

Bogyó melanotikus gyűrűsfoltosság – rezisztens *Capsicum* genotípusokon kialakuló betegség a paradicsom foltos hervadás vírussal (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) fertőzött bogyón

Salamon Pál – Nemes Katalin – Salánki Katalin

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő
salamon@abc.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A paprika bogyó melanotikus gyűrűsfoltosság (pepper fruit melanotic ringspot, FMRS) betegség (Salamon, 2009) etiológiai vizsgálatához fehér cecei típusú paprikák hajtattott állományjaiból gyűjtöttünk bogyómintákat. A begyűjtés folyamán megállapítottuk, hogy az FMRS tünetek csak egészséges levéletesű paprika növényeken fordultak elő olyan hajtatóházakban, ahol a nyugati virágtripsz (*Frankliniella occidentalis*) szaporodott el és a növényállományok egyedeinek kb. 30 %-án a TSWV fertőzésének tipikus levél- és bogyótünetei fordultak elő. A szimptomatológiai vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy az FMRS betegség kialakulásában a paprika genotípusának jelentős szerepe van. Kilenc FMRS-t mutató bogyó beteg részeiből minden esetben olyan mechanikailag átvihető vírust izoláltunk, amely tesztnövényeken a TSWV fertőzésére jellemző tüneteket okozott. A TSWV fertőzést az FMRS-t mutató bogyókon RT-PCR módszerrel is igazoltuk. A begyűjtött fehér bogyók utóérése alatt a melanotikus gyűrűsfoltos egyedek jelentősen nőttek. Az FMRS-t mutató, utóérlelt bogyók magjairól nevelt növénypopulációk minden esetben TSWV rezisztens és fogékony egyedekből álló, hasadó nemzedéknek bizonyultak. Nem melanotikus sárga gyűrűsfoltosságot mutató három bogyóból szintén kimutattuk a TSWV-t (egy esetben tobamovírral együtt), de ez utóbbi termékekből származó utódgenerációk csak TSWV fogékony egyedekből álltak. Fentiek alapján arra lehet következtetni, hogy az FMRS betegség a *Tsw* rezisztencia gént heterozigóta formában tartalmazó cecei típusú paprikák olyan bogyóin alakult ki, melyeket tripszek által közvetített TSWV fertőzött, azaz az FMRS tünet a bogyón manifesztálódó hiperszenzitív reakció (HR) a TSWV fertőzésére.

SUMMARY

Etiology of pepper fruit melanotic ringspot (FMRS) disease (Salamon, 2009) was studied on fruit samples collected in forced pepper populations. It was noticed that in spite of heavy thrips (*Frankliniella occidentalis*) infestations and of TSWV epidemic detected in the forcing houses, FMRS occurred only in plants having healthy foliage. Symptomatological surveys strongly suggested that FMRS appeared exclusively in specific pepper genotypes. The size of melanotic ringspots has been observed to grow at room temperature during post-ripening of diseased fruits. A mechanically transmitted plant virus was isolated from symptomatic parts of 9 white pepper fruits affected by FMRS. On test plants each of the virus isolates caused systemic symptoms characteristic to TSWV. Using cDNA/PCR technique and TSWV N-gene specific primers a ca. 300 bp long DNA fragment has been amplified from total nucleic acid extracted from symptomatic tissues but never from asymptomatic parts of the fruits showing FMRS. Plant progenies grown from seeds of FMRS diseased fruits segregated in respect of resistance and/or susceptibility to TSWV infection. TSWV was also detected in and isolated from three fruits showed non-melanotic yellow rings (one of them was infected with a tobamovirus, too). Seedlings derived from these fruits proved to be susceptible to TSWV. Based on the above results we could conclude that the FMRS disease developed on fruits of "cecei" type white peppers that carry a TSWV resistance gene, most likely the *Tsw* gene in heterozygous form. These fruits were infected with thrips transmitted TSWV and FMRS appeared as a hypersensitive reaction (HR) manifested in fruits.

Kulcsszavak: TSWV, *Capsicum*, rezisztencia, bogyó melanotikus gyűrűsfoltosság, FMRS

Keywords: TSWV, *Capsicum*, resistance, fruit melanotic ringspot, FMRS

BEVEZETÉS

A bogyó melanotikus gyűrűsfoltosság (fruit melanotic ringspot, FMRS) betegség fellépését az elmúlt években állapítottuk meg fehér cecei típusú paprikák hajtattott állományjaiban Kecskeméten és Gödöllőn (Salamon, 2009). A betegség olyan hajtatóházakban fordult elő, melyekben a nyugati virágtripsz (*Frankliniella occidentalis*) elszaporodását és a növényállományok egyedeinek 10-30 %-án a TSWV fertőzésének a paprikán ismert szisztemikus tüneteit (a csúcshajtások sárgulása, elhalása, koncentrikus gyűrűsfoltosság a leveleken, deformációk és nem melanotikus elhalások a bogyón) figyeltük meg. Az FMRS betegség jól fejlett, egészséges lombozatú növények terméssein alakult ki. A melanotikus gyűrűsfoltokból mechanikailag (szövetnedvvel) átvihető vírust izoláltunk, amely különböző tesztnövényeken a TSWV fertőzésére jellemző tüneteket okozott (Salamon, 2009). Fentiek alapján feltételeztük, hogy az FMRS-t tripszek által közvetített, a bogyón bekövetkező TSWV fertőzések okozhatják, de a betegség kialakulásában a paprika genotípusának is jelentős szerepe lehet. Ebben a dolgozatban azokat az eredményeket ismertetjük, melyek igazolták, hogy a beteg bogyókról származó vírusizolátumok patológiai és molekuláris tulajdonságaik alapján a TSWV-vel azonosíthatók és az FMRS betegség minden vizsgált esetben TSWV rezisztens paprika genotípusok terméssein alakult ki.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Szimptomatológiai vizsgálatok és anyagbegyűjtés

Az FMRS tünetek előfordulásának megállapítására 2009 nyarán Gödöllőn nyolc cecei típusú paprika hibrid kísérleti hajtattott állományában végeztünk szimptomatológiai felmérést. A kétismétléses kísérlet egy ismétlésében minden növényegyedről feljegyeztük a levélzetten és a bogyón megfigyelhető vírusos tüneteket, valamint a tripszek elterjedésére utaló bogyóparásodás előfordulását. A kísérletből négy FMRS tünetet mutató, szedésre érett bogyót gyűjtöttünk (G9-12), melyeken a tünetek változásait szobahőmérsékleten történő utóérlelés alatt tanulmányoztuk. 2009 nyarán, Kecskeméten, kísérleti hajtattott paprika állományban az FMRS tüneteit mutató öt növényről gyűjtöttünk szedésre érett bogyókat (Ca1-Ca5), melyeket szobahőmérsékleten utóérleltünk. Utóbbi termőhelyen három, a levélzetten tünetmentes növény 1-1, már színesedő bogyóját is begyűjtöttük (Ca6-Ca8), melyeken világossárga, nem nekrotikus gyűrűsfoltosság alakult ki.

Vírus izolálás és identifikálás

A beteg bogyókat csapvíz alatt mostuk, majd tüneteket mutató részeikből steril szikével az epidermiszt és a bogyóhúst is tartalmazó kb. 30 mm² nagyságú szövet darabot vágunk ki. A szövetmintákat 0.5 ml hideg steril foszfát puffer (0.1 M, pH = 7,0) hozzáadása után steril porcellán dörzsmozsarakban homogenizáltuk, majd az így nyert szövetnedvvel virofil tesztnövények (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii* és *N. glutinosa*) karborundummal leszórt leveleit dörzsöltük be. A tesztnövényeken kialakuló tüneteket 3-4 hétig tanulmányoztuk. A vírusizolátumok közül egy izolátumot (jelölése Ca1) *Chenopodium quinoa* tesztnövényről egyléziós passzálás után *N. benthamiana* növényeken szaporítottuk. A Ca1 vírusizolátum gazdanövénykörét mechanikailag inokulált tesztnövényeken részletesebben tanulmányoztuk.

A Ca1-Ca5 jelzésű paprika bogyókon kialakult egy-egy melanotikus gyűrűsfoltból, valamint a Ca6 jelzésű bogyó nem nekrotikus sárga gyűrűsfoltjából, továbbá ezen bogyók tünetmentes részeiből szövetdarabot vágunk ki, melyekből fenol-kloroformos kivonással teljes nukleinsav (TNS) kivonatot nyertünk. RT-PCR vizsgálatokhoz TSWV N-gén specifikus primereket terveztük (5'-GGG CTA GCG GAA AAC CTC GAC CAG ATC A-3'; 5'-CCC AGC ATT ATG GCA AGC C-3'), melyekkel az N gén kb. 300 bp hosszú szakasza amplifikálható. Az RT-PCR vizsgálatokhoz pozitív kontrollként a TSWV borsóból izolált törzsét használtuk (Salamon *et al.*, 2009).

A vizsgált növények genotípusának tesztelése utóvizsgálatokkal

A Ca1-Ca8, valamint a G9 paprika növények utóérlelt bogyóiból származó magokat elvetettük és a kikelt szikleveles korú növényeket a TSWV Ca1 izolátummal inokuláltuk a szikleveleken. A vizsgált bogyók anyanövényeinek TSWV rezisztens vagy fogékony genotípusára az utódok vírussal szembeni reakciói alapján következtettünk.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A bogyó melanotikus gyűrűsfoltosság előfordulása és a tünetek változása utóérlelt bogyókon

Az FMRS betegség súlyos tüneteit először Kecskeméten, kísérleti hajtattott paprika állományban észleltük 2008 őszén (Salamon, 2009). Az előfordulás gyakoriságát ekkor részletesebben nem mértük fel. Megfigyeltük ugyanakkor, hogy a betegség mindig olyan növényeken jelent meg, melyek levélzete egészséges volt. Az FMRS (izolált festékes foltok, középen határozott iniciális ponttal) okaként először ismeretlen gombás vagy baktériumos fertőzésre gyanakodtunk, amit a beteg bogyók mikroszkópos mikológiai vizsgálata és a baktérium kitenyészési kísérletek negatív eredménye kizárt. 2009 tavaszán, ugyanezen a termőhelyen, tripszek elszaporodását követően TSWV járvány lépett fel és az FMRS betegség is ismételtelen megjelent (*I. ábra* – Ca1-C5). Fentiek arra utaltak, hogy az FMRS betegség fellépése összefügg a TSWV jelenlétével és kialakulásában a paprika genotípusnak is jelentősége lehet. Utóbbi feltételezésünket támasztotta alá, hogy a TSWV tipikus tüneteit mutató, a levélzetten is beteg növények bogyóin sohasem tapasztaltunk melanotikus gyűrűsfoltosságot, ugyanakkor az FMRS tüneteket mutató bogyók egészséges lombozatú növényeken fordultak elő. Az állományban a fentiekén kívül olyan, a lombozaton tünetmentes növényeket is megfigyeltünk, melyek színesedő bogyóin nem melanotikus, de szintén pontszerű foltból kiinduló sárga gyűrűsfoltosság alakult ki (*I. ábra* – Ca7-Ca8).

2009 tavaszán Gödöllőn nyolc cecei típusú paprika genotípussal végzett kísérletben tapasztaltuk az FMRS gyakori előfordulását fóliaházban, ahol a nyugati virágtipsz (*Frankliniella occidentalis*) elszaporodását követően egyes genotípusokon (4, 7, 8) TSWV járvány alakult ki. A melanotikus gyűrűsfoltosság csak és kizárólag 5 növény genotípuson fordult elő (1-, 2-, 3-, 5- és 6-os genotípusok) a növényegyedek közel olyan arányában, mint a TSWV fertőzésre utaló szisztémikus tünetekkel megbetegedett tövek száma az FMRS-től mentes 4-, 7- és 8-as genotípusokon (*I. táblázat*). Az FMRS tünetet mutató tövek lombja ebben a kísérletben is egészséges volt. A tripsz kártételi bogyótüneteket mutató tövek arányában (80-100 %) a genotípusok között nem volt jelentős különbség.

1. ábra: Betegség tünetek rezisztens (Ca1-Ca5, G12) és fogékony (Ca7-Ca8) paprika növények TSWV-vel spontán fertőződött termésein.



Figure 1: Disease symptoms in resistant (Ca1-Ca5, G12) and susceptible (Ca7-Ca8) pepper genotypes naturally infected with TSWV on the fruits

A technikailag (szedésre) érett, fehér cecei típusú paprikák bogyóin kialakuló FMRS szimptomáit (1. ábra – Ca3, G12) korábban részletesen ismertettük (Salamon, 2009). A 2009-ben vizsgálatokhoz begyűjtött beteg fehér bogyókon tanulmányoztuk a tünetek változását az utóérlelés alatt. Minden esetben azt tapasztaltuk, hogy a melanotikus gyűrűsfoltok mérete a színesedő bogyókon a tárolás alatt jelentősen nőtt (1. ábra – Ca3, G12), a különálló közeli foltok összefolytak és a foltok szélétől távolabb esetenként új nekrotikus gyűrű, vagy gyűrűk alakultak ki (1. ábra – Ca1-Ca5). A sárga gyűrűsfoltosságot mutató, már színesedő bogyók foltjai (1. ábra – Ca7-Ca8) a 2-3 heti tárolás alatt nem barnultak, méretük lényegesen nem nőtt, és szélük lassan a teljesen bepirosodó bogyószínbe olvadt.

Vírus izolálás és identifikálás

A begyűjtött paprikabogyók beteg részeiből nyert szövetnedvvel inokulált teszt növények minden esetben vírusok fertőzésére utaló lokális és szisztemikus tünetekkel reagáltak. A megfigyelt szimptomák (klorotikus nekrotikus lokális foltok, súlyos szisztemikus sárgulás, nekrotikus foltok és 4-6 héttel az inokuláció után teljes elhalás) a TSWV fertőzésére utaltak (2. ábra). Egy sárga gyűrűsfoltosságot mutató bogyóból (Ca6) a TSWV-n kívül tobamovírust is izoláltunk, amire a *N. glutinosa* teszt növényen kialakult, a tobamovírusokra jellemző nagyszámú nekrotikus lokális léziók megjelenése utalt. A tobamovírusoktól mentes többi vírusizolátum között az akceptor teszt növények reakciói alapján jelentős különbséget nem tapasztaltunk. A részletesebben tanulmányozott Ca1 izolátum a gazdanövény körüli vizsgálat alapján a TSWV-vel azonos tulajdonságú vírusnak bizonyult (Salamon, nem közölt adat).

Vírusok fertőzésére utaló betegségtünetek előfordulása „cecei” paprika genotípusok hajtított állományában (Gödöllő, 2009. 06. 10.)

Genotípus (1)	Tőszám (db) (2)	Levél és/vagy bogyótüneteket mutató tövek száma (3) (db)*				
		Levéltünetek (4)		Bogyótünetek (5)		
		D, NGy, NF	TM	D, NF	BP	MGyF
8**	60	26	34	26	60	0
1	136	0	136	0	120	20
4	107	40	67	40	100	0
5	143	0	143	0	115	35
2	144	0	144	0	122	45
3	136	0	136	0	105	18
6	139	0	139	0	112	31
7*	60	16	44	16	58	0

*D: deformációk, NGY: nekrotikus gyűrűk, NF: nekrotikus foltosság, BP: barna parásodás, MGyF: melanotikus gyűrűsfoltosság, TM: tünetmentes

** szegélysorok, a genotípusok felsorolása a kiültetés sorainak megfelelő

Table 1: Occurrence of disease symptoms characteristic to viral infections in „cecei” pepper genotypes in forced stands

(2) Genotypes, (2) Number of plants, (3) Number of plants showing leaf and/or fruit symptoms, (4) Leaf symptoms, (5) Fruit symptoms

* D: deformations, NGY: necrotic rings, NF: necrotic spots, BP: brown scars, MGyF: melanotic ringspots, TM: symptomless,

** *border rows, the genotypes are listed according to the field arrangement

2. ábra: Betegségtünetek melanotikus gyűrűsfoltosságot (FMRS) mutató paprika bogyók szövetnedvével inokulált tesztnövényeken

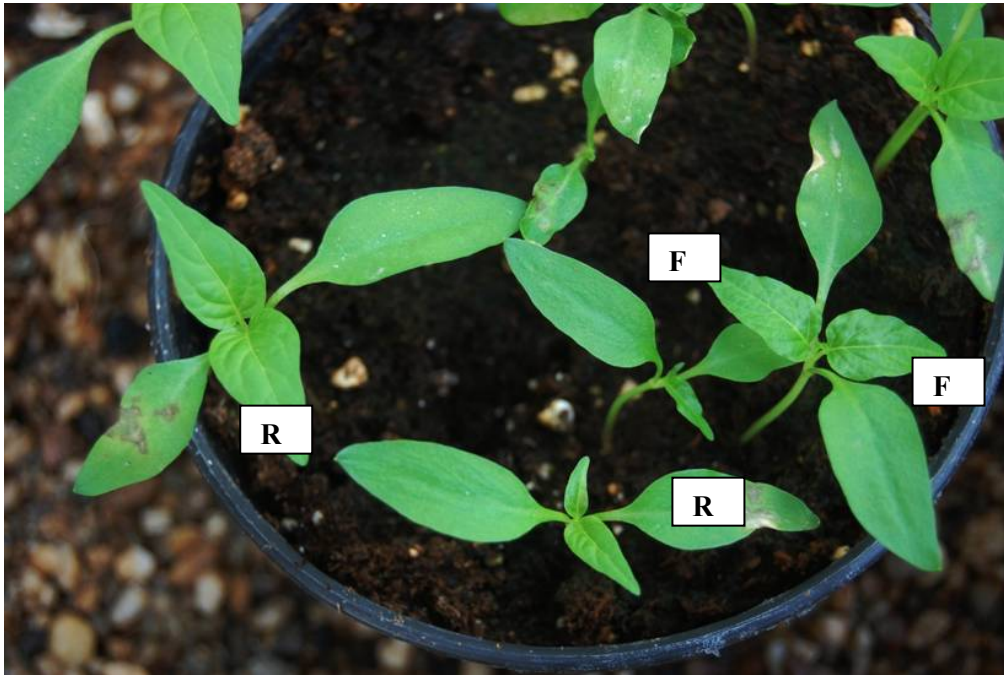


Alsó sor: *N. benthamiana*, Középső sor: *N. clevelandii*, Felső sor: *N. glutinosa*

Figure 2: Disease symptoms on test plants inoculated with extract of pepper fruits affected by FMRS

N. benthamiana (bottom row), *N. clevelandii* (middle row) and *N. glutinosa* (top row)

3. ábra: A TSWV-Ca1 izolátummal inokulált Ca1 utód növények reakciói



R = rezisztens, F = fogékony növények

Figure 3: Reactions of progenies of the pepper plant Ca1 inoculated with TSWV-Ca1

R = resistant plant, F = susceptible plant

A paprika bogyók beteg szövetrészeiből és a TSWV-Ps09 izolátummal fertőzött dohányból (pozitív kontroll) TSWV specifikus primerek felhasználásával RT-PCR módszerrel minden esetben a várt, kb. 300 bp hosszúságú DNS-t amplifikáltunk. A beteg bogyók tünetmentes részeiből és egészséges dohánylevélből kivont TNS preparátumból a felhasznált primerekkel amplifikálható DNS-t nem tudtunk kimutatni.

Rezisztencia vizsgálatok utódelemzéssel

Az FMRS-t mutató bogyók magjairól jól fejlődő, egészséges palántákat neveltünk. A Ca1 izolátummal inokulált palánták reakciói azt mutatták, hogy ezek a bogyók minden esetben TSWV rezisztens, feltehetően a *Tsw* gént tartalmazó, de erre a génre nézve heterozigóta (*Tsw/tsw*) anyanövényekről származtak. A *Tsw* rezisztencia gén jelenlétére utalt, hogy az inokuláció után a rezisztens palántákon nekrotikus lokális léziók alakultak ki és csúcseleveleik tünetmentesek maradtak, míg a fogékony testvérnövényeken lokális klorózis, majd szisztemikus érkivilágosodás, sárga gyűrűsfoltosság és súlyos növekedésgátlás lépett fel (3. ábra). A rezisztens (R)/fogékony (F) egyedek száma az FMRS tüneteket mutató bogyóként az alábbi volt: Ca1: 8/3; Ca2: 8/5; Ca3: 12/3; Ca4: 10/3; Ca5: 7/4; G9: 6/3. A TSWV-vel fertőzött Ca7 és Ca8 jelzésű – a bogyón nem az FMRS tüneteket mutató – növények utódai között rezisztens egyedeket nem találtunk (Ca7: 0/13, Ca8: 0/14).

A paprikán korábban ismeretlen bogyó melanotikus gyűrűsfoltosság (FMRS) betegség előzetes vizsgálatának eredményei arra utaltak, hogy a betegség kialakulása összefügg a bogyók TSWV-vel vagy más tospovírusal történt fertőződésével és a tünetek kialakulását a paprika genotípusa is befolyásolja (Salamon, 2009). A részletesebb patológiai vizsgálatok és az RT-PCR tesztek minden esetben megerősítették, hogy az FMRS-t mutató bogyók a TSWV-vel fertőződtek. A beteg bogyókon a vírus csak a melanotikus foltokból volt kimutatható, melyek mérete a leszedett bogyók utóérése alatt nőtt. Ez arra utal, hogy a melanotikus foltok növekedésében nem csak a növényen fejlődő termések természetes méretbeli változása, hanem a vírus lokális terjedése is szerepet játszik.

Az FMRS betegség előfordulása és tüneteinek tulajdonságai egyaránt arra utaltak, hogy a melanotikus gyűrűsfoltosság csak egyes paprika genotípusok lokális válaszreakciója közvetlenül a bogyó bekövetkezett TSWV fertőzésre. A termésről kiinduló fertőzések a TSWV-t terjesztő, a virágon és a fiatal bogyón táplálkozó tripszek jelenlétében minden paprika genotípuson előfordulhat. Mivel az FMRS betegség fellépését a TSWV-vel szisztemikusan fertőzött, fogékony paprika növényeken sohasem tapasztaltuk, a melanotikus gyűrűsfoltok pedig mindig a levélzeten egészséges növények bogyóin jelentek meg, feltételeztük, hogy az FMRS betegség a TSWV fertőzésére hiperszenzitív reakcióval (HR) válaszoló, rezisztens paprika genotípusokon lépett fel. Az utódelemzések valóban igazolták, hogy beteg bogyók olyan anyanövényekről származtak, melyek a TSWV-vel szemben rezisztenciát biztosító gént (*Tsw* gén, Boiteaux, 1995) tartalmazták heterozigóta formában. Spanyol kutatók az *Sw-5* gént tartalmazó rezisztens paradicsom fajták bogyóin állapították meg a TSWV által okozott

elhaló gyűrűsfoltosságot (Aramburu *et al.*, 2000). A paprikán tapasztalt sokkal súlyosabb FMRS betegség tüneteit először Magyarországon, fehér cecei paprikákon figyeltük meg.

Korábbi vizsgálataink szerint a TSWV a hajtásban fertőzhet már kinevelt, a vírussal szemben fogékony paprika növényeket. Ha a „késői” fertőzés a levélzeten történik, a szisztemizálódó vírus először a bogyón okoz sokszzerű, főként az epidermiszre kiterjedő gyűrűs elhalásokat, melyek lényegesen különböznek az FMRS tünetektől (Salamon *et al.*, 2008). A Ca6-Ca8 bogyók fogékony paprika genotípusok már kinevelt és egészséges levélzetű növényeiről származtak. A természetesen bekövetkező TSWV fertőzés ezen esetekben világos centrális foltból kiinduló nem nekrotikus gyűrűsfoltosságot idézett elő.

A TSWV-t lokalizáló *Tsw* rezisztencia gént Magyarországon több nemesítő cég beépítette a cecei típusú hibrid fajtákba. Mivel az FMRS tünet a rezisztens paprikafajták bogyóin a vírus által kiváltott specifikus válaszreakcióként értelmezhető, azaz a rezisztencia nem védi meg a fajtát egy súlyos bogyóbetegségtől (sőt annak egyik oka), a tripszek elleni hatékony védekezés a TSWV ellenálló fajták termesztésekor sem mellőzhető.

IRODALOM

- Aramburu, J.-Rodriguez, M.-Arino, J. (2000): Effect of tomato spotted wilt virus infection on the fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants of cultivars carrying the SW-5 gene. *J. Phytopathology*, 148: 569-574.
- Boiteaux, L. S. (1995): Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense*. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 146-149.
- Salamon, P. (2009): Fruit melanotic ringspot – a new disease of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural Sciences, Debrecen* 2009/38 Supplement, 55-59.
- Salamon P.-Nemes K.-Salánki K. (2009): Paradicsom foltos hervadás vírus (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV), a borsó (*Pisum sativum* L.) új kórokozója Magyarországon. “Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly” Tudományos Ülésszak 2009. október 28–30. Budapest. 334.
- Salamon P.-Hirka J.-Horváth J.-Juhász Z.-Varró, P.-Milotay P. (2008): Késői vírusfertőzések hajtott paprikán (*Capsicum annuum* L.) és paradicsomon (*Solanum lycopersicum* L.) – tünetek a bogyón. 13. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum. Előadások – Proceedings. 2008. október 15-16. Debrecen. 59-65.