

Virologiai vizsgálatok a dél-alföldi régióban termesztett paprika fajtákon. A dohány enyhe zöld mozaik vírus (*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV) molekuláris azonosítása

Nemes Katalin¹, Csilléry Gábor², Almási Asztéria¹, Salánki Katalin¹ és Tóbiás István^{1*}

¹MTA Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézete, Budapest

²Budakert Kft., Budapest

*e-mail: tobias.istvan@agrar.mta.hu

Összefoglalás

A dél-alföldi régióban Hó F1 és Nirvin F1 paprikafajtákon enyhe mozaik tüneteket figyeltünk meg 2015 tavaszán. A bogyókon jól látható növekedésgátlás, egyenetlen színeződés, foltosodás, nekrotikus foltok és csikozottság volt észlelhető. A kórokozó meghatározása céljából tesztnövény vizsgálatokat végeztünk *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *N. tabacum* cv. Xanthi-nc, *Nicotiana benthamiana*, *Capsicum annuum* cv. Albaregia (L+), *Capsicum annuum* cv. Fehérözön (L1) és *Capsicum annuum* cv. Brendon F1 (L3) növényeken, valamint RT-PCR módszerrel vizsgáltuk a kórokozót. A Nirvin F1 fajtáról származó minták a TMV-1,2,3 patotípusba tartoztak és a köpenyfehérje bázissorrendje alapján a paprika enyhe tarkulás vírussal (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) mutatta a legnagyobb azonosságot. A Hó F1 mintákból származó tobamovírusok a P0 patotípusba (TMV-0) tartoztak és a szekvencia elemzés után a legmagasabb azonosságot a dohány enyhe zöld mozaik vírussal (*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV) mutatta. Ismereteink szerint a TMGMV első jól dokumentált előfordulása paprikán hazánkban. Génbanki elérhetősége KT374283.

Kulcsszavak: tobamovirus, Hó F1, Nirvin F1, paprika enyhe tarkulás vírus, dohány enyhe zöld mozaik vírus, RT-PCR, patotípus

Abstract

In the spring of 2015 mild mosaic symptoms were observed on the leaf of "Hó F1" and „Nirvin F1” cultivars in the main pepper growing region of South-East Hungary. The symptoms on the fruits were more obvious, characterized by reduction in size, mottling and color changes, brown necrotic streaks and spots. In order to identify the pathogen symptomatic fruit samples were collected and carried to the lab. The reactions on *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *N. tabacum* cv. Xanthi-nc, *Nicotiana benthamiana*, *Capsicum annuum* cv. Albaregia (L+), *Capsicum annuum* cv. Fehérözön (L1) and *Capsicum annuum* cv. Brendon F1 (L3) indicated the presence of tobamovirus isolates belonging into pathotype 0 and/or 3. From the original pepper fruit total RNA was extracted and conventional RT-PCR method was used to amplify the coat protein gene. Products of the expected size (700 bp) were obtained and cloned into p-GEM T-Easy Vector (Promega, USA) and sequenced. According to the sequence data tobamovirus isolates from Nirvin F1 samples showed highest identity with *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) and belonged to the pathotype 3 (TMV-1,2,3), infecting the pepper varieties containing the L3 resistance gene.

Tobamovirus isolates from „Hó F1” cultivar were member of pathotype 0 (TMV-0) group and blast analysis of sequences showed the highest identity with a Spanish isolate (P04/17, Accession No. FN594859) of *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) (99%). The sequence of one isolate was deposited in GenBank (Accession No. KT374283). To our knowledge, this is the first proven data of TMGMV isolated from pepper in Hungary.

Keywords: tobamovirus, Hó F1, Nirvin F1, *Pepper mild mottle virus*, *Tobacco mild green mosaic virus*, RT-PCR, patotype

Bevezetés

Az étkezési paprika hazánk egyik legfontosabb zöldségnövénye, melynek gazdaságos termesztését sok esetben vírusbetegségek akadályozzák (Tóbiás és mtsai, 1978; Tóbiás és Molnár, 1981, 1983). Korábban hazánkban a paprikatermesztés döntő része szabadföldön történt, de az utóbbi időben egyre nagyobb jelentőséggel bír a hajtított paprikatermesztés. Az üvegházi és a fólia alatti paprikatermesztés előretörése azzal magyarázható, hogy rendelkezésre állnak minden fajtatípusban azok az új fajták, melyek nagyobb termésátlaggal és jobb minőséggel nagyobb jövedelmezőséget biztosítanak. A szabadföldi termesztésben a legnagyobb gondot az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) és a burgonya Y vírus (*Potato virus Y*,

PVY) jelentették, addig hajtásban a tobamovírusok [dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*), TMV, paprika enyhe tarkulás vírus (*Pepper mild mottle virus*, PMMV) Óbuda paprika vírus, (*Obuda pepper virus*, ObPV)] és a paradicsom foltos hervadás vírus (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) okozzák (Tóbiás és mtsai, 1981a,b; Tóbiás, 1984; Csilléry és Tóbiás, 1985; Csilléry és mtsai, 1995; Gáborjányi és mtsai, 1995; Kazinczi és mtsai, 2001; Horváth és mtsai, 2004). A vírusok elleni védekezésben - hazánkban a zöldségművelések közül elsők között – a paprikatermesztésben vezették be a rezisztens fajták alkalmazását (Tóbiás és Gáborjányi, 1985; Zatykó és mtsai, 1983). Egyik legnépszerűbb és legjobb TMV-rezisztens paprikafajta a Fehérözön volt, mely az *L1* rezisztenciagént tartalmazta. Néhány évvel a TMV - rezisztens fajták köztermesztésbe kerülését követően megjelentek olyan tobamovírusok, melyek az *L1* rezisztenciagént tartalmazó fajtákat fertőzték (Tóbiás és Csilléry, 1982, 1983, Csilléry és mtsai, 1983). Az új tobamovírus patotípusok ellen sikerrel vezették be a *Capsicum chinense* fajból származó *L3* rezisztenciagént, majd a még agresszívebb patotípusok ellen a *C. chacoense* fajból származó *L4* gén alkalmazását. Napjainkban a hajtásban használt jelentősebb paprikafajták már tartalmazzák az *L3* rezisztenciagént, sőt vannak *L4* gént tartalmazó fajták is. A 90-es évek közepén a hajtított paprikán robbanásszerűen megjelent és óriási károkat okozott a TSWV (Csilléry és mtsai, 1995; Gáborjányi és mtsai, 1995). A betegség megjelenése összefüggésben volt a nyugati virágtetű (*Frankliniella occidentalis*) hazai felbukkanásával. A TSWV ellen hatékony védelmet biztosít a *C. chinense* fajból származó *Tsw* gén, bár időnként feltűnnek a rezisztenciát áttörő patotípusok, amelyek ellen jelenleg nincs forgalomban rezisztens fajta (Bese és mtsai, 2012, Csilléry és mtsai, 2015).

Napjainkban a hajtási paprikatermesztés két legfontosabb vírusbetegségét a tobamovírusok és a paradicsom foltos hervadás vírus, különböző törzsei okozzák (Bese és mtsai, 2012, 2014; Csilléry és mtsai, 2012). Jelen dolgozatunkban a dél-alföldi régióban gyűjtött paprikaminták virológiai vizsgálatáról számolunk be.

Anyag és módszer

Vírus tünetek, tesztnövény vizsgálatok

A dél-alföldi paprikatermesztő régióban egy fóliaházban (NirvinF1 - zöld bloki bogójú fajta) és egy üvegházban (Hó F1 – fehér kúpos bogójú fajta) a szeptember-október hónapokban kiültetett állományokban március elejétől egyre fokozódó mennyiségben gyenge mozaikos levéltüneteket figyeltek meg a termelők. A tünetes növények behatóbb vizsgálata során

megállapítottuk, hogy a nagyon enyhe levélmozaikosodás mellett a bogyókon jól látható egyenetlen színeződés, foltok, egyes esetekben nekrotikus foltok, csíkozottság, és növekedésgátlás volt megfigyelhető (1. ábra). Mindkét helyről 12-12 levél és bogyómintát szedtünk. Mindkét esetben 5-5 mintát vizsgáltunk RT-PCR és tesztnövény módszerrel a kórokozók azonosítása végett. A tesztnövény vizsgálatokban *Nicotiana tabacum* cv Xanthi-nc, *N. tabacum* cv Samsun, *Capsicum annuum* cv Brendon, cv. Fehérözön és cv Albaregia használtuk.

A



B



1. ábra. A Hó F1 (A) és a Nirvin F1 (B) paprikafajták termésén látható tünetek

RT-PCR vizsgálatok

Az össznukleinsav kivonást a fertőzött bogyókból White és Kaper módszerével (1989) végeztük. Az RT-PCR-hez a primereket a különböző Tobamovírus izolátumok köpenyfehérjéinek homológ régióira terveztük, amelyek kb. 700 nt hosszúságú darabot emelnek ki a PCR során.

Az oligonukleotidok a következők voltak:

for 5'-GATCGCGCGAGTCGTGATTCGTATTTAAATATG-3'

rev 5'-TGGGCCGCCTACCGCGGCGG-3'

PCR reakció paraméterei a következők voltak: denaturálás: 5 perc 95 °C, 30 ciklus: 30 sec 95 °C; 30 sec 60 °C; 1 perc 72 °C; és 10 perc 72 °C a végén. A PCR termékeket High Pure PCR Purification Kittel (Roche) tisztítottuk, Az így kapott DNS fragmentumokat pGEM-T Easy Vector (Promega) plazmidokba klónoztuk, majd ezekkel *Escherichia coli* baktérium sejteket transzformáltunk. A klónok bázissorrendjét a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Baygen Genomikai Egység határozta meg (Szeged). A kísérleteinkben kapott és a Génbankból származó tobamovírus szekvenciákat az NCBI Blast program segítségével hasonlítottuk össze.

Eredmények és megvitatás

A *Nicotiana tabacum* cv Xanthi-nc és *N. tabacum* cv Samsun dohányokon mutatott tünetek egyértelműen egyedül a tobamovírus jelenlétére utaltak. A Hó F1 fajtáról származó tobamovírusok a P0 patotípusba (TMV-0) tartoztak, mivel csak az Albaregia paprikafajtát fertőzték szisztemikusan. A Fehérözön valamint a Brendon F1 fajtákon lokális nekrotikus lézió volt látható az inokulált leveleken. A Nirvin F1 paprikafajtáról származó minták szisztemikusan fertőzték a Brendon F1 fajtát, ami alapján a P3 patotípusba (TMV-1,2,3) soroltuk ezeket a tobamovírus izolátumokat.

A Nirvin F1 mintákból származó vírusok bázissorrendje a legnagyobb homológiát (99%) egy PMMoV spanyol rezisztenciatoró izolátummal mutatta (Accession No. X72587), ami alapján ezeket a paprika enyhe tarkulás vírus izolátumainak tartjuk. A Hó F1 paprikafajtáról gyűjtött vírusizolátumok a legnagyobb azonosságot (99%) egy TMGMV spanyol izolátummal mutatta (P04/17, Accession No. FN594859). Ezzel elsőként bizonyítottuk a dohány enyhe zöld mozaik vírus (*Tobacco mild green mosaic virus*) hazai előfordulását paprikán.

Hivatkozások

- Bese, G., Krizbai, L., Horváth, J. and Takács, A. 2012. Resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus*, (TSWV) on resistant pepper cultivars in Hungary. Internat. Symp. on Current Trends in Plant Protection, Belgrade, Serbia 2012. pp. 239-241.
- Bese, G., Korom, K. K., Kristó, I. és Takács, A. 2014. A paradicsom bronzfoltosság vírus (*Tomato spotted wilt virus* – resistance breaking strain, TSWV-RB) rezisztencia áttörő törzs elterjedésének vizsgálata a Dél-Alföldi régióban. Georgikon for Agriculture, 19, 1:194-198.
- Csilléry, G. és Tóbiás, I. 1983. Magyar és külföldi paprikafajták fenológiai jellemzése és a természetes vírusfertőzöttségének mértéke Nagyszénáson. Kertgazdaság, 17: 79-87.
- Csilléry, G., Tóbiás, I. and Ruskó, J. 1983. New pepper strains of tomato mosaic virus. Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung. 18. (4.) 195- 200.
- Csilléry, G., Gáborjányi, R., Tóbiás, I. és Jenser, G. 1995. Új paprika és paradicsom kórokozó. Paradicsom foltos hervadás vírus. Kertészet és Szőlészet, 29:8-9.
- Csilléry, G., Almási, A. and Tóbiás, I. 2012. Occurrence of resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* on resistance pepper cultivars in Hungary. The 21st International Pepper Conference, Florida, November 4-6 2012, pp 27.

- Csilléry, G., Almási, A., Salánki, K., Palkovics, L. és Tóbiás, I. 2015. Rezisztenciaforrások keresése *Capsicum* fajokban a *Tsw* rezisztenciagént áttörő paradicsom foltos hervadás vírussal szemben. *Növényvédelem*, 51 (5), 211-2014.
- Gáborjányi, R., Csilléry, G., Tóbiás, I. and Jenser, G. 1995. Tomato spotted wilt virus: A new threat for pepper production in Hungary. 10th Eucarpia Meeting, Budapest, 159-160
- Horváth, J., Kovács, J., Kazinczi, G. and Takács, A. 2004. Reaction of *Capsicum* genotypes to *Obuda pepper virus*, *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 23, 117-120.
- Kazinczi, G., Horváth, J., Kovács, J. and Takács, A. 2001. Affinity of the different capsicum genotypes to the resistance breaking strain of potato Y *potyvirus*. EUCARPIA XIth Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Antalya-Turkey 2001. pp. 261-264.
- Tóbiás I., Molnár A., Salamon P. és Beczner L. 1978. A paprika-patogén vírusok hatása néhány étkezési paprikafajtára. *Növényvédelem*, 10.(3.) 51-60.
- Tóbiás I. és Molnár, A. 1981. A szabadföldi paprika vírusai. *Kert. Egy. Zölds. Int. Tanácsadója*, 9. 26-27.
- Tóbiás, I., Maat, D. Z. and Huttinga, H. 1982. Two Hungarian strains of cucumber mosaic virus isolated from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) and melon (*Cucumis melo* L.): identification and antiserum preparation. *Neth. J. Pl. Path.* 88: 171-183.
- Tóbiás, I., Rast, A. Th. B. and Maat, D. Z. 1982. Tobamoviruses from pepper and eggplant: a comparison with tobacco mosaic virus (TMV) by test plants and serology. *Neth. J. Pl. Path.* 88: 257-268.
- Tóbiás, I. and Csilléry, G. 1982. New strains of tomato mosaic virus occurred in resistant varieties of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Capsicum Newsletter*, No. 1. 46.
- Tóbiás, I. és Molnár, A. 1983. Az étkezési paprikán előforduló vírustünetek és víruskórokozók Magyarországon. *Kertgazdaság*, 15: 49-55.
- Tóbiás, I. and Csilléry, G. 1983. Virus diseases of pepper in greenhouse and plastic tunnel in Hungary. *Eucarpia Capsicum and Eggplants*, Vth Meeting, Plovdiv, 4-7. July. pp. 148-150.
- Tóbiás I. 1984. Az étkezési paprikán előforduló két legfontosabb víruskórokozó jellemzése és csoportosítása. *Növ. Tud. Napok*. Budapest, 65.
- Tóbiás, I. és Gáborjányi, R. 1985. Víruskutató a rezisztencia-nemesítés szolgálatában. *Kertgazdaság*, 11: 51-53.
- White, J. L. and Kaper, J. M. 1989. A simple method for detection of viral satellite RNAs in small tissue samples. *J. Virol. Meth.* 23:83-94.

Zatykó, L., Csilléry, G. and Tóbiás, I. 1983. The role of resistance in the integrated control of diseases and pests in pepper. Int. Conf. Integr. Plant Prot., Budapest, 3: 42-45.