

A búza törpülés vírus (*Wheat dwarf virus*) etiológiai vizsgálata és molekuláris jellemzése című OTKA pályázat zárójelentése

A búza törpülés vírus (*Wheat dwarf virus*, WDV) első leírását követően (Vacke 1961) Európa számos országában, Közel-Keleten és Kínában is észlelték jelenlétét, sőt gazdasági jelentőségét is. A WDV megjelenése egybeesik az egyetlen ismert vektorának a csíkos gabonakabócának (*Psammotettix alienus*) paleartikus elterjedésével. Magyarországon elsőként 80-as évek végén írták le (Bisztray és Gáborjányi 1989), majd az utóbbi 15 évben a gabonán a leggyakrabban előforduló vírusbetegséget a WDV okozta. Az irodalmi adatok alapján a WDV két törzse ismert, a búzához adaptálódott búza törzs és az árpaéhoz adaptálódott árpa törzs.

Munkánk során az ország különböző helyeiről gyűjtöttünk be vírustünetet mutató növényeket, illetve csíkos gabonakabóca imágókat. A növények fertőzöttségét ELISA módszerrel vizsgáltuk. A kabóákat a WDV minkét hazánkban előforduló törzsére (búza és árpa törzs) egyaránt fogékony, izolátorháló alatt nevelt, jellemzően kétleveles stádiumú zab növényekre helyeztük, majd 3-5 hét elteltével ELISA vagy PCR módszerrel vizsgáltuk a növények vírustartalmát. Vírusátviteli tesztekkel Heves, Kál, Dunakiliti, Siófok, Martonvásár, Belsőbáránd, Pilisjászfalu és Szentes közeléből begyűjtött árpa törzs izolátumokkal, valamint Martonvásár, Pátka, Dalmand, Pula és Szeged közeléből begyűjtött búza törzs izolátumokkal végeztünk. A vírusizolátumok begyűjtése során észleltük, hogy a 2008-as évben őszi árpában az ország számos helyén nagymértékű fertőzés fordult elő, a hevesi gyűjtőhelyünkön ki is kellett szántani egy több száz hektáros területet. A 2010-es rendkívül csapadékos évben ugyanakkor nem sikerült újabb fertőzött területet találnunk, aminek részben az is oka lehetett, hogy az erős gombafertőzés gyakran elfedte a vírustüneteket. Tapasztalataink megerősítették azt a szakirodalomból ismert tény is, hogy az árvakelés foltok különösen jelentős vírusforrások lehetnek.

A WDV terjedése növényen belül és a vírus kimutathatósága

A WDV növényen belüli terjedését mikroizolátorral lokalizált vektorok segítségével végzett fertőzést követően tanulmányoztuk (2. ábra). A vírusinokuláció a növények kétlevelű stádiumában az idősebb levélen történt. Megállapítottuk, hogy 3 vírushordozó kabóca biztonsággal átviszi a vírust, melynek jelenléte PCR módszerrel 11 nappal az inokulációt követően már kimutatható az inokulált és az inokulált levéllel szemben található levélből (3. ábra). A WDV koncentrációja az inokulációt követően 4-5 hétig nő, és a vírus jelenléte a gyökérrendszer és esetenként a fiatal csúcsi levelek kivételével a növény minden részéből kimutatható (4. ábra). A tünetek erősödésével a vírus detektálhatósága csökkent. Az őszi folyamán fertőzött és külső hőmérsékleti viszonyok között (izolátorházban) tartott növényekből a vírust április végéig tudtuk kimutatni (5. ábra), majd kalászhányás idején már nem, de ekkorra a legtöbb fertőzött növény elpusztult (6. ábra).

A WDV detektálása

A vírus megbízható kimutatására vírus és vírustörzs specifikus indítószekvenciákat terveztünk, illetve az irodalomban közölt primereket ellenőriztük. Összesen 42 indítószekvenciát teszteltünk (32 saját tervezésű és 10 irodalomból vett), melyek közül az árpa törzs kimutatására a WDV-2100arpa F (5'-ttcaggcttacggagtatagatgttcat-3') és a WDV540arpaR (5'-taagccaaccaacaactcctacgg-3') indító-szekvenciapár bizonyult a legmegfelelőbbnek. A búzatörzs izolátumok specifikus kimutatására a WDV-CP5F (5'-

cacggatccatggtgaccaacaagg-3') és a WDV3kozR (5'-cggattacatgtactctaac-3') primerek bizonyultak a legjobbnak. A WDV kimutatására 4 indító-szekvenciapár is teljes biztonsággal alkalmazható (WDVCP5F – WDVCP3R, WDVCP5F – WDV3vegR, WDVP1–WDV3veg és WDVRepF – WDVRepR), de a leggyorsabb kimutatást a PCR paraméterek (95 °C 20 sec, 55 °C 15 sec, 70 °C 7 sec 20 ciklus) miatt az utolsó pár biztosította. A WDV gabonából történő gyors és megbízható kimutatására egy Sigma kitet (Sigma XNAP2) alkalmaztunk nukleinsav kivonásra és a WDVRepF (5'-cgcttgactctcttcgcac-3') és WDVRepR (5'-atatactagtgcaggatagaccattcaaacg-3') indító-szekvenciapárral emeltük ki a kb. 450 nt hosszú DNS-szakaszt. Ezzel a módszerrel mintegy 2 órán belül eldönthető egy mintáról, hogy tartalmaz-e vírust vagy nem. (A hagyományos ELISA módszer egy-másfél napig tart, míg a többi PCR vizsgálat 4-5 órát vesz igénybe.)

A WDV kimutatására egy új eljárást a gördülő körös vírusfeszaporítás (rolling circle amplification, RCA) módszert is kipróbáltuk, mely a Phi29 DNS polimeráz enzim működésén alapul. A módszer előnye, hogy nem igényel komolyabb laboratóriumi felszerelést (pl. PCR készüléket) és 30 órán belül eredményt ad.

A WDV gazdanövényköre

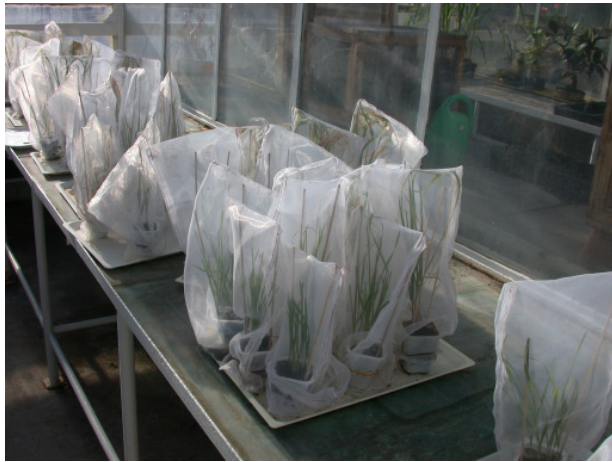
Az irodalmi adatok alapján bizonyított volt, hogy a WDV búza törzseket árpa és búza növényekről is izolálták, viszont ellentmondó adatok voltak arra vonatkozóan, hogy az árpa törzs fertőzi-e a búzát. Ezért a WDV-H07 árpa törzs izolátumával gazdanövényköri vizsgálatokat végeztünk és a búzán kívül számos fűfélést is teszteltünk. Bizonyítottuk, hogy a *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Avena strigosa*, *Bromus arvensis*, *Lolium temulentum*, *Phloem pratense*, *Puccinella distans* növények növekedésgátlással reagálnak a WDV fertőzésre, az *Agrostis stolonifera*, *Dactylis glomerata*, *Setaria italica*, *Lolium multiflorum* és *Lolium perenne* növények tünetmentes gazdanövényei a vírusnak, míg a *Triticum aestivum*, *Alopecurus pratensis*, *Arrhenatherum alatius*, *Bromus erectus*, *Bromus inermis*, *Festuca pratensis* és *Poa pratensis* növényeket nem fertőzte a WDV-H07 törzs. Eredményeink megerősítették azon irodalmi adatokat, mely szerint az árpa törzs nem fertőzi a búzát. Az *Agrostis stolonifera*, *Alopecurus pratensis*, *Arrhenatherum alatius*, *Bromus erectus*, *Bromus arvensis* és a *Puccinella distans* növények esetén elsőként írtuk le a vírus-növény kapcsolatot. Az árpa törzs két izolátuma, a H07 és a D01, között – az irodalomban eddig nem ismert - patológiai eltérést figyeltünk meg (7. ábra).

Molekuláris vizsgálatok

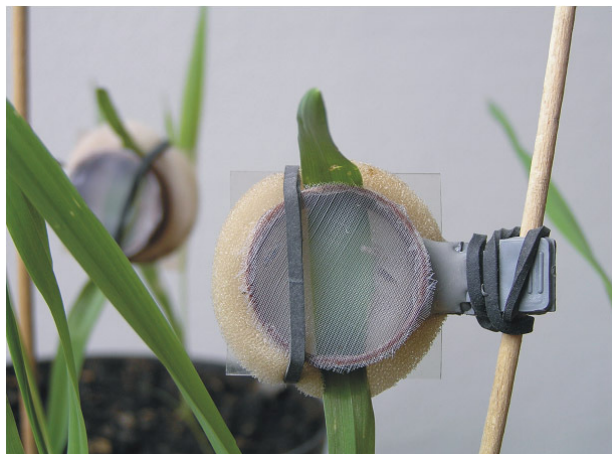
A molekuláris vizsgálatok céljából 6 búza törzs izolátumot (4 magyar és két ukrán), és 5 árpa törzs izolátumot (3 magyar, 1 bolgár és 1 ukrán) választottunk ki és a teljes genom klónozása után meghatároztuk azok bázissorrendjét. (1. táblázat)

A laboratóriumunkban meghatározott WDV izolátumok szekvenciáját összehasonlítottuk (2. táblázat).

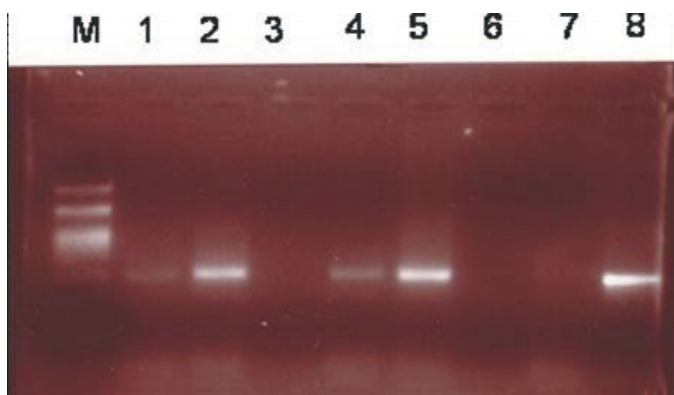
Megállapítottuk, hogy a hazánkban a búzáról, illetve árpáról begyűjtött WDV izolátumok a nagy földrajzi eltérés valamint az izolálási idő többéves különbsége ellenére nagy hasonlóságot mutattak (99,3% feletti hasonlóság). A búza és az árpa törzs izolátumai azonban már lényegesen eltérnek egymástól (85 % körüli azonosság). A génbankban található teljes genomra vonatkozó adatokkal összehasonlítva megállapítottuk, hogy a búza törzsek nagy hasonlóságot mutatnak (98,3 % feletti azonosság), míg az árpa törzsek izolátumai között nagyobb variabilitás figyelhető meg (93,3 % - 99,6 % azonosság). További érdekesség, hogy Odessza mellől búzáról begyűjtött WDV izolátum az árpa törzsbe tartozott, amire mindeddig nem volt irodalmi adat.



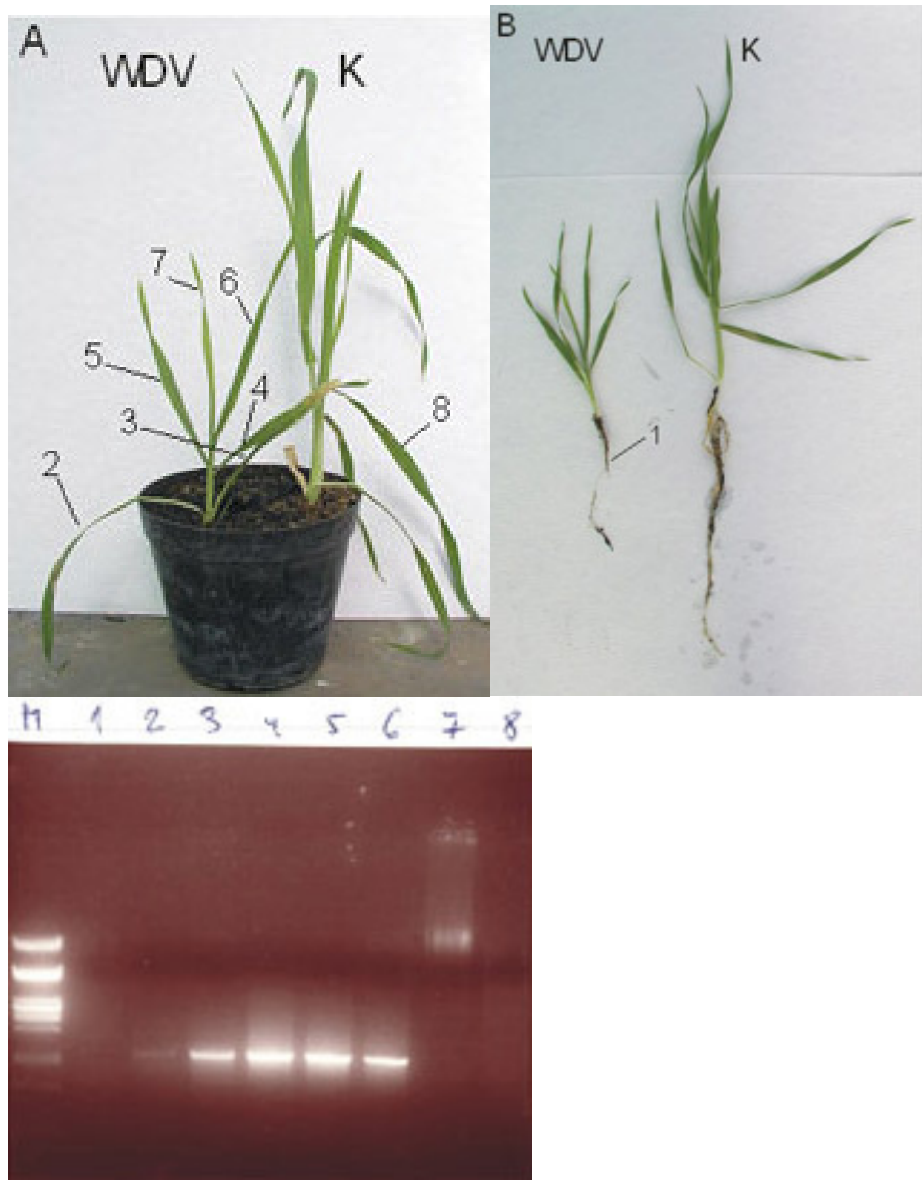
1. ábra A különböző izolátumok fenntartása üvegházban.



2. ábra A mikroizolátor alkalmazása a WDV átvitelénél.



3. ábra A WDV kimutatása PCR technikával 11 nappal az inokulációt követően.
1, 4 – inokulált levél, 2, 5 – szemközti levél, 3, 6 – gyökérrendszer, 7 – egészséges növény,
8 – pozitív kontrol



4. ábra A WDV kimutatása 36 nappal az inokulációt követően.



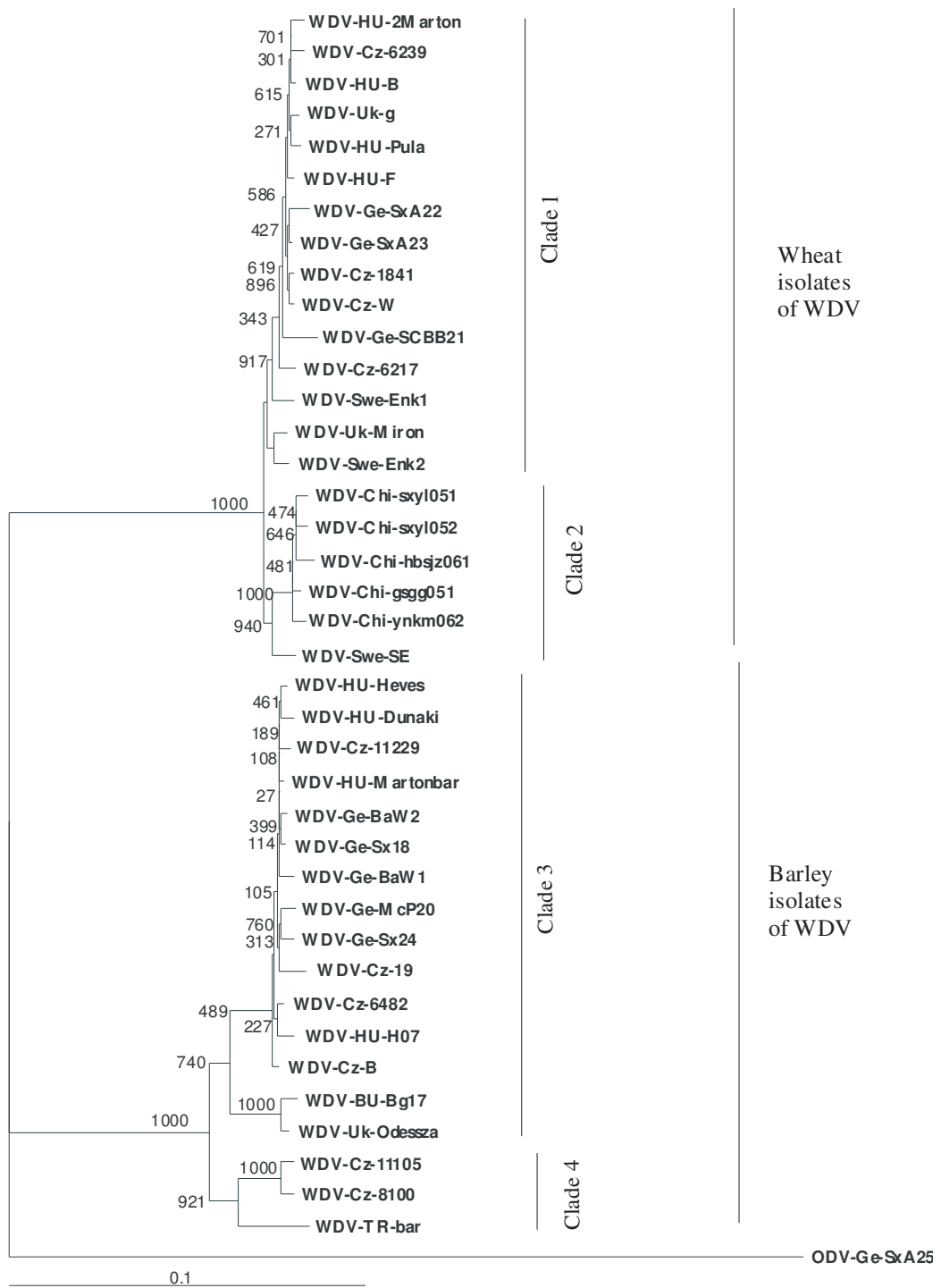
5. ábra: Izolátorházi körülmények között az ősszel fertőzött növényekből WDV április végéig volt kimutatható a beteg növényből.



6. ábra Kalászhányás idejére a beteg növény általában elpusztul.



7. ábra A WDV-H07 és WDV-D01 árpa törzs izolátumok eltérő patológiai tulajdonsága.



8. ábra Az ismert WDV izolátumok filogenetikai törzsfája