

SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZ• GAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
NÖVÉNYVÉDELMI INTÉZET
NÖVÉNYORVOS SZAK

Meggyültetvények virológiai felmérése

Készítette:
Czakó Dávid Fidél

Konzulens:
Dr. Körösi Katalin
egyetemi adjunktus

Küls• konzulens:
Dr. Várallyay Éva
tudományos f• munkatárs
Baráth Dániel
tudományos segédmunkatárs

Intézetigazgató:
Dr. Kiss József
egyetemi tanár

GÖDÖLL•
2018

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1 A vírusok általános jellemzése	6
2.2 <i>Prunus</i> fajokat megbetegítő vírusok.....	12
2.3 Szaporítóanyag előállítás szabályozása hazánkban.....	14
2.4 Karanténvírusok jellemzése.....	14
2.4.1 Alma klorotikus levélfoltosság vírus (Apple chlorotic leafspot virus-ACLSV)	14
2.4.2 Alma mozaik vírus (Apple mosaic virus- ApMV)	15
2.4.3 Arabisz mozaik vírus (Arabis mosaic virus- ArMV)	15
2.4.4 Cseresznye zöld gyűrűsfoltosság vírus (Cherry green ring mottle virus- CGRMV)	16
2.4.5 Cseresznye levélsodródás vírus (Cherry leafroll virus- CLRV).....	16
2.4.6 Cseresznye nekrotikus rozsdaszínű foltosság vírus (Cherry necrotic rusty mottle virus- CNRMV).....	17
2.4.7 Cseresznye aprógyümölcs-ség vírus 1 és 2 (Little cherry virus-1 és 2- LChV-1 és 2).....	17
2.4.8 Cseresznye levélfoltosság vírus (Cherry mottle leaf virus- ChMLV).....	18
2.4.9 Szilva törpülés vírus (Prune dwarf virus- PDV).....	19
2.4.10 <i>Prunus</i> nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (Prunus necrotic ringspot virus- PNRSV)	19
2.4.11 Málna gyűrűsfoltosság vírus (Raspberry ringspot virus- RpRSV).....	19
2.4.12 Szamóca látens gyűrűsfoltosság vírus (Strawberry latent ringspot virus- SLRSV)	20
2.4.13 Paradicsom fekete gyűrűs vírus (Tomato black ring virus- TBRV).....	20
2.5 Cherry Virus A (CVA)	21
2.6 Gyümölcsfák biotesttelése	21
2.7 Újgenerációs szekvenálás	23
3. Anyag és módszer.....	24
3.1 RNS kivonás	24
3.2 Keverék készítése a kivont RNS-ekből	25
3.3 Az RNS kicsapása	25
3.4 cDNS szintézise.....	25
3.5 A cDNS minőségének ellenőrzése	26
3.6 Vírusok kimutatása RT-PCR-rel	27
3.7 kisRNS könyvtár készítése	29
3.7.1 3' és 5' adapter ligálása	30

3.7.2 Reverz transzkripció	30
3.7.3 PCR amplifikálás	31
3.8 Bioinformatikai elemzés	32
4. Eredmények	33
4.1 Újfehértói meggy minták vírusdiagnosztikája	33
4.1.1 Az újfehértói törzsültetvény vizsgálata	33
4.1.2 Újfehértói <i>in vitro</i> meggy fajtajelöltek vizsgálata	34
4.2 A NAIK GYKI érdi törzsültetvény és a Velencén zajló virológiai indexelés eredményeiknek értékelése	35
4.2.1 Mintavételezés	35
4.2.2 Virológiai indexelés értékelése	36
4.2.5 A kisRNS könyvtárak bioinformatikai elemzése	37
4.2.3 cDNS készítése és min• ségének ellen• rzése „aktin tesztel”	42
4.2.4 RT-PCR tesztek vírusspecifikus primerekkel	42
5. Következtetések és javaslatok	45
6. Összefoglalás	47
Irodalmi hivatkozások	48
Köszönetnyilvánítás	55
Melléklet	56
NYILATKOZAT	61

1. Bevezetés

A gyümölcsstermesztés és fásszárú növényeink szaporítóanyagának el• állítása a hazai agráriumban igen nagy gazdasági jelent• séggel rendelkezik. Ezen növényeket a fajtatulajdonságok fenntartása érdekében vegetatív úton szaporítják. Mivel ültetvényeinket hosszú távra tervezzük kiemelten fontos az egészséges, kiváló min• ség• szaporítóanyagok el• állítása, mind az intenzív, mind a hagyományos gyümölcsstermesztésben. E hosszú id• alatt a különböz• kórokozó és kártev• szervezetek ellen, a vírusok és fitoplazmák kivételével, hatékonyan tudunk védekezni. Mivel egyes vírusok igen komoly gazdasági kárt képesek okozni, a vírusmentes szaporítóanyag el• állításra kell törekedni, amihez hatékony vírusdiagnosztikai vizsgálatokra van szükségünk. A vírusdiagnosztikában az ELISA-teszt (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) és a növényi biotesztek a legelterjedtebbek jelenleg. Az ELISA-teszt el• nye, hogy nagy mennyiség• mintát lehet vele elemezni, viszont kevésbé érzékeny. A biotesztek érzékenyebbek az ELISA-tesztnél, viszont id• igényes és korlátozott számú minta elemzésére adnak lehet• séget (Horváth és Gáborjányi, 2000). Ezen tesztek mellett nagy szerephez jutottak az elmúlt években a vírus nukleinsav tartalmának kimutatásán alapuló módszerek, mint például az RT-PCR (reverz transzkripciót követ• polimeráz láncreakció). El• nyük, hogy alacsony nukleinsav-koncentráció mellett is alkalmazhatóak, viszont használatukhoz ismernünk kell a vírus örökít• anyagának bázissorrendjét ahhoz, hogy specifikus indítószekvenciákat (primereket) tervezhessünk (Czotter et al. 2015a). A legújabb diagnosztikai módszerek új generációs szekvenáláson alapulnak, aminek az eredményeként megkapjuk a kórokozó és a gazda örökít• anyagának bázissorrendjét is (Czotter et al. 2015a). Ezen módszerek segítségével detektálható a gazdanövényben jelenlév• összes vírus, függetlenül attól, hogy jelenlétük ismert volt-e az adott gazdanövényben vagy az adott területen. Ezekkel az eszközökkel lehet• ségünk van kimutatni látens, tünetmentes és kevert fert• zéseket is, amikor nem tudjuk pontosan, hogy mi – csak az egyik vírus vagy a szimultán jelenlév• vírusok együttese – okozza a tünetet. A megfelelő érzékenység• vírusdiagnosztikai eljárásokkal tesztelt vírusmentes szaporítóanyag el• állítása mellett kiemelt szerephez kell jutnia a vektorok elleni védekezésnek, mivel célunk, hogy a kés• bbiekben megakadályozzuk a vektorok által terjesztett vírusok fert• zését.

Munkám célja a NAIK Gyümölcskutató Intézet újfehértói telepén vírusmentesített *in vitro* meggy fajtajelöltek és az újfehértói meggy törzsültetvény vírusdiagnosztikája. A begy• jtött levélmintákból RNS kivonást követ• en, az *in vitro* minták vírusdiagnosztikáját

RT-PCR-rel végeztem el, míg a törzsültetvényről származó mintákból RNS kivonást követően az újgenerációs szekvenálás (NGS) elvégzéséhez kisRNS könyvtárat készítettem.

A munkám további célja az NGS összehasonlítása a hagyományos bioteszt érzékenységeivel szemben. Ehhez munkatársaim által 2017-ben a NAIK Gyümölcskutató Intézet, érdi telephelyéről származó meggy és cseresznye anyafákról gyűjtött mintákat használtam, melyek kisRNS szekvenálása már elkészült, de a bioinformatikai elemzését én végeztem.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A vírusok általános jellemzése

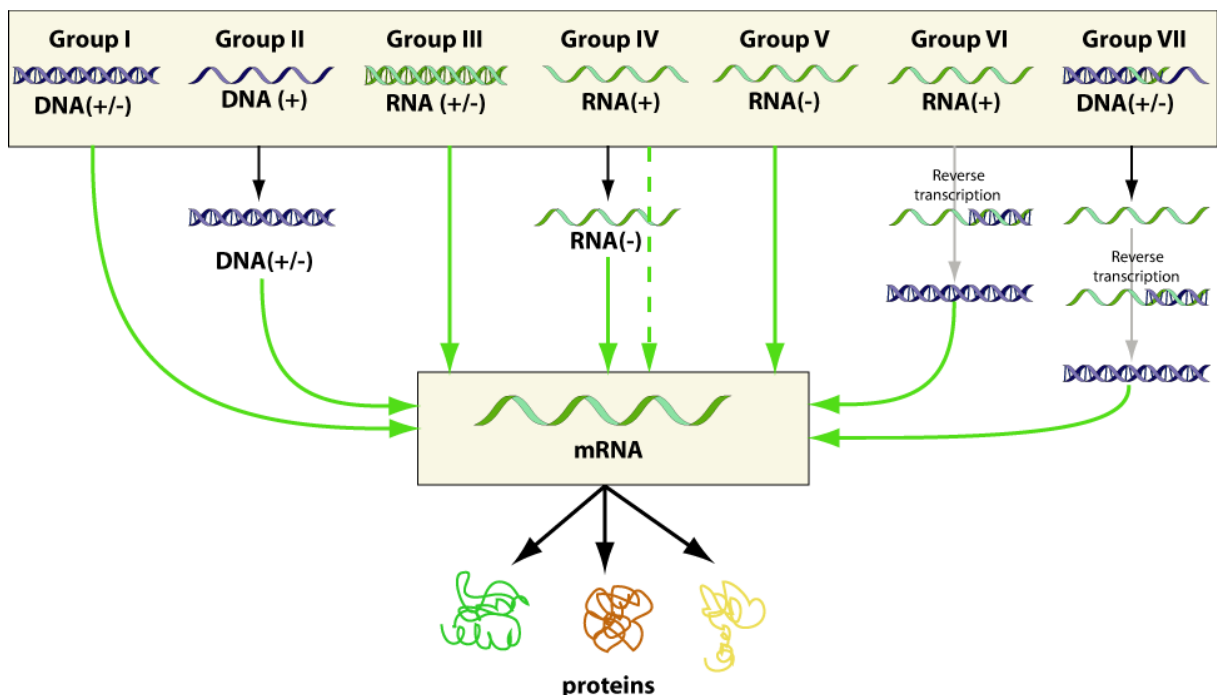
A növények az emberiséggel együtt fejlődtek, termesztett növényeink gyakran gondos nemesítési munka eredményei. Felhasználásuk széles körben elterjedt az ipartól az élelmiszerekig. Ahogy a növények, úgy a kórokozók is fejlődtek, sőt gyakran a növények és kórokozók koevolúciójáról beszélhetünk, ami az évek során az adott körülményekhez alkalmazkodva történt. A vírusok terjedésének kedvez az egész világra kiterjedő kereskedelem, valamint egy adott területre újonnan betelepített növények termesztése. A vírusok terjedését emellett elősegítik a vektorszervezetek számára kedvezően változó éghajlati viszonyok (Jones, 2009).

A vírusok kódoló nukleinsavból és fehérjéből álló fertőző, szubmikroszkopikus intracelluláris obligát paraziták. A nukleinsavban kódolt genetikai információjukat fehérjeburok (kapszid), esetenként lipid és glikoprotein burok veszi körbe (Bálint 2006; Virányi 2010; Cann 2016). A vírusok nem rendelkeznek saját anyagcserével, mind a felépítés, mind a lebontó folyamatok terén a gazdaszervezetre szorulnak, és önmagukban képtelenek a replikációra. Életciklusuk egy részében inaktív virionok, amik sejten kívüli, összeszerelődött vírusok, más részében a gazdasajtban replikálódnak, szintetizálódnak és összeszerelődnek (Cann 2016; Virányi 2010; Bálint 2006). A vírusok általában kisebbek, mint a baktériumok, továbbá a növényi vírusok általában kisebb méretek az állati vírusoknál. A jelenleg ismert leghosszabb vírus a *Pithovirus sibericum*, ami 1,5 μm , és a jelenleg ismert legnagyobb genommal rendelkező vírusok a Pandora vírusok, amelyek örökítőanyaga 2,8 Mbp, kb. 2500 gént kódolnak (Cann 2016; Legendre et al. 2014).

A vírusokon kívül megkülönböztetünk szubvirális elemeket ilyenek a virioidok, szatellit vírusok és szatellit RNS-ek. A viroidok obligát intracelluláris paraziták, amik 200-400 nukleotid méretű, cirkuláris, köpenyfehérje nélküli RNS molekulák (Cann 2016, Glits és Folk 2001). A szatellit vírusok nem csomagolódnak össze önálló virionokká. Replikációjukhoz szükségük van egy helper vírus replikáz enzimjére. A szatellit vírusok hatással vannak az eredeti vírus replikációjára és az általa okozott tünetek megjelenésére (Horváth és Gáborjányi, 2000). A szatellit RNS-ek a szatellit vírusokkal ellentétben nem alkotnak önálló virionokat, hanem a segítő vírussal közösen enkapszidálódnak (Roossinck et al. 1992).

A vírusoknak rendkívül változatos gazdaszervezetei lehetnek, állatokat, növényeket, az embert, baktériumokat (köztük fitoplazmákat is), gombákat, és algákat is képesek megfertőzni. Egyes vírusok fajspecifikusak, míg más vírusok széles gazdakörrel rendelkeznek. A növényi vírusok jelenlegi ismereteink szerint ártalmatlanok az emberekre (Dimmock et al. 2007). Napjainkban a leírt vírusok száma - a metagenomikai módszerek megjelenésével - folyamatosan nő (Pallas & Garcia 2011), az NCBI Referencia genom szekvenciái alapján 1760 növényt fertőző vírus referenciagenomja ismert (<http1>).

A vírusok örökítőanyaga változatos: lehet RNS vagy DNS, egyszálú vagy kétszálú, irányultsága pozitív vagy negatív (1. ábra). A növényi vírusok örökítőanyaga legtöbbször pozitív egyszálú RNS (ssRNS(+)), ritka a kétszálú DNS (dsDNS) örökítőanyag. A vírusok örökítőanyaga általánosan 4000-10000 nukleotid hosszú. A különböző örökítőanyaggal rendelkező vírusok replikációja eltér (Gergerich & Dolja 2006; Virányi 2010). A Baltimore-osztályzás a vírusok nukleinsavának, replikációjának, transzkripciójának alapján történő csoportosítás, ami a virális mRNS-ek képződése szerint osztályozza a vírusokat. Az osztályozás 7 csoportra osztja a vírusokat, amint az 1. ábrán látható.

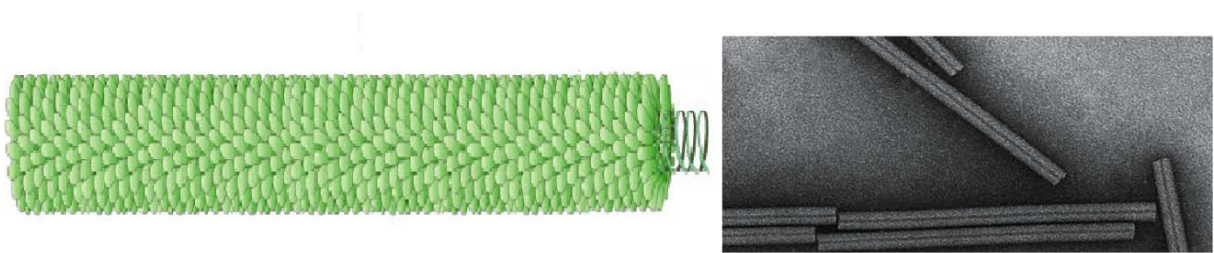


1. ábra: Baltimore-osztályzás (<http2>)

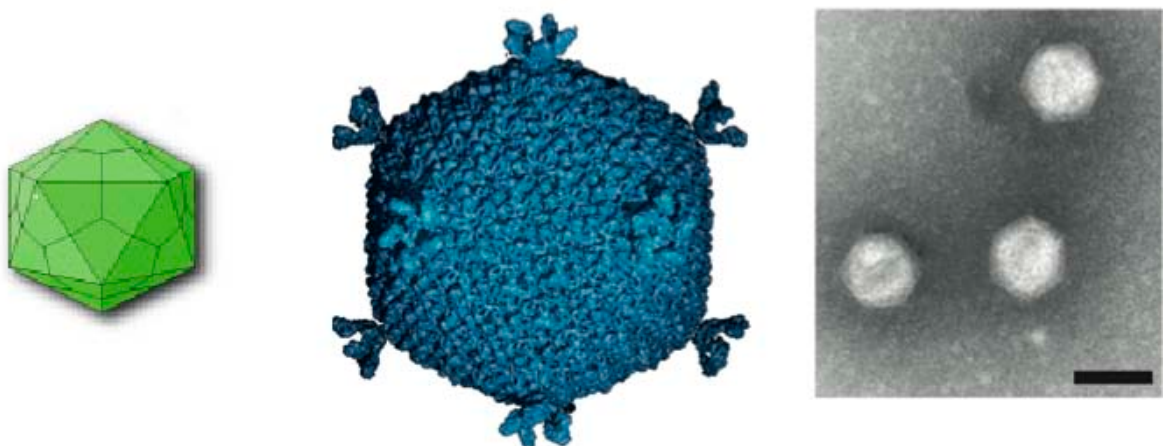
Az ICTV taxonómia ezzel szemben a biológiai tulajdonságok (a vírus gazdaszervezeten belüli terjedése, terjedésében szerepet játszó vektorok és a gazdaszervezetek rokonsági köre), a genomszerveződés (kódolt fehérjék), az örökítőanyag homológiája alapján rendszerezi a

vírusokat. A rendszer legkisebb rendszertani kategóriája a faj, majd a nemzetség, az alcsalád, a család és a rend következik (Horváth és Gáborjányi, 2000). Jelenleg 10 rendet, ezen belül 134 családot tartanak számon (ICTV 2017).

A vírusok örökítőanyagból és a nukleinsavat körülvevő kapszidból állnak, a kettőt együtt nukleokapszidnak nevezzük. A kapszid rendkívül fontos a vírusok okozta fertőzés folyamatában, mivel ez segíti a megkötődést, illetve a sejtekbe történő bejutást (Horváth és Gáborjányi, 2000). A vírusok alakját az őket körülvevő kapszid összeszerelésének szimmetriája alapján különböztetjük meg. Ezek alapján megkülönböztetünk helikális (2. ábra), ikozahedrális (3. ábra) és binális vírusokat. A helikális vírusok alegységei csavarmenet mentén helyezkednek el (Horne & Wildy, 1961). Az ikozahedrális (szférikus) vírusok ikozaéder vagy ehhez hasonló geometriai alakzat mentén kapcsolódnak (Cann 2016, Virányi 2010). A binális vírusok ikozahedrális fejből és helikális „farokrészből” állnak. A szférikus növényvírusok általában ~30 nm átmérőjűek, a pálcika vagy fonál alakú TMV vírus 300 nm hosszúságú és 18 nm átmérőjű (Gergerich & Dolja, 2006).



2. ábra: Helikális szimmetria (TMV vírus modellje és elektron mikroszkópikus képe) (<http3>; ICTV 2011)

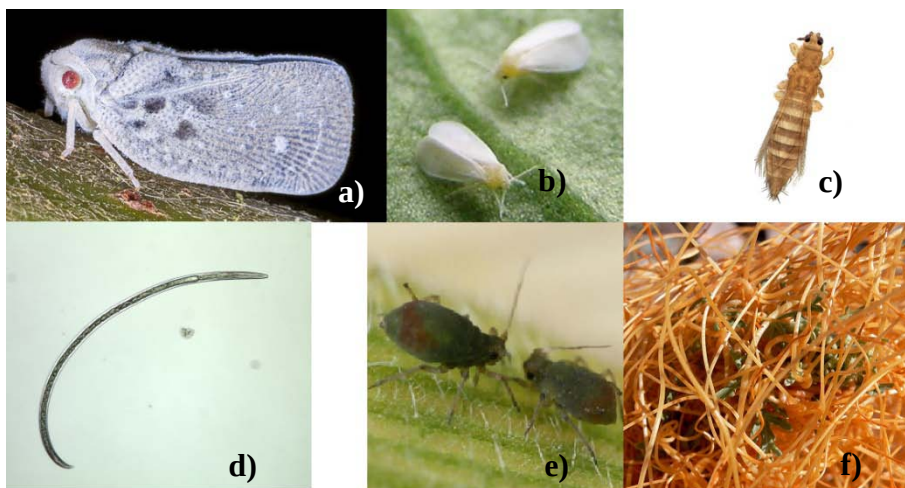


3. ábra: Ikozahedrális szimmetria (Corticoviridae családba tartozó vírus modellje és elektron mikroszkópikus képe) (<http4>; ICTV: Corticoviridae)

A vírusoknak minimum háromféle fehérjét kell kódolnia a megfelelő működéshez: a kapszid felépítésében résztvevő köpeny fehérjé(ke)t (CP, coat protein), a replikációhoz szükséges polimerázokat, és a mozgáshoz szükséges fehérjé(ke)t (movement protein, MP) (Virányi 2010; Cann 2016).

A vírusok nem képesek aktív módon átjutni a növényi sejtfalon. Éppen ezért átvitelük a természetben mechanikai sérüléseken keresztül és vektorok által történhet meg. Generatív módon maggal vagy pollennel terjedhetnek (Gergerich & Dolja, 2006). A „maggal” való terjedés során sok vírusról nem tisztázott, hogy maggal vagy a magházban meghúzódva valósul-e meg. Vegetatív szaporodás esetében a vírusok az utódnövényekre átkerülhetnek (hagyma, dugvány, rizóma, gumó, inda) (Sastry, 2013, Horváth és Gáborjányi, 2000). A vírusok átvihetők egyik növényről a másikra mechanikai úton, például metszéssel, oltással, szemzéssel és minden más eszköz okozta sérüléssel. A vegetatív módon szaporított növények esetében, ha az anyanövény fertőzött volt, akkor a vírus átkerül a szaporítóanyagba. A vírusok vízzel, öntözővízzel is terjedhetnek (Horváth és Gáborjányi, 2000, Stevens, 1983).

A vírusátvitel másik lehetséges módját a vektorok képviselik. A vektorok olyan szervezetek (gombák, virágos élősökök, ízeltlábúak, fonálférgek, stb.), amelyek a növények sejtjeiből táplálkoznak, így képesek felvenni a vírust, majd továbbjuttatni más növényekre. Néhány vírusvektort a 4. ábrán kívánok bemutatni. A gombák közül egyes talajlakó fajok lehetnek vírusvektorok, például az *Olpidium brassicae*, *Polymyxa betae* vagy a *Spongospora* fajok (Campbell, 1996). A virágos élősökök közül az aranka (*Cuscuta spp.*) fajokat kell megemlíteni. Az ízeltlábúak a legnépesebb csoportja a vírusvektoroknak. A kabócák, poloskák, levéltetvek, levélbolhák, liszteskék, pajzstetvek, tripszek, egyenesszárnyúak és egyes rágószájszervező rovarok lehetnek vektorszervezetek. A fonálférgek közül a *Longidorus*, *Xiphinema*, *Trichodorus* és a *Paratrachodorus* nemzetségbe tartozó fajok lehetnek vektorok (Horváth és Gáborjányi, 2000; Sastry, 2013). Vírusok általában rendkívül vektor specifikusak, nagy genetikai hasonlóságuk ellenére sem képesek ugyanazzal a vektorral terjedni (Gergerich & Dolja 2006).



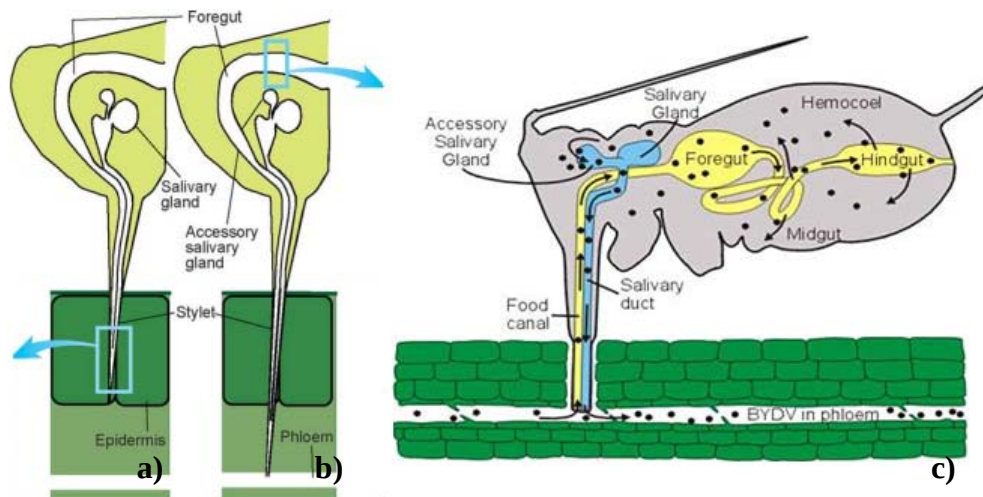
4. ábra: Vírusvektorok. a) *Metcalfa purinossa* (http5) b) *Aleyrodes* sp. (http6) c) *Thrips tabaci* (http7) d) *Xiphinema* sp. (http8) e) *Rophalosiphum padi* (http9) f) *Cuscuta* sp.(http10)

A vírusok vektorok által háromféleképpen terjedhetnek: perzisztens, szemiperzisztens és nem perzisztens úton. A nem perzisztens (5. ábra) módon terjedő vírusok a növények felszínhez közeli szövetében (epidermiszében) találhatók. Mechanikailag könnyen átvihetők, így a levéltetvek szájszervén már a próbaszívás során is megtapadhat a vírus, ami nem jut be a vektorok szervezetébe. A szájszerven való megtapadás után az állat azonnal képes leadni a vírust, nincs inkubációs idő, viszont csak rövid ideig fertőzőképes a vektor. Ide tartoznak általában a mozaik vírusok pl: búza mozaik vírus (WSMV).

A szemiperzisztens (5. ábra) terjedésű vírusokat a kártevők hosszabb próbaszívás során képesek felvenni, viszont nincs inkubációs idő, így a vektor azonnal fertőzőképes. A retenciós idő körülbelül a pár órától a pár napig tarthat. Ezek a vírusok mechanikailag nem vagy nehezen vihetők át pl: répa sárgaság closterovírus (BYV) (Ng & Folk 2006).

A perzisztens (5.ábra) terjedés esetében a vektor a vírust mélyebb szöveti rétegekbe (floémbe) veszi fel, ami bejut az állat haemolymphájába, nyálmirigyeibe. Hosszú inkubációs idő (órák, napok) a jellemző, emellett a vektor sokáig megtartja fertőzőképességét. A kártevők a próbaszívás során nem képesek felvenni a vírust, ehhez hosszabb felvételi szívás szükséges. A perzisztens módon terjedő vírus életciklusa lehet cirkulatív és propagatív. A cirkulatív életciklus során a vírusok (5.ábra) fertőzőképességüket akkor érik el, ha az utóból a nyálmirigyekbe jutnak. A vektorok általában egész életükben megtartják fertőzőképességüket. A látens szakasz pár óráig tart, a felvétel pár óra alatt megtörténhet (Ng és Folk 2006). Ide sorolható például a burgonya levélsodródás vírus (PLRV- vektora a *Myzus persicae* és *Macrosiphum euphorbiae* (Srinivasan & Alvarez 2007)). A propagatív életciklus során, a

cirkulatív életciklushoz hasonlóan, a vírusok képesek a vektor szervezetében replikálódni, sőt megfertőzhetik a rovarot és egyes vírusok az utódokba is képesek átjutni. Ebben az esetben a látens periódus napokig, hetekig is eltarthat. Ezek a vírusok mechanikailag nem vihetők át pl: Maize mosaic nucleorhabdovirus (MMV- vektora *Peregrinus maidis*) (Barandoc-Alaviar et al. 2016; Ng & Folk 2006).



5. ábra: a) nem-perzisztens vírus felvétel b) perzisztens vírusfelvétel
 c) cirkulatív vírusátvitel (Ng és Folk 2006; D'Arcy et al. 2001)

A növény és vírus kapcsolatától függően beszélhetünk lokális és szisztemikus fertőzésekről (Kucsera és Kevei 2010). Lokális fertőzés esetén a vírus a fertőzés közvetlen közelében lokalizálódik, míg a szisztemikus fertőzés során az egész növényben képes elterjedni. A gazda-kórokozó kapcsolat befolyásolja a tünetek kialakulásának helyét is. A gazdán megfigyelhető tünetek a következők lehetnek leveleken: alakbeli deformitások – torzulás, csavarodás, enációk, ráncosodás, hólyagosodás, páfránylevelség, kis méretű levelek –mellett nekrotikus és klorotikus léziók, klorózisok, mozaikfoltosság, györsfoltosság, sárgulás, érnekrozis, érkivilágosodás, hálózatoság, csíkosság. A felsorolt elváltozások közül a nekrotikus és klorotikus léziók tipikusan lokális fertőzésre utalnak. A növények szárán foltok, nekrozisok, internódium-megnyúlás vagy -rövidülés, hervadás, tumorok keletkezhetnek. A növények gyökerén vírusfertőzés hatására kialakuló tünetek a legkevésbé ismertek. A répa rizómánia hatására cukorrépán keletkező járulékos gyökerek megjelenése az egyik legjelentősebb, ezen kívül keletkezhetnek foltok és tumorok (Horváth és Gáborjányi, 2000). A tünetek a terméseken is megjelenhetnek, a gyümölcsökön deformációk, méretbeli torzulások, györsfoltosság, nekrotikus foltok, kövecsesedés, pöttyök és egyéb mintázatok megjelenése a leggyakoribb (Barba et al. 2015; Horváth és Gáborjányi, 2000).

2.2 *Prunus* fajokat megbetegít• vírusok

A vírusok általános jellemzése után fontos szót ejteni a csonthéjasokat megbetegít• vírusokról. A *Prunus* nemzetségbe tartozó fajokból telepített gyümölcsterm• ültetvények és a szaporítóanyag-el• állítás Magyarországon nagy gazdasági jelent• séggel rendelkezik, éppen ezért fontos, hogy már a szaporítóanyagoknál védekezzünk a kórokozók ellen. A hazai termelési viszonylatokat az 1. táblázatban kívánom bemutatni (KSH: fontosabb gyümölcsfélék termesztése és felhasználása (2014–)).

1. táblázat: Hazánk gyümölcstermeszt• területe és a betakarított termés alakulása 2016-ban

Gyümölcsterm• terület (2016)		Betakarított termés (2016)	
Összesen	90.939 ha	Összesen	755.410 tonna
Csonthéjas	37.587 ha	Csonthéjas	194.883 tonna
Meggy	14.661 ha	Meggy	73.591 tonna
Cseresznye	2.757 ha	Cseresznye	10.660 tonna

Hazánkban a 14/2017. (III. 23.) FM rendelet – a gyümölcsszaporító-anyagok el• állításáról és forgalomba hozataláról – meghatározza a kötelez• en ellen• rizend• kórokozók és kártev• k listáját. A rendelet 2. mellékletének 3. pontjában található azon károsítók jegyzéke (2. táblázat), amelyek esetében a kiindulási anyagokon, a prebázis, bázis, certifikált anyanövényeken és szaporító anyagokon, C.A.C (Conformitas Agraria Communitatis) ültetési anyagokon vizuális ellen• rzést és adott esetben mintavételt és laboratóriumi vizsgálatot kell végezni. A rendelet 31. pontja, 46. § (1) meghatározza, hogy a hatóság ellen• rzése során a 2. melléklet 3. pontjában felsorolt zárlati kórokozóktól való mentességet vizuálisan vizsgálja, majd szükség esetén elvégzi a megfelel• laboratóriumi vizsgálatot.

2. táblázat: 14/2017. (III. 23.) FM rendeletben meghatározott karantén vírusok

<i>Prunus amygdalus</i>	<i>Prunus armeniaca</i>
Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV)	Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV)
Alma mozaik vírus (ApMV)	Alma mozaik vírus (ApMV)
Szilva törpülés vírus (PDV)	Kajszli látens vírus (ApLV)
Prunus nekrotikus gy•r• sfoltosság vírus (PNRSV)	Szilva törpülés vírus (PDV)
Szilvahiml• vírus (PPV)	Prunus nekrotikus gy•r• sfoltosság vírus (PNRSV)
	Szilvahiml• vírus (PPV)
<i>Prunus domestica</i> és <i>P. salicina</i>	<i>Prunus persica</i>
Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV)	Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV)
Alma mozaik vírus (ApMV)	Alma mozaik vírus (ApMV)
Mirabolán látens gy•r• sfoltosság vírus (MLRSV)	Kajszli látens vírus (ApLV)
Szilva törpülés vírus (PDV)	Szilva törpülés vírus (PDV)
Prunus nekrotikus gy•r• sfoltosság vírus (PNRSV)	Prunus nekrotikus gy•r• sfoltosság vírus (PNRSV)
Szilvahiml• vírus (PPV)	Szamóca látens gy•r• sfoltosság vírus (SLRSV)
<i>Prunus avium</i> és <i>P. cerasus</i>	Szilvahiml• vírus (PPV)
Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV)	Viroidok
Alma mozaik vírus (ApMV)	• szibarack látens mozaik viroid (PLMVd)
Arabis mozaik vírus (ArMV)	
Cseresznye zöld gy•r• sfoltosság vírus (CGRMV)	
Cseresznye levélsodródás vírus (CLRV)	
Cseresznye nekrotikus rozsdaszín• foltosság vírus (CNRMV)	
Cseresznye aprógyümölcs• ség vírus 1 és 2 (LChV1, LChV2)	
Cseresznye levélfoltosság vírus (ChMLV)	
Szilva törpülés vírus (PDV)	
Prunus nekrotikus gy•r• sfoltosság vírus (PNRSV)	
Málna gy•r• sfoltosság vírus (RpRSV)	
Szamóca látens gy•r• sfoltosság vírus (SLRSV)	
Paradicsom fekete gy•r• s vírus (TBRV)	

2.3 Szaporítóanyag el• állítás szabályozása hazánkban

Magyarországon a 2003. évi LII. törvény a növényfajták állami elismerésér•l, a szaporítóanyagok forgalomba hozatalát és el• állítását szabályozza. Ezen törvény 30.§ (2) bekezdésének b), c), e), f) és h) pontjának értelmében, a kormány hatáskörében áll rendeletben meghatározni a szaporítóanyag-min• sítés eljárásrendjét, a szaporítóanyag-el• állítás tárgyi és személyi feltételeit és a növényvédelmi hatóság kijelölése. E törvényre hivatkozva született meg a 14/2017. (III.23) FM. rendelet a gyümölcs szaporítóanyagok el• állításáról és forgalomba hozataláról.

A certifikációs rendszerben történ• szaporítóanyagok el• állításáról a rendelet 7. § (1) bekezdés rendelkezik, miszerint a szaporítóanyag min• sítése akkor történhet meg, ha a szaporítóanyagot szolgáltató anyanövény megfelel a fajta leírásának és ez ellen• rzésre is került (14/2017. (III.23) 7.§ (1) bekezdés).

A prebázis anyanövények és szaporítóanyagok megfelel• fenntartásáról a 8.§ (1) rendelkezik. Ennek értelmében a prebázis anyanövényeket és szaporítóanyagokat megfelel• rovarmentes létesítményben kell fenntartani, ami biztosítja, légbeli vektoroktól és egyéb forrásokból származó fert• zésekt• l való mentességet (14/2017. (III. 23.) 8. § (1) bekezdés).

A bázis és certifikált anyanövények szabadföldi fenntartásáról a 8.§ (8) bekezdése kimondja, hogy a szaporítóanyagokat olyan területeken kell fenntartani, ahol légbeli vektorok vagy gyökerek érintkezése által, illetve gépek és oltáshoz használt eszközök által bekövetkezheth• keresztfert• zés potenciális lehet• ségeit• l és egyéb forrásoktól el van szigetelve (14/2017. (III.23) 8. § (8) bekezdés).

A fert• zött növények, növényi termékek és egyéb anyagok megsemmisítésér•l, a zárlati, a vizsgálatköteles nem zárlati károsítók, az ültetvények vizsgálatát a 7/2001. (I. 17.) FVM rendelet a növényegészségügyi feladatok végrehajtásának részletes szabályairól írja el• .

2.4 Karanténvírusok jellemzése

2.4.1 Alma klorotikus levélfoltosság vírus (Apple chlorotic leafspot virus-ACLSV)

Az alma klorotikus levélfoltosság vírust a *Betaflexiviridae* családba és a *Trichovirus* genusba sorolják (EPPO-ACLSV). Világszerte általánosan elterjedt, gazdanövényköre széles. A *Prunus* nemzetségbe tartozó fajok közül leírták már többek között meggyen, cseresznyén, • szibarackon, szilván, • szibarackon, mandulán, mirabolán szilván, japán szilván. Ezenkívül

előfordulását jelentették már almán, körtén, birsen, japán birsen és madárberkenyén (Plantwise-ACLSV). Tünetei változatosak lehetnek a gazdanövény fajtájától és a vírus törzsétől függően. Gazdaságilag fontos, napjainkban elterjedt alma fajtákon látens tüneteket okoz. Szilván barnás-vöröses színkéreghasadást, nekrotizist a kambiumban, hajtáspusztulást okozhat. A termésen besüppedő, nekrotikus vagy gyűrűs foltok jelenhetnek meg (Németh, 1979). Cseresznyén és meggyen nekrotikus, besüppedő foltok jelentek meg a termésen PNRS-vel való kevert fertőzés esetén (Németh, 1979). Kajszi esetében rozettás levélállás, a termésen besüppedő foltok jelenhetnek meg (Diekmann & Putter, 1996). Szibarak törzsén nekrotizist okozhat, a levelek hullámos szélűek, sötétzöld besüppedő foltokkal (Németh, 1979). Terjedése szemzéssel és oltással történik (Garcia-Ibarra et al., 2010).

2.4.2 Alma mozaik vírus (Apple mosaic virus- ApMV)

Az alma mozaik vírus rendszertanilag a *Bromoviridae* családba és a *Ilavirus* genusba tartozik (EPPO-ApMV). Világszerte igen elterjedt. Fás és lágyszárú növényeket is egyaránt fertőz, gazdanövényei leggyakrabban a *Rosaceae* családba tartozó fajok, fás és lágyszárú növényeket is fertőz egyaránt. Termesztett növényeink közül az almát, a körtét, a kajszit, az szibarakot, a cseresznyét, szilvát, mandulát, szamócát, málnát, szedret, piros ribizlit és a mogyorót fertőzi (EPPO-ApMV). A legelterjedtebb almafajták tünetmentesek. Mezei juhar levelén fehéres-szürkés foltok, galagonya levelén sárga klorotikus foltok jelenthetnek meg. Szilva leveleken csíkozottságot, rózsaleveleken mozaikos tüneteket mutat. A fogékony almafajták levelén krémszínű, később nekrotizálódó foltok figyelhetők meg, a levélerek sárgulhatnak. A terméseken sárga foltok képződnek. Csonthéjasok levelén világos sárga, szabálytalan foltok, gyűrűk, sárga érkivilágosodás, tölgyfa leveléhez hasonló formájú levelek alakulhatnak ki (Grimova et al. 2016; Németh, 1979; Plantwise-ApMV; EPPO-ApMV). A vírus átvitele történhet oltással, szemzéssel, mechanikai úton és maggal (Diekmann & Putter, 1996).

2.4.3 Arabisz mozaik vírus (Arabis mosaic virus- ArMV)

Az Arabisz mozaik vírus a *Secoviridae* családba és a *Nepovirus* genusba tartozik. A vírus az egész világon elterjedt. Gazdanövényköre rendkívül széles. Termesztett növényeink közül fertőzheti a cukorrépát, a szamócát, a kajsziarakot, az szibarakot, a mandulát, a szilvát, a meggyet, ezenkívül számos egyéb haszonnövényt, dísnövényt és gyomnövényt. Schmelzer (1963) mechanikailag fertőzve 28 családból, 93 különböző fajon mutatta ki a vírus jelenlétét. A vírus leggyakoribb tünetei a satnyulás, levélfoltosság, deformáltság, enációk

megjelenése, fogazott levélszél, rövid ízközök megjelenése, villás elágazás, sárgulás, érmenti mozaik foltosság. A szőlő növényvédelmében az A-típusú tóka-székely kórokozójaként tartják számon, tünete nagyon könnyen összekeverhető a fertőző leromlással, a két fertőzés gyakran együtt jelentkezik. A vírus terjedése történhet szemzéssel, oltással, mechanikai úton, maggal és *Xiphinema diversicaudatum* vektorral (Diekmann & Putter, 1996; Trudgill et al. 1983; McNamara, 1980, EPPO-Global Database).

2.4.4 Cseresznye zöld gyűrűsfoltosság vírus (Cherry green ring mottle virus- CGRMV)

A cseresznye zöld gyűrűsfoltosság vírus a *Betaflexiviridae* családba és a *Robigovirus* genusba tartozik. Az előfordulását jelentették Európa számos országából, Kanadából, az USA-ból, Chiléből, Japánból, Ausztráliából, Oroszországból, Koreából és Dél-Afrikából. A kórokozó gazdanövényköre *Prunus* fajokra korlátozódik. Termesztett növényeink közül fertőzheti a kajszit, a cseresznyét, a meggyet, az őszibarackot és a nektarint (Plantwise-CGRMV). A kajszit, őszibarack és cseresznye esetében gyakori a látens fertőzés (Diekmann & Putter, 1996). A vírus okozhat deformációkat, nekrozisokat, elszíneződést a levélen, ezenkívül a gyümölcsön léziók jelenhetnek meg és hajtáspusztulást idézhet elő. A fertőzés idősebb meggyfákon a levelek aszimmetrikus fejlődését, a levélerek mentén klorózisokat, nekrotikus foltokat, sárga elszíneződésű leveleket és ezeken megjelenő zöld gyűrűket okozhat. A fertőzött gyümölcsök minőségi mutatói elmaradnak az elvártaktól: keserű, ízetlen termés fejlődik. A gyümölcsök felületén nekrotikus foltok, gyűrűk találhatók, amik a gyümölcs húzába is megjelennek (Németh, 1979; Parker et al., 1976). A vírus szemzéssel és oltással terjed (Diekmann & Putter, 1996).

2.4.5 Cseresznye levélsodródás vírus (Cherry leafroll virus- CLRV)

A cseresznye levélsodródás vírus a *Secoviridae* családba és a *Nepovirus* genusba tartozik. A vírus Európában elterjedt, előfordulását jelentették az USA-ból, Ázsia több országából, Egyiptomból, Tunéziából, Chiléből, Peruból, Ausztráliából és Új-Zélandról (CABI,EPPO, 2014). Magyarországon az elterjedése szórványos. Gazdanövényköre változatos, termesztett növényeink közül fertőzi a diót, a cseresznyét, az almát, a málnát, a bodzát, a szőlőt és a mediterrán országokban az olajfát (EPPO-CLRV; Plantwise-CLRV; Glits és Folk, 2001). A fertőzött növények levelei aprók, deformáltak, színük felé sodródnak, abnormális színezetűek, vöröses-sárgás gyűrűs foltosak. Ezenkívül korai levélhullás, érnekrozis, erek sárgulása jelentkezik. Gyakori a törpülés, a hajtás száradás, az ágak elhalása, súlyos esetben az egész fa kiszáradhat (Glits és Folk, 2001; Bandte & Büttner, 2001; Jones &

Wood, 1978). Fertőzött almafa levelei deformáltak, nekrotikus és klorotikus foltok figyelhetők meg (Woo et al. 2012). A vírus terjedése oltással, szemzéssel, maggal, pollennel és vektorokkal (*Xiphinema coxi*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi*) mehet végbe (Diekman & Putter, 1996; Fritzsche & Kegler, 1964; Flegg, 1969).

2.4.6 Cseresznye nekrotikus rozsdaszínű foltosság vírus (Cherry necrotic rusty mottle virus- CNRMV)

A cseresznye nekrotikus rozsdaszínű foltosság vírus a *Betaflexiviridae* családba és a *Robigovirus* genusba tartozik. A vírus megjelenéséről beszámoltak már az USA-ból, Kanadából, Chiléből, Európa több országából, Indából, Kínából, Koreából, Japánból és Új-Zélandról. Gazdanövény köre *Prunus* fajokból áll: kajszli, szibarack, cseresznye, szilva és kései fürtösmeggy (Plantwise-CNRMV, EPPO-CNRMV). A fertőzött növény levelein nekrozisok jelenhetnek meg, abnormális elszíneződések és korán lehullanak. A hajtáscsúcs elhervad, mézgásodás jelenhet meg, fekélyes sebek képződnek, valamint a teljes növény korai öregedése jelentkezhethet. Cseresznye fa levelein barna nekrotikus foltok képződnek, melyek később kihullanak. A levélerek mentén sárga klorotikus elszíneződés figyelhető meg. (Németh, 1979; Plantwise-CNRMV). A vírus terjedése oltással és szemzéssel történik (Diekmann & Putter, 1996).

2.4.7 Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 és 2 (Little cherry virus-1 és 2- LChV-1 és 2)

A vírus a *Closteroviridae* családba, az LChV-1 a *Velarivirus* genusba, míg az LChV-2 az *Ampelovirus* genusba tartozik (EPPO-LChV1, EPPO-LChV2). A vírus burok nélküli – csak a kapszid veszi körbe –, ezenkívül helikális és rendkívül hosszú, nukleinsava pozitív egyszálú RNS (ssRNS(+)) (http11; http12). Az LChV-1 vírus legelső feljegyzése meggy és cseresznye fajokról történt, ezenkívül jelenlétét megfigyelték már kajszibarackon, szilván (Marais et al. 2016, Šafářová et al. 2017, EPPO-LChV1). A kórokozót legelőször 1933-ban Kanadában írták le. Az LChV-1-et jelentették Európa számos országából, Kínából, Japánból, Koreából az USA-ból, Chiléből Új-Zélandról. A vírus hazai elfordulását először a Diagnosztika csoport (Baráth et al., 2018) írta le. Európában a LChV-2-t Horvátországban, Németországban, Lengyelországban és az Egyesült Királyságban, Belgiumban írták le, emellett az USA-ban, Kanadában, Japánban, Kínában, Ausztráliában, Új-Zélandon és Dél-Koreában (EPPO-LChV2).

A kórokozó a növény floemjében található meg. A LChV-1 különböző tüneteket produkálhat a termesztés helyétől, fajtától és az évszaktól függően. A frissen ültetett fertőzött

növények nem mutatnak tünetet, sokáig látens marad a vírus. Később nyáron vagy korán ősszel a levelek színén pirosas-lilás vagy bronz színű elszíneződés tapasztalható, viszont a fő levélerek megtartják eredeti zöld színüket. A legtöbb tünet viszont a gyümölcsökön tapasztalható (6. ábra), a minőséget jelentősen rontva, eladhatatlanná téve a termést. Kezdetben a gyümölcsök fajtára jellemzően növekednek, viszont szüret előtt teljesen megállnak a fejlődésben. A tünetek között felsorolható az ízetlenség, az alacsony cukortartalom, az egészségeshez képest sápadt és kis méretű termések. 'Bing' cseresznye termése a normálistól eltérő színű, méretű, formájú és ízű. 'Sam' cseresznye esetében a levelek érkezői bronzos vagy pirosas-ibolyás elszíneződése jellemző, a termés mérete és íze szintén nem a fajtára jellemző (EPPO- Data Sheets on Quarantine Pests: LChV). A vírus terjedése oltással, szemzéssel történhet (Diekmann & Putter, 1996)



6.ábra: LChV-1 tünetei levélen és gyümölcsön (EPPO-LChV1)

2.4.8 Cseresznye levélfoltosság vírus (Cherry mottle leaf virus- ChMLV)

A cseresznye levélfoltosság vírus a *Betaflexiviridae* családba és a *Trichovirus* genusba tartozik (EPPO-ChMLV). A vírus Európában, Dél-Afrikában és az USA-ban elterjedt (Németh, 1979). Gazdanövényei közé tartozik a cseresznye, a meggy és az őszibarack, amik általában tünetmentesek. 'Bing' cseresznye esetében a levelek kisebbek az egészségeseknél, ráncosodnak, torzulnak, klorotikus, nekrotikus foltok és lyukak keletkeznek rajtuk, de a levelek nem hullanak le. Cseresznye esetében a gyümölcsök rendkívül aprók, ízetlenek és később érnek. A gyümölcsökön apró, szabálytalan, világos barna nekrotikus foltok képződhetnek. A fák törpe növények, rozettás levélállásúak. A tünetek magas hőmérséklet esetén maszkírozódnak (James & Mukerji, 1993; Reeves, 1941; Diekmann & Putter, 1996;

Németh, 1979). A vírus terjedése oltással, szemzéssel, mechanikai úton és *Eriophyes inaequalis* vektorral történhet (Diekmann & Putter, 1996)

2.4.9 Szilva törpülés vírus (Prune dwarf virus- PDV)

A szilva törpülés vírus a *Bromoviridae* családba és az *Ilarvirus* genusba tartozik (EPPO-PDV). A vírust először Németországban írták le, Magyarországon 1960-as években találták meg a kórokozót. Világszerte elterjedté vált, Észak-Afrikában, Észak és Dél-Amerikában, Ausztráliában, Új-Zélandon, Európa és Ázsia számos országában jelentették (Plantwise-PDV; Glits és Folk, 2001). Gazdanövényköre *Prunus* fajokból áll, kimutatták már cseresznyén, mandulán, kajszin, meggyen, szibarackon, szilván (Diekmann & Putter, 1996). A fertőzött növények törpültek, leveleik mozaik foltosak, rozettás állásúak, aprók és deformáltak, klorotikus foltok, gyűrűk, csíkok jelenhetnek meg rajtuk. A fás részekén mézgásodás figyelhető meg. (Glits és Folk, 2001; Plantwise-PDV; Diekmann & Putter, 1996). Terjedése oltással, szemzéssel, maggal és pollennel történhet (Diekmann & Putter, 1996).

2.4.10 Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (Prunus necrotic ringspot virus- PNRSV)

A Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus a *Bromoviridae* családba és a *Ilarvirus* genusba tartozik (EPPOP-PNRSV). A vírus Észak-Amerikából terjedt szét az egész világon. A cseresznye és a meggy a legjelentősebb gazdanövénye, de fertőzi a szilvát, kajszit, mandulát, szibarackot és más *Prunus* nemzetségbe tartozó növényeket is, ezenkívül fertőzheti a rózsát és a komlót is. Fertőzött növény levéltünetei között említhető az elszíntelenedés, lyukacsosodás, apró, abnormális színezetű és formájú levelek megjelenése, nekrotikus foltok, klorotikus gyűrűk és foltok. A vírus okozta tünetek két csoportra oszthatók: sokk és krónikus tünetek. A lokális nekrozisok (sokk tünet) fiatal leveleken fejlődhetnek ki és a levelek teljes elrongyolódását okozhatják. A krónikus tünetek során a kifejlődő gyakran erősen fogazottak, két levélcsúcs is fejlődhet. A levél fonákán, a levélerek mentén enációk fejlődhetnek. Cseresznye levelén leginkább sokk tüneteket találhatunk (Plantwise-PNRSV, Glits és Folk, 2001). Terjedése oltással, szemzéssel, mechanikai úton, maggal és pollennel (Diekmann & Putter, 1996; Nyland et al. 1976).

2.4.11 Málna gyűrűsfoltosság vírus (Raspberry ringspot virus- RpRSV)

A málna gyűrűsfoltosság vírus a *Secoviridae* családba és a *Nepovirus* genusba tartozik. A vírus egész Európában elterjedt, ezenkívül jelentették már Oroszországból, Iránból, Üzbegisztánból, Törökországból, Kazahsztánból (EPPO-RpRSV, CABI-RpRSV).

Gazdanövénykörét tekintve *Prunus* fajok közül a cseresznyét fert•zi, ezenkívül termesztett növényeink közül fert•zheti a ribizlit a sz•l•t, a málnát, a szamócát és az articsókát (EPPO-RpRSV, Plantwise-RpRSV). A fert•zött növény levelein mozaikos foltok, érkivilágosodás, klorotikus foltok, „olajfoltosodás” és levélsodródás tünetek jelentkezhetnek. Másodlagos tünetként a fert•zött növény levelein enációk jelenhetnek meg. A fejl•d• levelek keskenyek, szélük durván fogazott. A vírus terjedése oltással, szemzéssel, mechanikai úton és vektorokkal (*Longidorus elongatus*, *Longidorus macrosoma*) történhet (Diekmann & Putter, 1996).

2.4.12 Szamóca látens gy•r•sfoltosság vírus (Strawberry latent ringspot virus- SLRSV)

A szamóca látens gy•r•sfoltosság vírus a *Secoviridae* családba tartozik, további rendszertani kategóriába egyelőre nincs besorolva. A vírus egész Európában elterjedt, ezenkívül Kanadában, az USA-ban, Ausztráliában, Új-Zélandon, Izraelben és Törökországban jelentették. Gazdanövényei közé tartozik a szamóca, a málna, a szeder, a piros és fekete ribizli, a cseresznye, a szilva, az •szibarack, a kajszi, a bodza, a sz•l• és más dísznövények (EPPO-SLRSV; Diekmann & Putter, 1996). A vírus általában kevert fert•zés során mutat tünetet, málnában például arabis mozaik vírussal együtt érkivilágosodást okozhat. Szamócában szintén ritkán látható a tünete, általában ArMV-vel kevert fert•zés esetén találkozhatunk vele (EPPO-SLRSV, Murrant, 1987; Murrant and Lister, 1987). Franciaországban •szibarack ültetvényben PDV-vel együtt találták meg, ahol rozettás levélállást, törpült növést és hajtás pusztulást okozott (Scotto La Massese et al., 1973). Cseresznyén PDV-vel kevert fert•zés esetén a levelek fonáki részén enációk jelentek meg (Ragozzino & Alioto, 1992). Önállóan a vírus rozettás levélállást, későbbi virágzást okozhat, a fejl•d• levelek keskenyek és aprók maradnak, rajtuk klorotikus foltok jelenhetnek meg. A terjedése oltással, szemzéssel, mechanikai úton, *Xiphinema diversicaudatum* vektorral és maggal történhet (Diekmann & Putter, 1996).

2.4.13 Paradicsom fekete gy•r•s vírus (Tomato black ring virus- TBRV)

A paradicsom fekete gy•r•s vírus a *Secoviridae* családba és a *Nepovirus* genusba tartozik. A vírus Európában -Franciaországban kiemelkedően- elterjedt. Brazíliában, Kanadában, USA-ban, Kenyában, Indiában és Japánban írták le előfordulását. Gazdanövényköre széles, egy és kétszik• növényeket is fert•z, sok fontos termesztett növényünket is. *Prunus* fajok közül az •szibarackot, a mandulát és a cseresznyét fert•zi. A

vírus legjelentősebb gazdanövényei az őszibarack, a piros és fekete ribizli, a málna és a szamóca (EPPO-TBRV; Diekmann & Putter, 1996; Németh, 1979). Fertőzött őszibarack levelei torzultak, klorotikus foltok láthatók, mandula levelei keskenyek és hullámos szélűek és enációk találhatók rajtuk (Németh, 1979). Szamóca és ribizli levelein klorotikus gyűrűk és foltok jelenhetnek meg (Murant, 1987; Murant & Lister, 1987). A vírus terjedhet szemzéssel, oltással, mechanikai úton, maggal, vektorokkal (*Longidorus attenuatus* és *L. elungatus*) (Diekmann & Putter, 1996).

2.5 Cherry Virus A (CVA)

A CVA a *Betaflexiviridae* családba és a *Capillovirus* genusba tartozó, helikális, pozitív egyszálú RNS vírus (ssRNS(+)) (EPPO-CVA). A vírust Németországban írták le először cseresznyén (Jelkmann, 1995). Európa több országában elterjedt, ezenkívül jelentették már Kínában, Japánban, Kanadában és az USA-ban (CABI/EPPO, 2007). Magyarországi előfordulását munkacsoportunk (Baráth et al. 2018) írta le először. Látens vírus, önmagában nem okoz tünetet csak kevert fertőzésekben, ebben az esetben a többi vírus tüneteit felerősíti, éppen ezért nehéz a vírus azonosítása (Marais et al., 2012; Gao et al. 2017). Kevert fertőzést írtak le például: az Apple chlorotic leafspot vírussal (ACLSV), az Apricot pseudo chlorotic leafspot vírussal (APCLSV), a Cherry green ring mottle vírussal (CGRMV), a Little Cherry vírussal (LChV-1 és LChV2) (Barone et al. 2006; Isogai et al. 2004). Jelenleg nem ismerünk a vírus terjesztéséért felelős vektort, viszont oltással, szemzéssel átvihető a vírus (Marais et al., 2012; Gao et al. 2017). A legelső megfigyelt gazdanövénye a cseresznye (Jelkmann 1995), majd később leírták kajszibarackon, őszibarackon, szilván, meggyen, és egyéb *Prunus* fajokon (Jelkmann, 1995; Kinoti et al., 2016; Koinuma et al., 2016; Marais et al., 2008).

2.6 Gyümölcsfák biotesztelése

Napjainkban 44 vírust ismerünk, ami *Prunus* fajokat képes fertőzni (Rubio et al. 2017). Némely vírus kimutatása lehetséges biotesztekkel indikátornövényeken, ami napjainkban is elterjedt eljárás és a gyors diagnosztikai módszerek (PCR-tesztek, ELISA-módszer) mellett sem veszítette el jelentőségét. Hátrányai közé tartozik, hogy drága, nagy a kézimunka igénye, az idő és a hely igénye, törzsültetvényeken sem használják rutinszerűen. E tulajdonságok ellenére is használatos napjainkban, mivel a tesztnövényeken található tünetek alapján egyértelműen meghatározható a jelenlévő vírus és tanulmányozásuk lehetetlen lenne növények nélkül. A megfelelő minőségű, vírusmentes szaporítóanyag előállítás, fajtaminősítés elképzelhetetlen lenne biotesztek nélkül (Bach és Szűnyegi, 1996; Horváth és

Gáborjányi, 2000). A 14/2017. (III. 23.) FM rendeletben meghatározott karantén vírusokra a 3. táblázatban foglaltam össze az indikátornövényeket. A használt indikátornövények: vadcsereesznye (*Prunus avium*), *P. persica* GF 305, *P. serrulata* 'Kwanzan' és 'Shirofugen'; 'Sam', 'Bing' és 'Canindex' cseresznye fajták (Diekmann & Putter, 1996).

3. táblázat: Karanténvírusok indikátornövényei (Diekmann & Putter, 1996)

Vadcsereesznye	GF305	Kwanzan	Sam	Canindex	Shirofugen	Bing
CLRV, LChV, PDV, PNRSV	ACLSV, ApMV, ArMV, CLRV, PDV, PNRSV, RpRSV, SLRSV, TBRV	CGRMV	CNRMV, LChV	LChV	PNRSV, PDV	CNRMV, ChMLV, RpRSV

Gyümölcsterm• fáink biotesztje két csoportra osztható, vannak lágyszárú és fás szárú tesztek (Legrand, 2015). A csonthéjasok lágyszárú tesztelése során *Cucumis sativus*, *Chenopodium quinoa* és *Celosia argentea* növényeket alkalmaznak. A vizsgálatokat februártól áprilisig végzik. A felhasznált növényi részeket dörzsmozsárban eldörzsqszölik és az így kapott szövetnedvvel megfert•zik a teszt•növényt, amit a vizsgálat id•tartamára vektormentes növényházba kell helyezni (Lambert et al., 2012; Rowhani et al., 2005; Horváth és Gáborjányi, 2000).

A csonthéjasok fás szárú tesztelése történhet szabadföldön vagy üvegházban. Az üvegházi tesztelés során cserepes alanyokra történik a vírusátvitel, ami történhet kett•s oltással, kéregátültetéssel vagy gyökéroltással (Legrand, 2015; Horváth és Gáborjányi, 2000).

A szabadföldi tesztelés során a vírusátvitel történhet egyszer• szemzéssel, kett•s szemzéssel, kett•s oltással, kéregátültetéssel. Az átvitel módjának megválasztása függ attól, hogy a kórokozó a fa melyik részében található, a kimutatandó vírustól, az indikátornövényt•l és az alanytól és az indikátornövény típusától. Egyszer• szemzés esetén az indikátorként használt alany és a nemes faja ugyanaz vagy szemzéshez kompatibilis, bár egyes gyorsesztek elvégzéséhez nem szükséges kompatibilitás. Kett•s szemzést akkor kell alkalmazni, ha nem az alany az indikátor. Ebben az esetben vírusmentes alanyon egymás fölé kell szemezni a vizsgálandó szemet és az indikátort, majd kihajtás után a vizsgálandó hajtást vissza kell vágni. Kett•s oltás esetében az indikátort rá kell oltani a vizsgálandó fa oltóvessz•jére és ezt a kombinációt kell az alanyra ráoltani. A kéregátültetés akkor használatos, ha az alany és a vizsgált fa különböz• fajhoz tartoznak. Ilyenkor szem nélküli kéregpajzsot kell készítenünk és az alanyon ennek megfelel• alakú bemetszésbe kell helyeznünk (Horváth és Gáborjányi,

2000; Legrand, 2015). A szabadföldi gyors tesztek elvégzése kisebb hely és időigényű, valamint nagy tömegben elvégezhető. A gazdaságilag legjelentősebb vírusokra van lehetőségünk tesztet beállítani. Ezek közé tartozik a Shirofugen-teszt, ami során *P. serrulata* cv. Shirfugen indikátor növényen PDV és PNRSV vírusokra tudunk tesztet végezni. A GF305 teszt során *P. persica* cv. GF305 magoncon vagy magonc alanyon végeznek PPV, PDV vagy PNRSV vírusokra tesztet (Genti et al., 1998; Rowhani et al., 2005; Horváth és Gáborjányi, 2000; Németh, 1979).

2.7 Újgenerációs szekvenálás

Az újgenerációs szekvenálás (Next-Generation Sequencing; NGS) napjainkban egyre elterjedtebb módszer a vírus diagnosztikában, ami a nukleinsav szekvenálásán és a bioinformatikai elemzésen alapul. A módszer nagy hatékonyságú, gyors, korszerű és költségkímélő. A növényvírusok diagnosztikájában az Illumina/Solexa és a Roche 454 fajtájú szekvenálások a legelterjedtebbek, ezeken kívül még több fajtája is létezik. Az újgenerációs szekvenálással egy adott mintából több millió szekvencia is leolvasható, mivel nagy áteresztőképességű, viszont csak pár száz bázispár hosszú nukleinsav fragmentum szekvenálható vele (Barba et al., 2014). A kapott szekvenciák további elemzésére bioinformatikai módszerekkel van lehetőségünk.

A hagyományos módszerekkel ellentétben az újgenerációs szekvenálással akár egy új vírus teljes genomja is összerakható, nincs szükség vírusspecifikus antitestekre, vagy genomjuk egy darabjának ismeretére, specifikus primerek tervezéséhez (Massart et al., 2014). Magyarországon ezzel a módszerrel sikerült elsőként leírni a szőlő Pinot Gris Vírust (GPGV) (Czotter et al., 2015b), a Cherry Virus A (CVA) és a Little Cherry Virus 1 (LChV-1) vírust (Baráth et al., 2018).

3. Anyag és módszer

3.1 RNS kivonás

Ahhoz, hogy egy mintában vizsgálni tudjuk egy adott vírus jelenlétét, először ki kell tisztítanunk a mintából a benne található RNS-t. Ez nem csak a növényi gazda összes RNS-ét, hanem az RNS örökítőanyaggal rendelkező vírus RNS-ét is tartalmazni fogja.

A gyűjtött levelek teszteléséhez az RNS kivonást Gambino és munkatársai (2008) módszere alapján végeztem. A -70°C -on tartott mintákat folyékony nitrogénbe helyeztem, majd 150-200 mg levélmintát dörzscsészében, folyékony nitrogén hozzáadásával homogenizáltam. Az így homogenizált mintákhoz 17 μl jégen tartott β -merkaptotetanolt adtam, majd alapos keverés után 850 μl 65°C -ra előmelegített CTAB extrakciós puffert (2%CTAB+ 2,5%PVP+ 100mM Tris-HCl (pH 8,0) + 25mM EDTA+ 2M NaCl) pipettáztam. A mintákat Eppendorf csövekbe töltöttem, vortexelés után 10 percig 65°C -os vízfürdőben rázattam, közben kézzel döntögetve kevertem. A mintákhoz ezután 850 μl kloroform:izoamil-alkohol 24:1 arányú keverékét adtam, döntögetve kevertem, majd 15 percig 4°C -on 10.000 rpm-en centrifugáltam azokat. A minták felülúszóját új Eppendorf csövekbe pipettáztam, ehhez hozzámértem 800 μl jégen tartott kloroform:izoamil-alkoholhoz (24:1), majd döntögetve kevertem. Az óvatos keverésre azért van szükség, mert a hosszú nukleinsavak a vortexelés miatt összetörnének. Ezt követően 10 percig 4°C -on 10.000 rpm-en centrifugáltam. A centrifugálás után kialakult felülúszóból 450 μl -t hozzáadtam 250 μl 9M LiCl-hoz, aminek a hatására az RNS szelektíven kicsapódott, a DNS pedig a felülúszóba került. Döntögetve kevertem, majd 30 percig jégen tartottam. Ezután a mintákat 20 percig 4°C -on 13.000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszó leöntését követően a csapadékra 450 μl 65°C -os STE-t (1M NaCl+ 0,5%SDS+ 10mM Tris-HCl (pH 8,0)+ 1mM EDTA (pH 8,0)) mértem. Erősen vortexelés után 450 μl jégen tartott kloroform:izoamil-alkoholt (24:1) pipettáztam a mintákra, majd döntögetve kevertem és 10.000 rpm-en 4°C -on 10 percig centrifugáltam azokat. A centrifugált mintákról 400 μl felülúszóhoz 280 μl izopropanolt és 30 μl 4M-os nátrium-acetátot mértem. Óvatosan döntögetve összekevertem, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam azokat. Ezután 20 percig 4°C -on 13.000 rpm-en centrifugáltam, majd leöntöttem a felülúszót. A keletkezett csapadékra rámértem 1 ml 70%-os etanolt, 5 percig 4°C -on 13.000 rpm-en centrifugáltam, majd leöntöttem az alkoholt, az esetleges maradékot pedig törőpapíron lecsepegtettem. A mintákat 10 percig SpeedVac-ben szárítottam. Miután a minták teljesen kiszáradtak, 25 μl Milli-Q (MQ) vízben visszaoldottam, majd vortex segítségével elkevertem azokat. Az RNS mintákat 1,2%-os agaróz gélen választottam el

elektroforézis során, a kapott gélképen pedig ellenőrizhettem az RNS kivonás sikerességét. Az elektroforézishez 3 µl visszaoldott mintát 5 µl FDE festékkel és ehhez hozzáadott 2 µl MQ vízzel festettem meg. A minták RNS koncentrációját Nanodrop 2000 UV-VIS spektrofotométerrel mértem. A méréshez 2 µl mennyiséget használtam fel mintánként.

3.2 Keverék készítése a kivont RNS-ekből

A munka egyszerűbbé és átláthatóbbá tétele érdekében az egyedi RNS-mintákból fajta keveréket, majd a fajtakeverékekből egy ültetvény keverékét készítettem, az RNS koncentrációk figyelembevétele mellett azért, hogy az ültetvénykeverékben minden fajta reprezentatívan legyen jelen. Továbbiakban az így készített keverékekkel folytattam munkákat. Az egyedi mintákat a későbbi vizsgálatokhoz -70°C fagyasztóban tároltuk.

3.3 Az RNS kicsapása

Az RNS kicsapására azért volt szükség, hogy csökkentsem a használandó minta mennyiségét, viszont növeljem a keverék koncentrációját. A fajtakeverékek összemérése után, 560 µl ültetvény keveréket kaptam. Ehhez hozzámértem 1 µl GlycoBlue-t (ThermoFisher), 30 µl 4M NaAc és 1,3 ml 70% etanolt. Ezt egy éjszakán keresztül -20°C-on inkubáltam, majd 30 percig 4°C-on teljes fordulatszámon centrifugáltam. A felülúszó eltávolítása után az eppendorf alján kialakult pelletet 70% etanollal átmostam, majd 10 percig SpeedVac berendezésben szárítottam és visszaoldottam 100 ml desztillált vízben.

3.4 cDNS szintézise

A polimeráz láncreakció (PCR: Polymerase Chain reaction) használatával lehetősünk nyílik *in vitro* körülmények között egy adott DNS vagy cDNS molekula sokszorosítására. Ahhoz, hogy a mintáimból RNS örökítőanyaggal rendelkező vírusokat tudjak kimutatni, először az RNS-ről cDNS-t szintetizáltam, mivel a DNS-függő DNS-polimeráz RNS templátról nem képes szintézist végezni. Ennek során cDNS termék keletkezik, ami egy olyan egyszálú DNS molekula, ami a mintában jelenlévő RNS templátról szintetizálódik reverz transzkriptáz enzim hozzáadásával.

Templátként az RNS mintáimat felhasználva a RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Scientific) segítségével cDNS-t készítettem reverz transzkripcióval (Czotter et al. 2018a). Egy mintára vonatkoztatva, templátként 500 ng tisztított RNS-t használtam, amihez 0,25 µl Random Hexamer Primert adtam, amire azért van szükség, mert a mintában jelenlévő összes RNS-ről képes cDNS-t írni. A keverékhez annyi, nukleázoktól mentes vizet adtam, hogy a végtérfogata 3 µl legyen, amit később a reakcióhoz szükséges keverékkel 5 µl-

re egészítettem ki. Vortexelést követően 65 °C-os vízfürdőben denaturáltam 5 percig, majd jégre tettem a mintákat.

A reakcióhoz szükséges keveréket a kit leírása alapján összemértem, miszerint mintánként 1 µl 5x reakciós puffert (RB: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 0,5 µl 10mM dNTP-t, 0,25 µl RiboLock RNáz Inhibitort, 0,25 µl RevertAid RT enzimet mértem össze.

A reverz-transzkripciót az alábbi protokoll szerint végeztem:

- 25 °C 10 perc -anelláció
 - 42 °C 60 perc
 - 45 °C 10 perc
 - 70 °C 10 perc -enzim inaktiválása/denaturáció
- } inkubálás (cDNS szintézis)

Az elkészült cDNS-eket tízszeresére hígítottam, ezeket használtam a továbbiakban a vírusspecifikus PCR reakciókhoz.

3.5 A cDNS minőségének ellenőrzése

A reverz transzkripció sikerességének és a cDNS minőségének ellenőrzésére, vizsgálataim során a cDNS szintézis után a gazda endogén aktin mRNS-ének kimutatására alkalmas tesztet: aktin-tesztet végeztem. A teszt végrehajtásához PCR reakciót használtam, amely során olyan, a *Malus domestica* aktin mRNS-éhez tervezett specifikus primereket használtam, melyek a *Prunus* fajok – így a cseresznye és a meggy aktin mRNS-ét is képesek sokszorozni.

AZ NCBI honlapján megtalálható a *M. domestica* aktin mRNS szekvenciája (AB638619.1), ami alapján hallgatótársam, Varga Tünde tervezett forward és a reverz primert. A primerek tervezésekor figyelembe vette, hogy a primerek szekvenciáiban ne legyen túl sok (<3 db) bázisismétlés és a 3' vég citozin vagy guanin legyen (Varga, 2016). Az amplifikáláshoz használt primereket a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat: *Malus domestica* aktin mRNS-re tervezett primerek

Primerek	Szekcencia (5'-3')	Termék hossza(bp)
Mxd_aktin-F	GGAAGTGGGAATGGTGAAGGC	719
Mxd_aktin-R	GCTCCAATTGTGATGACTTG	

A reakcióhoz a Phire Green Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific) enzimet használtam. A reakcióhoz szükséges keveréket a következők szerint állítottam össze 15 µl végtérfogatban (Varga, 2016).

Az alábbi protokoll 1 mintára vonatkozik:

9,4 µl MQ víz

3 µl 5x Phire Green reakciós puffer

0,75 µl Forward primer (10 µM)

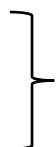
0,75 µl Revers primer (10 µM)

0,3 µl 10mM dNTP

0,3 µl Phire Hot Start II DNA Polymerase

0,5 µl templát (10x hígítású cDNS)

A PCR reakciót az alábbi beállítási protokoll szerint végeztem:

1. denaturáció: 98°C – 30 s
 2. denaturáció: 98°C – 10 s
 3. anelláció: 55°C – 10 s
 4. elongáció: 72°C – 20 s
 5. végső elongáció: 72°C – 1 min
- 

A kapott PCR terméket a megfelelő pozitív és negatív (MQ víz) kontrollal együtt 1,2%-os agaróz gélen elektroforézissel választottam el. Méretmarkernek GeneRuler 100 bp DNA Ladder-t (Thermo Fisher) használtam.

3.6 Vírusok kimutatása RT-PCR-rel

RT-PCR használatával csak olyan vírusok kimutatására van lehetőségünk, amelyek jelenlétét ismerjük, illetve feltételezzük, valamint a vírus örökítőanyagát legalább részben ismerjük (Boonham et al. 2014).

A gyümölcsfákat fertőző vírusok kimutatásához a PNRSV kimutatására az irodalomban leírt primereket használtam, míg a CVA és a LChV-1 vírusokra specifikus primereket (indítószekvenciákat) csoportunk tervezte. Az új generációs szekvenálás során kapott vírusspecifikus kis RNS readek alapján készített konszenzus szekvenciákat összevetettük az NCBI/GenBank adatbázisában szereplő szekvenciákkal. A szekvenciák illesztésével a legkonzervatívabb régiók kiválasztásával terveztük primereinket a PCR reakciókhoz (Czotter et al. 2016). A három vírus kimutatásához használt primerek szekvenciáit, tulajdonságait az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat: A vírusspecifikus RT-PCR reakciókban használt primerek tulajdonságai

Vírus	Gén	Hossz (bp)	Primer	Indítószekvencia (5'-3')	Anellációs hőmérséklet (°C)
Cherry Virus A	MP*	1391	CVAMP-FM (5400)	ATGTCGATCATACCAG TYAAG	62
			CVAMP-Rm (6791)	TTACCTTCTGCACCAA CYAC	
Prunus Necrotic Ringspot Virus	CP*	405	PNcpinF	GAGTATTGACTTCACGA CCAC	56
			PNcpinR	CTTTCATTTCGGAGAAA TTCG	
Little Cherry Virus-1	HSP70h*	795	LChV1_9493F	GTTGTTAGATTCCGTCA TTAR	51
			LChV1_10288 R	CAGTCGAACTACCAAG CGTTC	

*MP= movement protein (mozgási fehérje), CP= coat protein (köpenyfehérje), HSP70h= heat shock protein 70 homologue (h• sokkfehérje 70 homológ)

A reakcióhoz szükséges keveréket a következők szerint állítottam össze 15 µl végtérfogatban.

Az alábbi protokoll 1 mintára vonatkozik:

9,4 µl MQ víz

3 µl 5x Phire Green reakciós puffer

0,75 µl Forward primer (10 µM)

0,75 µl Revers primer (10 µM)

0,3 µl 10mM dNTP

0,3 µl Phire Hot Start II DNA Polymerase

0,5 µl templát (10x hígítású cDNS)

A PCR reakciót az alábbi beállítási protokoll szerint végeztem:

1. denaturáció: 98°C – 30 s
 2. denaturáció: 98°C – 10 s
 3. anelláció: x. táblázat
 4. elongáció: 72°C – 20 s
 5. végső elongáció: 72°C – 1 min
- } 40X

A kapott PCR terméket a megfelelő pozitív kontrollal együtt 1,2%-os agaróz gélen elektroforézissel választottam el. Méretmarkernek GeneRuler 100 bp DNA Ladder-t és

GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder-t (Thermo Fisher) használtam. Az alkalmazott pozitív kontrollokat a 6. táblázatban foglaltam össze.

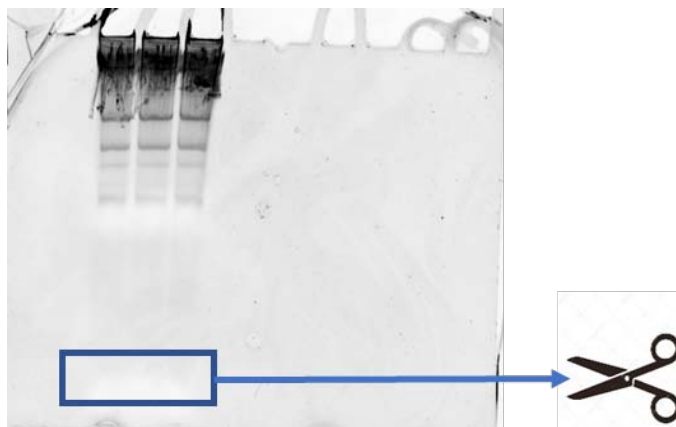
6. táblázat: Alkalmazott pozitív kontrollok

Vírus	Pozitív kontroll
Cherry Virus A	Pannónia kajszi
Little Cherry Virus-1	Magyar kajszi
Prunus Necrotic Ringspot Virus	Velencei virológiai állomáson mintázott tünetes kajszi

3.7 kisRNS könyvtár készítése

A kisRNS könyvtárat a TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina) protokollja alapján készítettem.

A kisRNS-eket a levélmintákból készített összes RNS-t tartalmazó kivonatból tisztítottam. A könyvtár elkészítésének első lépéseként 8 %-os ureát tartalmazó poliakrilamid gélre öntöttem, amit 100V-on 20-30 percig el-futtattam, majd a zsebeket 1x-es TBE pufferrel (tris-borát-EDTA) átmostam. Közben 30 µl RNS-t tartalmazó kivonatot és 30 µl FDE festéket összemértem, majd 65 °C-on 20 percig tartó denaturálás után jégre tettem a mintákat. 20 µl mintát pipettáztam a gél zsebeibe, majd addig futtattam 100 V-on, míg a brómfenolkék festék elérte a gél alját. Miután elérte a festék a gél alját, steril petricsészébe 60 ml 1x-es TBE puffert öntöttem, amibe 3 µl etídium-bromidot pipettáztam, majd ebbe belehelyeztem a gél és annyi puffert töltöttem még rá, hogy az teljesen ellepje. Az etídium-bromidos festésre azért van szükség, mert az etídium-bromid a nukleinsavak bázisai közé interkalálódik, ami UV fény alatt fluoreszkál, így ellenőrizhetjük az RNS-ek jelenlétét. A kisRNS tartományt UV fény alatt steril szikével kivágtam (15-30 bp, a brómfenolkék festék felett) (7.ábra).



7. ábra: kisRNS mérettartományának kivágása. (Czakó Dávid, 2017)

Steril t•vel 3-4 ponton kilyukasztottam a 0,5 ml-es Eppendorf cs•vet, majd ezt behelyeztem egy 2 ml-es Eppendorf cs•be. A kivágott gél darabot 0,5 ml-es Eppendorf cs•ben 2 percig 13.000 rpm-en centrifugáltam, így a gél átcentrifugálódott a lyukakon. Ezután rámértem 500 µl 0,3 M-os NaCl oldatot és egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltam.

Inkubálás után a mintákat átöntöttem Spin X cellulóz-acetátos filter cs•be és 16.000 rpm-en 2 percig centrifugáltam, majd ezt a folyamatot megismételtem még egyszer. A mintákra rámértem 600 µl izopropanolt és 1 µl GlycoBlue-t (ThermoFisher). Ezután 2 óra 30 percig inkubáltam a mintákat -70 °C-on, majd 4 °C-on 20 percig centrifugáltam teljes sebességen. A felülúszó leöntését követ•en a cs• alján kialakult pelletet kétszer átmostam 1 ml 70%-os etanollal és SpeedVac géppel 10 perc alatt kiszáritottam. A csapadékot 20 µl ultra tiszta vízben (kit tartalmazza) oldottam vissza (Czotter et al. 2018b).

3.7.1 3' és 5' adapter ligálása

A 3' és 5' adapter ligálásra azért van szükség, mert primerként szolgálnak a kés•bbi PCR reakciók során. Jégen hozzámértem 2,5 µl visszaoldott kisRNS-hez 0,5 µl RA3-t (RNS 3' adapter). 2 percig 70 °C-on denaturáltam, majd jégre tettem. Az el•z•leg összemért keverékbe belepipettáztam 1 µl HML-t (ligálási puffer), 0,5 µl T4 RNA Ligase 2-t és 0,5 µl RNase inhibitor. Ezután 28°C-on 1 órán át inkubáltam PCR készülékben, majd pár percre jégre raktam. Belemértem 0,5 µl STP-t (stop solution), majd 15 percig 28°C-on inkubáltam és jégre tettem.

Az 5' adapter ligálásához el•ször steril PCR cs•be kimértem 0,5 µl RA5-t (RNS 5' adapter), majd 2 percig 70 °C-on denaturáltam, utána jégre tettem. Jégen tartva belepipettáztam 0,5 µl 10 mM ATP-t és 0,5 µl T4 RNS ligázt. Alapos keverést követ•en a keverékbe 1,5 µl-t hozzámértem a 3' adapter reakcióhoz. 28°C-on 1 órán át inkubáltam PCR készülékben, majd jégre raktam (Czotter et al. 2018b).

3.7.2 Reverz transzkripció

cDNS készítése azért szükséges, mert PCR reakciók során az RNS nem használható templátnak. A reverz transzkripció során egyszálú cDNS szintetizálódik (Wonderlich 2014). Steril PCR cs•be belemértem 1 µl RTP-t (RNS RT primer) és 6 µl-t a 3'-5' adapterekkel ligált termékbe. A keveréket 2 percig 70°C-on denaturáltam PCR gépben, majd jégre tettem. Elkészítettem az RT reakcióhoz szükséges keveréket: 2 µl 5x reakció puffer, 1 µl ultrapure víz, 0,5 µl 12,5 mM dNTP, 1 µl RNase inhibitor és 1 µl Revert Aid H-reverse transzkriptáz

hozzáadásával. 5,5 µl RT reakció keveréket hozzápipettáztam a 3'-5'adapterrel ligált/primer reakció elegyhez, majd 1 órán át 50°C-on PCR készülékben inkubáltam.

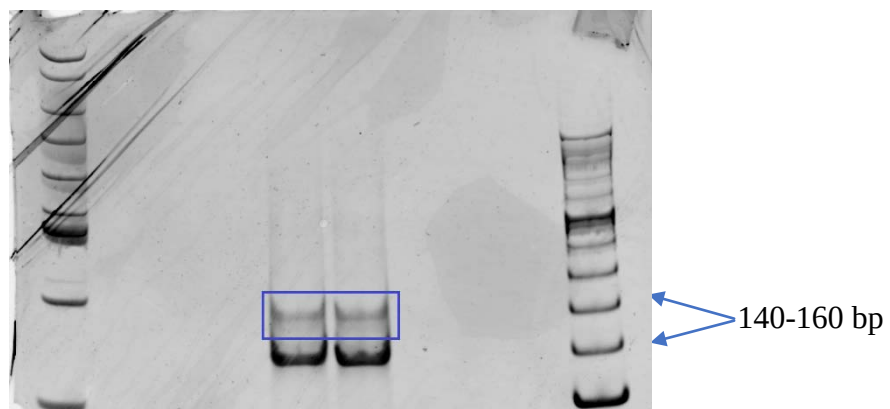
3.7.3 PCR amplifikálás

Az el•z• lépésben szintetizált cDNS-t RNA PCR index (Illumina) szekvenciáinak használatával PCR-rel amplifikáltam. Összemértem a PCR reakcióhoz szükséges keveréket az alábbiak szerint: 4,25 µl MQ víz, 12,5 µl PML (PCR mix) 1µl RP1 (RNS PCR primer) és 1 µl RNA PCR primer index. Az összeállított keverékhez 6,25 µl cDNS-t pipettáztam.

A PCR reakciót a következ• beállítás mellett végeztem:

1. denaturáció: 98°C - 30 s
 2. denaturáció: 98°C - 10 s
 3. anelláció: 60°C - 30 s
 4. elongáció: 72°C - 15 s
 5. végs• elongáció: 72°C - 10 min
- } 40X

A PCR terméket ezután 8%-os natív poliakrilamid gélen futtattam. A gél el•futtatása és a zsebek mosása után 25µl PCR terméket összekevertem 5 µl Orange DNA-loading dye festékkel. Két különböz• mérettartományú markert használtam, 20 bp DNA ladder-t és 50 bp low-molecular-weight ladder-t. A futtatást el•ször 50 V-on végeztem, amint a minták bejutottak a gélbe, 100 V-on addig futtattam, amíg a xylén-kék festék elérte a gél alját. Steril petricsészébe 60 ml 1xTBE-t mértem, ebbe 3 µl etídium-bromid festéket pipettáztam majd behelyeztem a gél 5 percre. Az ellen•részésképpen megfuttatott PCR termék 140-160 bp mérettartomány közé kerül az elválasztásnál (8. ábra).



8. ábra: Ellen•rz• futtatás 8%-os akrilamid gélen.
(Czakó Dávid, 2017)

0,5 µl-es steril Eppendorf cs• alját steril t•vel 3-4 helyen kiszúrtam, majd belehelyeztem egy 2 ml-es Eppendorf cs•be. UV fény alatt steril szikével izoláltam a kisRNS régiót (140-160 bp) és a kilyukasztott PCR cs•be helyeztem a kivágott gél darabokat. Kétszer ismételve, 4 percig 13.000 rpm-en centrifugáltam, majd rámértem 500 µl 0,3 M NaCl oldatot és egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltam. Az inkubációs id• leteltével a cs• teljes térfogatát átpipettáztam Spin X cellulóz-acetátos filtercs•be, majd 2 percig 16.000 rpm-en, majd felpipettáztam és megismételtem újra a centrifugálást. Centrifugálás után rámértem 1 ml cc. etanolt és 1 µl GlycoBlue-t, majd 2 óra 30 percig -70°C-on inkubáltam. Ezt követ•en 20 percig 13.000 rpm-en centrifugáltam 4°C-on. A cs• alján kialakult pellet•l leöntöttem a felülúszót és kétszer átmostam 70%-os etanollal, majd kiszárítottam SpeedVac vákuum centrifugával. A csapadékot 12 µl 1xTBE pufferben visszaoldottam (Czotter et al. 2018b).

3.8 Bioinformatikai elemzés

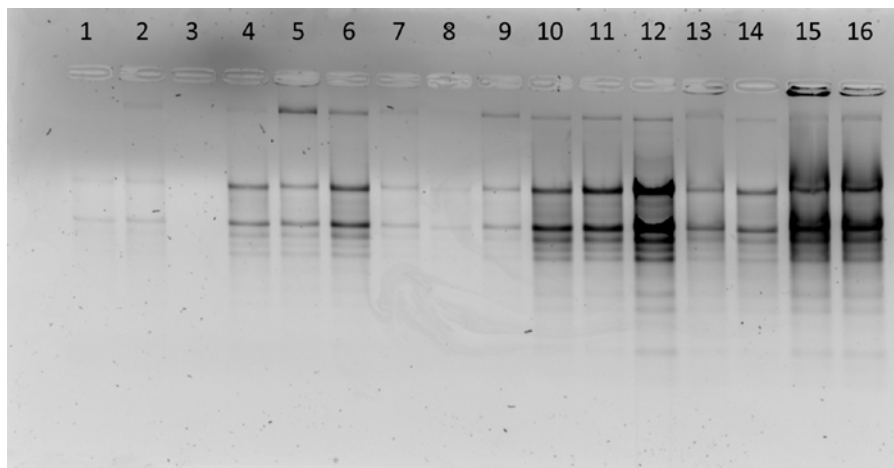
A kisRNS könyvtárak szekvenálását az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft. (Debrecen) végezte Illumina® HiScanSQ NGS platformot használva. A kapott adatok elemzését CLC Genomics Workbench 11 (Qiagen Bioinformatics®) programmal végeztem.

4. Eredmények

4.1 Újfehértói meggy minták vírusdiagnosztikája

4.1.1 Az újfehértói törzsültetvény vizsgálata

A NAIK GYKI újfehértói törzsültetvényről gyűjtött levélmintákból történő RNS kivonást Gambino és munkatársai (2008) módszere alapján végeztem. A mintavételezés 2018-ban történt, a mintázott fajtákat a melléklet 1. táblázatában foglaltam össze. A kivonás eredményességét 1,2%-os agaróz gélen történő elválasztással ellenőriztem (9. ábra).



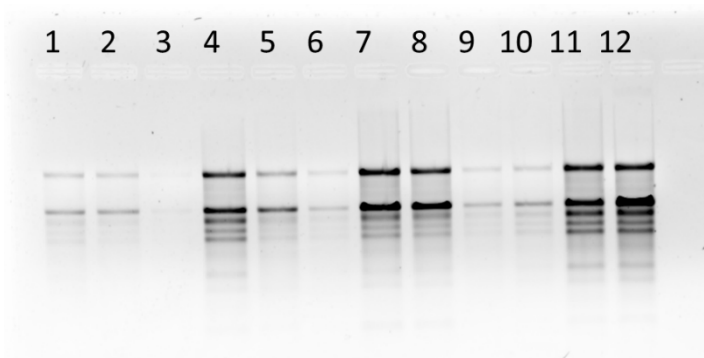
9. ábra: Az Újfehértóról származó meggy mintákból tisztított RNS minőségének ellenőrzése 1,2% agaróz gélen történő elektroforetikus elválasztással. (Czakó Dávid, 2017)

Ezt követően megmértem a minták RNS koncentrációját. A kivonás eredményességét nagyban befolyásolta a mintázott fa fajtája és a növényi szövet minősége, emiatt több kivonást ismételni kellett, valamint a koncentráció mérés során nagy eltérések mutatkoztak. A koncentrációmérés eredményének alapján először fajtakeveréket készítettem, majd az összes fajtakeverékből egy újabb keveréket (ültetvény keveréket) készítettem. A koncentrációkülönbségekből adódó eltérések kiküszöbölésére a keverékeket úgy készítettem el, hogy az RNS minták egyenlő mértékben legyenek jelen a keverékében. Abban az esetben, amikor egy fajtáról csak egy fáról származó minta állt rendelkezésemre, nem készítettem keveréket. A mellékletben szereplő 1. táblázat tartalmazza a keverékek koncentrációmérésének adatait. A túl nagy térfogatú minta elkerüléséhez az RNS-t kicsaptam, és kisebb térfogatban oldottam vissza, így nagyobb koncentrációt kaptam. Munkám folytatásában ebből a keverékből kisRNS könyvtárát készítettem, aminek a szekvenálása jelenleg folyamatban van, amit az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft. (Debrecen) végez, Illumina HiScanSQ NGS platformot használva. A továbbiakban a bioinformatikai elemzést és a vírusspecifikus PCR reakciókat munkatársaim által 2017-ben a NAIK Gyümölcskutató Intézet, érdi telephelyéről

származó meggy és cseresznye anyafákról gyűjtött mintákból és szekvenált kisRNS könyvtárból végeztem.

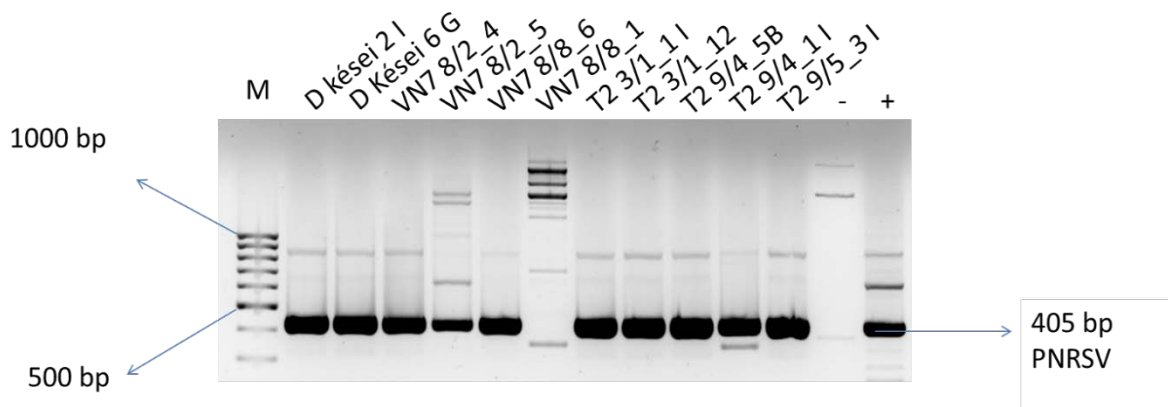
4.1.2 Újfehértói *in vitro* meggy fajtajelöltek vizsgálata

Az Újfehértón vírusmentesített *in vitro* meggy fajtajelöltekről kapott mintákból készült RNS kivonásokat szintén Gambino és munkatársai (2008) protokollja alapján végeztem, majd a kivonás eredményességét 1,2%-os agaróz gélen történő elválasztással ellenőriztem (10. ábra). Ezt követően megmértem az izolált RNS koncentrációkat, amiket a fajtajelöltek adataival együtt a melléklet 2. táblázatában foglaltam össze. A vizsgálatok folytatásához cDNS-t készítettem. A vírusspecifikus PCR reakciókhoz 10-szeres hígítású cDNS-t használtam.



10. ábra: *In vitro* meggy minták RNS kivonásának minőségellenőrzése 1,2% agaróz gélen történő elektroforetikus elválasztással. (Czakó Dávid, 2017)

A munkámat PNRSV specifikus PCR-reakció elvégzésével folytattam. A fajtajelöltek vírusdiagnosztikájának elvégzése azért volt szükséges, hogy megállapítsuk, hogy mely fajtajelöltek esetében volt sikeres a vírusmentesítés, melyikiek esetében nem. A sikertelen vírusmentesítéseket ismételni kell, a fertőzött egyedeket pedig a továbbiakban nem szükséges fenntartani. A vizsgálat eredményét a 11. ábra mutatja, amin jól látszik a fajtajelöltek fertőzöttsége. A várt termékünk 405 bp magasságában található. A vizsgált 11 fajtajelölt közül csupán egyet találtunk PNRSV vírustól mentesnek.



11. ábra: Meggy in vitro fajtajelöltek PCR tesztje PNRSV vírusra. (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -: negatív kontroll, +: pozitív kontroll [Velencei virológiai állomáson mintázott tünetes kajszi]). (Czakó Dávid, 2017)

4.2 A NAIK GYKI érdi törzsültetvény és a Velencén zajló virológiai indexelés eredményeiknek értékelése

4.2.1 Mintavételezés

A mintavételezést munkatársaim végezték 2017-ben Érden. Olyan fákról gyűjtöttek levélmintákat, melyeket 2016-ban a velencei virológiai laborban bioteszt kísérletekben kezdtek el tesztelni. A fák, néhány kivételtől eltekintve, nem mutattak vírushatás okozta tünetet. *Phoma pomorum* okozta kártétel több esetben előfordult (Linda 34. sor 46. fa; Valerij Cskalov 32. sor 17. fa; Cigány 59 29. sor 1. fa; Érdi jubilleum 29. sor 11. fa). Emellett állati károsítók (*Melonontha* sp., *Myzus cerasi*) okozta kártétel (Cigány 59 29. sor 1. fa; Piramis: 36. sor 1. fa) volt megfigyelhető. A fák kondíciójukat tekintve megfelelőek voltak, a 33. sor 17. fán (Katalin) tápanyaghiány tünete volt látható. LChV-1-re utaló bronzosodás volt megfigyelhető a Germersdorfi 3 (32. sor 8. fa) és a Bigerreau Burlat (33. sor 6. fa) fajták esetében (12. ábra).



12. ábra: Germersdorfi 3 és Bigerreau Burlat fajtákon LChV-1-re utaló levéltünet. (Baráth Dániel, 2017)

4.2.2 Viroológiai indexelés értékelése

A NAIK Gyümölcskutató Intézetből származó, Velencén, virológiai fésztre kihelyezett fák értékelése 2018-ban történt. A bioteszten GF305, Kwanzan, vadcsesznye, Canindex, Sam és Bing csesznye fajtákat alkalmaznak indikátornövényként. A vizuális szemrevételezés során több fajta esetében tapasztalható volt, hogy az alany, a szemzett vizsgálódó fajta, vagy az indikátor nem eredt meg, illetve elfordult megvelés okozta kár miatt, hogy az adott növény nem volt bonitálható. Ennek eredményét a 7. és 8. táblázatban foglaltam össze.

7. táblázat: A virológiai fésztben lévő meggy fajták indikátornövényeinek bonitálhatósága

	Vadcsesznye	Kwanzan	Canindex	Sam	Bing
Indikátorok (db)	50	50	30	30	40
Megeredt indikátorok (db)	50	50	27	25	39
%	100	100	90	83,33	97,5
Ebből tünetet mutatott(db)	0	15	0	0	0
%	0	30	0	0	0

8. táblázat: A virológiai fésztben lévő csesznye fajták indikátornövényeinek bonitálhatósága

	Vadcsesznye	Kwanzan	Canindex	Sam	Bing
Indikátorok (db)	49	43	30	30	40
Megeredt indikátorok (db)	45	38	29	30	40
%	91,84	88,37	96,67	100	100
Ebből tünetet mutatott(db)	0	0	0	0	0
%	0	0	0	0	0

Amint a táblázatban is látható, a meggy fajták indikátorai közül a vadcsesznye és a Kwanzan japáncsesznye fajták kivételével, a megeredés nem volt tökéletes. A Canindex fajta esetében 3, a Sam fajta esetében 5, a Bing esetében pedig 1 növény nem eredt meg. A csesznye fajták indikátornövényei közül a vadcsesznye esetében 4, a Kwanzan japáncsesznye esetében 5 és a Canindex csesznyefajta esetében 1 növény nem eredt meg.

Néhány fa esetében itt is tapasztalható volt *Phoma pomorum* és/vagy állati kártétel. Leggyakoribb a cserebogár (*Melonontha sp*) és a fekete cseresznye levéltet• (*Myzus cerasi*) kártétele volt. A Bigerreau Burlat és Petrus fajták Canindex indikátor növényen, Sunburst fajta Sam indikátornövényen és Érdi jubilleum vadcsereznye indikátornövényen találtunk levéltet• okozta kártételt. A tüneti megfigyelés során nem találtunk vírusfert•zésre utaló jelet, viszont a Maliga emléke, a Piramis és az Érdi nagygyümölcs• meggy fajták esetében Kwanzan indikátor növényen a levélszél sárgulását, a levél húzottságát tapasztaltuk (13. ábra). A f•teszten lévő egyes indikátor fák adatait a melléklet 3. és 4. táblázatában foglaltam össze.



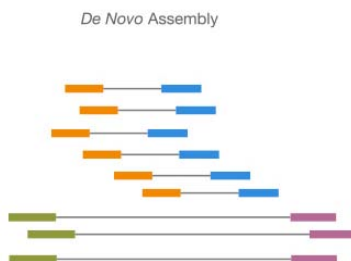
13. ábra: Piramis fajtán tapasztalt klorotizálódott levélszél, deformáltság és húzottság. (Czakó Dávid, 2018)

4.2.5 A kisRNS könyvtárak bioinformatikai elemzése

A kisRNS könyvtárban megtalálható a levélmintákból származó összes kisRNS, nem csak a növényi endogén szabályzó kisRNS-ek, hanem az RNS interferencia során keletkező siRNS-ek szekvenciáját tartalmazza. Vírusfertőzött fa esetén ilyenkor a jelenlevő vírus szekvenciájával megegyező kisRNS-eket is találunk a szekvenált mintában. Az érdi törzsültetvényről származó mintákból készített kisRNS könyvtár szekvenálását a UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft. (Debrecen) végezte Illumina® HiScanSQ NGS platformot használva. A kapott adatok elemzését CLC Genomics Workbench 11 (Qiagen Bioinformatics®) programmal végeztem. Ennek segítségével lehetőségem nyílt a mintáimban található összes jelenlevő (akár ismert, akár eddig ismeretlen) vírus kimutatására.

Az elemzés első lépéseként trimmeltem a szekvenciákat. Ennek során eltávolítottam a könyvtárkészítés során a kisRNS-ekhez ligált adapterek szekvenciáját a szekvenciavégekről és eltávolításra kerültek a nem megfelelő minőségű szekvenciák. Ezt követően az átfedő

szekvenciákat tartalmazó kisRNS olvasatokból hosszabb szakaszokat építettem össze, amit a bioinformatikában „contig”-építésnek neveznek (14. ábra). Ennek során hosszabb szakaszokat kaptam, melyeket a referencia vírusgenomokra illesztve nagyobb pontossággal kaphatok találatot, csökkentve a hibás illesztések lehetőségét.



14. ábra: „Contig” építés Illumina® platformon történő szekvenálás után (http13)

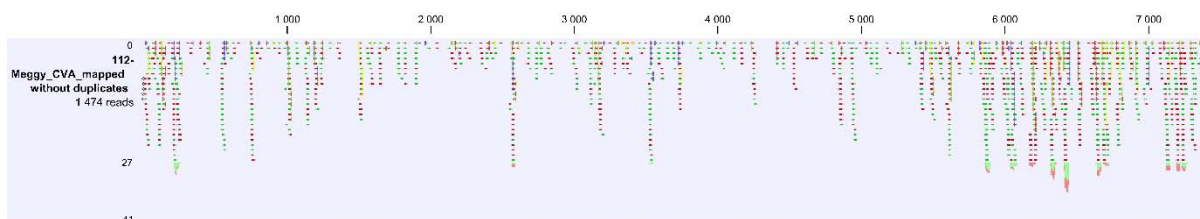
A kapott szakaszokat ráillesztettem az NCBI vírus-referenciagenomokat tartalmazó adatbázisára, így egy találati listát kaptam, ami megmutatta, hogy melyik vírus mutatható ki a növényből. A kapott listából a legalacsonyabb E-value/értékre való rendezés után, melynek maximumát E^{-5} értékben határoztuk meg, kiválasztottam a potenciálisan jelenlévő vírusokat. Az E-value a találat szignifikancia szintjét jellemzi, minél kisebb az érték annál valószínűbb egy adott vírus előfordulása. Az így kapott találatokat a 9. táblázatban foglaltam össze.

9. táblázat: E-value alapján rendezett találatok adatai

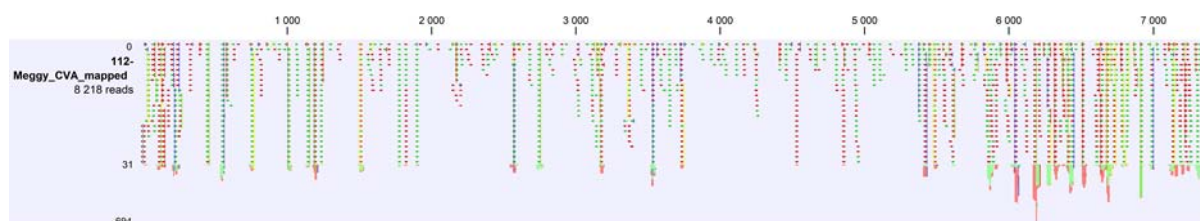
Meggy			Cseresznye		
Legalacsonyabb E-value	Vírus	Contigok száma	Legalacsonyabb E-value	Vírus	Contigok száma
1,72E-24	Cherry Virus A	31	3,80E-19	Pepper chlorotic spot virus isolate 14YV733 segment L	10
1,62E-17	Pepper chlorotic spot virus isolate 14YV733 segment L	11	4,13E-08	Cherry Virus A	23
2,14E-05	Nootka lupine vein-clearing virus	5	5,65E-07	Sweet potato leaf curl Spain virus	2
7,64E-05	Papaya lethal yellowing virus	9	2,14E-05	Grapevine Red Globe virus isolate Graciano-	9
			2,80E-05	Juncus maritimus associated virus isolate 13-FMN-1	6
			6,99E-05	Abutilon Brazil virus DNA A segment	1

A legalacsonyabb E-értékre való rendezése után, mind a két könyvtár esetében a CVA rendelkezett a legalacsonyabb E-értékkel. Az ezen kívül talált vírusokkal való vizsgálatot a kevés felillesztett szakasz miatt nem folytattam.

Ezt követően kiválasztottam azt a vírust, amelyikre a legtöbb contigot fel tudtam illeszteni, ami a cseresznye és a meggy könyvtár esetében is a CVA volt. Az NCBI GenBankból kikerestem a CVA referencia genomját, majd ráillesztettem a trimmelt szekvenciákra, így megkaptam, hogy hány read-et tudott a program felilleszteni. Minél nagyobb lefedettséget kapunk a referenciára illeszkedő readek elemzése során, annál valószínűbb, hogy az illeszkedő readek virális eredetűek. A bioinformatikai elemzés alapján mind a két kisRNS könyvtárból kimutatható volt a CVA jelenléte. A 14. ábrán látható a meggy kisRNS könyvtárra való nem redundáns readek illeszkedése. A nem redundáns readek illesztése során a program az egyedi szekvenált kis RNS-eket csak egyszer illeszti fel, míg a redundáns readek esetében az összes illeszkedő kisRNS-t megjeleníti, ez látható a meggy kisRNS könyvtár esetében a 15. ábrán. A nem redundáns illeszkedés során a meggy kisRNS könyvtárra 1474, a redundáns illeszkedés során 8218 readet tudott a program felilleszteni.

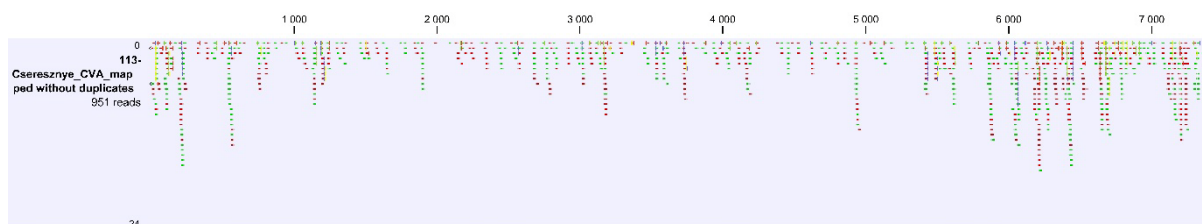


14. ábra: CVA referenciagenomra történő nem redundáns readek illeszkedése a meggy kisRNS könyvtár esetében.

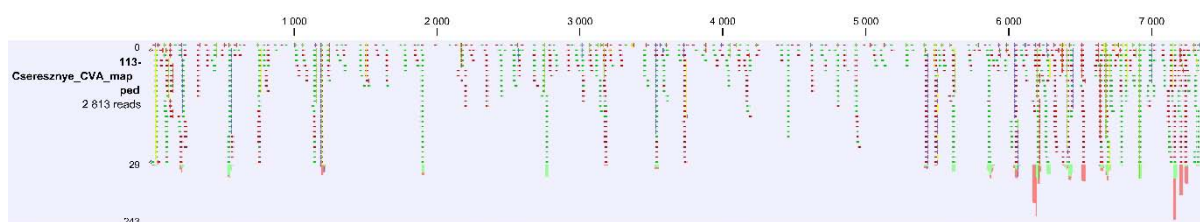


15. ábra: CVA referenciagenomra történő redundáns readek illeszkedése a meggy kisRNS könyvtár esetében.

A 16. ábrán látható a cseresznye kisRNS könyvtárra való nem redundáns readek illeszkedése, mely során a program 961 readet tudott felilleszteni. A 17. ábrán a redundáns readek illeszkedése látható, mely során 2813 readet tudott a program felilleszteni.



16. ábra: CVA referenciagenomra történő nem redundáns readok illeszkedése a cseresznye kisRNS könyvtár esetében.



17. ábra: CVA referenciagenomra történő redundáns readok illeszkedése a cseresznye kisRNS könyvtár esetében.

Munkám folytatásában az illesztéseket elvégeztem a 14/2017. (III. 23.) FM rendeletben meghatározott karantén vírusokra is. A karanténvírusok adatait a korábban említett találati listából a 10. táblázatban foglaltam össze

10. táblázat: Karantén vírusok adatai a bioinformatikai elemzés alapján

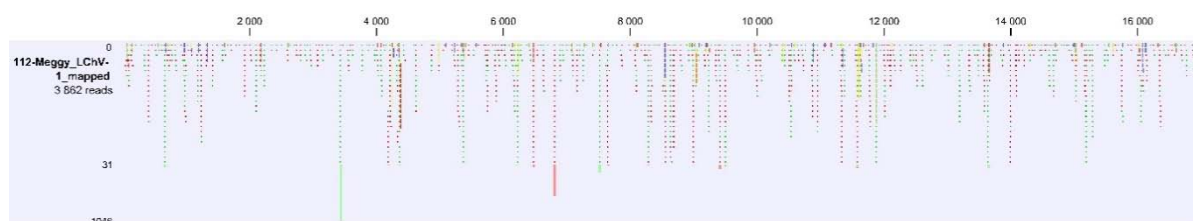
Meggy			Cseresznye		
Legalacsonyabb E-valor	Vírus	Contigok száma	Legalacsonyabb E-valor	Vírus	Contigok száma
0,44125	ACLSV	6	0,382415	ACLSV	13
0,12792	ApMV	5	0,143244	ApMV	5
0,000666767	ArMV	10	0,01245	ArMV	15
0,13458	CGRMV	4	0,143244	CGRMV	9
0,03622	CLRV	9	0,048282	CLRV	16
0,18538	CNRMV	6	0,04104	CNRMV	8
0,04104	LChV1	29	0,003765	LChV1	39
0,03622	LChV2	25	0,03622	LChV2	36
0,0386325	ChMLV	27	0,045868	ChMLV	21
0,0579389	PDV	10	0,055525	PDV	9
0,053111	PNRSV	13	0,134848	PNRSV	14
0,010377	RsRSV	6	0,011667	RsRSV	15
0,031391	SLRSV	14	0,12642	SLRSV	26
0,0382415	TBRV	21	0,009685	TBRV	30

Az összefoglalt eredmények alapján a listából kiválasztottam azt a vírust amelyikre a legtöbb contigot tudtam illesztést végezni. Ez a cseresznye és a meggy kisRNS könyvtár esetében a LChV-1 vírus volt.

Az NCBI GenBankból letöltöttem a LChV-1 referencia genomját, majd ráillesztettem a trimmelt szekvenciákra. A bioinformatikai elemzés alapján mind a kettő kisRNS könyvtárból kimutatható a vírus jelenléte. Az 18. ábrán a nem redundáns readok illeszkedése, a 19. ábrán a redundáns readok illeszkedése látható a meggy kisRNS-re. A nem redundáns illeszkedés során a meggy könyvtárra 1201, a redundáns illeszkedés során 3862 readet tudott a program felilleszteni.



18. ábra: LChV-1 referenciagenomra történő nem redundáns readok illeszkedése a meggy kisRNS könyvtár esetében.

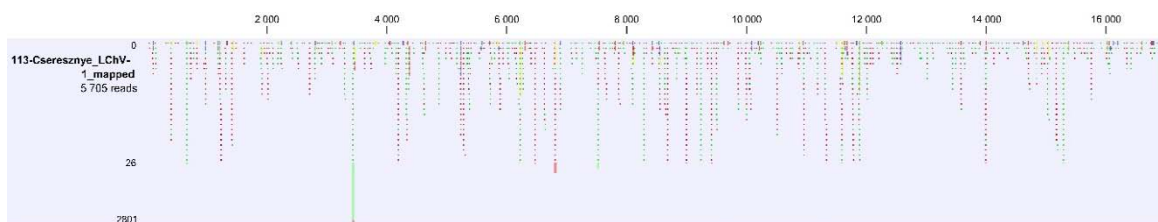


19. ábra: LChV-1 referenciagenomra történő redundáns readok illeszkedése a meggy kisRNS könyvtár esetében.

A program nem redundáns illeszkedés során (20. ábra) a cseresznye kisRNS könyvtárra 1165, a redundáns illeszkedés során (21. ábra) 5705 readet tudott a program felilleszteni.



20. ábra: LChV-1 referenciagenomra történő nem redundáns readok illeszkedése a cseresznye kisRNS könyvtár esetében.



21. ábra: LChV-1 referenciagenomra történő redundáns readek illeszkedése a cseresznye kisRNS könyvtár esetében.

Munkám folytatásaként az újgenerációs szekvenálás során kapott vírusok visszaigazolását végeztem vírusspecifikus primereket felhasználva RT-PCR reakciókkal.

4.2.3 cDNS készítése és minőségének ellenőrzése „aktin tesztel”

A vírusspecifikus PCR-reakciók elvégzését megelőzően, a munkatársaim által 2017-ben érdeklő gyűjtött mintákból előleg izolált RNS-ekről első lépésben cDNS-t készítettem. A vizsgált meggy és cseresznye fajták és az RNS koncentráció mérés adatait a melléklet 5. és 6. táblázatában foglaltam össze. A cDNS szintézis eredményességének vizsgálatára, általunk „aktin-tesztnek” nevezett eljárást alkalmaztam, amely során alma aktin mRNS-re tervezett specifikus primerekkel PCR-reakciót végeztem. Az alma aktin génjére tervezett indítószekvenciák az aktin gén nagyfokú hasonlósága miatt sokszorozni képesek a meggy és a cseresznye aktint is, ezért ezek a primerek felhasználhatóak voltak az ezekről a növényekről készített cDNS minőségének meghatározására. Az aktin teszt eredménye a meggy minták esetében a 22. ábrán, a cseresznye minták esetében a 23. ábrán látható. A várt PCR terméket 719 bp-nál láthatjuk, melynek meghatározásához Thermo Scientific GeneRuler 100bp markert használtam.

4.2.4 RT-PCR tesztek vírusspecifikus primerekkel

A vírusspecifikus PCR-reakciókhoz 10-szeres hígítású cDNS-t használtam. Az eredmények ellenőrzését 1,2%-os agaróz gélen történő elválasztással végeztem. A kapott PCR termékek méretének azonosításához Thermo Scientific GeneRuler 100bp plus markert használtam.

A CVA kimutatására szolgáló PCR-reakció meggy mintákról készült gélképe a 22. ábrán, a cseresznye mintákról készült gélkép a 23. ábrán látható. A vírus kimutatására a mozgási fehérjét kódoló génszakaszra tervezett primert használtam. A reakció során keletkező terméket 1391 bp-nál vártam. Az ábrákon látható, hogy a törzsültetvényben megtalálható a vírus, a bioinformatikai elemzést megerősítve. A cseresznye esetében a Tünde és a Bigarreau

Burlat fajtákból, míg a meggy fajták esetében az Érdi jubilleum, a Pándy 279 és az Újfehértói fürtös fajtákból tudtam kimutatni a vírus jelenlétét.

A karantén vírusok közül a PCR-tesztet LChV-1-re és PNRSV-re végeztem el. A LChV1 vírus kimutatására HSP70 h•sokkfehérjére tervezett primert alkalmaztam. A vizsgálat eredménye meggy minták esetében a 22. ábrán, cseresznye minták esetében a 23. ábrán látható. A terméket 795 bp-nál vártam. A bioinformatikai vizsgálat ellenére, specifikus PCR-reakcióval nem sikerült kimutatnom a LChV-1 vírust. Annak kiderítésére, hogy miért nem sikerült PCR-reakcióval kimutatni a vírust, a trimmelt szekvenciákból az illeszked• kisRNS-ek consensus szekvenciáját készítettem. Ahol nem állt rendelkezésre szekvenciaadat, ott a program N bet•t illesztett be. Ezt követ•en az alkalmazott primerek szekvenciáját ráillesztettem a consensus szekvenciára, hogy megtudjam mutatnak-e eltérést. A consensus szekvencia hiányzó részei miatt sem a forward (24. ábra), sem a reverse (25. ábra) primer esetében nem tudtam pontos összehasonlítást végezni, ezért sem kizárni, sem meger•síteni nem tudom annak lehet•ségét, hogy a kisRNS szekvenálás eredményeinek visszaigazolása azért nem járt sikerrel, mert a mintákban jelenlev• LChV1 variáns a primerek szekvencia szakaszában eltér a primer szekvenciájától.

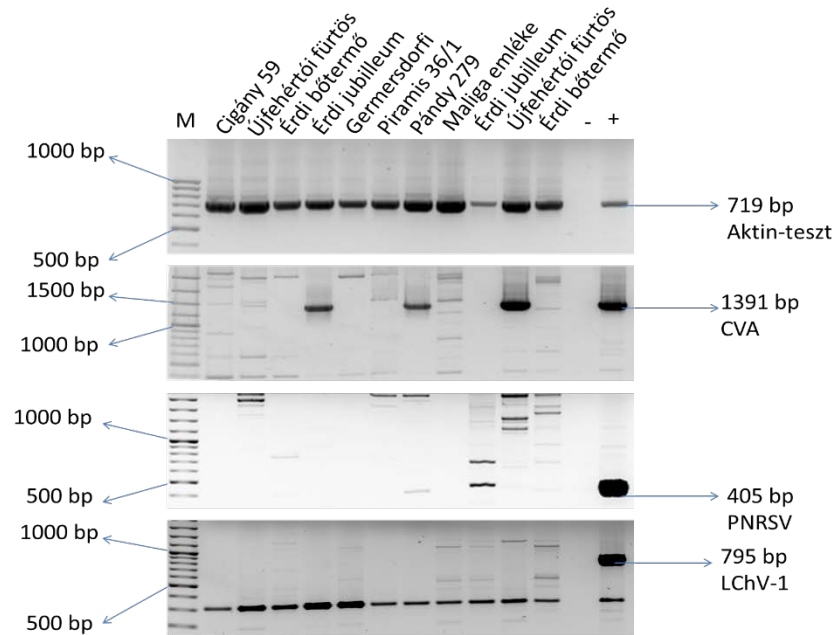
NC_001836.1	TCATTAATAAAAGCTTGAAGTTGTTAGATTCCGTCATTAGTCGAAATCATATCTCAAAGG	9533
10288R	-----	0
consesus	NNNNNNNNNNNNNTTGAAGTTGTTAGATTCCGTCATTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	9529
9493F	-----GTTGTTAGATTCCGTCATTAR-----	21

24. ábra: A forward primer illeszkedése

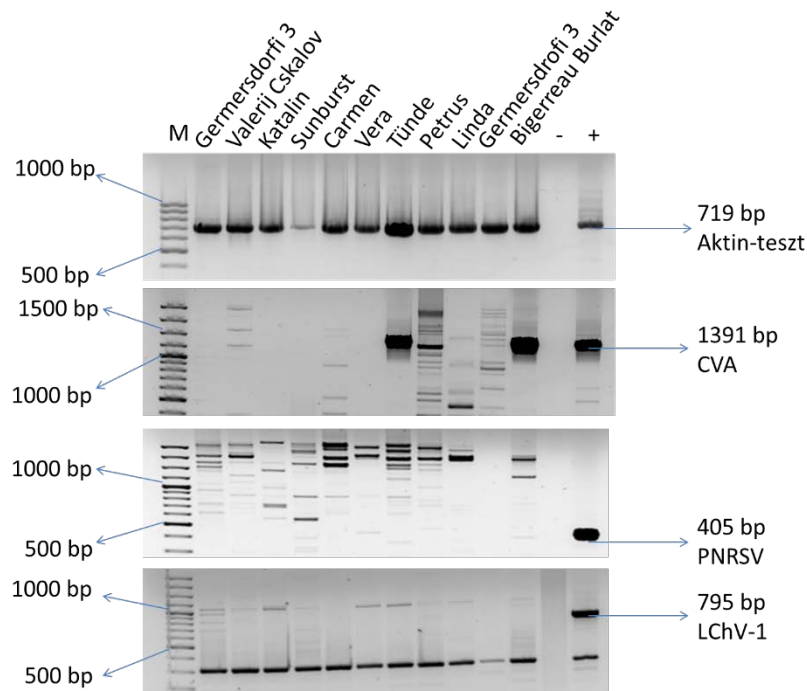
NC_001836.1	TTGATTCTTTAGATGAACGCTTGGTAGTTCGACTGTTATTTATATTAGACGGGGTATTTA	10313
10288R	-----GAACGCTTGGTAGTTCGACTG-----	21
consesus	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTGGTAGTTCGACTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTA	10309
9493F	-----	21

25. ábra: A reverse primer illeszkedése

A PNRSV specifikus PCR-tesztet els•sorban nem a bioinformatikai elemzés visszaigazolására végeztem, hanem azért, mert kíváncsi voltam, hogy vajon az *in vitro* meggy minták er•s fert•zöttségéhez hasonlóan tapasztalok-e er•s PNRSV fert•zöttséget a törzsültetvény anyafái esetében. A PNRSV vizsgálatának eredményét a meggy minták esetében a 22. ábra, a cseresznye minták esetében a 23. ábra mutatja. A vírus kimutatására köpenyfehérjét kódoló szakaszra tervezett primert alkalmaztam. A PCR-reakció során keletkez• terméket 405 bp-nál vártam. A vizsgálat eredménye szerint a törzsültetvényben nem található meg a PNRSV vírus.



22. ábra: A meggy mintákon végzett PCR vizsgálatok gélképei. (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -: negatív kontroll, +: pozitív kontroll [(CVA Pannónia kajsz, PNRSV Velencei virológiai állomáson mintázott tünetes kajsz, LChV-1 Magyar kajsz)]) (Czakó Dávid, 2018)



23. ábra: A cseresznye mintákon végzett PCR vizsgálatok gélképei. (M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNS marker, -: negatív kontroll, +: pozitív kontroll [(CVA Pannónia kajsz, PNRSV Velencei virológiai állomáson mintázott tünetes kajsz, LChV-1 Magyar kajsz)]) (Czakó Dávid, 2018)

5. Következtetések és javaslatok

A Velencei Virologiai Laboratórium kísérleti területén beállított f•teszt tüneti megfigyelésének összevetése az ugyanarról az anyafáról gy•jtött minták NGS eredményeivel mindenképpen fontos információkkal szolgál a jövő diagnosztikai eljárásainak kidolgozásában. A bioteszt nagy tér-, munka- és időigénye miatt felvetődött a kérdés, hogy szerepet vállalhat-e az újgenerációs szekvenálás a vírusmentesítési folyamatok ellenőrzésére vírusdiagnosztikára beállított biotesztek felváltásában. A kapott eredmények alapján a bioteszt érzékenysége nem minden esetben kielégítő és nem minden esetben egyezik az újgenerációs szekvenálás eredményeivel. A biotesztben megjelenő hibalehetőségek: időjárási tényezők, művelési károk, félrevezető tünetek, az adott vírushoz toleráns indikátor zavarhatják a vizuális értékelés megbízhatóságát. A növények bonitálhatóságát komplikálttá teszi, ha az alany, vagy az indikátornövény a szemzés, művelés során bekövetkezett sérülés miatt, vagy a jelenlevő vírus fertőzése miatt nem eredt meg. Emellett meg kell említeni a szántóföldi biotesztelés során korlátozott mértékben rendelkezésre álló vizsgálati területet, ami a csemeték talajuntságához, tápelemhiányához vezethet, tovább növelve a bonitálás hatékonyságának csökkenését. A talajok eltérő tápanyagellátottsága nem egyenletes, ami a növények méretbeli különbségét és fenotípusos eltéréseit eredményezheti.

Az újgenerációs szekvenálás teret nyit már ismert és ismeretlen vírusok kimutatására is. Alkalmazása során minden esetben szem előtt kell tartani, hogy olyan vírusok diagnosztikájára kell koncentrálnunk, amik tényleges gazdasági kárt képesek okozni. Az új vagy az adott országban eddig ismeretlen vírusokról - amik jelen vannak és voltak - egyelőre kevés információ áll rendelkezésünkre. Ide tartozik a Cherry Virus A, mely jelenlegi ismereteink szerint kevert fertőzés során más vírusok által okozott tüneteket felerősítheti, de tényleges gazdasági jelentőségéről egyelőre kevés információ áll rendelkezésünkre.

További vizsgálatokat igényel a bioinformatikai vizsgálatok alapján kimutatott LChV-1 PCR-reakcióval történő visszaigazolása. Az általam használt HSP70h fehérjét kódoló régióra tervezett primerpár mellett más primerek használatával mindenképpen meg kell ismételni a vizsgálatot. A kórokozó kimutatása igen nehéz feladat, egyes esetekben tünetmentes maradhat a fertőzés. A LChV1- vírus kimutatására rendelkezésünkre állnak indikátor növények, viszont, különböző izolátumok eltérő tüneteket mutathatnak eltérő indikátor növényen, például a V2356 izolátum Shirofugen japáncseresznye fán okozza az úgynevezett 'Shirofugen stunt disease' betegséget (Candresse et al., 2013), míg az ITMAR

izolátum Kwanzan japáncseresznyén okozza a 'Kwanzan stuning syndrome' tüneteit (Matic et al., 2009). A hatékony diagnosztizálást tovább nehezíti, hogy LChV-1 rendkívül variábilis, a vírus nagyfokú genetikai diverzitását írták le (Katsiani et al., 2018), ami megnehezíti az RT-PCR-rel történő visszaigazolást, mivel a magas mutációs ráta lehetővé teszi olyan variánsok létrejöttét, melyek szekvenciája pont ott mutat eltérést, ahol a primerek kötődnének a templát DNS-hez. Cseresznye fában kimutatták a LChV-1 különböző genotípusai által okozott kevert fertőzést (Katsiani et al., 2018).

Összefoglalva eredményeimet megállapíthatjuk, hogy a valóban vírusmentes szaporítóanyagok előállításához mindenképpen szükséges a vírus diagnosztikájának további tökéletesítése.

6. Összefoglalás

A nagy gazdasági jelentőséggel rendelkező csonthéjas gyümölcsfajtákból vírusmentes szaporítóanyag előállítása megkerülhetetlen és nélkülözhetetlen feladat. Ennek elengedhetetlen eleme a megfelelő diagnosztikai és vírusmentesítési eljárás alkalmazása és vírusmentes törzsültetvény fenntartása.

Munkám célja a NAIK Gyümölcskutató Intézet újfahértói telephelyén vírusmentesített *in vitro* meggy fajtajelöltek és az újfahértói meggy törzsültetvény vírusdiagnosztikája. A begyűjtött levélmintákból RNS kivonást végeztem, az *in vitro* minták vírusdiagnosztikáját RT-PCR-rel végeztem el, míg a törzsültetvényről származó mintákból RNS kivonást követően az újgenerációs szekvenálás (NGS) elvégzéséhez kisRNS könyvtárat készítettem. Az *in vitro* meggy fajtajelöltek PNRSV vírusra specifikus PCR-reakciójának eredményeképpen a fajtajelöltek nagyfokú fertőzöttségét állapítottam meg. A törzsültetvényről származó mintákból készített kisRNS könyvtár újgenerációs szekvenálása jelenleg folyamatban van.

A munkám további célja az NGS érzékenységének összehasonlítása, a hagyományos bioteszttel szemben. Ehhez munkatársaim által 2017-ben a NAIK Gyümölcskutató Intézet, érdi telephelyéről származó meggy és cseresznye anyafákról gyűjtött mintákat vizsgáltam. A gyűjtött mintákról korábban már elkészített kis RNS könyvtár bioinformatikai elemzését én végeztem. A mintázott fákról 2016-ban a Velencei Virologiai Laboratórium fűtesztet állított be a kísérleti területén, ahol 2018. júliusában tüneti felmérést végeztünk. A fűteszten végzett tüneti felmérés nem mutatott vírusfertőzésre utaló jelet. Az Érdiől származó minták bioinformatikai elemzése kimutatta a törzsültetvény CVA fertőzöttségét. Munkám folytatásában bioinformatikai vizsgálatot végeztem a törzsültetvényben megtalálható, a 14/2017. (III. 23.) FM rendeletben meghatározott karanténvírusok kimutatására. Ennek során az ültetvény LChV-1 fertőzöttségét állapítottam meg. A kimutatott vírusok visszaigazolását adott vírusra specifikus PCR-reakciókkal végeztem. A CVA esetében bebizonyítottam az érdi törzsültetvény fertőzöttségét, viszont a LChV-1 visszaigazolása nem járt sikerrel. A LChV-1 fertőzöttség bizonyítására további vizsgálatok szükségesek, melyeket új primerek felhasználásával fogunk végezni. Az újfahértói *in vitro* fajtajelöltek erős PNRSV fertőzöttségének miatt elvégeztem a PNRSV specifikus PCR-tesztet ezen mintákon is, ami megerősítette a bioinformatikai vizsgálat eredményét, egyértelműen kimutatta, hogy PNRSV vírussal az érdi törzsültetvény nem fertőzött.

Irodalmi hivatkozások

1. **Baráth, D., Jaksa-Czotter, N., Molnár, J., Varga, T., Balássy, J., Szabó, K.L., Kirilla, Z., Tusnádý E, G., Preininger, É., Várallyay É.** (2018): Small RNA NGS Revealed the Presence of Cherry Virus A and Little Cherry Virus 1 on Apricots in Hungary. *Viruses*, 10 (6): 318-330.
2. **Bach I., Sz•nyegi S.** (1996) A szaporítóanyag certifikációs rendszere és követelményei. OMMI, Budapest, 95 p.
3. **Bandte, M. & Büttner, C.** 2001. A review of an important virus of deciduous trees – cherry leaf roll virus: occurrence, transmission and diagnosis. *Pflanzenschutzberichte*, 59: 1–19 p.
4. **Barandoc-Alviar, K., Ramirez, G.M., Rotenberg, D., Whitfield, A.E.** (2016): Analysis of Acquisition and Titer of Maize Mosaic Rhabdovirus in Its Vector, *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Insect Science*, 16(1):14.
5. **Barba, M., Czosnek, H., Hadidi A.** (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6(1): 106–36.
6. **Barba, M., Ilardi, V, Pasquini, G.** (2015): Chapter Tree-Control of Pome and Stone Fruit Virus Diseases. *Advances in virus research*, 91:47-83.
7. **Barone, M., Alioto, M., Marais, A., Candresse, T., and Ragozzino, A.** 2006. First report and high prevalence in noncherry hosts of Cherry virus A in Italy. *Plant Disease*, 90(11):1459.
8. **Bálint M.** (2006): *Molekuláris biológia I-II. M•szaki Kiadó, Budapest, 414 p.*
9. **Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J. and Mumford, R.** (2014): Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 163: 262-268.
10. **CABI/EPPO** (2014): Cherry leafroll virus. in: *Distribution Maps of Plant Diseases*(No.April), Map 800 (Edition 2). CABI, Wallingford, UK.
11. **CABI/EPPO** (2007): Cherry virus A. [Distribution map]. *Distribution Maps of Plant Diseases*, No.October. Wallingford, UK: CABI, Map 1009 (Edition 1).
12. **Campbell, R.N.** (1996): Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*,34: 87-108.
13. **Candresse, T., Marais, A., Faure, C., Gentit, P.** (2013): Association of Little cherry virus 1(LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology*, 103: 293–298.
14. **Cann, A.J.** (2016): *Principles of Molecular Virology*. 6th ed., Elsevier, 308p.
15. **Czotter (a), N., Szabó, E., Molnár, J., Deák, T., Lázár, J., Szegedi, E., Bisztray, Gy., Tusnádý, E. G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay, É.** (2015): Új diagnosztikai módszerek a sz•l•vírusfert•zöttségének megállapítására. *Borászati Füzetek különszám*, 153-155. IF:0262-268

16. **Czotter** (b), N., Szabó, E., Molnár, J., Pesti, R., Oláh, E., Deák, T., Bisztray, Gy., Tusnady E, G., Kocsis, L., Burgyán J., Várallyay É. (2015): Sz•l•ültetvényeink metagenomikai diagnosztikája új, hazánkban eddig nem leírt vírusok jelenlétét mutatta ki. *Növényvédelem* 51(12): 550-559.
17. **Czotter**, N., Demián, E., Molnár, J., Tusnady E., G., Kocsis, L., Burgyán, J., Várallyay É. (2016): Sz•l• vírusdiagnosztika új megközelítésben. *Borászati füzetek*, 26(4): 22-27.
18. **Czotter** (a), N., Molnar, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., Szittyá, Gy., Kocsis, L., Deak, T., Bisztray, Gy., Tusnady E., G., Burgyan, J., Varallyay E. (2018): NGS of Virus-Derived Small RNAs as a Diagnostic Method Used to Determine Viromes of Hungarian Vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 9(122), doi: 10.3389/fmicb.2018.00122
19. **Czotter** (b), N., Molnár, J., Pesti, R., Demián, E., Baráth, D., Varga, T., Várallyay É. (2018): Use of siRNAs for Diagnosis of Viruses Associated to Woody Plants in Nurseries and Stock Collections. In: Pantaleo, V., Chiumenti M. (ed.): *Viral Metagenomics*. HumanaPress, 115-130 p., 217 p.
20. **D'Arcy**, C. J., Eastburn, D.M., Schumann, G.L. (2001): *Illustrated Glossary of Plant Pathology*. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2001-0219-01
21. **Diekmann** M. & **Putter** C.A.J. (1996): Stone fruits. FAO (IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm); no.16, Rome. 109 p.
22. **Dimmock**, N.J., Easton, A.J., Leppard, K.N. (2007): *Introduction to Modern Virology*. 6th ed., Blackwell Publishing, 536 p.
23. **Flegg**, J.M. (1969): Tests with potential nematode vectors of cherry leaf roll virus. *Annual Report of East Malling Research Station*, A52, 155-157 pp.
24. **Fritzsche**, R. and **Kegler** N. (1964): Die übertragung des Blattrollvirus der Kirsche durch Nematoden. *Naturwissenschaften*, 51:299.
25. **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.
26. **Gao**, R., Xu, Y., Candresse, T., He, Z., Li, S., Ma, Y., Lu, M. (2017): Further insight into genetic variation and haplotype diversity of Cherry virus A from China. *PLoS ONE*, 12, e0186273.
27. **García-Ibarra**, A., Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., Soler, F., Sánchez-Navarro, J.A. (2010): Pollen and Seed Transmission of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) in Apricot. *Acta Horticulturae*, 862: 483-487.
28. **Gentit**, P., Cornaggia, D., Desvignes, J.C. (1998): Identification and comparison of different *Prunus* phytoplasma diseases by indexing on GF305 peach seedlings in the greenhouse. *ISHS, Proc. 17th Int. Symp. on Fruit Tree Virus Diseases. Acta Horticulturae*, 472:723–729.
29. **Gergerich**, R.C., **Dolja**, V.V. (2006): *Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe*. The Plant Health Instructor, DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01

30. **Glitsch M. és Folk Gy.** (2001): Kertészeti növénykórtan. Mez•gazda Kiadó, Budapest, 582 p.
31. **Grimová, L., Winkowska, L., Konrady, M., Rysánek P.** (2016): Apple mosaic virus. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(1): 1–19.
32. **Horne, R.W., & Wildy, P.** (1961): Symmetry in Virus Architecture. *Virology*, 15, 348-373.
33. **Horváth J. és Gáborjányi R.** (2000): Növényvírusok és virológia vizsgálati módszerek. Mez•gazda Kiadó, Budapest, 426 p.
34. **Isogai, M., Aoyagi, I., Nakagawa, M., Kubodera, Y., Satoh, K., Katoh, T., Inamori, M., Yamashita, K., and Yoshikawa, N.** (2004): Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *J. General Plant Pathology*, 70:288-291.
35. **James, D., Mukerji, S.** (1993): Mechanical transmission, identification, and characterization of virus associated with mottle leaf in cherry. *Plant Disease*, 77:271-275.
36. **Jelkmann, W.** (1995): Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. 1. *General Virology*. 76:2015-2024.
37. **Jo, Y., Lian, S., Cho, J.K., Chu, H., Choi, H., Cho W.K.** (2017): First Report of *Asian prunus virus 2* and *Cherry virus A* infecting Japanese Apricot (*Prunus mume*) in Korea. *Plant disease*, 101(9):1683.
38. **Jones, A.T., Wood, G.A** (1978): The occurrence of cherry leaf roll virus in red raspberry in New Zealand. *Plant Disease Reporter*, 62(9): 835-838.
39. **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.
40. **Katsiani, A., Maliogka, I.V., Katis, N., Svanella-Dumas, L., Olmos, A., Ruiz-García, B.A., Marais, A., Faure, C., Theil, S., Lotos, L., Candresse, T.** (2018): High-Throughput Sequencing Reveals Further Diversity of Little Cherry Virus 1 with Implications for Diagnostics. *Viruses*, 10(7): 385-399.
41. **Kinoti, W.M., Constable, F., Nancarrow, N., Rodoni, B., Plummer, K.M.** (2016): First Report of *Cherry virus A* (CVA) in Australia and the First Report of CVA Infecting *Prunus cerasifera*. *Plant disease*, 100(7):1511.
42. **Koinuma, H., Nijo, T., Iwabuchi, N., Yoshida, T., Keima, T., Okano, Y., Maejima, K., Yamaji, Y., Namba, S.** (2016): First complete genome sequence of Cherry virus A. *Genome Announcements*, 4(3):e00498-16
43. **Kucsera J. és Kevei F.** (2010): Mikrobiológia I. JATEPress, Szeged, 302 p.
44. **Lambert, S.J., Scott, J.B., Pethybridge, S.J., Hay, F.S.** (2012): Strain characterization of Potato virus S isolates from Tasmania, Australia. *Plant Disease* 96: 813–819.

45. **Legendre**, M., Bartoli, J., Shmakova, L., Jeud, S., Labadie, K., Adrait, A., Lescot, M., Poirot, O., Bertaux, L., Bruley, C., Couté, Y., Rivkina, E., Abergel, C., Claverie, J.M (2014): Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11):4274-4279.
46. **Legrand**, P. (2015): Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: a review. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 45(2): 240–251.
47. **Marais**, A., Faure, C., Svanella-Dumas, L., Candresse, T. (2008): First report of Cherry virus A in *Prunus mume* in China. *Plant Disease*, 92(11):1589.
48. **Marais**, A., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Jelkmann, W. (2011): Chapter 29-*Cherry Virus A*. In: Hadidi, A., Barba, M., Candresse, Thierry., Jelkmann W. (ed.): *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*. APS Publisher, 147-150 p., 428 p.
49. **Marais**, A., Svanella, D.L., Barone, M., Gentit, P., Faure, C., Charlot, G., Ragozzino, A., Candresse, T. (2012): Development of a polyvalent RT-PCR detection assay covering the genetic diversity of Cherry capillovirus A. *Plant Pathology*, 61: 195–204.
50. **Marais**, A., Faure, C., Theil, S., Svanella-Dumas, L., Brans, Y., Maurice, I., Blin, V., Candresse, T. (2016): First report of Little cherry virus 1 on plum in France. *Plant Disease*, 100(12): 2544.
51. **Massart**, S., Olmos, A., Jijakli, H., Candresse, T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, 188: 90–96.
52. **Matic**, S., Minafra, A., Sanchez-Navarro, J.A., Pallas, V., Myrta, A., Martelli, G.P. (2009): ‘Kwanzan Stunting’ syndrome: Detection and molecular characterization of an Italian isolate of Little cherry virus 1. *Virus Research*, 143: 61–67.
53. **McNamara**, D.G. (1980) The spread of arabis mosaic virus through non-cultivated vegetation. *Plant Pathology*, 29: 173-176.
54. **Murant** A.F. (1987): Raspberry yellow dwarf and associated diseases of *Rubus* caused by arabis mosaic and strawbeberry latent ringspot viruses. In: *Virus diseases of small fruits*. Ed: Converse R.H. US Government Printing Office, Washington, DC, USA, 204–211p., 277 p.
55. **Murant**, A.F., **Lister** R.M. (1987): European nepoviruses in strawberry. In: *Virus diseases of small fruits*. Ed: Converse R.H. US Government Printing Office, Washington, DC, USA, 46–55 p., 277 p.
56. **Németh** M (1979): Gyümölcsfák vírusos, mikoplazmás és rickettsiás betegségei. *Mezőgazda* kiadó, Budapest, 628 p.
57. **Ng**, J.C.K, **Falk**, B.W. (2006): Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 44:183–212.

58. **Nyland, G.** (1976): Cherry rasp leaf. in: *Virus Diseases and Non-infectious Disorders of Stone Fruits in North America*. ed: Gilmer, R.M., Moore, J.D., Nyland, G., Welsh, M.F., and Pine, T.S. Agriculture Handbook No. 437. USDA, Washington, D.C., USA, 219-221 p., 433 p.
59. **Pallas, V., & Garcia, J.A.** (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology*, 92(12): 2691-2705.
60. **Parker, K.G., Fridland, P.R., Gilmer, R.M.** (1976): Green ring mottle. in: Gilmer, R.M., Moore, J.D., Nyland, G., Welsh, M.F., Pine, T.S. (ed): *Virus diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America*. US Department of Agriculture, Washington, 193–199 p., 437 p.
61. **Ragozzino, A & Alioto, D.** (1992): Cherry rasp leaf etiology in Campania. *Acta Horticultura*, 309: 115-118.
62. **Reeves, L.E.** (1941): Mottle leaf, a virus disease of cherries. *Journal of Agricultural Research*, (62):9 555-572.
63. **Roossinck, M.J., Sleat, D., Palukaitis P.** (1992): Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiological Reviews*, 56(2): 265-279.
64. **Rowhani, A., Uyemoto, J.K., Golino, D.A., Martelli, G.P.** (2005): Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 261–278.
65. **Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Marais, A., Sánchez-Navarro, J., Pallás, V., Candresse, T.** (2017): Recent advances and prospects in *Prunus* virology. *Annual Applied Biology*, 171: 125-138.
66. **Šafářová, D., Faure, C., Candresse, T., Navrátil, M., Nečas, T., Marais, A.** (2017): First report of Little cherry virus 1 infecting apricot in the Czech Republic. *Plant Disease*, 101(5): 845.
67. **Sastry, K.S.** (2013): Seed-borne plant virus diseases. Springer India, 328 p.
68. **Schmelzer, K.** (1963): Investigations on viruses of ornamental and wild woody plants. 2nd part. Viroses of *Forsythia*, *Lonicera*, *Ligustrum* and *Laburnum*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 46: 105-138.
69. **Scotto La Massese, C., Marenaud C., Dunez. J.** (1973): Analyse d'un phénomène de dégénérescence du pêcher dans la vallée de l'Eyreux. C. R. Seances Académie d'Agriculture de France, 59: 327-339.
70. **Srinivasan, R., Alvarez, J.M.** (2007): Effect of mixed viral infections (potato virus Y-potato leafroll virus) on biology and preference of vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 100(3): 646-655.
71. **Stevens, W.A.** (1983) Transmission of Plant Viruses. In: Stevens, W.A. (ed.): *Virology of Flowering Plants. Tertiary Level Biology*. Springer, Boston, 41-68 p., 183 p.
72. **Trudgill, D.L.; Brown, D.J.F.; McNamara, D.G.** (1983) Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematodes. *Revue de Nématologie*, 6: 133-141.

73. **Varga T.** (2016): RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása az alma vírusfertőzöttségének kimutatására. Diplomamunka, ELTE, Budapest, 72 p.
74. **Várallyay É.** (2015): Új korszak a növényi diagnosztikában. Főszárúak vírusváltója. Élet és Tudomány, 70(49): 1542-1544.
75. **Virányi F.** (2010): Általános növénykórtan. Szent István Egyetem, Gödöllő, 104 p.
76. **Wonderlich Líviusz** (2014): Molekuláris biológiai technikák. Typotex Kiadó, Budapest, 231 p.

Internetes források

77. **EPPO ACLSV.** <https://gd.eppo.int/taxon/ACLSV0> (2018. szeptember)
78. **EPPO-APMV** <https://gd.eppo.int/taxon/APMV00> (2018. szeptember)
79. **EPPO- ArMV** <https://gd.eppo.int/taxon/ARMV00> (2018. szeptember)
80. **EPPO-CLRV** <https://gd.eppo.int/taxon/CLRV00> (2018. szeptember)
81. **EPPO-CNRMV** <https://gd.eppo.int/taxon/CNRM0> (2018. szeptember)
82. **EPPO-CVA** <https://gd.eppo.int/taxon/CVA000> (2018. szeptember)
83. **EPPO-LChV1** <https://gd.eppo.int/taxon/LCHV10/> (2017.december)
84. **EPPO-LChV2** <https://gd.eppo.int/taxon/LCHV20> (2017.december)
85. **EPPO-PDV** <https://gd.eppo.int/taxon/PDV000> (2018. szeptember)
86. **EPPO- PNRSV** <https://gd.eppo.int/taxon/PNRSV0> (2018. szeptember)
87. **EPPO- RpRSV** <https://gd.eppo.int/taxon/RPRSV0> (2018. szeptember)
88. **EPPO- SLRSV** <https://gd.eppo.int/taxon/SLRSV0> (2018. szeptember)
89. **EPPO- Data Sheet son Quarantine Pests: LChV**
https://gd.eppo.int/download/doc/761_ds_LCHV20_en.pdf (2017.december)
90. **http1** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=10239&host=plants>
(2018.október)
91. **http2** <https://viralzone.expasy.org/254> (2017. december)
92. **http3** <https://viralzone.expasy.org/734> (2017. december)
93. **http4** <https://viralzone.expasy.org/885> (2017. december)
94. **http5** https://commons.wikimedia.org/wiki/Metcalfa_pruinosa (2017.december)
95. **http6** https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Aleyrodes_proletella (2017. december)
96. **http7** https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thrips_tabaci.jpg (2017. december)
97. **http8** [http://www.nemasoil.com/images/LargeImages/Xiphinema/Sept-25-2007/Succession%20\(SF1\)/SF1-1/Xiphinema/Xiphinema.png](http://www.nemasoil.com/images/LargeImages/Xiphinema/Sept-25-2007/Succession%20(SF1)/SF1-1/Xiphinema/Xiphinema.png) (2017. december)

98. **http9**
https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Rhopalosiphum#/media/File:Rhopalosiphum_padi_5471106.png (2017. december)
99. **http10**
https://commons.wikimedia.org/wiki/Cuscuta#/media/File:Cuscuta_sp_on_sage_closeup.jpg
(2017. december)
100. **http11** <https://viralzone.expasy.org/4858> (2017. december)
101. **http12** <https://viralzone.expasy.org/285> (2017. december)
102. **http13** <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/whole-genome-sequencing/de-novo-sequencing.html> (2018. október)
103. **ICTV: Corticoviridae.** ICTV Online (10th) Report (2017). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/corticoviridae (2017. december)
104. **ICTV 2011.** ICTV 9th Report. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/280/virgaviridae-figures (2017 december)
105. **ICTV 2017.** Virus Taxonomy, EC 49, Singapore, July 2017. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (2018.szeptember)
106. **KSH: fontosabb gyümölcsfélék termesztése és felhasználása (2014–).**
https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_omn006b.html (2017. december)
107. **Plantwise- ACLSV** <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=6077>
(2018. szeptember)
108. **Plantwise- CGRMV** <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=16027>
(2018. szeptember)
109. **Plantwise- CLRV** <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=16077>
(2018. szeptember)
110. **Plantwise- PDV** <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=42402>
(2018.szeptember)
111. **Plantwise- PNRSV** <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=42426>
(2018. szeptember)
112. **Plantwise- RpRSV** <https://www.plantwise.org/knowledgebank/datasheet.aspx?dsid=48120> (2018. szeptember)

Köszönetnyilvánítás

Legels•ként szeretnék köszöntetet mondani Dr. Várallyay Évának a munkám során nyújtott szakmai vezetésért és a kutatás elvégzéshez szükséges körülmények biztosításáért. Köszönettel tartozom továbbá, a munkámba fektetett bizalomért, a rengeteg jó tanácsért és a dolgozatom lelkiismeretes javításért.

Köszönettel tartozom Baráth Dániel PhD hallgatónak, az egész munkám során nyújtott rengeteg gyakorlati és elméleti tanácsért és segítségért.

Köszönettel tartozom Dr. Körösi Katalinnak a munkám során nyújtott segítségért és javaslatokért.

Köszönettel tartozom Dr. Nyerges Klára és Zsovákné Hangyál Rozália a NÉBIH Velencei Virologiai Labor munkatársainak, hogy a virológiai f•teszt bonitálását lehetővé tették.

Köszönettel tartozom az intézet összes dolgozójának, akik valamilyen formában segítették munkámat.

Melléklet

1. táblázat: Újfehértói törzsültetvényről származó meggy minták adatai

Fajta	Izolátorhá- zi jelzés	Fajtakever- ék sorszám	Fajtakeverék konc. (ng/μl)	Ültetvény keverék konc. (ng/μl)
Újfehértói fürtös	M1/1	1	83,2	556,8
	M1/2			
	M1/4			
	M1/5			
Oblacsinszka	M2/1	2	132,8	
	M2/2			
Erika	M3/1	3	119,3	
	M3/2			
	M3/3			
Petri (LPP41 R)	M4/2	4	54,5	
	M4/3			
	M4/4			
	M4/5			
LPP4/1 D	M6/4	5	46,6	
	M6/2			
	M6/3			
VN-4	M8/1	6	102	
	M8/2			
UFO-2	M9/1	7	133,3	
	M9/2			
Kántorjánosi 3	M10/1	8	53,2	
	M10/2			
	M10/3			
	M10/4			
	M10/5			
Kései meggy	M11/1	9	112,1	
	M11/2			
LPP4/1 M	M12/1	10	47,5	
LPP4/1 A	M13/1	11	54,5	
	M13/2			
LPP4/1 N	M14/2	12	119,9	
LPP4/1-N2	M15/1	13	246,7	

2. táblázat: In vitro meggy fajtajelöltek adatai

Sorszám	Fajta	konc. (ng/μl)
1	D kései 2 I	58,8
2	D Kései 6 G	118
3	VN7 8/2_4	181,4
4	VN7 8/2_5	221,9
5	VN7 8/8_6	57,2
6	VN7 8/8_1	318,3
7	T2 3/1_1 I	104
8	T2 3/1_12	287
9	T2 9/4_5 B	129,4
10	T2 9/4_1 I	96,1
11	T2 9/5_3 I	35,9

3. táblázat: Meggy fajták indikátorainak megfigyelése

Sorszám	Fajta	Sor	Fa	Eredmény	Indikátorok				
					Vadcsereznye	Kwanzan	Canindex	Sam	Bing
11	Cigány 59	29	1	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	2	2	4
				tünetek	0	0	0	0	0
12	Újfehértói fűrtös	30	1	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
13	Érdi b• term•	31	1	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	3	1	3
				tünetek	0	0	0	0	0
14*	Debreceni b• term•	32	1	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	3	2	4
				tünetek	0	0	0	0	0
15	Érdi jubileum	29	7	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
16	Kántorjánosi	-	-	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	2	2	4
				tünetek	0	5	0	0	0
17	Érdi nagygyümölcs•	7	3	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	3	3	4
				tünetek	0	5	0	0	0
18	Piramis 36/I	36	1	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	2	3	4
				tünetek	0	5	0	0	0
19	Pándy 279	29	13	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
20	Maliga emléke	29	19	teszten	5	5	3	3	4
				megeredt	5	5	3	3	4
				tünetek	0	5	0	0	0

* anyafákat kivágták

4. táblázat: Meggy fajták indikátorainak megfigyelése

Sorszám	Fajta	Sor	Fa	Eredmény	Indikátorok				
					adcsereszny	Kwanzan	Canindex	Sam	Bing
1	Germensdorfi 3	32	1	teszten	5	3	3	3	4
				mageredt	4	3	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
2	Valerij Cskalov	32	17	teszten	5	4	3	3	4
				mageredt	3	3	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
3*	Bigarreau burlat	33	1	teszten	5	4	3	3	4
				mageredt	4	4	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
4	Katalin	33	17	teszten	5	5	3	3	4
				mageredt	5	1	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
5	Sunburst	33	33	teszten	5	5	3	3	4
				mageredt	5	5	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
6	Carmen	34	12	teszten	5	4	3	3	4
				mageredt	5	4	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
7	Vera	34	23	teszten	4	4	3	3	4
				mageredt	4	4	2	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
8	Tünde	34	34	teszten	5	4	3	3	4
				mageredt	5	4	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
9	Petrus	34	40	teszten	5	5	3	3	4
				mageredt	5	5	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0
10	Linda	34	46	teszten	5	5	3	3	4
				mageredet	5	5	3	3	4
				tünetek	0	0	0	0	0

* anyafákat kivágták

5. táblázat: Érdi törzsültetvényről származó meggy minták adatai

Sorszám	Fajta	Sor	Fa	Fajtakeverék konc. (ng/μl)
1	Cigány 59	28	1	100,8
2	Újfehértói fürtös	30	1	382,9
3	Érdi b• term•	31	1	248,4
	Debreceni b •term• *	32	1	
4	Érdi jubilleum	29	7	390,2
5	Germersdorfi	7	9	371,1
	Érdi nagygyümölcs•*	7	3	
6	Piramis	36	1	288,5
7	Pándy 249	29	13	280,7
8	Maliga emléke	29	19	190,3
9	Érdi jubilleum	29	11	146,5
10	Újfehértói fürtös	30	3	444,7
11	Érdi b• term•	31	5	88,8

* anyafákat kivágták

6. táblázat: Érdi törzsültetvényről származó cseresznye minták adatai

Sorszám	Fajta	Sor	Fa	Fajtakeverék konc. (ng/μl)
1	Germersdorfi 3	32	1	218,9
2	Valerij Cskalov	32	17	551,5
	Bigerreau Burlat*	33	1	
3	Katalin	33	17	322,5
4	Sunburst	33	33	444,3
5	Carmen	34	12	428,8
6	Vera	34	23	423
7	Tünde	34	34	151,6
8	Petrus	34	40	145,1
9	Linda	34	46	372,7
10	Germersdorfi 3	32	8	110,3
11	Bigerreau Burlat	33	6	110,8

* anyafákat kivágták

NYILATKOZAT

Alulírott Czákó Dávid Fidél, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar Növényorvos MSc szak végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar / Intézet honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, _____ év _____ hó _____ nap

hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, _____ év _____ hó _____ nap

konzulens aláírása

intézetigazgató aláírása