



**SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGUS MSC, NAPPALI TAGOZAT**

KAJSZI IZOLÁTORHÁZAK VÍRUSFERTŐZÖTTségÉNEK DIAGNOSZTIKÁJA

Készítette:

Bükki Alexandra

Belső témavezető:

Dr. Kiss Erzsébet

Egyetemi tanár

SZIE, Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet

Külső témavezetők:

Dr. Várallyay Éva

Tudományos főmunkatárs

Baráth Dániel

Tudományos segédmunkatárs

NAIK- Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet,

Diagnosztika Csoport

Gödöllő

2018

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
1.1 Diplomamunkám célkitűzései.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. A vírusok általános jellemzése.....	5
2.1.1. A vírusfertőzés lefolyása.....	7
2.1.2. A vírusfertőzés következményei.....	7
2.1.3. A vírusok átvitele.....	7
2.1.4. Viroidok.....	8
2.2. Fás szárú gyümölcsöket fertőző vírusok jelentősége.....	8
2.2.1. Szilva himlő vírus.....	9
2.2.2. Prunus nekrotikus gyűrűfoltosság vírus.....	11
2.2.3. Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1.....	12
2.2.4. Cseresznye vírus A.....	14
2.2.5. Őszibarack látens mozaikosság viroid.....	15
2.3. A növények védekezése.....	17
2.4. A vírusok terjedésének korlátozása.....	19
2.4.1. Növényvédelmi szabályozások.....	19
2.4.2. Az általános tanúsítási eljárás.....	19
2.4.3. A szaporítóanyagok előállításának szabályozása hazánkban.....	20
2.5. A vírusdiagnosztikai módszerek áttekintése.....	21
3. Anyag és módszer.....	25
3.1. A növényi minták.....	25
3.2. RNS kivonás.....	25
3.3. RNS keverékek készítése.....	26
3.4. RT-PCR alapú vírustesztek.....	27
3.4.1. Vírus specifikus PCR.....	27
3.5. Northern-blot analízis.....	29
3.6. A <i>Little Cherry Virus 1</i> p21 régiójának amplifikálása és klónozása.....	31
3.6.1. A p21 régióra tervezett primerek optimális annellálási hőmérsékletének megállapítása.....	31
3.6.2. A p21 régió amplifikálása.....	32
3.6.3. PCR termék tisztítása agaróz gélből.....	32

3.6.4. PCR termék vektorba ligálása	33
3.6.5. Ligálási reakció transzformálása <i>E. coli</i> -ba	33
3.6.6. Plazmidok tisztítása	34
3.6.7. Plazmidok restrikciós emésztése	34
4. Eredmények és értékelésük	35
4.1. RNS kivonás és keverékek készítése	35
4.2. RT-PCR teszt vírus specifikus primerekkel	38
4.3. A fajtakeverékek RT-PCR vizsgálata	44
4.4. Northern-blot analízis	48
4.5. A <i>Little Cherry Virus 1</i> p21 régiójának amplifikálása és klónozása	50
4.5.1. A p21 fehérje kódoló régió szekvencia elemzése	52
5. Következtetések és javaslatok	53
6. Összefoglalás	54
Köszönetnyilvánítás	55
Irodalomjegyzék	56
Mellékletek	59

1. Bevezetés

A fásszárú gyümölcsöket számos vírus betegítheti meg. A jelenleg ismert egyetlen védekezési mód ellenük a megelőzés. Mivel gyümölcsfáink ültetésekor hosszútávra tervezünk, nagyon fontos, hogy már a szaporítóanyag előállításánál törekedjünk a vírusmentességre. Hazánkban a kedvező tulajdonságokkal rendelkező gyümölcsfa fajták állami elismerésének egyes lépései, és a szaporítóanyag előállítása izolátorházakban zajlik. Ezek olyan létesítmények, melyek biztosítják a rovarvektorok által terjesztett, vagy bármely egyéb forrásból eredő fertőzéstől való elszigeteltséget. A kórokozómentes környezet fenntartásának érdekében az izolátorházban nevelt növényeket rendszeresen ellenőrzik a hagyományos vírusdiagnosztikai módszerekkel, mint például az ELISA, a PCR vagy a bioteszt. Ezekkel a technikákkal csak ismert vírusokat vizsgálhatunk. Az RNS interferencia során keletkező kis RNS-ek újgenerációs szekvenálása azonban a mintában jelenlévő összes kórokozót képes kimutatni, így ez a módszer teljesen új távlatokat nyitott a növényi vírusdiagnosztikában. Kutatócsoportunk 2016-ban cseresznyét fertőző vírusokat detektált a NAIK Érdi Kutatóállomásáról gyűjtött kajszi mintákban, újgenerációs szekvenálással.

1.1. Diplomamunkám célkitűzései:

- A ceglédi és újfehértói kajszi izolátorházak fertőzöttségének felmérése az újonnan detektált, eredetileg cseresznyét fertőző vírusok tekintetében, valamint a minták tesztelése további három, csonthéjasokat megbetegítő vírusra.
- Tüneteket mutató, Balatonvilágosról származó Toyesi fajta vizsgálata ugyanezen vírusokra.
- A cseresznye aprógyümölcsűség vírus egy fehérjét kódoló génjének szekvencia elemzése, mely vélhetően az RNS interferencia gátlásában vesz részt. A kajszit fertőző vírustörzs esetében ez a szekvencia még nem ismert.

2. Irodalmi áttekintés

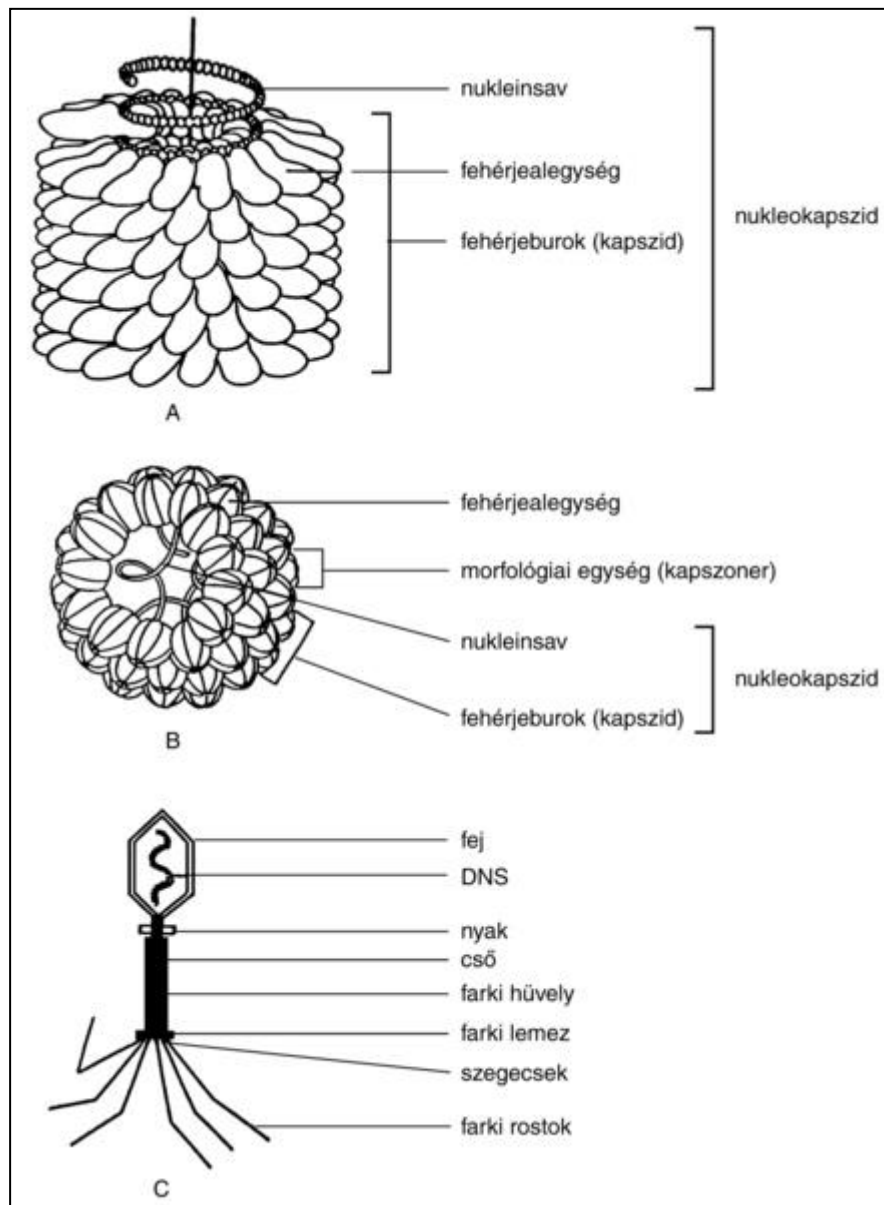
A növények házasítását és monokultúrák termesztését megelőzően, a növényi patogének a nagy fajgazdagságú területeken vadon élő növényekkel fejlődtek együtt. Ezek a koevolúciós folyamatok formálták a növények és az őket fertőző vírusok kapcsolatát. A növények házasítása 10-15000 évvel ezelőtt kezdődött meg, majd az ember vándorlásának következményeként a termesztett fajok kikerültek eredeti környezetükből. A domesztikációs forrópontokon a házasított növényeket támadó kórokozók az ott őshonos flórára jellemző patogének voltak. Később, a vírusok evolúcióját ahhoz a megváltozott környezethez való alkalmazkodás jellemezte, ahol a gazdanövényt termesztették. Az utóbbi 100 év emberi tevékenységének hatására (a klímaváltozás, a növekvő népesség, és a növényekkel való kereskedelem) a növények, vírusok és a vírusokat terjesztő vektorok egyensúlyának dinamikája folyamatosan, egyre gyorsabb ütemben változik, melynek következménye a vírusok gyors evolúciója (Jones 2009).

2.1 A vírusok általános jellemzése

A vírus olyan fertőző genetikai információ, mely önálló anyagcserére nem képes, replikációja a fertőzött gazdasejt szintézisrendszerének módosításával valósul meg. Sejten kívüli formájuk a virion, mely szerkezetét tekintve két részből áll: nukleinsavból, illetve az ezt körülvevő köpenyfehérjéből. Utóbbit kapszidnak nevezik, mely morfológiai alegységekből, kapszomerekből áll. A nukleinsavat és a köpenyfehérjét együttesen nukleokapszidnak nevezik, melyet egyes vírusok esetében még egy külső lipidburok (envelope) is határol, amibe glikoproteinek és vírus specifikus fehérjék épülhetnek be. Ez a réteg gazdasejt eredetű, nem a vírustól származik (Pesti et al. 2001). A kapszid és az envelope hozzák létre a vírusok jellegzetes morfológiáját, melyről az 1. ábrán láthatunk néhány példát (Horváth & Gáborjányi 1999).

A vírusok genomja csak egyfajta nukleinsavat, vagy DNS-t, vagy RNS-t tartalmaz, mely szerkezetét tekintve lehet lineáris vagy cirkuláris, egyszálú (ss, single stranded) vagy kétszálú (ds, double stranded), egy- vagy több darabból álló, osztatlan vagy többkomponensű, illetve pozitív (+) vagy negatív (-) polaritású (Pesti et al. 2001). A növénypatogén vírusok általában egyszálú (+) RNS genommal rendelkeznek.

A vírusgenom általában 1-12 gént tartalmaz, melyek különböző funkciójú fehérjéket kódolhatnak: strukturális fehérjék, replikációhoz szükséges enzimek, transzport fehérjék, melyek a növényben való elterjedést segítik, valamint segítő (helper) fehérjék, amelyek a vektorok általi terjedésben vesznek részt (Horváth & Gáborjányi 1999).



1. ábra

A vírusok sematikus ábrázolása. A: helikális szerkezetű dohány mozaik vírus, B: kubikális szimmetriájú tarlórépa sárgamozaik vírus, C: bináris szerkezetű bakteriofág (Horváth & Gáborjányi 1999).

2.1.1. A vírusfertőzés lefolyása

A vírusok önálló anyagcserével nem rendelkeznek, ezért replikációjukhoz a gazda fehérje- és nukleinsav szintetizáló rendszerét használják fel. A folyamat során a gazdasejtet úgy programozzák át, hogy az elősegítse az új virionok szintézisét (Horváth & Gáborjányi 1999). A vírusfertőzés során bekövetkező replikáció lépései a következők (Horváth & Gáborjányi 1999, Pesti et al. 2001):

1. Megtapadás. A virion és a gazdasejt felszíne között stabil kötődés jön létre.
2. Bejutás. Növényi vírusok esetében ennek előfeltétele a sejtfal sérülése, rovarok, időjárás vagy valamilyen mechanikai károsodást okozó tényező által.
3. Dekapszidálódás. A virion köpenyfehérjéjét a gazdasejt enzimeji lebontják, ekkor szabaddá válik a nukleinsav, és megkezdődhet a vegetatív vírus replikációja.
4. Szintetikus, vagy eklipsz fázis. A vírus örökítőanyagának sokszorosítása nukleinsav polimerázok segítségével. Ezzel egy időben megkezdődik a vírusfehérjék szintézise.
5. Vírusérés. Ebben a fázisban a keletkezett nukleinsav, fehérje és egyéb építőelemek érett, fertőzőképes vírusokká egyesülnek.
6. Kiszabadulás. Az érési szakasz után a fertőzött sejtek szétesésével a virionok kiszabadulnak.

2.1.2. A vírusfertőzés következményei

A növényi vírusok sejtek közötti terjedése a plazmodezmákon keresztül valósul meg, majd elérve a szállítószöveteket, az egész növényt képesek megfertőzni. A vírusfertőzést követő néhány napban a gazdaszervezetben különböző fiziológiai, citológiai, morfológiai elváltozások következnek be, melyeknek látható tünetei lehetnek a szín- és forma módosulások. Léteznek olyan növényi vírusok is, amik hosszú idő, akár évek múltán okoznak tüneteket a növényen, ilyenek a fás szárú növények vírusai (Horváth & Gáborjányi 1999).

2.1.3. A vírusok átvitele

A növényvírusok természetes terjesztői a rovarvektorok, mint például a levéltetvek, kabócák, fonálférgek, de átjutásuk egyik növényről a másikra történhet parazita növények segítségével (pl. *Cuscuta* spp.) is. Kertészeti oltással a fogékony gazdanövények könnyen megfertőzhetők, illetve generatív (mag) és vegetatív (gumó, hagyma, rizóma) szaporítással elősegíthetjük a vírusok terjedését. A növekvő nemzetközi kereskedelem és a rezisztencia

hiánya a növényekben gyorsítja a kórokozók széles földrajzi elterjedését (Horváth & Gáborjányi 1999).

2.1.4. Viroidok

A viroidok néhány száz nukleotid hosszú, gyakran másodlagos struktúrákat tartalmazó RNS molekulák. Jellemzően cirkulárisak, és nem rendelkeznek köpenyfehérje borítással (Flores et al. 2006). Semmilyen fehérjét nem kódolnak, de néhány viroid ribozim aktivitással rendelkezik. Szaporodásukhoz a gazdasejt RNS polimeráz II-jét használják fel (Pesti et al. 2001). Mivel proteinek nem kódolnak, valószínűleg a gazdasejt fehérjéivel lépnek interakcióba, hogy a sejtről-sejtre történő mozgásuk, ezáltal az egész növény fertőzése megvalósulhasson (Flores et al. 2006). Az egyedek közötti átvitel történhet mechanikusan, vagy vektorok útján. Kizárólag növényi patogének (Pesti et al. 2001).

2.2. Fás szárú gyümölcsöket fertőző vírusok jelentősége

Gyümölcsfáinkat számos vírus fertőzheti meg. Ezek hatása a gazdanövényre függ annak genotípusától, a kórokozó ágenstől, illetve befolyásolják a környezeti tényezők. A klimatikus viszonyok nemcsak az aktuális év termésminőségére- és mennyiségére vannak hatással, de befolyásolják a patogéneket terjesztő rovar vektorok migrációját, ezáltal a fertőzött ültetvények mennyiségét (Barba et al. 2015).

Egyes kórokozók tünetmentesen vannak jelen a növényben, s ekkor a gyümölcsfák lassú növekedése, kisebb terméshozam és gyümölcsméret mutatja a vírusok jelenlétét. Ezek a lassú változások nem olyan szembetűnőek, így gyakran nem tulajdonítanak nagy jelentőséget ennek az igen fontos problémának. Ezzel szemben a nem látens vírushatásnak látható ismertetőjelei lehetnek, mint például a levelek sodródása, nekrotikus elhalása, elszíneződése. Hasonló tünetek jelenhetnek meg a gyümölcsökön is, ezek alakja és mérete megváltozhat. A vírusok okozta tünetek közvetett és közvetlen gazdasági veszteségeket okoznak, melyek például a termés piaci minőségének romlása, a gyümölcsfák növekedésének és életképességének csökkenése. Ehhez járulnak hozzá a vírusmentesítés és az egészséges növények fenntartásának költségei (Bos 1982, Barba et al. 2015).

Vizsgálatainkat a *Prunus* nemzetségbe tartozó gyümölcsfákon végeztük. E nemzetségbe tartozó gyümölcsfák jelentősen hozzájárulnak az emberi táplálkozáshoz, termésük fogyasztása csökkenti az érrendszeri betegségek, valamint a rák kialakulásának esélyét.

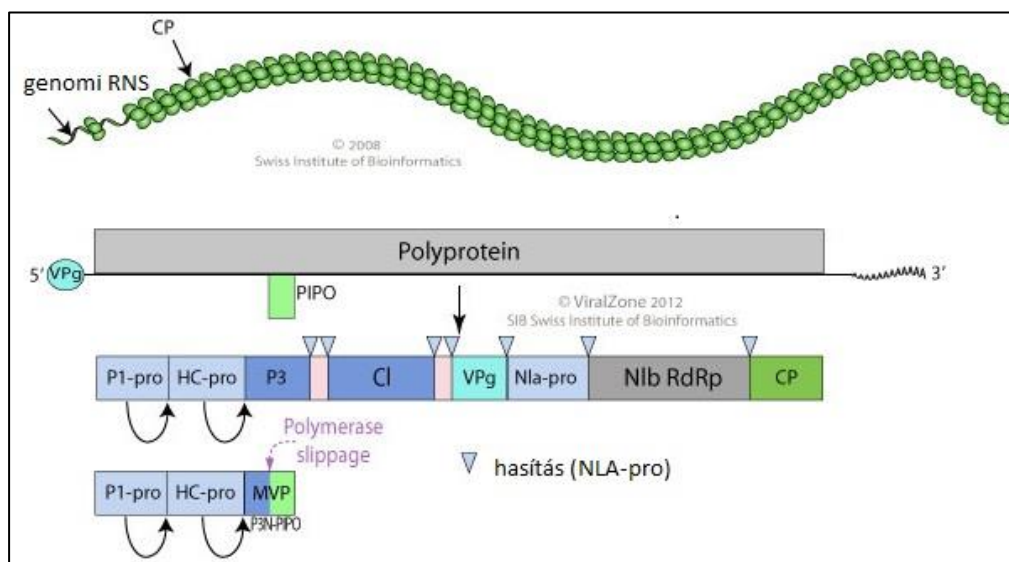
A gyümölcsök egészségi állapotának fenntartásához nagyon fontos, hogy az őket támadó vírusok jelenlétét időben detektáljuk, a rovar vektorokat visszaszorítsuk, és kizárólag vírusmentes szaporítóanyaggal dolgozzunk (Barba et al. 2015).

A továbbiakban azokról a vírusokról lesz szó, melyek jelenlétét kutatócsoportunkkal részletesen vizsgáltuk hazai izolátor házakban és ültetvényeken.

2.2.1. Szilva himlő vírus (*Plum pox virus- PPV*)

A szilva himlő vírust a csonthéjasok egyik legpusztítóbb kórokozójaként tartják számon, különösen veszélyeztetettek a szilva-, őszibarack-, illetve kajszai ültetvények. A vírus tüneteit Bulgáriában figyelték meg 1917-ben, de hivatalosan csak 1932-ben írták le. Először szilván, majd ugyanitt kajszin is jelentkeztek a vírusfertőzésre utaló tünetek (Atanasoff 1932, Rimbaud et al. 2015). Később világszerte kimutatták jelenlétét különböző *Prunus* fajokban. A vírust hatékonyan terjesztő vektorokként tartják számon az alábbi levéltetű fajokat: *A. fabae*, *A. spiraecola*, *B. persicae* és *Myzus persicae* (Gildow et al. 2004). A rovarok mellett a fertőzött szaporítóanyaggal történő kereskedelem is nagy szerepet játszott a PPV különböző törzseinek kontinenseken átívelő térhódításában (Anon 2003, Rimbaud et al. 2015).

A vírus a Potyviridae családba tartozik, genomja csavart pálcikába csomagolt pozitív egyszálú RNS molekula, melyről egyetlen poliprotein expresszálódik, ez utóbbiból később 11 érett fehérje keletkezik proteolitikus hasítással (2. ábra). A PPV jelenléte a levélben



2. ábra

A Potyviridae család jellemző szerkezete és genomszerveződése. Fent: Envelope nélküli, helikális szimmetriájú csavart pálcika. Lent: Lineáris ssRNS(+) genom, és a hasítással keletkező fehérjék (forrás: ViralZone.expasy.org, 2018).

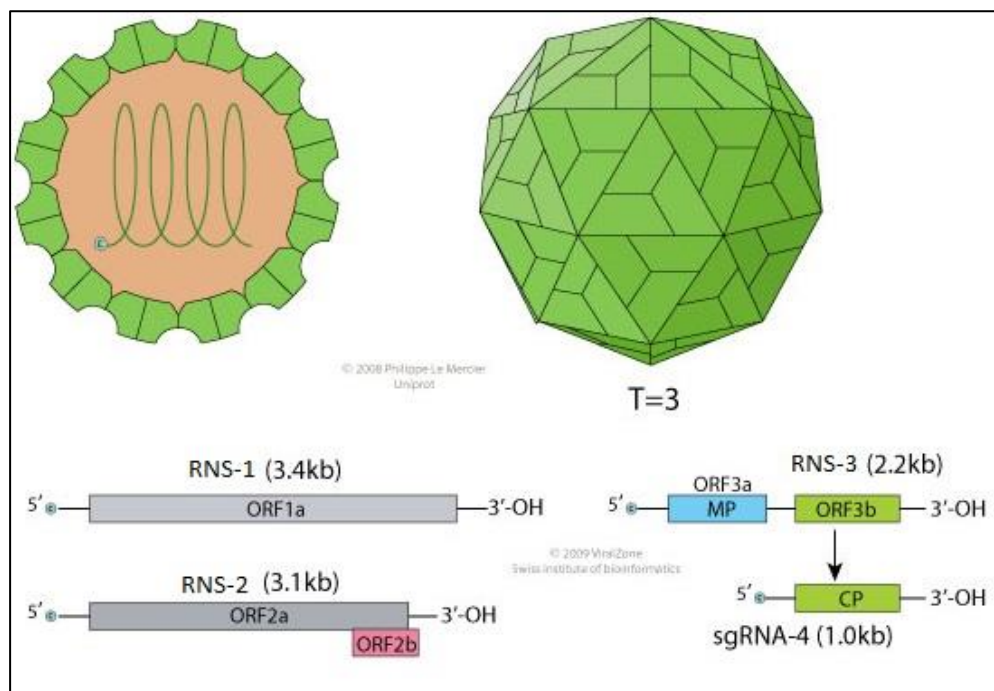
fiziológiai rendellenességeket okoz, mely főként a klorofill koncentrációjának változására vezethető vissza. Ez hatással van a fotoszintézisre, így a cukor metabolizmusra is, ami által nő a gyümölcsök savassága. Nemcsak minőségi, hanem esztétikai romlás is jellemzi a PPV-vel fertőzött csonthéjasokat. A levelek eltorzulnak, sárgászöld gyűrűk, foltok jelennek meg rajtuk. A gyümölcsökre jellemző az érett állapot előtti lehullás, valamint előfordulnak klorotikus és nekrotikus területek, elszíneződések (3. ábra). A kajszibarack esetében a magon is megfigyelhetők a gyűrűs elváltozások (Rimbaud et al. 2015).



3. ábra
A *Plum pox virus* által okozott fertőzés tünetei
(Rimbaud et al. 2015 alapján).

2.2.2. *Prunus nekrotikus gyűrűfoltosság vírus (Prunus necrotic ringspot virus- PNRsV)*

A *Prunus* nekrotikus gyűrűfoltosság vírust őszibarackban írták le először 1941-ben az Amerikai Egyesült Államokban (Cochran & Hutchins 1941). A vírus a Bromoviridae család *Ilarvirus* nemzetségéhez tartozik (Herranz et al. 2013). Pozitív egyszálú RNS genomja van, mely három részből áll (4. ábra): Az RNS1 és RNS2 a replikáz fehérjét, az RNS3 a köpenyfehérjét és mozgási fehérjét kódolja (Kinoti et al. 2017).



4. ábra

Az *Ilarvirus* nemzetség jellemző szerkezete és genomszerveződése. Fent: Az envelope nélküli, ikozaéderes szimmetriájú virion. Lent: A hámosztatú, lineáris ssRNS(+) genom (forrás: ViralZone.expasy.org, 2018).

A csonthéjasokat fertőző *Ilarvirus*-ok közül a PNRsV az egyik leggyakrabban előforduló patogén számos országban. Széles gazdakörrel rendelkezik, minden *Prunus* genushoz tartozó növényt képes megfertőzni, termesztett és vad fajokat egyaránt, de komlóban és rózsában is kimutatták már. Az általa okozott tünetek a fertőzést követő első évben mutatkoznak, melyek a gazda érzékenységtől, a vírus törzstől és a klimatikus viszonyoktól függően változhatnak. Néhány növényfaj esetében a kórokozó teljesen tünetmentes, másoknál kisebb levélméret, klorotikus gyűrűk, nekrotikus foltok jelennek meg (5. ábra), valamint csökken a gyümölcsök mérete és a termés hozam. Kajszi-baracknál az elszíneződött foltok a gyümölcsökre is jellemzőek (Pallas et al. 2012).

A PNRsV könnyen átvihető egyik növényről a másikra vegetatív szaporítással. Emellett különböző ízeltlábúak, például tripszek segítségével a távolabbi területekre eljuttatott, kórokozót tartalmazó pollen az ott élő és termesztett, egészséges növényeket betegítheti meg. Néhány esetben ismert a mag által bekövetkező vírusátvitel, melynek során az anyanövény a magon keresztül megfertőzheti az embriót. Utóbbi révén biztosított a vírus generációról-generációra történő terjedése, ennek figyelembe vételével az ellenük történő védekezésnek nagy jelentősége van (Pallas et al. 2012, Barba et al. 2015).



5. ábra

A PNRsV tünetei cseresznyén

(A képet készítette: Jay W. Pscheidt, 1990).

2.2.3. Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (Little cherry virus 1- LChV-1)

A cseresznye aprógyümölcsűség tünetegyüttes két vírushoz köthető: a LChV-1-hez valamint a LChV-2-höz. Az általuk okozott betegséget először Kanadában, 1933-ban észlelték, majd néhány éven belül a legtöbb környező ültetvény megfertőződött. Azóta a világ számos cseresznyetermő vidékén detektálható a kórokozók jelenléte (Matic et al. 2009).

Amint azt nevük is jelzi, a rájuk legfogékonyabb növények a különböző cseresznyefajták (Barba et al. 2015). A fertőzött egyedek gyümölcsei kezdetben normális növekedést mutatnak, majd körülbelül 10 nappal a betakarítás előtt nem érnek tovább. Ennek következtében színük halványabb lesz az érett termésekhez képest, ízük pedig élvezhetetlen, így a megbetegedett fák termései nem eladhatóak (6. ábra). Megfigyelték, hogy a sötétebb gyümölcsöket termő fajtákon a tünetek sokkal erősebben mutatkoznak, mint azokon, melyek

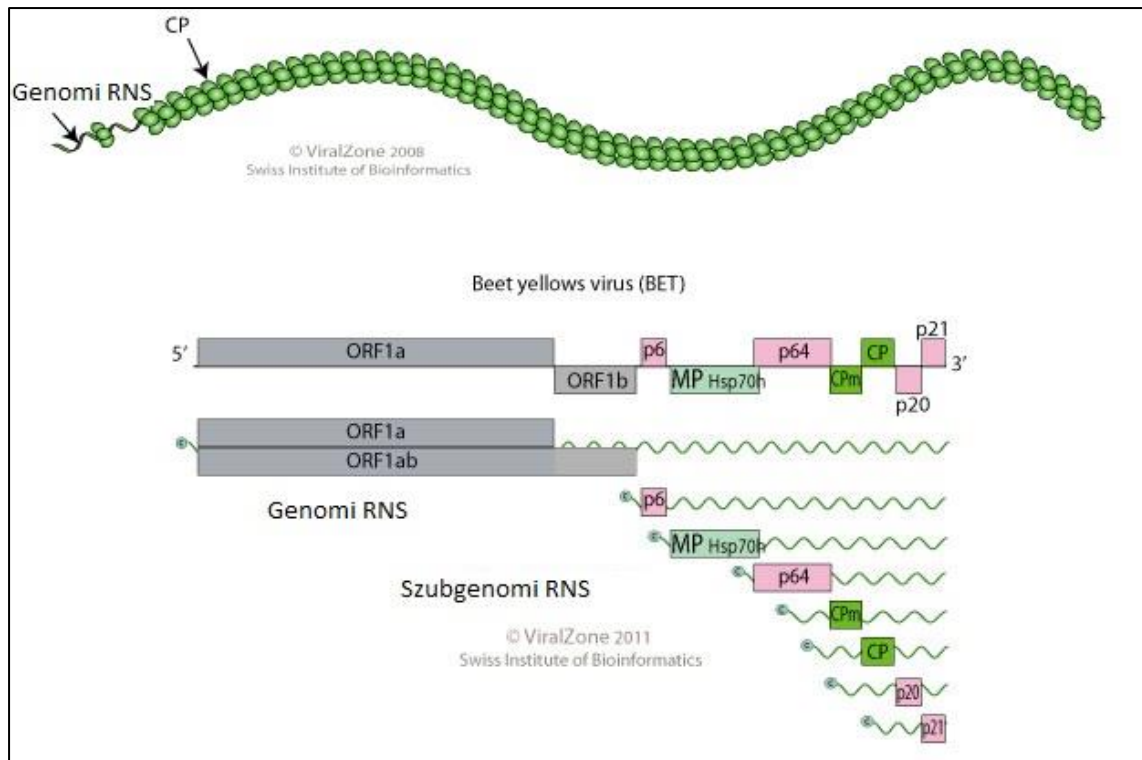
halványpiros illetve sárga színű cseresznyéket hoznak. Néhány fajta esetében a betegség a leveleken is mutatkozik. Jellemzően augusztus végén észlelhető a levélfelszín piros, lila, illetve bronzos elszíneződése, miközben az éretet zöld marad. A vírusok által okozott tünetek évről-évre és területenként is változhatnak. Egyes cseresznyefajták akár tünetmentesek is lehetnek, vagy csak csekély elváltozásokat mutatnak (Sheets & Pests 1996).



6. ábra

A cseresznye aprógyümölcsűség egyik tünete. Fent egy egészséges, alul pedig egy fertőzött ágat láthatunk (forrás: <http://treefruit.wsu.edu/article/little-cherry-disease-basics/>, 2018).

Az általunk vizsgált LChV-1 a Closteroviridae család *Velarivirus* nemzetségéhez tartozik. Genomja pozitív egyszálú RNS, mely 8 nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) tartalmaz (7. ábra). Ezek kódolják többek között a köpenyfehérjét, az RNS függő RNS polimerázt, a helikázt, a metil-transzferázt és a hősokkfehérjét (Dolja et al. 2006; Wang et al. 2016). Továbbá az egyik ORF régióról feltételezhetően az RNS interferenciát gátló silencing szupresszor fehérje expresszálódik (Katsiani et al. 2017). A LChV-1 a vegetatív úton szaporított növények között könnyen terjeszthető, azonban rovar vektora nem ismert. Ennek ellenére meggy, őszibarack és más *Prunus* fajokban is detektálták már (Barba et al. 2015, Wang et al. 2016).



7. ábra

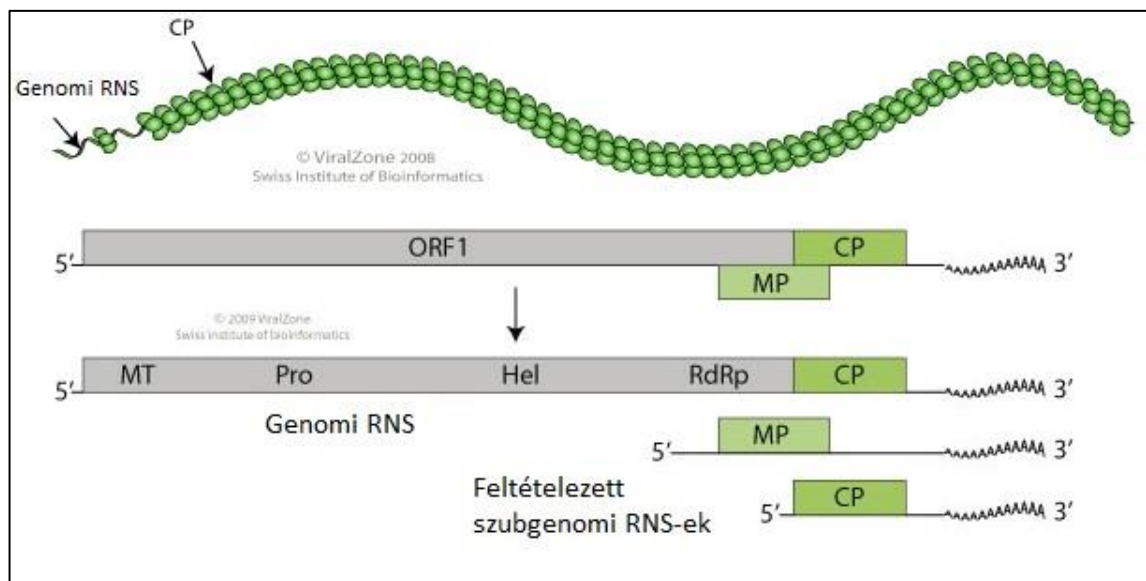
A *Velarivirus* nemzetség jellemző szerkezete és genomszerveződése. Fent: Envelope nélküli fonalas pálcika. Lent: A Cukorrépa sárgulás vírus genomszerveződése (forrás: ViralZone.expasy.org, 2018).

2.2.4. Cseresznye vírus A (*Cherry virus A*- CVA)

A cseresznye vírus A a Betaflexiviridae családon belül a *Capillovirus* nemzetséghez tartozik. A vírus genomja pozitív egyszálú RNS molekula, mely két átfedő ORF régióba rendeződik (8. ábra). Az ORF1 régió kódolja az RNS függő RNS polimerázt és a köpenyfehérjét. Az ORF2-ről a mozgási fehérje expresszálódik (Jelkmann 1995, Gao et al. 2017).

A vírust először Németországban azonosították 1995-ben (Jelkmann 1995). Azóta a világ számos országában kimutatták, főként meggy és cseresznye ültetvényeken, ritkábban előfordul azonban más *Prunus* nemzetséghez tartozó fajban, így szilvában, őszi-, és kajsziarackban is. Bár vegetatív szaporítással a CVA könnyen átvihető az egészséges növényekbe, nagymértékű elterjedésének ellenére rovar vektorai egyelőre nem ismertek (Gao et al. 2017).

Jelenleg nincs bizonyíték arra, hogy a vírus jelenléte a vizsgált egyedekben kapcsolatban állna a gazdanövényen megfigyelt tünetekkel. Ennek megállapítása azonban nem egyszerű, mert a CVA-t a legtöbb esetben más kórokozókkal együtt azonosították a mintákból (Marais et al. 2012). Jelkmann kutatócsoportja például LChV-1 által fertőzött cseresznyefákban írta le először a vírust, de a tünetek és a CVA jelenléte között összefüggést nem tudtak kimutatni (Jelkmann 1995). Az általánosan elfogadott álláspont jelenleg az, hogy a Cherry Virus A a gazdanövényben látens, azonban nincs kizárva, hogy egyes izolátumok az erre fogékony növényben tüneteket okozhatnak (Marais et al. 2012).



8. ábra

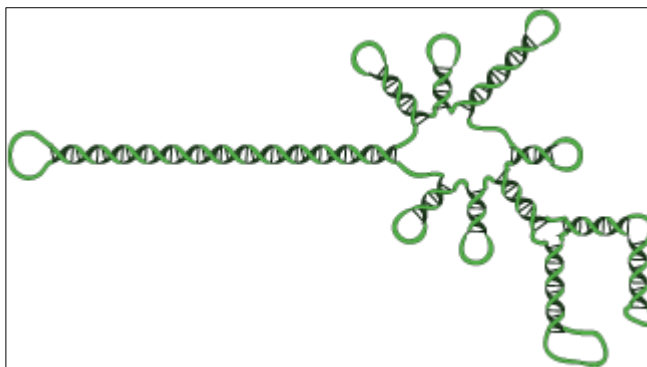
A *Capillovirus* nemzetség jellemző szerkezete és genomszerveződése. Fent: Envelope nélküli fonalas pálcika. Lent: A lineáris ssRNS(+) genom. (forrás: ViralZone.expsy.org, 2018)

2.2.5. Őszibarack látens mozaikosság viroid (*Peach latent mosaic viroid- PLMVd*)

Az őszibarack látens mozaik viroid okozta megbetegedést először Franciaországban 1976-ban figyelték meg olyan szaporítóanyagokon, melyek Japánból és Amerikából származtak (Desvignes 1976). A fertőzés legtöbbször tünetmentes, de okozhat levélfoltosodást, mozaikosságot, a virágoknál csíkos mintázatot, valamint albinizmust (10. ábra). A rügyfakadás és termésérés késleltetett, előfordulhat rügyelhalás, és legrosszabb esetben a legyengített fák idő előtti öregedése (Flores et al. 2006).

Korábban azt gondolták, hogy a viroid kizárólagos gazdája az őszibarack, azonban szilvában, cseresznyében és kajszibarackban is detektálták már (Boubourakas et al. 2009).

A kórokozó a *Pelamoviroid* nemzetséghez tartozik az *Avsunviroidae* családon belül. Genomja egyetlen cirkuláris RNS, mely 336-351 nukleotidból áll, konformációja kiágazó hurkokat tartalmaz (9. ábra). A PLMVd



9. ábra

Az Avsunviroidae családra jellemző cirkuláris ssRNS genom (forrás: ViralZone.expasy.org, 2018).

horizontálisan terjeszthető például vegetatív szaporítással, vagy levéltetvek által, de vertikálisan, magon keresztül nem jut át az embrióba, és pollen útján sem terjed (Flores et al. 2006).



10. ábra

A PLMVd jellegzetes tünetei. A bal felső képen a levél mozaikosságát láthatjuk. A tőle jobbra lévő képen megfigyelhető a felső virágok rózsaszín elszíneződése az alsó, egészségesekéhez képest. A bal alsó kép felső sorában az egészséges gyümölcsök láthatók, alatta az elszíneződött példányok. A jobb alsó kép bal oldalán látható kerekded magok fertőzött gyümölcsökből származnak, a jobb oldaliak az egészségesek (Flores et al. 2006).

2.3. A növények védekezése

A növények a legtöbb esetben képesek kivédeni a vírusok káros hatásait, melynek mértéke függ a növény fogékonyságától, valamint attól, hogy a kórokozó képes-e átjutni a természetes fizikai barrieréken. A vírusok indukálta növényi válaszreakció a specifikus vírusfelismerés, melynek során a patogén kódolta virulencia faktorokat a növényi sejtek felismerik. Ennek következménye a hiperszenzitív vagy nekrotikus immunválasz kialakulása a megtámadott sejtekben, mely a védekezésben szerepet játszó hormonok (szalicilsav, jázmonsav, nitrogén-oxid) szintjére hat, vagy reaktív oxigénformák képződését indítja el a szövetekben. Sejt szinten a stresszindukció a kalciumion homeosztázis változását idézi elő, melynek következtében megváltozik a membránpotenciál, így annak permeabilitása is. Ezek a hiperszenzitív reakciók a vírusok terjedésének megakadályozásában játszanak szerepet. Eredményesen csak azok a vírusok képesek megfertőzni a gazdanövényt, melyek rendelkeznek nem felismerhető virulencia faktorokkal (Pallas & García 2011, Mandadi & Scholthof 2013).

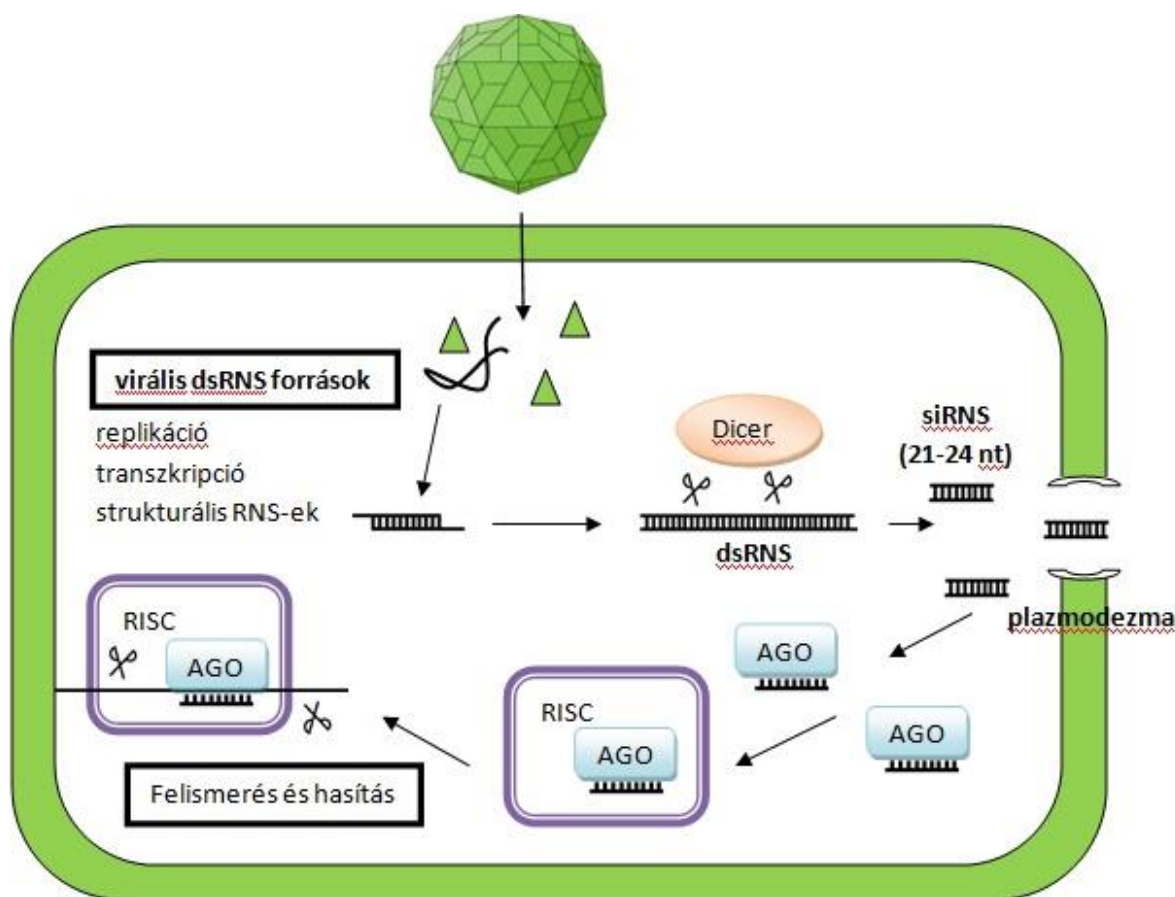
A magasabb rendű növények képesek megvédeni magukat a vírushatásokkal szemben az RNS interferencia alapú védekező folyamataik által (Ding & Voinnet 2007). Az RNS interferenciához kapcsolódó legismertebb publikáció Andrew Fire és Craig Mello munkájához köthető, akik az RNS interferencia felfedezéséért 2006-ban fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat kaptak (Fire et al. 1998).

A vírusok elleni védekezés során működő RNS interferencia alapvetően két részre bontható (11. ábra). A vírusok replikációja során keletkező kétszálú RNS-t a növény felismeri, és 21-24 nukleotid hosszú kis interferáló RNS (small interfering RNA, siRNS) molekulákra hasítja. A folyamathoz nélkülözhetetlenek az RNázIII enzimek közé sorolt, endonukleáz aktivitással rendelkező Dicer molekulák. Második lépésként a siRNS-ek egy multiprotein komplexbe (RNS induced silencing complex, RISC) épülnek, mely egy nukleáz aktivitással rendelkező, központi Argonauta (AGO) fehérjét tartalmaz. A RISC a siRNS-sel komplementer molekulákat képes felismerni, és azt hasítani vagy transzlációját gátolni, ezzel az RNS interferenciát megvalósítani. A folyamat eredményeként a virális RNS-ek működésképtelenné válnak (Hammond 2005).

Felmerül a kérdés, hogy ha a növények kifejlesztettek egy ilyen hatékony védekezési mechanizmust a vírusok ellen, hogyan lehetséges, hogy a vírusok mégis képesek szaporodni és elterjedni a növényekben? Nem sokkal Fire és Mello felfedezése után publikálták, hogy

egyes vírusok az antivirális csendesítést hatástalanító fehérjét, úgynevezett VSR-eket (viral suppressor of RNA silencing) képesek termelni. Ez bizonyítja, hogy az RNS interferencia egy természetes és hatékony, vírusok elleni védekező rendszer a növényekben, mely a kórokozókat evolúciós nyomás alá helyezi (Anandalakshmi et al. 1998; Burgyán & Havelda 2011).

A Closteroviridae család néhány törzsénél már leírtak VSR funkciójú fehérjét. Ennek analógiájaként egy görög kutatócsoport megvizsgálta a LChV-1 p21 fehérjét, és azt tapasztalták, hogy tranziens tesztekben ez a molekula VSR-ként működik (Katsiani et al. 2017). Funkciója feltételezhetően a siRNS-ek nagy affinitással való kötése, még mielőtt a RISC-be épülnének. Ennek eredményeként a növényben olyan fejlődési rendellenességek lépnek fel, melyek jellemzően vírusfertőzésre utalnak (Ye & Patel 2005, Dolja et al. 2006). Ezt a fontos megfigyelést szeretnénk tovább vizsgálni kísérleteink során.



11. ábra
Az RNS interferencia folyamata növényi sejtben.

2.4. A vírusok terjedésének korlátozása

2.4.1. Növényvédelmi szabályozások

A gyümölcsfák fajtahűségének megőrzése érdekében az egyedeket vegetatív úton szaporítják, így a vírusok szaporítóanyaggal történő terjedésének kockázata nő, melyet az országok közötti kereskedelem fel is gyorsíthat. Ennek megelőzése céljából, nemzetközi együttműködéssel létrejöttek olyan növényvédelmi szabályzatok, melyek elsősorban arra irányulnak, hogy kizárják a kórokozókat azokról a földrajzi területekről, ahol korábban nem ismerték őket. Ez vonatkozik azokra a területekre is, ahol a betegség előfordulhat, de terjedése korlátozott. A szabályozások régióként eltérőek lehetnek.

Hazánk az European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO) szervezetével működik együtt növényvédelmi kérdésekben. Az EPPO javaslatot tesz bizonyos patogének korlátozására, melyet az adott ország a saját körülményeinek figyelembe vételével mérlegel és végrehajthat. Az EPPO útmutatót kínál a növényi szaporítóanyag minősítéséhez, egyes vírusok esetében javasolja a fertőzött növények eliminálását az ültetvényről, vagy ezek karantén alá helyezését, szabályozza a rovar vektorok elleni inszekticidek használatát, valamint a vírusmentes szaporítóanyag-előállításához és rezisztencianemesítéshez nyújt segítséget (Barba et al. 2015).

2.4.2. Az általános tanúsítási eljárás

A szaporítóanyag vegetatív előállítása során fontos a növények egészséges állapotának fenntartása és a fajtahűség. A tanúsítás biztosítja ennek teljesülését. Az eljárás régióként bizonyos eltéréseket mutat, általános lépései azonban mindenütt megegyeznek, ezek az alábbiak:

A minőségi követelményeknek megfelelő növényegedek kiválasztása: Ez kizárólag agronómiai szempontból történik, a jelöltek egészségi állapota általában nem ismert.

A genetikai állomány fenntartása: A kiválasztott fajtaegedeknek a potenciális veszélyt jelentő kórokozóktól mentesnek kell lennie. Minden egyes növényt az előírt diagnosztikai módszerekkel kell a vírusokra tesztelni. A vizsgált növényeket izolátorházakban tartják fenn, hogy megelőzzék a rovarvektorok által terjesztett megbetegedéseket, és gyakran egyéni konténerben nevelik őket, hogy fonálférgektől mentes talajt biztosítsanak a növényeknek (12. ábra).

A szaporítóanyag előállítása: A vírusmentesnek bizonyult fajtát vegetatívan szaporítják a lehető legkevesebb lépésben a fertőzések elkerülése végett. *In vitro* mikroszaporítás is alkalmazható a folyamat gyorsítása érdekében. Az előállított szaporítóanyagot továbbra is izolált körülmények között kell fenntartani.

A növények minősítése: Azok a növények, melyek nem mutatnak tüneteket minőségromlást okozó betegségekre, illetve ezek előállítása során szigorúan követték az előírásokat, hivatalos tanúsítványt kapnak (Barba et al. 2015).



12. ábra
Kajsi izolátorház Újfehértón
(fotó: Baráth Dániel, 2016).

2.4.3. A szaporítóanyagok előállításának szabályozása hazánkban

Hazánkban a növényfajták állami elismerését, valamint a szaporítóanyagok előállítását és forgalomba hozatalát a 2003. évi LII. törvény szabályozza. A törvény felhatalmazza a kormányt, hogy rendeletben megállapítsa a szaporítóanyag-minősítés eljárási rendjét, a szaporítóanyag-előállításnak személyi és tárgyi feltételeit, és jelölje ki a növénytermesztési hatóságot. Erre hivatkozva született meg a 14/2017. (III. 23.) FM rendelet a gyümölcs szaporítóanyagok előállításáról és forgalomba hozataláról, mely szerint az ellenőrzési és minősítési feladatokat a NÉBIH, a növénytermesztési hatáskörben eljáró járási hivatal, valamint növény- és talajvédelmi hatáskörben eljáró járási hivatal látja el (2003. LII. 30.§).

A rendeletben megszabják, hogy a szaporítóanyagot olyan rovarmentes létesítményben kell fenntartani, mely biztosítja a légbeli vektorok általi vagy bármely egyéb lehetséges forrásból eredő fertőzéstől való mentességet (14/2017. (III. 23.) 8. § 1. bekezdés). Továbbá

rendelkeznek arról is, hogy a már minősített anyanövényeket és szaporítóanyagot olyan földterületeken kell fenntartani, amelyek el vannak szigetelve a légbeli vektorok vagy a gyökerekkel való érintkezés által előidézett fertőzés, a gépek vagy az oltáshoz használt eszközök révén bekövetkező keresztfertőzés potenciális forrásaitól és bármely egyéb lehetséges fertőzésforrástól (14/2017. (III. 23.) 8. § 8. bekezdés).

Ugyanezen rendelet 7. §-ából általam kiemelték szerint a certifikációs rendszerben történő szaporítóanyag akkor minősíthető, ha az anyanövény megfelel a fajta leírásának, és ez ellenőrzésre került; illetve megfelel az egészségi állapotra vonatkozó követelményeknek.

A termelői nyilvántartásra vonatkozó jogszabályokat, vizsgálatköteles károsítókat, a fertőzött növények megsemmisítését, valamint a szaporító- és ültetvényanyagok vizsgálatát a 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet a növény-egészségügyi feladatok végrehajtásának részletes szabályairól írja elő.

2.5. A vírusdiagnosztikai módszerek áttekintése

A vírusok elleni védekezés legfontosabb eleme a megelőzés, a patogének időben történő felismerése és azonosítása. Ennek egyik módja a biológiai diagnosztika, mely során a vírus-gazdanövény interakciót folyamatosan megfigyelik, és a kialakult tünetek alapján következtetnek a kórokozó jellegére. A vizsgálathoz gyakran alkalmaznak a feltételezett patogénre fogékony indikátornövényt (Barba et al. 2015).

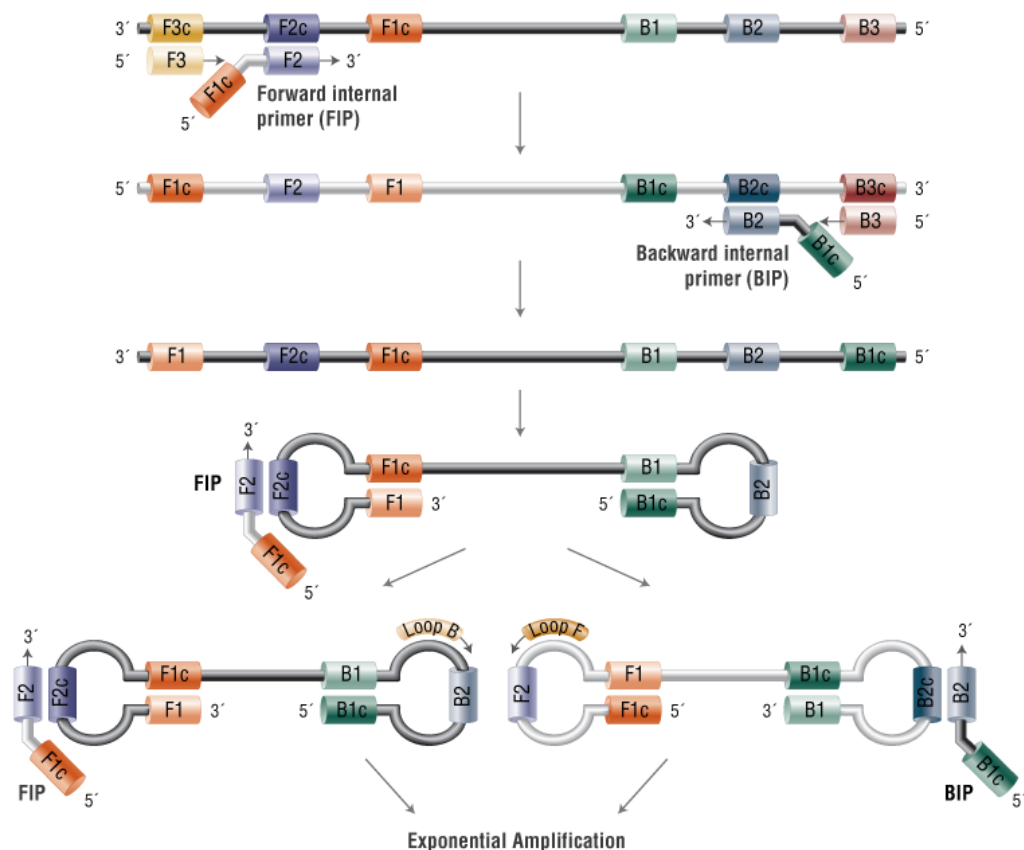
A további növényi vírusdiagnosztikai módszerek ezzel szemben molekuláris módszereken alapulnak, melyek a vírus valamely fehérjéjének vagy nukleinsav szekvenciájának ismeretét feltételezik. Az ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) alkalmazása a PPV detektálására 1977-ben Clark és Adams által hatalmas áttörés volt a vírusdiagnosztikában, mely teljesen új távlatokat nyitott a vírustesztek fejlődésében. A módszer lényege a specifikus antigén-antitest kapcsolat kialakulása egy szilárd hordozó felületen, melynek létrejöttét színváltozás jelzi. Ez a legszélesebb körben alkalmazott diagnosztikai eljárás, mert gyors, könnyen kivitelezhető, és azonnal értelmezhető eredményt ad. Az eljárás költséges része a viroidok és vírusokból származó fehérjék, például a köpenyfehérje tisztítása a mintából, valamint az ennek megfelelő antiszérum előállítása (Boonham et al. 2014, Barba et al. 2015).

A másik elterjedt, vírusok detektálását lehetővé tevő módszer a PCR (Polymerase Chain Reaction). Ez az ELISA-val szemben sokkal érzékenyebb eljárás, mert a kórokozók nukleinsav szekvenciájának amplifikációján alapul, valamint kis mennyiségű DNS is elegendő a sikeres reakcióhoz. Minden PCR teszthez szükség van templát DNS-re. Mivel a legtöbb növényi vírus RNS genommal rendelkezik, első lépésként reverz transzkripcióval létre kell hozni az ennek megfelelő, komplementer DNS (cDNS) szálát, melyről PCR termék keletkezhet. Amennyiben rendelkezésünkre áll a vírus genomjának bázissorrendje, arra specifikus oligonukleotid szekvenciákat (primereket) tudunk tervezni, melyek kiindulópontjai lesznek a DNS polimeráz által katalizált lánchosszabbításnak. Agaróz gélelektroforézissel ellenőrizhetjük, hogy a kívánt fragmentumot sikerült-e amplifikálni, illetve jelen van-e a vizsgált mintában (Garibyan & Avashia 2013).

A PCR egyik továbbfejlesztett változata a kvantitatív PCR (qPCR), melynek alkalmazása során a kívánt termék jelenléte és mennyisége már a reakció közben, valós időben meghatározható. A sokszorozítani kívánt DNS szakaszra leggyakrabban egy komplementer Taqman próbát terveznek, mely a fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer elvén lehetővé teszi, hogy a Taq polimeráz működése során keletkező termékről fluoreszcens jelet kapjunk (Boonham et al. 2014).

Egy másik, gyakran használt módszer a multiplex PCR, mely alkalmas arra, hogy egy mintát egyszerre több vírusra teszteljünk különböző primerpárokat alkalmazva. Előnye, hogy időtakarékos, de optimalizálása nehézségekbe ütközhet, és gyakori a nem specifikus termék keletkezése (Garibyan & Avashia 2013).

A PCR hatékony diagnosztikai módszer, de a készülék drága, ezért igény van olyan tesztekre, melyek kisebb beruházást igényelnek, illetve terepen is elvégezhetők. A LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) megfelel ennek az elvárásnak, és a módszer másik előnye, hogy denaturálás nélkül is képes a kívánt szakaszt amplifikálni, így a teljes reakció egy hőmérsékleten játszódhat le, mely körülbelül 65°C. A folyamathoz 6 nukleinsav szakaszra terveznek primereket, még hozzá úgy, hogy a szintetizálódott termékekben önkomplementer régiók keletkezzenek, így ezek hurok struktúrákat formálnak (13. ábra). Ezáltal lehetővé válik, hogy a lánchosszabbítás ne csak a 3' végekről indulhasson el, hanem a hurkokról is, melynek köszönhetően a folyamat kevesebb, mint 30 perc alatt lejátszódhat (Notomi et al. 2000, Boonham et al. 2014).



13. ábra

A LAMP vázlatos rajza

(forrás: <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification>, 2018).

Az említett diagnosztikai módszerek mindegyike valamilyen előzetes ismeretet igényel a vírusok azonosításához (fehérje, nukleinsav szekvencia), azonban előfordulhat, hogy a tüneteket olyan patogén okozza, melyről nem rendelkezünk semmilyen információval.

A 2000-es évek elején kifejlesztettek egy olyan metagenomikai módszert, mely lehetővé teszi a vizsgált mintában lévő összes élőlény detektálását. Az újgenerációs szekvenálási technikák (Next-generation sequencing, NGS) a hagyományos diagnosztikai módszerekkel szemben, nem igényelnek előzetes szekvencia ismeretet a vizsgált szervezetről (Barba et al. 2013).

A növényi vírusdiagnosztikában hatalmas áttörést jelentett az RNS interferencia révén keletkezett virális kis RNS-ek újgenerációs szekvenálása, mellyel lehetőségünk nyílik egy

adott növényi mintában jelenlévő összes vírus detektálására. A módszer nagy előnye a hagyományos szekvenálási technikákhoz képest, hogy egyszerre nagy mennyiségű olvasatot (read-et) képez (Barba et al. 2013, Hadidi et al. 2016). A növényi vírusdiagnosztikában először 2009-ben alkalmazták új vírusok azonosítására (Kreuze et al. 2009). Innentől kezdve az újonnan leírt növényi vírusok száma ugrásszerűen nőtt, ez többek között annak is köszönhető, hogy az NGS ára jelentősen csökkent. Az NGS technológiát növényi vírusok esetében különböző törzsek elkülönítésére, karakterizálására, mutációk feltárására, szisztémás terjedés feltérképezésére, evolúciós kutatásokra, és egyéb célú tanulmányokra alkalmazzák (Hadidi et al. 2016).

Számtalan előnye mellett az újgenerációs szekvenálásnak hátránya, hogy a kapott, nagy mennyiségű szekvencia összeillesztése és azonosítása kihívást jelent különösen az új vírusok esetében. Több szoftvercsomag is rendelkezésünkre áll az adatok kielemezésére, de ezek mindegyike egyféle funkcióra specializálódott, például szekvencia illesztés vagy polimorfizmus vizsgálat (Barba et al. 2013), de integrált megoldás még nem született a felmerülő igények kielégítésére. A jelenlegi álláspont szerint tehát nem az a kihívás a jövőre nézve, hogy az NGS rendszereket tökéletesítsük, hanem a keletkezett adatmennyiséget képesek legyünk feldolgozni, és szakszerűen elemezni, az erre alkalmas szoftverek fejlesztésével (Boonham et al. 2014).

3. Anyag és módszer

3.1. A növényi minták

A kísérletek alapjául szolgáló levélminták a NAIK Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet ceglédi és újfehértói izolátor házaiban nevelt kajszibarack fajtajelöltekről származnak (14. ábra). A 2016 októberében gyűjtött leveleket a négy égtájnak megfelelően az ágak közepéről szedte a csoport. További mintagyűjtés történt 2016-ban Balatonvilágoson, Toyesi fajtáról. Felhasználásig minden mintát $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk.



14. ábra

Tüneteket mutató kajszibarack levelek az újfehértói izolátorházban
(fotó: Baráth Dániel, 2016).

3.2. RNS kivonás

Az RNS kivonást Gambino optimalizált módszerével végeztük (Gambino et al. 2008). Ehhez 150 mg levélmintát használtunk fel egyedenként az alábbiak szerint: A leveleket folyékony nitrogénnel lehűtött dörzscsészében homogenizáltuk, majd $17\text{ }\mu\text{l}$ β -merkaptoetanolt és $850\text{ }\mu\text{l}$ $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on előmelegített CTAB tartalmú extrakciós puffert adtunk hozzá. Eppendorf csövekbe öntöttük át a mintákat, majd erős vortexelést követően 10 percig $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben ráztattuk. Hozzáadtunk $850\text{ }\mu\text{l}$ jégen tartott kloroform-izoamilalkoholt, erősen rázva kevertük, majd 10 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk (10000 rpm).

Új Eppendorf csövekbe pipettáztunk $800\text{ }\mu\text{l}$ kloroform-izoamilalkoholt és ráértük a felülúszót a lefugált mintákról. Intenzív keverés után ismét 10 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk ($10\text{ }000\text{ rpm}$). Új csövekbe $250\text{ }\mu\text{l}$ 9M -os LiCl-et mértünk, és hozzáadtunk $450\text{ }\mu\text{l}$ felülúszót. Óvatosan döntögetve kevertük, majd 30 percig jégen tartottuk. Ezt követően 20 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk (13000 rpm). A felülúszót leöntöttük, és a csapadékra $450\text{ }\mu\text{l}$ $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra

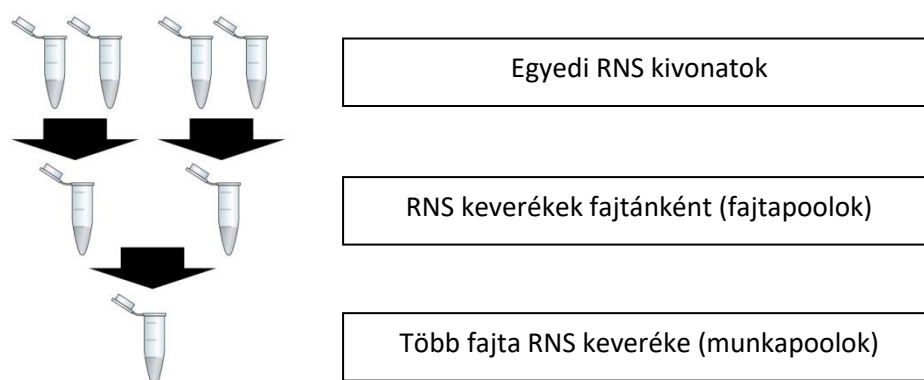
felmelegített SSTE-t pipettáztunk. Vortexelés után 450 µl kloroform-izoamilalkoholt adtunk hozzá, majd döntögetve kevertük és 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk (10000 rpm).

Új csövekbe 280 µl izopropanolt és 30 µl 4M-os nátrium-acetátot mértünk, melyre 400 µl felülúszót pipettáztunk. Óvatos átforgatást követően 5-10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Centrifugáltuk 20 percig 4 °C-on (13 000 rpm), majd a felülúszót leöntöttük. A csapadékhoz 1 ml 70%-os etanolt adtunk, és 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk (13000 rpm). Az alkoholt leöntöttük a mintákról és 10 percig SpeedVac-ben szárítottuk őket. Végezetül az RNS-t 25 µl steril (MQ) vízben visszaoldottuk, és a koncentrációkat Nanodrop készülékkel megmértük.

Mintánként 3 µl visszaoldott RNS-t FDE festékkel megfestettünk, és 1,2%-os agaróz gélen ellenőrző elektroforézist végeztünk.

3.3. RNS keverék készítése

A nagy mintaszám könnyebb és gyorsabb feldolgozása végett a kivont RNS-ekből az adott fajtaikat tartalmazó keveréket, fajtapoolt készítettünk, majd a minták koncentrációinak figyelembe vételével további, több fajtaikat tartalmazó keveréket készítettünk, és az így kapott munkapoolokkal dolgoztunk tovább (15. ábra). Az egyedi RNS-eket tovább tároltuk, hogy később a vírusok jelenlétét kimutató teszteket az adott fajtára, és egyedre is elvégezhessük.



15. ábra
Az RNS keverékek készítése.

3.4. RT-PCR alapú vírustesztek

A vírusok jelenlétének kimutatására szolgáló PCR tesztek elvégzéséhez a kajszi levelekből kivont RNS keverékekről cDNS-t kell előállítani. A templátként szolgáló RNS kivonatok koncentrációit a mellékletben található táblázatokban foglaltam össze (37-41. táblázat).

A reverz transzkripciót a Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-jével végeztük. Ehhez mintánként 0,5 µg RNS-t használtunk fel, majd hozzámértünk 0,25 µl random primert és annyi MQ vizet, mely az elegyet 3 µl végtérfogatra egészítette ki. Vortexeltük, centrifugáltuk és 5 percig 65 °C-os vízfürdőben inkubáltuk a csöveket. Ezután jégre helyeztük őket és közben összemértük a reakcióhoz szükséges keveréket az alábbiak szerint: 5x reakció pufferből 1 µl-t, 10mM dNTP-ből 0,5 µl-t, Ribolock RNáz inhibitorból 0,25 µl-t és RevertAid reverz transzkriptáz enzimből szintén 0,25 µl-t mértünk össze. A már denaturált és jégen tartott mintákhoz hozzámértünk ebből a keverékből 2-2 µl-t. A reverz transzkripció során a mintákat termosztátban inkubáltuk, 10 percig 25 °C-on, 60 percig 42 °C-on, 10 percig 45 °C-on, majd a reakciót 10 perc 70 °C-on való inkubálással állítottuk le. Az elkészült cDNS-eket 10x-esére hígítottuk, -20 °C-on tároltuk és RT-PCR alapú vírusdiagnosztikai tesztekhez használtuk fel.

3.4.1. Vírus-specifikus PCR

A PCR vizsgálatokhoz az irodalomban publikált, vagy saját tervezésű vírus-specifikus primereket használtuk. A primereket a kutatócsoport a korábbi kisRNS könyvtárak szekvencia elemzései, és az adatbázisban található vírusvariánsok szekvenciája alapján tervezte (16. táblázat).

A reakcióhoz szükséges reakciólegyet az alábbiak szerint mértük össze:

MQ: 9,4 µl

Thermo Scientific 5X Phire Green Reaction Buffer: 3 µl

Forward primer (10 µM): 0,75 µl

Reverz primer (10 µM): 0,75 µl

10mM dNTP: 0,3 µl

Thermo Scientific Phire Hot Start II DNA Polymerase (1u/50 µl): 0,3 µl

Templát (10x cDNS): 0,5 µl

Összesen: 15 µl

A folyamat a következő protokoll szerint zajlott:

98 °C	30 mp		
98 °C	10 mp	}	40x
hibridizációs			
hőmérséklet	10 mp		
(15. táblázat)			
72 °C	20 mp		
72 °C	1 perc		

16. táblázat

Vírus-specifikus primerek az RT-PCR tesztekhez

Vírus	Gén	Hossz (bp)	Primer	Szekvencia (5'- 3')	Hibridizációs hőmérséklet (°C)
Cherry Virus A	<i>mp</i>	1392	CVAMP-Fm (5400)	ATGTCGATCATACCA GTYAAG	62
			CVAMP-Rm (6791)	TTACCTTCTGCACCA ACYAC	
Plum Pox Virus	<i>cp</i>	243	PPV_P2 (9292)F	CAGACTACAGCCTCG CCAGA	62
			PPV_P1 (9534)R	ACCGAGACCACTACA CTCCC	
Little Cherry Virus-1	<i>hsp70</i>	796	LChV1_9493F	GTTGTTAGATTCCGTC ATTAR	51
			LChV1_10288R	CAGTCGAACTACCAA GCGTTC	
Peach Latent Mosaic Viroid	teljes genom	337	PLMVd_F (117-141)	CCCGATAGAAAGGCT AAGCACCTCG	58
			PLMVd_R (92-116)	AACTGCAGTGCTCCG AATAGGGCAC	
Prunus Necrotic Ringspot Virus	<i>cp</i>	384	PNcpinF	GAGTATTGACTTCAC GACCAC	56
	<i>cp</i>		PNcpR	CTTTCCATTTCGGAGA AATTTCG	

mp= movement protein (a mozgási fehérjét kódoló gén), *cp*= coat protein (a köpenyfehérjét kódoló gén), *hsp70*= heat shock protein (a hősokk fehérjét kódoló gén)

A PCR termékeket a megfelelő pozitív kontrollal együtt (17. táblázat) 1,2%-os agaróz gélen elektroforetikusan választottuk el.

17. táblázat

Az RT-PCR vírusesztekhez alkalmazott pozitív kontrollok forrása

Vírus	+ Kontroll
Cherry Virus A	Pannónia kajszibarack
Plum Pox Virus	Tuleu gras szilva
Little Cherry Virus-1	Magyar kajsz
Peach Latent Mosaic Viroid	Cresthaven őszibarack
Prunus Necrotic Ringspot Virus	Velencei virológiai állomáson mintázott tünetes kajsz

3.5. Northern-blot analízis

Az RT-PCR eredmények megerősítésére northern-blot hibridizációt végeztünk a CVA és a PLMVd esetében. A folyamat a következők szerint történt:

Denaturáló gél készítése az RNS mintákhoz.

1,35 g agarózt 66 ml steril vízzel forraltunk, majd körülbelül 60 °C-ra visszahűtöttük. 9 ml 10X MAE-t és 15 ml formaldehidet egy mérőhengerbe öntöttünk. Miután a gél lehült, hozzáöntöttük ezt az oldatot. Így 90 ml denaturáló gél készítettünk, melyet tiszta tálcába öntöttünk, behelyeztük a fésűt, és hagytuk megszilárdulni.

A minták előkészítése és elválasztása.

9 µl RNS preparátumhoz 31 µl mintakezelőt adtunk, mely 1 mintára számolva 4 µl 10X MAE-t, 7 µl formaldehidet és 20 µl formamidot tartalmazott. Ezt az adott mintaszámmal megszoroztuk. A mintakezelőhöz 1 µl etídium-bromidot adtunk. Vortexeltük, majd néhány másodpercig centrifugáltuk. A mintákhoz 2 µl FDE festéket adtunk, majd 65 °C-on 15 percig denaturáltuk őket. Ha a gél megszilárdult, a mintákat felvittük a zsebekbe, és 1X MAE pufferben 90V-on 2-3 órán át elektroforetikusan választottuk el. Ennek eredményét UV fény alatt ellenőriztük.

Blottolás.

Első lépésben a membránt (Hybond N) olyan méretre vágtuk, mely lefedte a gél zsebek alatti részét a felvitt minták teljes szélességében. Ezt 20X SSC oldattal átitattuk. A felületet az alábbiak szerint készítettük elő: Egy üveglapra 2 szűrőpapírt helyeztünk, melyek végükön 20X SSC oldatba értek. Majd egy 20X SSC oldatba merített szűrőpapírt buborékmentesen ráhelyeztük az előzőekre. Erre tettük rá a gél, és oldalról fóliával leszigeteltük, hogy ne száradjon ki a felület. A géltre ráigazítottuk a membránt, szintén figyelve arra, hogy ne maradjon levegő közöttük. A membránra további 3 réteg szűrőpapírt helyeztünk, majd nagy mennyiségű papírtörölővel és az erre fektetett nehezékekkel biztosítottuk, hogy a minták a kapillárishatás elvén a gélről a membránra kerüljenek. A blottolás egy éjszakán át zajlott.

UV fixálás és prehibridizáció.

A folyamat előkészítése során bekapcsoltuk a 65 °C-os termosztátot, melyben a 2X SSC oldatot és a prehibridizációs puffert felmelegítettük. A mintákat UV crosslinkerben rögzítettük a membránhoz. A fixálás után 30 percig 2X SSC-ben 65 °C-on mostuk a membránt, hogy az esetlegesen nem hozzákötődött RNS-t eltávolítsuk. Ezt követően a membránt 1 órán keresztül 65 °C-on a prehibridizációs folyadékban inkubáltuk. Ez idő alatt elkészítettük a hibridizációhoz szükséges, radioaktívan jelölt próbát.

Próba készítése.

A próbához templátként a CVA esetében Pannónia fajtából készült mintát, PLMVd vizsgálathoz pedig Cresthaven fajtájú őszibarack mintát használtunk. A reakciót a Thermo Scientific Decalabel DNA Labeling Kit segítségével végeztük. 1,5 ml Eppendorf csőbe összemértünk 5 µl 5X reakciópuffert, 19 µl steril vizet és 1 µl templátot. 10 perc 100 °C-os hőkezelést követően pár percig jégen tartottuk. A következő lépésben hozzáadtunk 1,5 µl MIX C keveréket (mely nem tartalmaz dCTP-t), 0,5 µl Klenow polimerázt és 3 µl radioaktívan jelölt dCTP-t. 37 °C-on egy órán át inkubáltuk. Ezt követően 2 µl dNTP-t adtunk a reakcióhoz, és újra 37 °C-on tartottuk 5 percig. Végül 90 °C-on 5 percig hőkezeltük és jégre helyeztük.

Hibridizáció, mosás.

Egy 14 ml-es Falcon csőbe kimértük a hibridizációs puffert, majd hozzáadtuk az elkészített próbát. Ezt a keveréket a membránt tartalmazó csőbe öntöttük. A hibridizáció egy éjszakán át 65 °C-on történt. Másnap 65 °C-on előmelegített 2X SSC és 0,1 %-os SDS oldattal mostuk a membránt. 4 éjszakai expozíciót követően a röntgen filmet előhívtuk.

3.6. A *Little Cherry Virus 1* p21 régiójának amplifikálása és klónozása

A LChV-1 egyik ORF régiója feltételezhetően az RNS interferenciát gátló silencing szupresszor fehérjét kódolja (Katsiani et al. 2017). Ez a szekvencia a kajszit fertőző vírustörzsekből nem ismert. A p21 fehérjét expresszáló gén amplifikálása és klónozása után célunk, hogy a szakaszt szekvenáljuk.

3.6.1. A p21 régióra tervezett primerek optimális annellálási hőmérsékletének megállapítása

A LChV-1 silencing szupresszor fehérjét kódoló régiójára tervezett primerpárnak gradiens PCR-relhatároztuk meg a kapcsolódási hőmérsékletét. Templátként a LChV-1 RT-PCR vírusesztekhez használt pozitív kontroll cDNS-t használtuk, mely 0,5 µg RNS felhasználásával készült. Összesen 50 µl térfogatú keveréket mértünk össze a reakcióhoz:

5X Q5 puffer	10 µl
10mM dNTP	1 µl
Forward primer (10 µM)	2,5 µl
Reverz primer (10 µM)	2,5 µl
Q5 polimeráz (2u/ µl)	0,5 µl
templát	1,5 µl
MQ víz	32 µl

Forward primer: LChV1_p21F (15328) 5'-STTYGCWWCKCAAGTDAGTAAG-3'

Reverz primer: LChV1_p21R (15998) 5'-ACTTCTACYTTAATGGTAACCTG-3'

Az összemért keveréket 10-10 µl-enként PCR csövekbe mértük szét, és öt lépcsős gradiens állítottunk be az alábbiak szerint:

98 °C	30 mp	} 40x
98 °C	10 mp	
1. 53,6 °C	} 20 mp	
2. 58,8 °C		
3. 63,8 °C		
4. 68 °C		
5. 70 °C		
72 °C	20 mp	
72 °C	2 perc	

Ellenőrzésként 1,2%-os agaróz gélre 5 µl mintát vittünk fel, melyet 6X DNS mintakezelővel festettünk meg és elektroforézissel választottuk el.

3.6.2. A p21 régió amplifikálása

A korábbi RT-PCR vírusesztekre LChV-1 pozitív, 10-szeresére hígított cDNS-ekből hármat kiválasztottunk, melyeket templátként használtunk: Magyar kajszi fajta az érdi törzsültetvényről, Ceglédi kedves fajta a Cegléd II izolátorházból és egy Újfehértói meggy fajtagyűjteményből származó minta. A primerek ugyanazok, melyeket a gradiens PCR-hez használtunk. A reakcióhoz a következő keveréket állítottuk össze:

Q5 Puffer 5X	15µl
10mM dNTP	1,5 µl
Forward primer (10 µM)	3,75 µl
Reverz primer (10 µM)	3,75 µl
Q5 polimeráz (2u/ µl)	0,75 µl
templát	1,5 µl
MQ	48,75 µl
<u>Összesen:</u>	75 µl

A PCR reakciót az alábbi beállítások szerint végeztük:

98 °C	30 mp	
98 °C	10 mp	} 40x
58,8 °C	20 mp	
72 °C	20 mp	
72 °C	2 perc	

Ellenőrzésként 1,2%-os agaróz gélre 5 µl mintát vittünk fel, melyet 6X DNS mintakezelővel festettünk meg és elektroforézissel választottuk el.

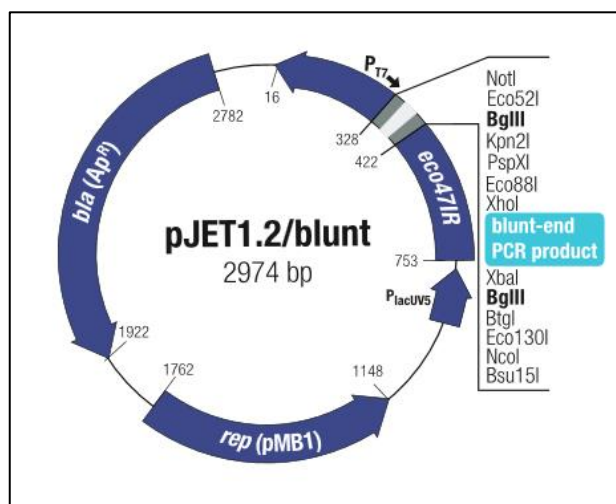
3.6.3. PCR termék tisztítása agaróz gélből

A sikeresen amplifikált PCR termékből 20 µl-t 1,2%-os agaróz gélen elválasztottuk. UV fény alatt steril szikével kivágtuk, és a Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) segítségével visszaizoláltuk a terméket a következőképpen: A kivágott gélhez 1:1 arányban Binding puffert adtunk és 65 °C-on 10 percig inkubáltuk. Vortexelést követően a feloldódott gél a tisztító oszlopra mértük, majd egy percig centrifugáltuk (13000 rpm) és a szűrletet eltávolítottuk. Az oszlopra 100 µl Binding puffert mértünk, újabb egy percig centrifugáltuk.

Ezt követően 700 µl Washing puffert mértünk hozzá és 2 percig centrifugáltuk. Az oszlopot tiszta, 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük és 20 µl elúciós pufferrel leoldottuk a DNS-t az oszlopról. A tisztítás hatékonyságát agaróz gélen való elválasztással ellenőriztük.

3.6.4. PCR termék vektorba ligálása

A tisztított DNS terméket a CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) segítségével vektorba ligáltuk. A reakcióhoz 3 µl tisztított PCR terméket, 0,5 µl pJET1.2 blunt klónozó vektort (18. ábra), 2X reakció puffert, 0,5 µl T4 ligázt és 1 µl MQ vizet mértünk össze, és 15 percig szobahőn inkubáltuk.



18. ábra

A pJET 1.2 blunt klónozó vektor térképe

(forrás: <http://abo.com.pl/pl/p/CloneJET-PCR-Cloning-Kit/14261>, 2018).

3.6.5. Ligálási reakció transzformálása *E. coli*-ba

A ligálási eleggyel 100 µl DH5α kompetens baktérium sejtet transzformáltunk. Első lépésként 5µl ligátumra ráértük a kompetens sejteket és 20 percig jégen inkubáltuk. 30 másodpercig 42 °C-on hő sokknak tettük ki őket, majd 0,5 ml SOC táptalajt mértünk hozzájuk. A sejtek regenerálása 37 °C-on 40 percig tartó rázatással történt. A szuszpenzióból steril fülke alatt 150 µl-t szélesztettünk LB és ampicillin tartalmú agarlemezre, melyet egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. A kinőtt baktérium kolóniák közül kiválasztottuk 4 telepet, és átoltottuk a fent említett összetevőket tartalmazó szilárd agarlemezre, továbbá ampicillines folyékony LB táptalajba.

3.6.6. Plazmidok tisztítása

A felszaporított plazmidokat a baktériumokból a NucleoSpin Plasmid DNA purification Kit-tel nyertük ki. A sejteket tartalmazó LB kultúrát centrifugáltuk 30 mp-ig (13000 rpm), a felülúszót eltávolítottuk. 250 µl A1 puffert adtunk az összegyűjtött baktérium sejtekhez és vortex segítségével reszuszpendáltuk. Ezután 250 µl A2 puffert adtunk hozzá és döntögetve kevertük, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az A3 pufferből 300 µl-t mértünk az elegyhez, óvatosan átforgattuk, majd 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót a Kit-ben található oszlopra mértük és 1 percig centrifugáltuk. 600 µl A4 pufferrel mostuk az oszlopot, 1 percig centrifugáltuk, majd a szűrletet eltávolítottuk. További 2 perc centrifugálást követően az oszlopot 1,5 ml-es csőbe tettük át, és 30 µl AE pufferrel eluáltuk a tiszta plazmidot.

3.6.7. Plazmidok restrikciós emésztése

A ligálás eredményességének ellenőrzéséhez a pJET konstrukciót XbaI és XhoI enzimekkel emésztettük. Ehhez 2 µl plazmidot használtunk fel, melyhez 10 µl 10X Tango Puffert, 0,4 µl XbaI és 0,2 µl XhoI enzimet, valamint 5,4 µl MQ vizet adtunk hozzá. Egy órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, az emésztett és emésztetlen mintákat 1,2%-os agaróz gélen választottuk el.

A kiválasztott pozitív klónok DNS szekvenciáját a BIOMI Kft. határozta meg Sanger szekvenálással.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. RNS kivonás, és keverékek készítése

Az RNS kivonást minden esetben (újfehértói és ceglédi izolátorházak, tüneteket mutató Toyesi fajta) a Gambino által kidolgozott protokoll szerint végeztük (Gambino et al. 2008). Az RNS koncentrációkat a mellékletben található táblázatokban foglaltam össze (37-41. táblázat).

Az egyedi RNS-ekből első lépésben fajtánként készítettünk keverékeket, majd a fajtakeverékekből egy újabb lépésben, több fajta RNS-ét tartalmazó keveréket készítettünk. Ezzel a vizsgálati mintaszámot csökkentettük.

Az RNS keverékek készítése a következő lépések szerint történt. Az egyedek RNS kivonatának koncentrációit NanoDrop berendezéssel megmértük. A fajtakeverékekhez minden esetben annyi egyedi kivonatot mértünk össze, hogy az 2 µg RNS-t tartalmazzon. A fajtakeverékek további összemérésekor azt vettük figyelembe, hogy mennyi mintát szeretnénk felhasználni egy keverékcsoporthoz elkészítéséhez. Amennyiben 4 vagy több fajtát szeretnénk volna összevonni, úgy 2-2 µg RNS-t használtunk fel a keverék készítéséhez, ennél kevesebb minta esetén 1-1 µg-ot.

Abban az esetben, amikor adott fajtából csak egy növény állt rendelkezésre, nem készítettünk keveréket, azonban a fajtakeverékek további összevonásakor ezek a minták is koncentrációjuknak megfelelően voltak reprezentálva. A balatonvilágosi Toyesi fajtáról egyetlen keverék készült, mely 4 levélminta RNS kivonatát tartalmazta (ez a 10. munkapool jelölést kapta).

Az alábbi táblázatokban (19-22.) összefoglaltam az izolátorházakban fenntartott, és általunk vizsgált kajszi fajtajelöltek adatait, valamint az RNS kivonatokból készített keverékek jelöléseit.

19. táblázat

Az Újfehértó II. izolátorház kajszi fajtajelöltjei, és a belőlük készült RNS kivonatok keverékeinek jelölései

Újfehértó II izolátorház			
A fa sorszáma	A fa fajtája	A fajtákból készült keverékek sorszáma (fajtapoolok, FP)	A fajtakeverékek összevonásának sorszáma (munkapoolok, MP)
KAH-15/1	Ceglédi bíbor	7	1
KAH-15/2			
KAH-15/3			
KAH-16/1	Bergeron	8	
KAH-16/2			
KAH-16/3			
KAH-17/1	Rózsakajsi	9	
KAH-17/2			
KAH-17/3			
KAH-18/1	Budapest	10	
KAH-18/2			
KAH-18/3			

20. táblázat

Az Újfehértó IV. izolátorház kajszi fajtajelöltjei, és a belőlük készült RNS kivonatok keverékeinek jelölései

Újfehértó IV. izolátorház			
A fa sorszáma	A fa fajtája	A fajtákból készült keverékek sorszáma (fajtapoolok, FP)	A fajtakeverékek összevonásának sorszáma (munkapoolok, MP)
KA-1/1	Roxana (2010)	1	2
KA-1/2			
IV/KA-2	Ceglédi kedves (2010)	nem készült keverék	
KA-3/1	Ceglédi kedves (2006)	2	
KA-3/2			
IV/KA-4/1	Ny. F.emléke	3	
IV/KA-4/2			
KA-5/1	Ceglédi szilárd	4	3
KA-5/2			
KA-6/1	Bukurija	5	
KA-6/2			
KA-7/1	C 1426 (2007)	6	
KA-7/2			

21. táblázat

A Cegléd II. izolátorház kajszi fajtajelöltjei, és a belőlük készült RNS kivonatok keverékeinek jelölései

Cegléd II. izolátorház			
A fa sorszáma	A fa fajtája	A fajtákból készült keverékek sorszáma (fajtapoolok, FP)	A fajtakeverékek összevonásának sorszáma (munkapoolok, MP)
1/1	Roxana (2010)	11	4
1/2			
2/1	Ceglédi kedves H-I. 6/42 (2010)	12	
2/2			
3/1	Ceglédi kedves H-I. 6/42 (2006)	13	
3/2			
4/1	Ny.F. emléke H-II. 25/65 (2005)	14	
4/2			
5/1	Ceglédi szilárd H-II. 20/6 (2005)	15	5
5/2			
6/1	Bukurija (2005)	16	
6/2			
7/1	C 1426 (2007)	nem készült keverék	
8/1	Ny.F. emléke H-II. 25/65 (2010)	17	
8/2			
9/1	Ceglédi gömbölyű H-I. 5/50 (2010)	18	6
9/2			
10/1	Ceglédi szilárd H-II. 20/6 (2010)	19	
10/2			
11/1	Ceglédi zamatos H-II. 50/65 (2010)	20	
11/2			
12/1	Ceglédi napsugár H-II. 19/39 (2010)	nem készült keverék	

22. táblázat

A Cegléd III. izolátorház kajszai fajtajelöltjei, és a belőlük készült RNS kivonatok keverékeinek jelölései

Cegléd III. izolátorház			
A fa sorszáma	A fa fajtája	A fajtákból készült keverékek sorszáma (fajtapoolok, FP)	A fajtakeverékek összevonásának sorszáma (munkapoolok, MP)
13/1	Ceglédi napsugár	21	7
13/2	Ceglédi napsugár		
13/3	Ceglédi napsugár		
13/4	Ceglédi napsugár		
13/5	Ceglédi napsugár		
14/1	Ceglédi szilárd	22	
14/2	Ceglédi szilárd		
15/1	Mandulakajszi	23	8
15/2	Mandulakajszi		
15/3	Ceglédi bíbor	24	
16/1	Ceglédi bíbor		
17/1	Harmat	nem készült keverék	
18/1	Korai piros	nem készült keverék	
19/1	Bergeron	nem készült keverék	
20/1	Ceglédi piroska	nem készült keverék	9
21/1	Pannónia	nem készült keverék	
22/1	Roxana	25	
22/2	Roxana		
23/1	Ceglédi zamatos	nem készült keverék	

4.2. RT-PCR teszt vírus specifikus primerekkel

A kísérlethez először azokról az RNS keverékekről készítettünk cDNS átíratot, melyek a legtöbb egyed RNS-ét tartalmazták, tehát a munkapoolokról. Ezzel időt és energiát takaríthattunk meg, hiszen a későbbi kutatási lépések során elegendő volt azokat a keverékeket megvizsgálni egy adott vírus jelenlétére fajta szinten is, amelyek a keresett vírusra az első RT-PCR teszt során pozitív eredményt mutattak. A vizsgálathoz a korábbi táblázatok alapján következő munkapoolokat használtuk fel:

Újfehértó II izolátorház-1

Újfehértó IV izolátorház- 2,3

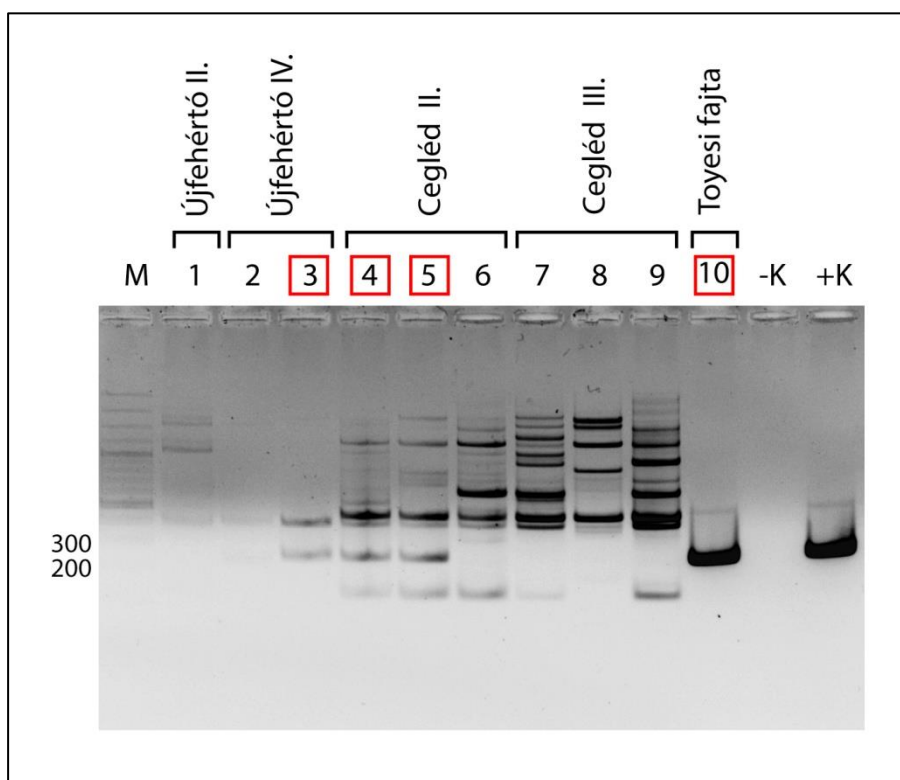
Cegléd II izolátorház- 4,5,6

Cegléd III izolátorház- 7,8,9

Toyosi kajsz-10

A 10 keverék 10-szeresére hígított cDNS-ével végzett RT-PCR eredményeket az alábbi ábrákon láthatjuk, melyek az agaróz gélen elválasztott, etídium-bromiddal festett DNS termékek képei UV fénnel megvilágítva. Markerként a Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS létrát használtuk.

A **PPV**-re végzett víruseszt esetében a 3,4,5 és 10 jelzésű keverékek esetében tudtuk a primerek által határolt, 243 bp hosszú nukleotid szakaszt amplifikálni. Ez azt jelenti, hogy az újfehértói IV. izolátorházban, a ceglédi II. izolátorházban és a Toyosi fajtában is jelen van a vírus (23. ábra).

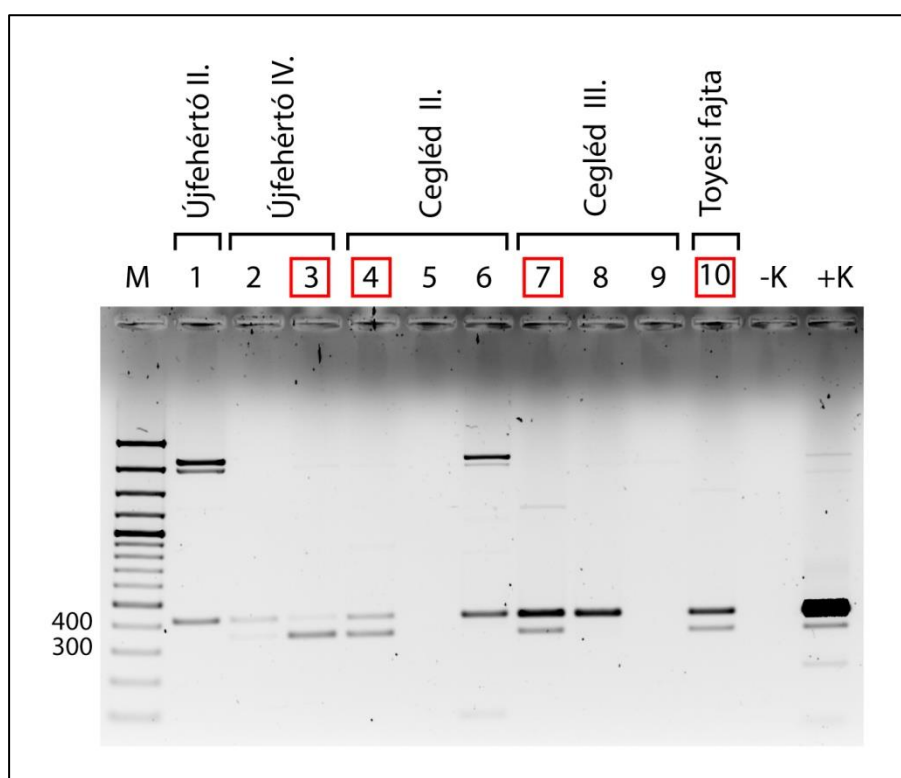


23. ábra

Az RNS keverékek RT-PCR tesztje *Plum pox virus*-ra. A köpenyfehérjét kódoló génszakaszra tervezett primer párokkal (PPV_P2 (9292) F- PPV_P1 (9534)R) amplifikált régió hossza 243 bp. A minták sorszáma jelöli a munkapoolokat.

Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll).

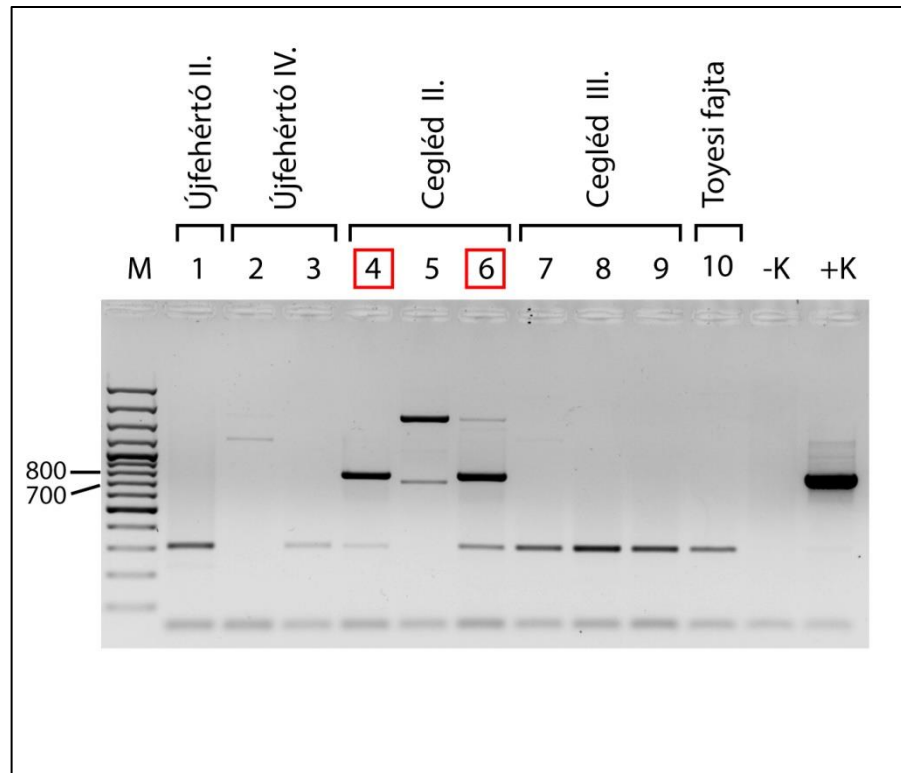
A **PNRsV** vizsgálat eredményét mutatja a 24. ábra, amin látható, hogy több minta esetében egy erős aspecifikus jelet kaptunk körülbelül 400 bp magasságban. A várt termékünk azonban 384 bp hosszú, így a tesztre pozitív eredményt a 3,4,7 és 10 keverékek mutattak. Ezek alapján az úfehértói IV. izolátorház, a ceglédi II. és III. izolátorház kajszai egyedei, illetve a Toyesi fajta fertőzött a vírussal.



24. ábra

Az RNS keverékek RT-PCR tesztje *Prunus necrotic ringspot virus*-ra. A köpenyfehérjét kódoló génszakaszra tervezett primer párokkal (PNcpinF - PNcpR) amplifikált régió hossza 384 bp. A minták sorszáma jelöli a munkapoolokat. Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll).

A **LchV-1** vizsgálat eredményeként, a vírus hsp70 hősokkfehérjét kódoló szakaszára tervezett primerek által felszaporított régiók a 4 és 6 jelölésű RNS keverékekről készült minták esetében jól detektálhatóak. Ezek alapján a vírus a ceglédi II. izolátorházban van jelen (25. ábra).

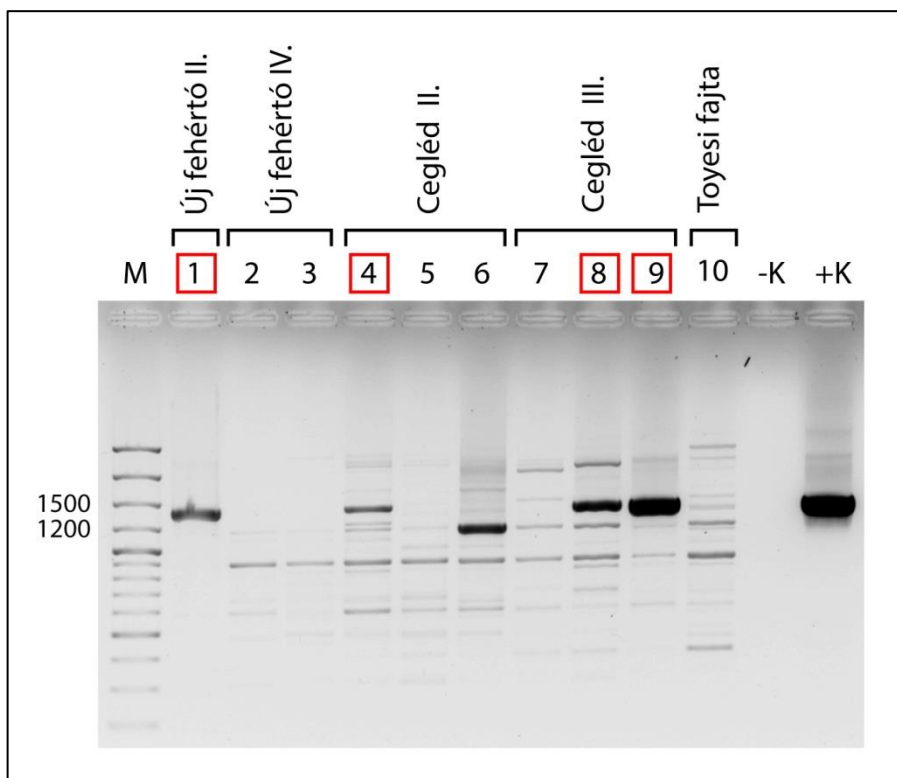


25. ábra

Az RNS keverékek RT-PCR tesztje *Little cherry virus 1*-re. A hsp70 hősokkfehérjét kódoló génszakaszra tervezett primer párokkal (LChV1_9493F-LChV1_10288R) amplifikált régió hossza 796 bp. A minták sorszáma jelöli a munkapoolokat. Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -K: negatív kontroll,

+K: pozitív kontroll).

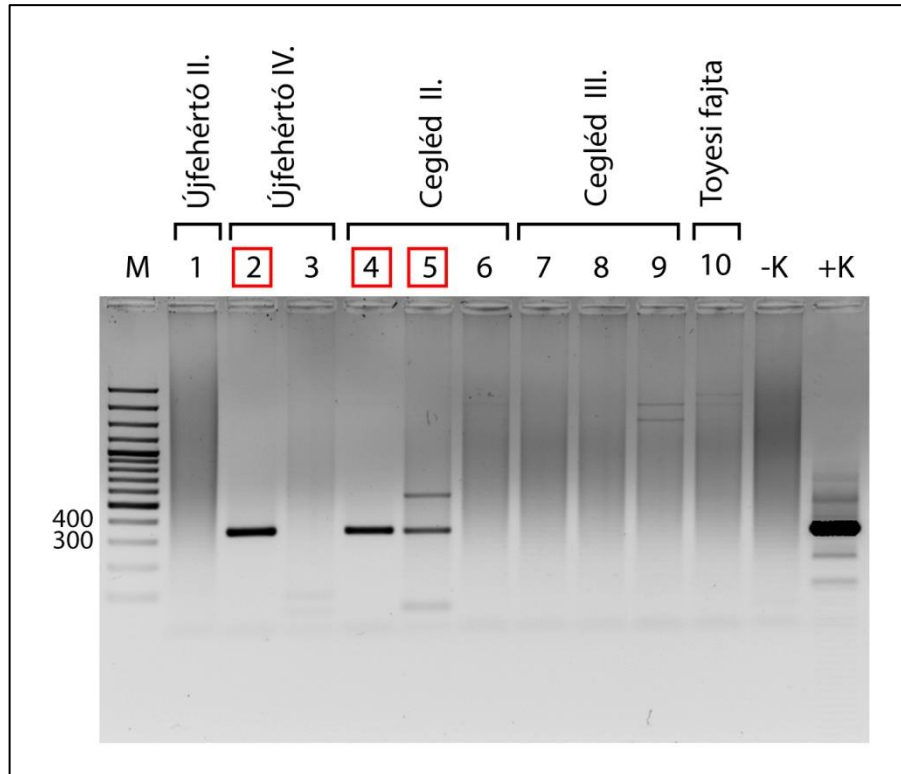
A CVA jelenlétének diagnosztikai vizsgálata során, a vírus mozgási fehérjét kódoló szakaszára tervezett primereket használtunk. Az RT-PCR eredményeként 1392 bp hosszú terméket vártunk. A gélelektroforézis alapján az 1,4,8 és 9 számozású keverékek tartalmazzák a vírust, tehát mindkét vizsgált ceglédi izolátorház, illetve az újfehértói II. izolátorház kajsziarackfái fertőzöttek (26. ábra).



26. ábra

Az RNS keverékek RT-PCR tesztje *Cherry virus A*-ra. A mozgási fehérjét kódoló génszakaszra tervezett primer párokkal (CVAMP-Fm (5400) - CVAMP-Rm (6791)) amplifikált régió hossza 1392 bp. A minták sorszáma jelöli a munkapoolokat. Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll).

A **PLMVd** teljes genomjának RT-PCR-rel történő amplifikálása során a 2,4 és 5 jelölésű minták mondhatók pozitívnak az elektroforézis gélkép alapján. Ennek értelmében az újfehértói IV. izolátorház és a ceglédi II. izolátorház egyedeiben van jelen a kórokozó (27. ábra).



27. ábra:

Az RNS keverékek RT-PCR tesztje *Peach Latent Mosaic viroid*-ra. A teljes genomra tervezett primerpárokkal (PLMVd_F (117-141)- PLMVd_R (92-116)) amplifikált régió hossza 337 bp. A minták sorszáma jelöli a munkapoolokat. Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll).

4.3. A fajtakeverékek RT-PCR vizsgálata

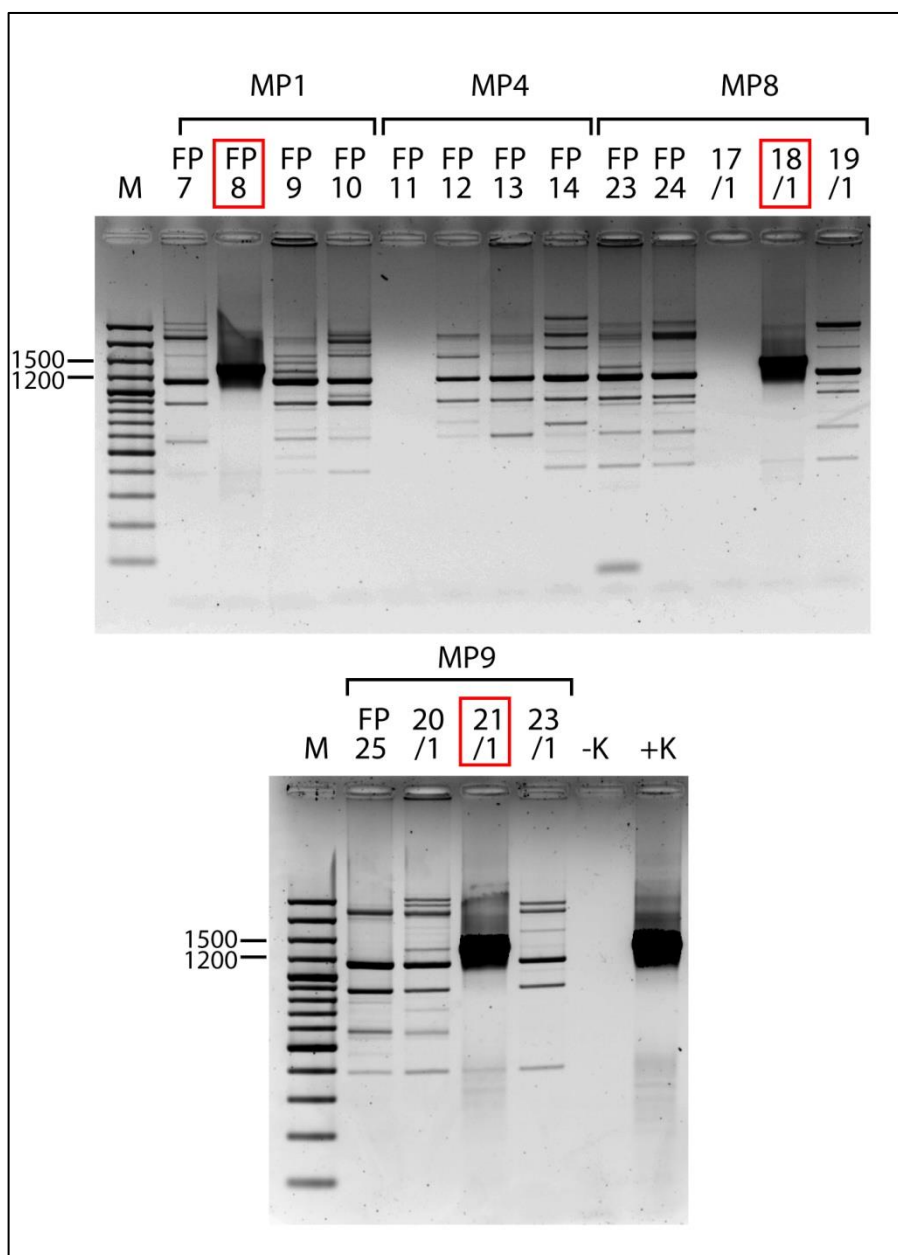
A munkapoolokat három esetben vizsgáltuk tovább: A LChV-1, CVA és PLMVd kórokozók általi fertőzésre pozitív eredményt mutató mintákat fajta szinten is ellenőriztük RT-PCR tesztel.

Döntésünket az alábbi indokokkal tudjuk alátámasztani. A CVA és LChV-1 vírusok jelenlétét Magyarországon először 2016-ban detektálta kutatócsoportunk a NAIK Érdi Kutatóállomásának kajszi izolátorházából és törzsültetvényéből, ezért fontos megvizsgálnunk, hogy a vírusok az ország más területein is jelen vannak-e (Czotter et al. 2017).

A PLMVd jellemzően őszibarack fajták megbetegedését okozó szubvirális ágens (Boubourakas et al. 2009). Magyarországon kajsziban még nem írták le, ennek ellenére az RT-PCR reakciók kimutatták jelenlétét az általunk tesztelt mintákban. Érdeemesnek tartottuk további vizsgálatokat végezni, hogy pontosabb képet kapjunk az izolátorházak fertőzöttségéről.

Ehhez a vizsgálatához újabb cDNS átiratokat készítettük azokról a fajtakeverésekről, melyek RNS-ét a korábban pozitív keverékek tartalmazták. A fajták tesztelése során ugyanazokkal a primerekkel és kontroll mintákkal dolgoztunk, mint amiket a munkapoolok RT-PCR reakcióinál alkalmaztunk.

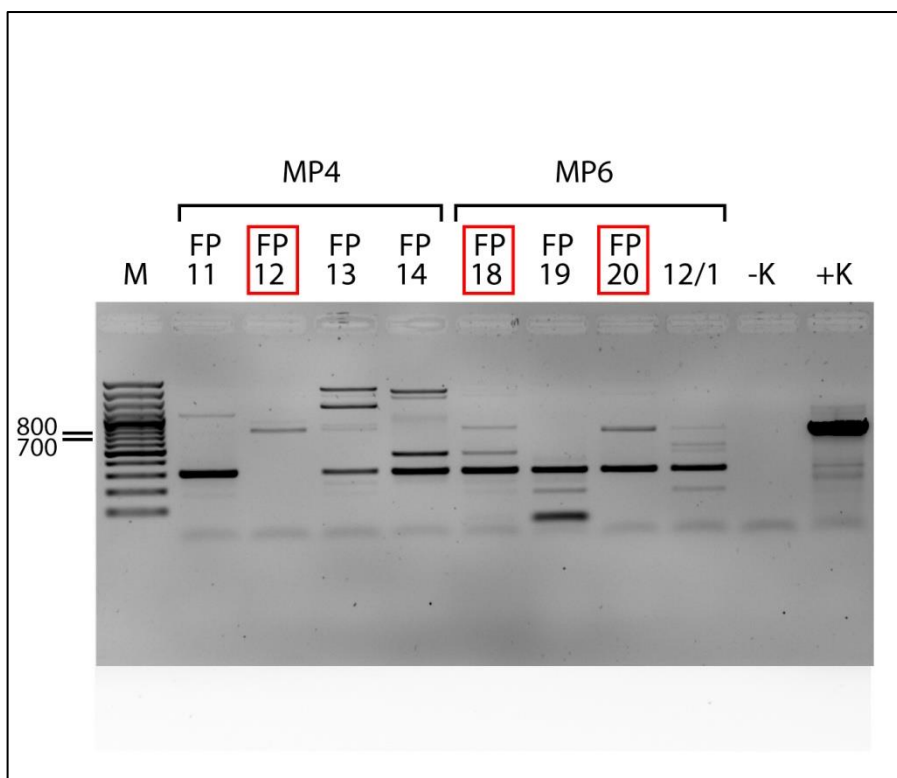
A fajtakeverékek CVA fertőzöttségére irányuló RT-PCR vizsgálat eredményeit a 28. ábrán láthatjuk. Eszerint a Bergeron (FP8), Korai piros (18/1) és Pannónia fajtákban (21/1) detektáltuk a vírust.



28. ábra

Az RNS fajtakeverékek RT-PCR tesztje *Cherry virus A*-ra. A mozgási fehérjét kódoló génszakaszra tervezett primer párokkal (CVAMP-Fm (5400) - CVAMP-Rm (6791)) amplifikált régió hossza 1392 bp. A minták sorszáma jelöli a fajtakeveréseket (FP), illetve a fa sorszámát, amennyiben arról nem készült keverék. Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll).

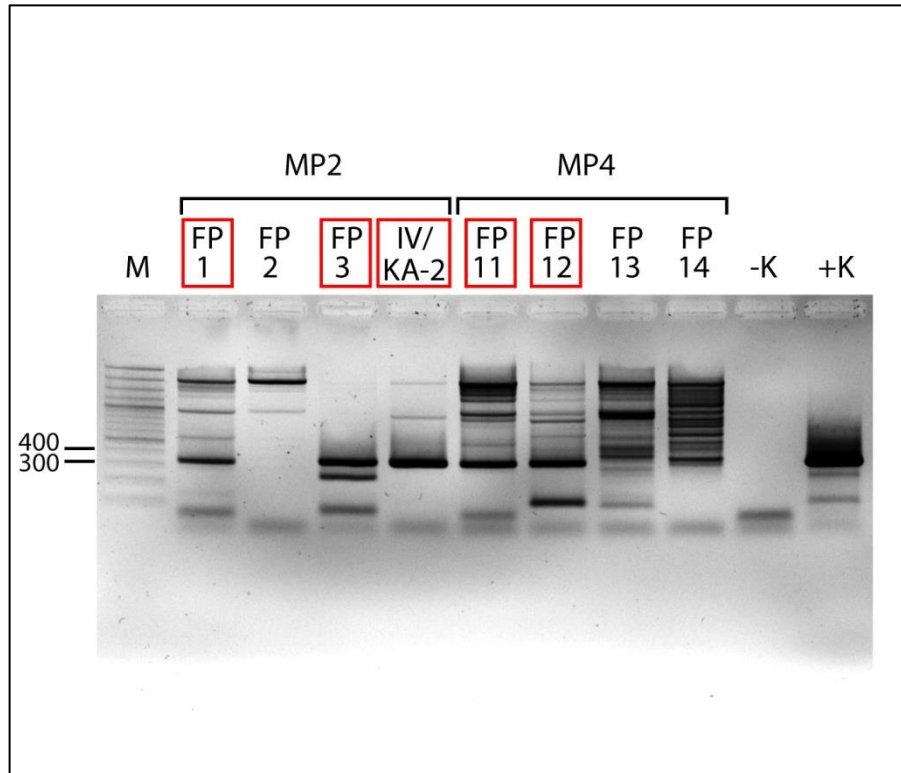
A **LChV-1** vizsgálat eredményét az alábbi gélelektroforézis fotón láthatjuk (29. ábra). Az amplifikált RT-PCR termékek közül a Ceglédi kedves H-I. 6/42 (2010) (FP12), Ceglédi gömbölyű H-I. 5/50 (2010) (FP18) és Ceglédi zamatos H-II. 50/65 (2010) (FP20) fajtákban jelen van a vírus.



29. ábra

Az RNS fajtakeverékek RT-PCR tesztje *Little cherry virus 1*-re. A hsp70 hősokkfehérjét kódoló génszakaszra tervezett primer párokkal (LChV1_9493F-LChV1_10288R) amplifikált régió hossza 796 bp. A minták sorszáma jelöli a fajtakeveréseket (FP), illetve a fa sorszámát, amennyiben arról nem készült keverék. Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll).

A fajtakeverékek **PLMVd**-re történő tesztelése során a Roxana (2010) (FP1), a Ny. F.emléke (FP3), Ceglédi kedves (2010) (IV/KA-2), Roxana (2010) (FP11) és a Ceglédi kedves H-I. 6/42 (2010) (FP12) fajták pozitívak a gélképen (30. ábra). A Roxana (2010) fajta tehát az Újfehértó IV. és a Cegléd II. izolátorházban is fertőzöttséget mutat.



30. ábra

Az RNS keverékek RT-PCR tesztje *Peach Latent Mosaic viroid*-ra. A teljes genomra tervezett primer párokkal (PLMVd_F (117-141)- PLMVd_R (92-116)) amplifikált régió hossza 337 bp. A minták sorszáma jelöli a fajtakeverékeket (FP), illetve a fa sorszámát, amennyiben arról nem készült keverék. Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll).

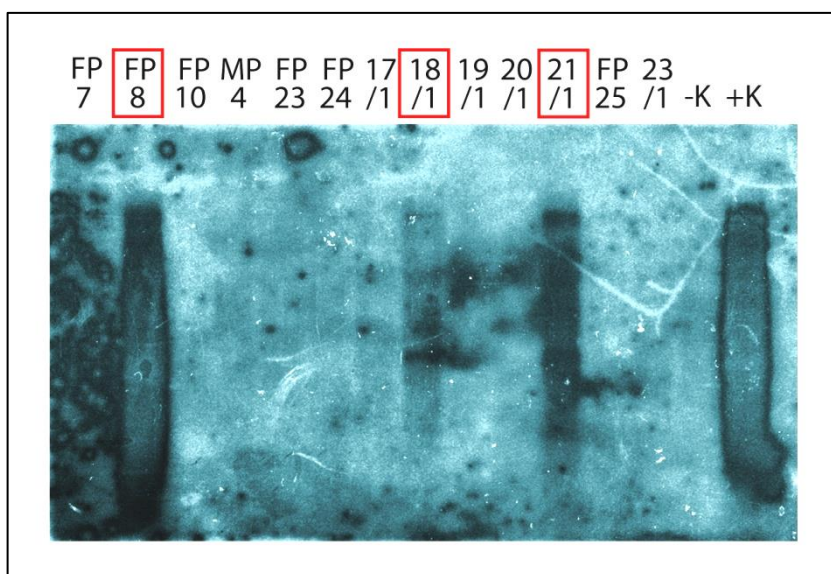
4.4. Northern-blot analízis

A CVA és a PLMVd esetében northern-blot analízist is végeztünk az RT-PCR tesztek megerősítésének érdekében. A PLMVd jelenléte a hazai kajszi fákban, valamint az izolátorházak CVA-val való fertőzöttsége új, és lényeges információ lenne a hazai növényvédelmi kutatások terén, ezért fontosnak gondoltuk, hogy az eredményeket más vírusdiagnosztikai módszerrel is alátámasszuk.

A northern-blot eredményeket autoradiográfia segítségével tettük láthatóvá. A filmet a membránnal (mely a radioaktívan jelölt próbával hibridizált RNS keverékeket hordozza) 4 éjszakán át exponáltuk -70 °C-on.

A CVA esetében a northern-blot eredmények teljes mértékben igazolják az RT-PCR-rel végzett kísérleteinket (31. ábra). Így nagy bizonyossággal megállapítható, hogy a Bergeron (FP8), Korai piros (18/1) és Pannónia (21/1) fajták valóban fertőzöttek a CVA-val, tehát az Újfehértó II. és Cegléd III. izolátorházakban a vírus jelen van.

Az MP4 számú keveréket az RT-PCR-el ellentétben itt nem vizsgáltuk fajta szinten, mert ehhez fajtánként elegendő RNS nem állt a rendelkezésünkre. Ez esetben az MP4-es keveréket vizsgáltuk.

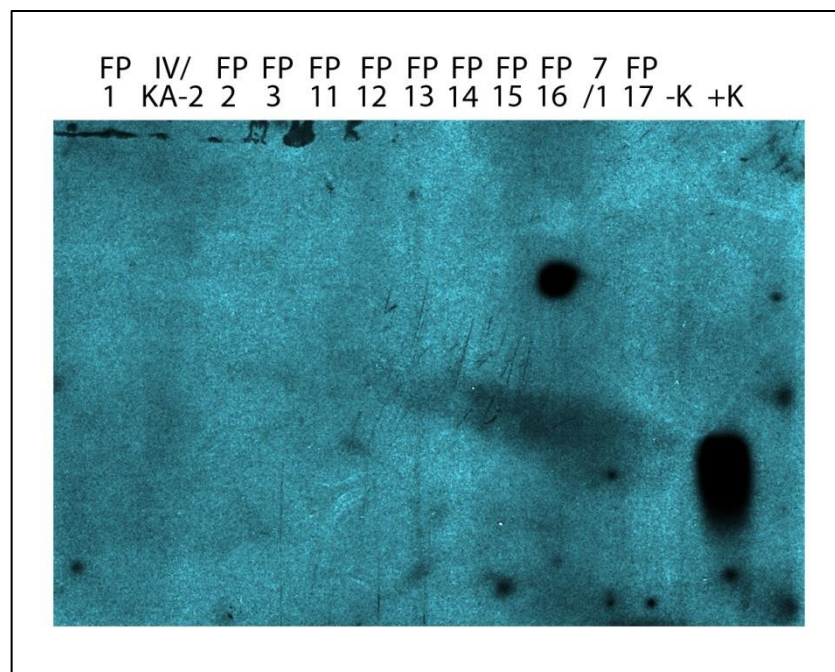


31. ábra

Az RNS fajtakeverékek northern-blot analízise *Cherry virus A*-ra. 4 éjszakás expozíció.

A minták sorszáma jelöli a fajtakeverékeket, illetve a fa sorszámát, amennyiben arról nem készült keverék. Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (-K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll).

A **PLMVd** fertőzöttség megerősítése érdekében végzett northern-blot kísérletben, az RT-PCR tesztre pozitív minták nem a várt eredményt mutatták. A + kontrollon kívül egyik sem hibridizált az általunk készített, radioaktív izotóppal jelölt próbával (32. ábra). Ennek lehet az oka, hogy a kajsziban a viroid sokkal kisebb mennyiségben van jelen, mint az elsődleges gazdájában, az őszibarackban. Azonban az a magyarázat is elképzelhető, hogy az RNS keverékekről készített cDNS, vagy az RT-PCR-hez használt reakcióelegy kontaminálódott a munkafolyamat során. E kérdés eldöntéséhez újabb kivonatokra és újabb tesztekre lesz szükség.



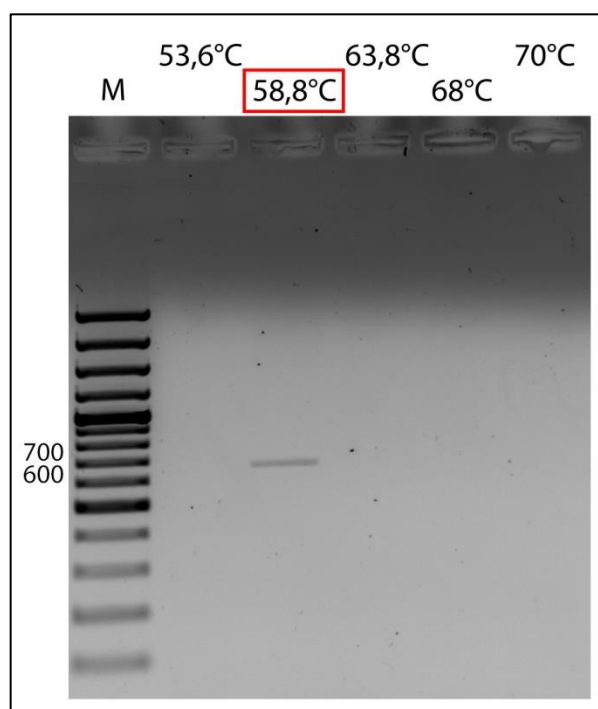
32. ábra

Az RNS fajtakeverékek northern-blot analízise *Peach latent mosaic viroid*-ra. 4 éjszakás expozíció. A minták sorszáma jelöli a fajtakeverékeket, illetve a fa sorszámát, amennyiben arról nem készült keverék. Pirossal vannak kiemelve a pozitív eredményt mutató minták (M: marker, -K: negatív kontroll, +K: pozitív kontroll).

4.5. A *Little Cherry Virus 1* p21 régiójának amplifikálása és klónozása

A LChV-1 kajszit fertőző törzsében a p21 régió szekvenciája nem ismert. Szeretnénk megvizsgálni, hogy a különböző gazdanövényrel rendelkező ágensek között mutatkozik-e eltérés ebben a kódoló szakaszban. Ennek megállapítására, első lépésként az RT-PCR tesztekhez pozitív kontrollként használt Magyar kajszi fajta cDNS-ét használtuk templátként.

Gradiens PCR-rel megállapítottuk a LChV1_p21F (15328)- LChV1_p21R (15998) primer pár optimális a hibridizációs hőmérsékletét (33. ábra). Ezzel a kapcsolódási hőmérséklettel végeztük a p21 fehérjét kifejező szakasz amplifikálását, melyhez templátként a Magyar kajszi fajtáról az érdi törzsültetvényről, a Ceglédi kedves fajtáról a Cegléd II izolátorházból és egy Újfehértói meggy fajtagyűjteményből származó mintáról készült cDNS-t használtunk. Ezek a mintáink, a korábbi PCR tesztekben mind LChV-1 pozitívak voltak.

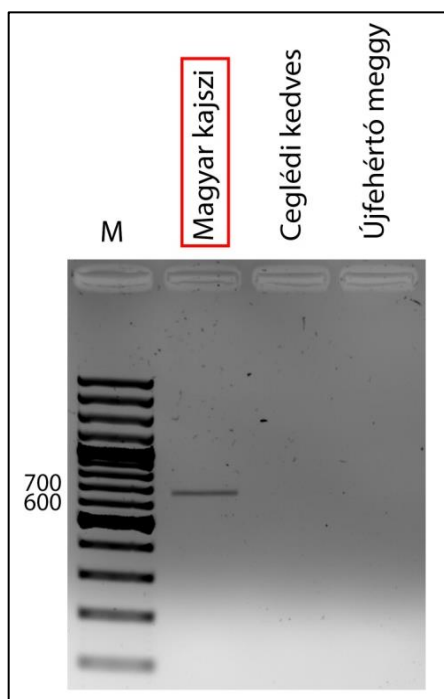


33. ábra

A gradiens PCR eredménye. Pirossal van bekeretezve a primer pár optimális kapcsolódási hőmérséklete.

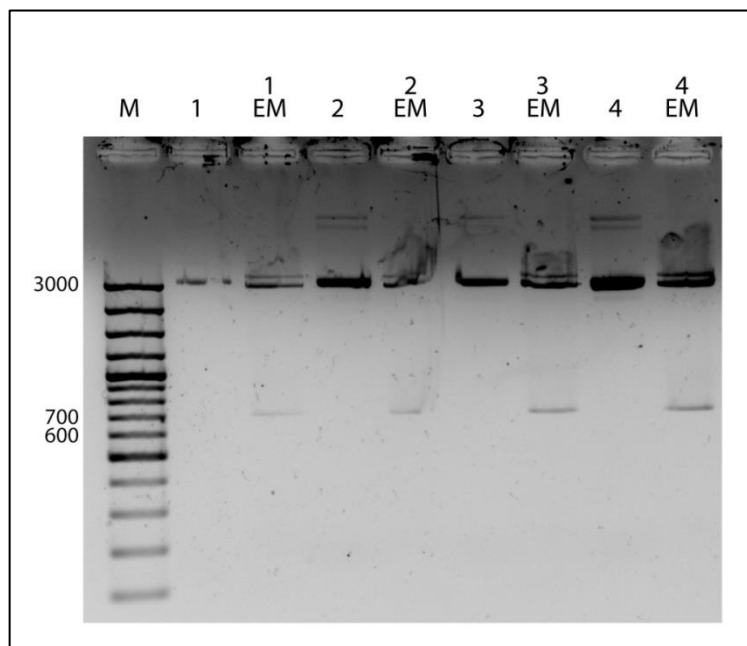
A reakció csak a Magyar kajszi fajta esetében működött, a többinél nem keletkezett PCR termék (34. ábra). Az amlifikált terméket tartalmazó reakcióelegyből 20 µl-t újra elválasztottunk gélelektroforézissel, és a megfelelő méretű, 671 bázispár hosszúságú frakciót visszaizoláltuk a gélből. A tisztított PCR terméket pJET1.2 blunt klónozó vektorba ligáltuk, majd a ligálási termékkel kompetens *E.coli* sejteket transzformáltuk. A szuszpenzióból agarlemezre szélesztettünk, és a vektort tartalmazó sejttelpekből 4-et új szilárd, illetve folyékony táptalajba oltottunk. A szilárd táptalajon lévő tenyészetet később is felhasználhattuk, amennyiben a kísérlet valamelyik fázisában szükségessé vált volna.

A folyékony sejttenyészetekből kitisztítottuk a klónozott terméket feltehetően tartalmazó plazmidokat. Ezeket a vektor klónozó helyén lévő restriktációs enzim hasítóhelyének megfelelő restriktációs enzimekkel (XbaI és XhoI) emésztettük, hogy a ligálás eredményességét ellenőrizzük. A reakcióelegyet elektroforetikusan elválasztottuk, és a gélképen láthatóvá váltak a vektorból kiemésztett DNS darabok (35. ábra). Mind a négy minta tartalmazta az inszertet, így ezeket elküldhettük szekvenálásra.



34. ábra:

A LChV-1 vírus p21 régiójának PCR eredménye. A várt termék csak a Magyar kajszi fajtánál keletkezett.



35. ábra:

A tisztított plazmidok restrikciós emésztése, agaróz gélen elválasztva. A számok a mintákat jelölik, az EM: emésztett plazmid. A 671 bp magasságnál a kiemésztett DNS darablátható, a pJET 1.2 klónozó vektor hossza 2974 bp.

4.5.1. A p21 fehérjét kódoló régió szekvencia elemzése

A kapott szekvenciákat az NCBI adatbázis referencia genomjaihoz hasonlítottuk. Mind a 4 esetben egyezést találtunk a LChV-1 ORF7-es régiójával. Ennek segítségével azt is megállapítottuk, hogy az inszert melyik orientációban épült be a vektorba. Mivel a szekvenálásnál használt primerhez képest ez fordított orientációban történt, a szekvencia reverz komplementerét kellett figyelembe vennünk a további elemzések során. Clustal Omega programmal szekvencia illesztést végeztünk a vizsgált DNS szakasz és a referenciagenom között. (36. ábra) Mind a 4 esetben azt tapasztaltuk, hogy a p21 fehérjét kódoló gén ATG transzlációs start kodonja helyett TTG triplettel kezdődik a szekvencia. Ennek alapján az általunk izolált és beépült DNS szakaszból nem keletkezhetne működőképes p21 fehérje.

LChV_1_ORF7	-----ATGTTACCTCAAGTTTGGAAATG
A68I3_p21_Fw#pJET_1.2	TACCGGAAAAAATTTTCCATGAACGAATTACGCAGTTTGTACCTCAAGTTTGGAAATG
A68I4_P21_FW#pJET_1.2	TACCGGAAAAAATTTTCCATGAACGAATTACGCAGTTTGTACCTCAAGTTTGGAAATG
A68I1_p21_Fw#pJET_1.2	TACCGGAAAAAATTTTCCATGAACGAATTACGCAGTTTGTACCTCAAGTTTGGAAATG
A68I2_p21_Fw#pJET_1.2	TACCGGAAAAAATTTTCCATGAACGAATTACGCAGTTTGTACCTCAAGTTTGGAAATG

36. ábra

A p21 fehérjét kódoló régiót tartalmazó plazmidok szekvenciáinak illesztése a referencia genomhoz.

5. Következtetések és javaslatok

Az újfahértói és ceglédi izolátorházak kajszi fajtajelöltjeivel végzett kísérletek kimutatták, hogy az általunk vizsgált öt vírustörzs közül egy vagy több minden izolátorházban előfordul. A vírusok közül a LChV-1, a PLMVd és a CVA fertőzőttséget fajta szinten is megvizsgáltuk, a CVA esetében northern-blot hibridizációval is alátámasztottuk eredményeinket. Az említett három vírus által okozott tünetek kajsziiban nem ismertek. Látens kórokozóként vagy kevert fertőzésben viszont hozzájárulhatnak a fák gyengüléséhez, vagy a termés romlásához. Ezért fontosnak tartjuk, hogy a jövőben az RT-PCR tesztekre pozitív fajtákat egyed szinten is megvizsgáljuk, hiszen a fertőzött egyedek vegetatív szaporításával fennáll e vírusok terjedésének veszélye. További célunk a jövőre nézve, hogy az egyes izolátorházakból gyűjtött mintákat újgenerációs szekvenálással is megvizsgáljuk, így szélesebb képet kaphatunk a vírusfertőzőttségről. Az ehhez szükséges kis RNS könyvtárakat már elkészítettük.

A Toyosi fajtán a levelek klorotikus elváltozását és a termésen megjelenő gyűrű alakú foltokat figyeltük meg. Az RT-PCR vizsgálatok PPV és PNRsV fertőzőttséget mutattak ki. Mivel a PPV egy EPPO listán szereplő karantén kórokozó, és a PNRsV súlyos termésvesztést okoz, javasolt a fertőzött egyedek eliminálása az egészséges fák védelme érdekében.

A LChV-1 p21 fehérjét kódoló gén amplifikálása és klónozása biztató eredményeket helyezett kilátásba, azonban a szekvencia-elemzés alapján kiderült, hogy a génről működőképes fehérje nem keletkezik. Ez több kérdést is felvet, többek között azt, hogy vajon a kajszi fertőző LChV-1 törzsekben működik-e egyáltalán ez a silencing szupresszor. Mielőtt messzemenő következtetéseket vonnánk le a kapott eredményekből, érdemes a kísérletet megismételni akár már a cDNS szintézistől kezdve. Amennyiben találunk olyan kajszi mintát, melyben a p21 fehérje működőképes, szeretnénk az expressziós mértékét összehasonlítani a más gazdanövényt fertőző LChV-1 törzsek p21 kifejeződésével, és megfigyelni, hogy ezek között van-e eltérés.

6. Összefoglalás

A gyümölcsfák vegetatív szaporítása az őket megbetegítő vírusok terjedésének veszélyét hordozza magában. Ezért kiemelten fontos feladat a szaporított fajták anyanövényeinek és utódainak növény-egészségügyi vizsgálata.

Kutatócsoportunk a NAIK újfehértói és ceglédi izolátorházaiban nevelt kajszai fajtajelöltek, valamint egy Balatonvilágosról származó fajta vírusdiagnosztikai vizsgálatát tűzte ki célul öt lehetségesen előforduló kórokozóra nézve. A begyűjtött levelek RNS kivonataiból a mintaszám csökkentése érdekében keverékeket készítettünk, és ezeket több lépésben vizsgáltuk. Először több fajtát tartalmazó RNS keverékek RT-PCR tesztjét végeztük el, melyből kiderült, hogy mely izolátorházakban van jelen a vizsgált vírus. Következő lépésben a pozitív eredményt mutató, több fajtát tartalmazó keverékeket fajta szinten is megvizsgáltuk. Ezek alapján megtudtuk, hogy mely fajták fertőződtek a kórokozóval. Egy vírus, a CVA esetében az RT-PCR tesztet northern-blot hibridizációval is megerősítettük. Az eredményeink rávilágítanak arra, hogy a hatóságok által kötelezően vizsgálandó vírusok mellett, olyan kórokozók is jelen lehetnek az izolátorházakban, melyeket korábban nem diagnosztizáltak.

A LChV-1 p21 fehérjét kódoló génjének izolálását és klónozását követően szeretnénk volna megtudni a szakasz szekvenciáját, ugyanis ez a kajszit fertőző LChV-1 törzsek esetében nem ismert. Hosszú távú célunk, hogy kiderítsük, a különböző gazdanövényeket fertőző törzsek p21 fehérje expressziója között van-e eltérés. Első eredményeink azt mutatják, hogy a Magyar kajszai fajtából izolált vírus ezen régiójáról nem keletkezik működőképes fehérje, mert az első triplet nem teszi lehetővé a transzláció elindítását. Az eredmény megerősítéséhez, és a következtetések levonásához további kísérletek elvégzése szükséges.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni dr. Várallyay Évának a kutatás szakmai vezetését, a feladataimhoz szükséges körülmények biztosítását, és a bizalmat, mellyel lehetőségem nyílt az önálló munkavégzésre és a gyakorlati tapasztalatok elsajátítására. Hálás vagyok a diplomadolgozathoz adott tanácsokért és javaslatokért, valamint a készséges és lelkiismeretes javításért.

Köszönöm Baráth Dánielnek és Demián Emesének a munkám során nyújtott segítséget, a gyakorlati tippeket, a megszerezett tapasztalataik továbbadását. Köszönöm a baráti jó tanácsokat, beszélgetéseket és támogatást.

Köszönöm dr. Kiss Erzsébetnek a dolgozat véglegesítéséhez nyújtott hatalmas segítségét, és javaslatait.

Hálás vagyok Molnár Dávidnak a folyamatos támogatásért és biztatásért, a képek szerkesztésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségért, és türelméért.

Irodalomjegyzék

- A. Katsiani, K. Katsarou, K. Kalantidis, N.I. Katis, V.I. Maliogka (2017) Identification of an RNA silencing suppressor encoded by the genome of Little cherry virus 1. 24th International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Thessaloniki, 2017 június 5-9.
- Anandalakshmi, R. et al., 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Genetics*, 95(October), 13079–13084.
- Anon, 2003. EPPO Standards Diagnostic protocols for regulated pests Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. *OEPP/EPPO Bulletin*, 33, 245–247 & 289–295.
- Barba, M., Czosnek, H. & Hadidi, A., 2013. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1), 106–136.
- Barba, M., Ilardi, V. & Pasquini, G., 2015. *Control of pome and stone fruit virus diseases* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.001>.
- Boonham, N. et al., 2014. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20–31. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>.
- Bos, L., 1982. Crop losses caused by viruses. *Crop Protection*, 1(3), 263–282.
- Boubourakas, I.N., Fukuta, S. & Kyriakopoulou, P.E., 2009. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 160(1–2), 63–68.
- Burgyán, J. & Havelda, Z., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science*, 16(5), 265–272.
- Czotter N., Varga T., Baráth D., Molnár J., Balássy J., Deák T., Tusnády G., Kocsis L., Preininger É., Burgyán J., and Várallyay É. (2017) NGS studies on fruit tree screenhouses and stock collections in Hungary 24th International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Thessaloniki, 2017 június 5-9.
- Ding, S.W. & Voinnet, O., 2007. Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell*, 130(3), 413–426.
- Dolja, V. V., Kreuze, J.F. & Valkonen, J.P.T., 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research*, 117(1), 38–51.
- Fire, a et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486653> <http://www.nature.com/nature/journal/v391/n6669/pdf/391806a0.pdf>.
- Flores, R. et al., 2006. Peach latent mosaic viroid: Not so latent. *Molecular Plant Pathology*, 7(4), 209–221.
- Gambino, G., Perrone, I. & Gribaudo, I., 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520–525.
- Gao, R. et al., 2017. Further insight into genetic variation and haplotype diversity of Cherry virus A from China. *PLoS ONE*, 12(10), 1–20.
- Gariyban, L. & Avashia, N., 2013. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- Gildow, F. et al., 2004. Plum pox in north america: identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. *Phytopathology*, 94(8), 868–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18943108>.

- Hadidi, A. et al., 2016. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–12.
- Hammond, S.M., 2005. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters*, 579(26), 5822–5829.
- Herranz, M.C. et al., 2013. A remarkable synergistic effect at the transcriptomic level in peach fruits doubly infected by prunus necrotic ringspot virus and peach latent mosaic viroid. *Virology Journal*, 10(1), 1. Available at: Virology Journal.
- Horváth József, Gáborjányi Richard (1999): Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó Kft., 332 p. 2-5.
- http1 Wolters Kluwer <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0300052.tv> (2018 március)
- http2 Wolters Kluwer <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=A0100007.FVM> (2018 március)
- http3 Wolters Kluwer
<https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=A1700014.FM×hift=ffffff4&txtreferer=00000001.TXT>
(2018 március)
- Jelkmann, W., 1995. herry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotids sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *Journal of General Virology*, 76(1995), 2015–2024.
- Jones, R.A.C., 2009. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research*, 141(2), 113–130.
- Kinoti, W.M. et al., 2017. Analysis of intra-host genetic diversity of Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) using amplicon next generation sequencing. *PLoS ONE*, 12(6), 1–21. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0179284>.
- Kreuze, J.F. et al., 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.024>.
- Mandadi, K.K. & Scholthof, K.-B.G., 2013. Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *The Plant Cell*, 25(5), 1489–1505. Available at: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.113.111658>.
- Marais, A. et al., 2012. Development of a polyvalent RT-PCR detection assay covering the genetic diversity of Cherry capillovirus A. *Plant Pathology*, 61(1), 195–204.
- Matic, S. et al., 2009. Production of antibodies to Little cherry virus 1 coat protein by DNA prime and protein boost immunization. *Journal of Virological Methods*, 155(1), 72–76.
- Notomi, T. et al., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), p.E63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871386>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC102748>.
- Pallas, V. et al., 2012. Ilarviruses of Prunus spp.: a continued concern for fruit trees. *Phytopathology*, 102(12), 1108–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23148725>.
- Pallas, V. & García, J.A., 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology*, 92(12), 2691–2705.

- Pesti M. (szerk.) (2001): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 308 p. 41-59.
- Rimbaud, L. et al., 2015. Sharka Epidemiology and Worldwide Management Strategies: Learning Lessons to Optimize Disease Control in Perennial Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 357–378.
Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-phyto-080614-120140>.
- Sheets, D. & Pests, Q., 1996. Cherry little cherry “virus.” *Europe*.
- Wang, J. et al., 2016. Complete nucleotide sequence of little cherry virus 1 (LChV-1) infecting sweet cherry in China. *Archives of Virology*, 161(3), 749–753.
- Ye, K. & Patel, D.J., 2005. RNA silencing suppressor p21 of Beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure*, 13(9), 1375–1384.

Mellékletek

37. táblázat

Az Újfehértó II izolátorház kajszi egyedeiből kivont RNS koncentrációk

Újfehértó II izolátorház					
A fa sorszáma	RNS koncentráció ng/μl	A fajtákból készült keverékek sorszáma (fajtapoolok, FP)	RNS koncentráció ng/μl	A fajtakeverékek összevonásának sorszáma (munkapoolok, MP)	RNS koncentráció ng/μl
KAH-15/1	224,5	7	195,0	1	99,6
KAH-15/2	194,9				
KAH-15/3	165,6				
KAH-16/1	120,0	8	96,0		
KAH-16/2	127,7				
KAH-16/3	40,2				
KAH-17/1	83,2	9	83,6		
KAH-17/2	13,9				
KAH-17/3	84,0				
KAH-18/1	214,6	10	138,7		
KAH-18/2	108,8				
KAH-18/3	92,7				

38. táblázat

Az Újfehértó IV izolátorház kajszi egyedeiből kivont RNS koncentrációk

Újfehértó IV. izolátorház					
A fa sorszáma	RNS koncentráció ng/μl	A fajtákból készült keverékek sorszáma (fajtapoolok, FP)	RNS koncentráció ng/μl	A fajtakeverékek összevonásának sorszáma (munkapoolok, MP)	RNS koncentráció ng/μl
KA-1/1	97,7	1	219,8	2	124,2
KA-1/2	341,9				
IV/KA-2	107,8	nem készült keverék			
KA-3/1	110,3	2	125,8		
KA-3/2	141,2				
IV/KA-4/1	158,0	3	158,2		
IV/KA-4/2	158,3				
KA-5/1	131,0	4	112,5	3	118,8
KA-5/2	94,0				
KA-6/1	165,6	5	143,7		
KA-6/2	121,8				
KA-7/1	153,5	6	129,3		
KA-7/2	105,1				

39. táblázat
A Cegléd II. izolátorház kajszi egyedeiből kivont RNS koncentrációk

Cegléd II. izolátorház					
A fa sorszáma	RNS koncentráció ng/μl	A fajtákból készült keverékek sorszáma (fajtapoolok, FP)	RNS koncentráció ng/μl	A fajtakeverékek összevonásának sorszáma (munkapoolok, MP)	RNS koncentráció ng/μl
1/1	195,8	11	158,15	4	127,2
1/2	120,5				
2/1	157,6	12	134,3		
2/2	111,0				
3/1	97,4	13	102,0		
3/2	106,5				
4/1	338,6	14	253,5		
4/2	162,3				
5/1	166,5	15	167,3	5	125,0
5/2	168,1				
6/1	114,1	16	112,4		
6/2	110,7				
7/1	132,2	nem készült keverék			
8/1	137,5	17	167,85		
8/2	202,2				
9/1	113,9	18	111,35	6	126,4
9/2	108,8				
10/1	134,9	19	167,5		
10/2	200,0				
11/1	81,2	20	124,5		
11/2	167,8				
12/1	265,7	nem készült keverék			

40. táblázat

A Cegléd III. izolátorház kajszi egyedeiből kivont RNS koncentrációk

Cegléd III. izolátorház									
A fa sorszáma	RNS koncentráció ng/μl	A fajtákból készült keverékek sorszáma (fajtapoolok, FP)	RNS koncentráció ng/μl	A fajtakeverékek összevonásának sorszáma (munkapoolok, MP)	RNS koncentráció ng/μl				
13/1	78,9	21	128,62	7	189,5				
13/2	117,9								
13/3	507,1								
13/4	275,3								
13/5	163,9								
14/1	211,2	22	273,1	8	124,9				
14/2	335,0								
15/1	161,2	23	130,75			9	137,6		
15/2	100,3								
15/3	155,8	24	156,8					9	137,6
16/1	157,8								
17/1	125,1	nem készült keverék		9	137,6				
18/1	163,6	nem készült keverék							
19/1	180,0	nem készült keverék							
20/1	126,7	nem készült keverék		9	137,6				
21/1	285,0	nem készült keverék							
22/1	141,7	25	124,85			9	137,6		
22/2	108,0								
23/1	143,1	nem készült keverék							

41. táblázat

A további felhasznált RNS kivonatok koncentrációi

Felhasznált növény	RNS koncentráció (ng/μl)
Magyar kajszi	275,1
Toyesi fajtakeverék	130,7
Újfehértó meggy (LChV-1 fertőzött)	110,0