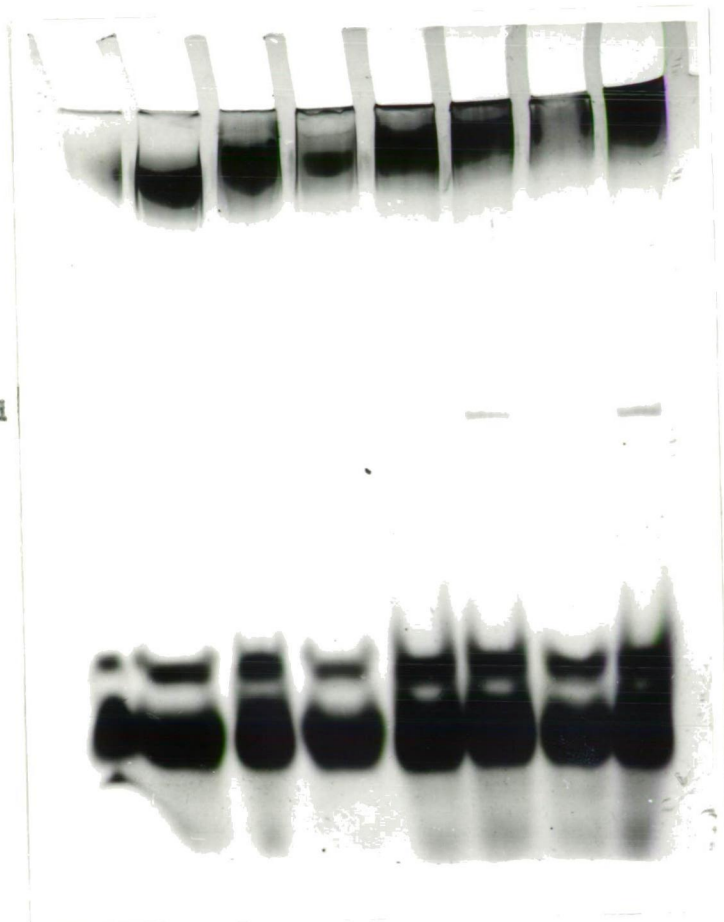
A 3. táblázatban feltüntetett kísérletek adataiból arra következtettünk, hogy a sárgulás megjelenésében a fényintenzitásnak nincs jelentős szerepe, de a folytonos megvilágításnak igen.

Megfigyeltük továbbá azt, hogy amennyiben a viroid fertőzés után a növényeket 22°C -on üvegházban 16 órás megvilágítás mellett neveltük, a törpülésszerű tünetek nem jelentkeztek meg. Azonban ezeket a növényeket folytonos megvilágításra helyezve $/30^{\circ}\text{C}$ -on/ a sárgulásszerű tünet robbanásszerűen 4-5 nap alatt kifejlődött.

Ugy tűnik, hogy a viroid szintézis sebességét a folytonos megvilágítás elősegíti. Erre utalnak azok az adatok, amely szerint a folytonos megvilágítás mellett nevelt viroid-fertőzött paradicsomban a fertőzőképesség 10-szer nagyobb, mint a normál 16 órás megvilágítás esetén /Yang és Hooker, 1977/. Saját vizsgálataink ezt alátámasztják; ugyanis azt tapasztaltuk, hogy a 16 órás megvilágításon, ill. folytonos fényben nevelt növényekben a viroid koncentráció erősen különbözik. Ezt a 2 M LiCl oldható nukleinsav frakciók 8 %-os poliakrilamid gélen történő szétválasztásával bizonyítani is tudtuk /5. ábra/.

Kísérleteink alapján tehát a viroid-indukált sárgulás jelenségét, mint diagnosztikai szempontból fontos tünetet a PSTV különböző törzseinek kimutatására alkalmazni lehet. E

viroid



5.ábra. A viroid koncentráció növekedése folytonos megvilágítás alatt. A 2.,4.,6. és 8.csatornán a viroid fertőzött paradicsom minták láthatók 0,3,6 és 9 nappal a folytonos megvilágításra helyezés után. Az 1., 3.,5. és 7 csatornán pedig egészséges növényekről származó minták.



tesztre a *Lycopersicum esculentum* Mill.cv. Rutgers és K-700-as paradicsomfajták megfelelőek. A paradicsom palántákat két lomblevelés korban kell fertőzni, majd folytonos megvilágításnak kell kitenni a fertőzött növényeket. 28-30°C-on a viroid-fertőzött növényeken 8 napon belül sárgulás tünete jelenik meg, míg a fertőzetlen növények zöldek maradnak.

4.3. Magyarországi burgonya minták vizsgálata

Vizsgálataink célja az volt, hogy megállapítsuk, Magyarországon előfordul-e viroid fertőzés a burgonyatáblákon vagy sem. Ezért az ország burgonyatermelő körzeteiből olyan mintákat gyűjtöttünk be, amelyek keromlásos betegsége gyanítható volt. Jelenlegi kísérleteink nem terjedtek ki arra, hogy megállapítsuk, Magyarországon a viroid fertőzés mértékét.

Az ország különböző körzeteiből /Szabolcs megye, Veszprém megye, Csongrád megy/ 120 burgonyagumót gyűjtöttünk össze olyan burgonyatövek alól, amelyek betegnek látszottak. Természetesen ezek a gumók más, a viroidon felüli vírusokkal is fertőzöttek lehettek, azonban ezek azonosítására nem törekedtünk.

A burgonyaminták fajtamegoszlását tekintve elsősorban a hazai fajtákat vizsgáltuk. A burgonya gumókat üvegházban meghajtottuk és poliakrilamid gél teszt segítségével határoztuk meg a viroid-fertőzöttség mértékét.

Közvetlenül burgonya levélből történő kimutatás sikeres

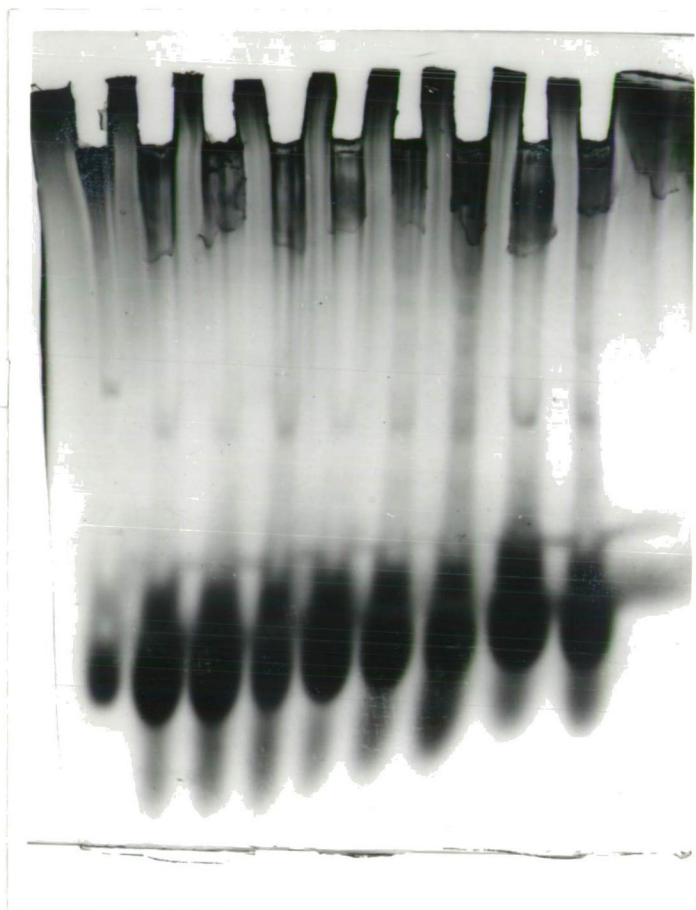
volt, azonban a kivont nukleinsav preparátum nem olyan tiszta mint a paradicsom preparátum. Ezért az egyes nukleinsav sávok nem olyan élesek /6.ábra/. A viroid sávok azonban felismerhetők, a gélből kivághatók és további vizsgálatra alkalmasak voltak. A 120 gumó letesztelése során az alábbi eredményeket kaptuk /4.táblázat/:

4.táblázat. Magyarország különböző megyéiből származó burgonya minták viroid fertőzöttsége

Minta származási helye	Vizsgált gumók száma	Fertőzött gumók száma
Szabolcs megye		
Kisvárdai K-2	40	22
Kisvárdai K-3	40	27
Csongrád megye		
Kisvárdai rózsza	20	8
Desiré	12	3
Veszprém megye		
Desiré	8	4

A 4.táblázat adataiból látható, hogy az átlagos fertőzöttség mintegy 53 %-os volt. Ez a magas fertőzöttségi arány azonban csupán azt jelenti, hogy a burgonya leromlás tüneteit

viroid



6.ábra. Burgonya tesztelés viroid fertőzésre
poliakrilamid gél segítségével. Az
1., 7. és 9. csatornán lévő minták
viroidot tartalmaztak.

mutató tövek között más virusfertőzés mellett a viroidok is jelen vannak.

4.4. A burgonyában talált izolátumok viroid természetének bizonyítása

A poliakrilamid gélen megjelenő extra nukleinsav csík megjelenése nem elég bizonyíték még a kórokozó viroid természetére, mivel az ún. szatelit vírusok RNS-einek hasonló molekulaszúlya van. A szatelit RNS-ek azonban önmagukban nem fertőzőképesek, így végső bizonyítékkul a viroid természet bizonyítására a poliakrilamid gélből kivágott viroid sáv fertőzőképessége szolgál. A poliakrilamid gél teszt során kapott 64 viroid csíkot külön-külön paradicsom palántákra fertőztük és ennek eredményeit az 5. táblázatban mutatjuk be.

5. táblázat. A poliakrilamid gélből izolált viroid sávok vissza fertőzése K-700-as paradicsom palántákra

Minták	Minták száma	Minták száma
	amely törpülést okozott 16 ó. megvilágítás mellett	amely kisárgulást okozott folyt. megvilágítás mellett
Kisvárdai K-2	14	22
Kisvárdai K-3	17	27
Kisvárdai Rózsa	4	8
Desiré	0	7



A táblázat adataiból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a gélből kivágott nukleinsav sávok fertőzőképesek és folytonos megvilágítás mellett valamennyi viroid izolátum tünetei megjelentek. Az a tény, hogy 16 órás megvilágítás esetén nem minden izolátum okozott tünetet, azt mutatja, hogy az általunk talált viroid izolátumok között nem csupán a PSTV erős törzse, hanem a gyenge törzsek is előfordulnak. A gyenge törzsek ugyanis folytonos megvilágítás mellett az erős törzsekéhez hasonló tüneteket okoznak.

4.5. Burgonyáról izolált PSTV által okozott termés csökkenés

Az általunk izolált PSTV törzsek termés csökkenti hatásának vizsgálatában az idő rövidsége miatt csupán üvegházi vizsgálatokat tudtunk elvégezni.

A PSTV termésre gyakorolt hatásának vizsgálatára a PSTV erős törzsével fertőztünk paradicsom palántákat és ugyanolyan számú kontroll, fertőzetlen palántával együtt a termés beéréséig neveltük őket. Időközben megfigyeltük a virágzás folyamatát is.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a viroid-fertőzött paradicsomok növekedése hamar leáll és a kontroll növények magasságának egyharmadára nőnek /7. ábra/. A virágzás átlagosan 10 nappal korábban indul meg a fertőzött paradicsom-



7.ábra. Burgonyáról izolált viroid tünetei
/törpeség, rozettásodás/ K-700-as
paradicsom fajtán. Jobbról egészséges,
balról fertőzött növény.

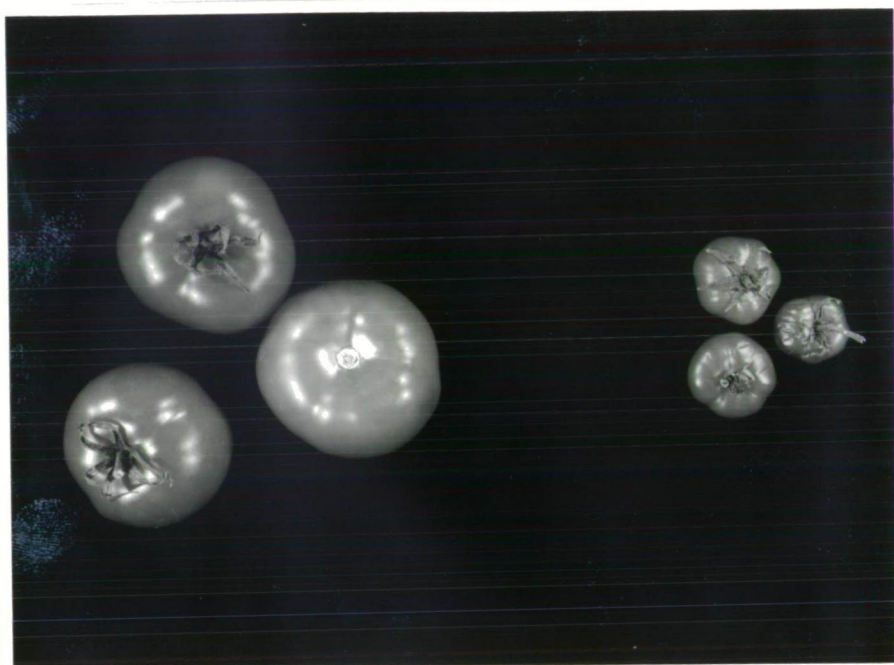
mon és a virágok száma 20 %-kal nagyobb, mint az egészséges növényeken.

Megfigyeltük továbbá, hogy a PSTV fertőzött paradicsomok virágai torzultak, ami a legtöbb esetben a természetes megporzást is lehetetlenné teszi /8. ábra/.

A megfigyelt virágtorzulások ellenére azt tapasztaltuk, hogy a fertőzött növényeken nagy számu, de igen apró gyümölcsök fejlődtek /9. ábra/. 50 egészséges és 50 fertőzött paradicsomról szedett termés mennyisége a termés súlyát illetően 70 %-kal kisebb volt a fertőzött növényeken, mint az egészségeseken.

Provokativ fertőzéses kísérleteink tehát azt mutatták, hogy amennyiben a PSTV fertőzés palánta korában éri a növényeket, igen jelentős termés-csökkenést okoz. Az apró termések azonban értékesíthetetlenek. Így gyakorlatilag a kár 100 %-osnak tekinthető. Amennyiben a fertőzés a vegetációs időszak későbbi szakaszára esik, a termés-csökkenés mértéke sokkal kisebb.

Munkám célja elsősorban az volt, hogy megállapítsuk Magyarországon a viroid betegségnek szerepe-van-e a burgonya leromlásban. Dolgozatomnak nem célja azonban, hogy a magyarországi fertőzöttség, ill. a viroid betegség eltorzultságát megállapítsuk. Ezt a feladatot kollegáim a MÉM Növényvédelmi és Agrokémiai Központtal együttműködve a következő években fogják elvégezni.



8.ábra. Balról egészséges, jobbról viroid
fertőzött paradicsomról származó
termések.

5/ ÖSSZEFOGLALÁS

Magyarországon a burgonya viroidbetegségek előfordulásáról nem volt tudomásunk. Megállapítottuk, hogy az ország különböző körzeteiből begyűjtött burgonya minták jelentős része fertőzött a burgonya spindle tuber viroid különböző törzseivel.

Munkánk során adaptáltuk és értékeltük a különböző viroid tesztelési módszereket. Azt tapasztaltuk, hogy a poliakrilamid gél-elektroforézises teszt a leggyorsabb és legmegbízhatóbb. Indikátor növények alkalmazása esetén pedig diagnosztikai célra a folytonos megvilágítás mellett megjelenő viroid indukált albinizmus jelensége a viroid betegség felismerésére megbízhatóan alkalmazható.



IRODALOMJEGYZÉK

- Branch, A.D., Dickson, E. /1980/: Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by southern hybridization. *Virology*, 104, 10-26.
- Davies, J.W., Kaesberg, P., Diener, T.O. /1974/: Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis. *Virology*, 61, 281-286.
- Diener, T.O. /1971/: Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of free nucleic acid III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exist in extracts or in situ. *Virology*, 43, 75-89.
- Diener, T.O., Raymer, W.B. /1971/: Potato spindle tuber "virus". Commonwealth Mycological Inst. Assoc. Appl. Biol. Descript. Plant Viruses 66, 4.
- Diener, T.O. /1971/: Potato spindle tuber "virus". A replicating low molecular weight RNA. *Virology*, 411-428.
- Diener, T.O. /1970/: Isolation exonuclease-resistant ribonucleotide from healthy and potato spindle tuber virus infected tomato leaves. *Phytopathology*, 60, 1014.
- Diener, T.O. /1974/: Viroids as prototypes or degeneration products of viruses. In: *Viruses, evolution and cancer* /E. Kurstak and K. Maramorosch, eds./ Academic Press, New York pp. 757-783.
- Diener, T.O. /1979/: *Viroids and viroid diseases*. John Wiley and Sons. New York - Chichester - Brisbane - Toronto.
- Fernow, K.H., Peterson, L.C., Plaisted, R.L. /1969/: The tomato test for eliminating spindle tuber from potato planting stock. *Am. Potato J.* 46, 424-429.
- Fernow, K.H. /1967/: Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57, 1347-1352.

- Föglein, F.J. /1979/: Viroid betegség előfordulása Délmagyarországon. Növényvédelem, 15, 354-358.
- Goss, R.W. /1930a/: The symptoms of spindle tuber and unmottled curly dwarf of the potato. Univ. Nebraska, Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 47, 34.
- Gratz, L.O., Schultz, E.S. /1931/: Observation on certain virus diseases of potato in Florida and Maine. Am. Potato J., 7, 187-200.
- Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., Sängner, H.L. /1978/: Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. Nature, 273, 203-208.
- LeClerc, E.L., Lombard, P.M., Eddins, A.H., Cook, H.T., Campbell, J.C. /1944/: Effect of different amounts of spindle tuber and leaf roll on yields of Irish potatoes. Am. Potato J., 21, 60-71.
- Leont'eva, Yu.A. /1964/: Identification of potato gothic. Izv. Kuibyshev. Sel. Khoz. Inst. 14, 279-286 /noted from Rev. Appl. Mycol. 45, 273, 1966/.
- Manzer, R.J., Merriam, D. /1961/: Field transmission of the potato spindle tuber virus and virus X by cultivating and hilling equipment. Am. Potato J., 38, 346-352.
- Martin, W.H. /1922/: "Spindle tuber", a new potato trouble. Hints to potato growers. N.Y. State Potato Assoc. B. /8/: 4.
- McClellan, A.P.D. /1948/: Bunchy-top disease of tomato: additional host plants and the transmission of virus through the seed of infected plants. S. Africa J. Agr. Sci. Bull., 256, 28.
- McClements, W.L., Kaesberg, P. /1977/: Size and secondary structure of potato spindle tuber viroid. Virology, 76, 477-484.
- Morris, T.J., Wright, N.S. /1975/: Detection on polyacrylamide gel of diagnostic nucleic-acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. Am. Potato J. 52, 57-63.

- Morris, T.J., Smith, E.M. /1977/: Potato spindle tuber diseases: procedure for the detection of viroid RNA and certification of diseasefree potato tubers. *Phytopathology*, 67, 145-150.
- Mühlbach, H.P., Sängner, H.L. /1977/: Multiplication of cucumber pale fruit viroid in inoculated tomato leaf protoplasts. *J.gen.Virol.*, 35, 377-386.
- Mühlbach, H.P., Sängner, H.L. /1979/: Viroid replication is inhibited by amantin. *Nature*, 278, 185-188.
- Rodriguez, J.L., Garcia Martinez, J.L. /1978/: The relationship between plant growth substances and infection of *Gymura aurantica* DC by citrus exocortis viroid. *Physiological Plant Pathology*, 13, 355-363.
- Sängner, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J., Kleinschmidt, A.K. /1976/: Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rodlike structures. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 73 /11/: 3852-3856.
- Sängner, H.L. /1972/: An infectious and replicating RNA of low weight. The agent of the exocortis disease of citrus. *Advances in the Biosciences*, 8, 103-116.
- Schumann, G.L., Thurston, H.D., Horst, R.K., Kawamoto, S.O., Nemoto, G.I. /1978/: Comparison of tomato bioassay and slab gel electrophoresis for detection of potato spindle tuber viroid in potato. *Phytopathology*, 68, 1256-1259.
- Semancik, J.S., Weathers, L.G. /1971/: Evidence for an infectious double-stranded RNA plant virus. *Phytopathology* 61, 910.
- Singh, R.P. /1970a/: Occurrence symptoms and diagnostic hosts strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 60, 1314.
- Singh, R.P., Finnie, R.E., Bagnall, R.H. /1970/: Relative prevalence of mild and severe strains of potato spindle tuber virus in Eastern Canada. *Am.Potato J.*, 47, 289-293.

- Singh, R.P., Brien, M.J.O. /1970/: Additional indicator plants for potato spindle tuber virus. *Am.Potato J.*, 47, 367-371.
- Singh, R.P. /1971/: A local lesion host for potato spindle virus. *Phytopathology*, 61, 1034-1035.
- Singh, R.P., Finnie, R.E., Bagnall, R.H. /1971/: Losses due to potato spindle tuber virus. *Am.Potato J.*, 48, 262-267.
- Singh, R.P., O'Brien, M.J. /1970/: Additional indicator plants for potato spindle tuber virus. *Am.Potato J.* 47, 367-371.
- Yang, T.C., Hooker, W.J. /1977/: Albinism of potato spindle tuber viroid-infected Rutgers tomato in continuous light. *Am.Potato J.*, 54, 519-530.
- Wahn, K.F., Rosenberg de Gomez, Sanger, H.L. /1980/: Cytopathic changes in leaf tissue of *Gymura aurantica* infected with viroid of citrus exocortis disease. *J.gen.Virol.*, 49, 355-365.
- Werner, H.O.C. /1926/: The psindle tuber diseases as factor in seed potato production. *Univ.Nebraska Agr.Exp.Sta. Res.Bull.*, 32, 128.
- Zaitlin, M., Niblett, C.L., Dickson, E., Goldberg, R.B. /1980/: Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by solution and filter hybridization. *Virology*, 104, 1-9.

Köszönetet mondok Farkas Gábor akadémikusnak, hogy számomra a doktori értekezés elkészítését lehetővé tette. Megköszönöm Dr.Föglein Ferenc tudományos munkatársnak, hogy értékes elméleti és gyakorlati tanácsaival hozzájárult tudásom gyarapításához.