

DIPLOMADOLGOZAT

Kossuth Tamás

**Gödöllő
2020**



**SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR**

NÖVÉNYORVOS SZAK

**Szántóföldi növények fitoplazma és vírus fertőzöttségének vizsgálata két esettanulmány
kapcsán**

**Készítette:
Kossuth Tamás**

**Konzulens:
Dr. Bán Rita
egyetemi docens
Kertészettudományi Kar
Növényvédelmi Intézet
Integrált Növényvédelmi Tanszék**

**Külső konzulensek:
Dr. Várallyay Éva
csoportvezető, tudományos tanácsadó, NAIK, MBK**

**Nagyné Dr. Galbács Zsuzsanna
tudományos munkatárs NAIK, MBK**

**GÖDÖLLŐ
2020**

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	5
2	Irodalmi áttekintés	6
2.1	A kukorica jelentősége	6
2.2	A fitoplazmák jelentősége	7
2.3	A vírusok jelentősége	13
2.3.1	Vírusdiagnosztika	17
3	Anyag és módszer	19
3.1	Kukoricavörösödés tüneteit mutató kukorica fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata.....	19
3.1.1	Mintavételi terület.....	19
3.1.2	Fertőzött egyedek kiválasztása.....	19
3.1.3	Minták begyűjtése és tüneti vizsgálata	20
3.1.4	DNS kivonás	22
3.1.5	Pool-ok elkészítése.....	23
3.1.6	Nested PCR.....	23
3.2	Köles, mint vírusrezervoár gyom vizsgálata	27
3.2.1	Minták begyűjtése.....	27
3.2.2	RNS tisztítás	28
3.2.3	Elegy létrehozása a különálló mintákból.....	28
3.2.4	Vírus diagnózis RT-PCR alkalmazásával	28
3.2.5	PCR termékek tisztítása	29
3.2.6	Klónozás	30
4	Eredmények és értékelésük	31
4.1	Stolbur fitoplazma vizsgálata kukoricában	31
4.1.1	Nested PCR P1-P7 és U3-U5 primerekkel	32
4.1.2	Nested PCR STOL 11 F2-R1 és STOL 11 F3-R2 primerekkel.....	32
4.2	Köles, mint vírus rezervoár gyom	33
4.2.1	WSMV határozott jelenléte a kölesben	34
4.2.2	Különböző BYSMV törzsek a két különböző helyszínen.....	35
4.2.3	BVG, amit még nem írtak le Magyarországon	36
5	Következtetések.....	37
5.1	Fitoplazma vizsgálata kukoricában.....	37
5.2	Köles, mint vírusrezervoár gyom.....	37
6	Összefoglalás.....	39
6.1	Fitoplazma vizsgálata kukoricában.....	39

6.2	Köles, mint vírusrezervoár gyom	39
7	Köszönetnyilvánítás	41
8	Irodalomjegyzék	42

1 Bevezetés

A kórtan tudománya egyre nagyobb figyelmet szentel a nehezebben vizsgálható és diagnosztizálható növénypatogéneknek, úgymint a vírusoknak és fitoplazmáknak. Vizsgálatukat megnehezíti kis méretük, dinamikusan változó genetikai információjuk és a változatos tünetek melyeket produkálhatnak. Továbbá, az a tény, hogy sok esetben tünetmentesen lehetnek jelen az adott növényben. Mindezek miatt nehezen követhető mozgásuk országok és földrészek között. Erre viszont nagyon nagy szükség lenne, mert a globalizáció és a fejlett világkereskedelem elősegíti ezen veszélyes kórokozók terjedését, mely veszélyezteti az addig jól működő mezőgazdasági termelő modelleket. A kórokozók feltérképezésére és detektálásra számtalan új bioinformatikai és biotechnológiai mód áll rendelkezésre. A folyamatosan változó klíma miatt új vektorszervezetek jelentek meg, melyek potenciális hordozói és terjesztői az eddig ismeretlen kóroknak. Mindezek összessége megnehezíti a jól bevált termesztési technológiák és kultúrnövény vetésszerkezet fenntartását. A gazdákat új kihívások elé állítja, részben szakítaniuk kell a hagyományos növénytermesztési- és védelmi gyakorlatukkal. A jövőben egyre nagyobb fenyegetést jelentő vírusokkal és fitoplazmákkal szemben csak egy új típusú, tudásintenzív mezőgazdasági modell képes felvenni a harcot.

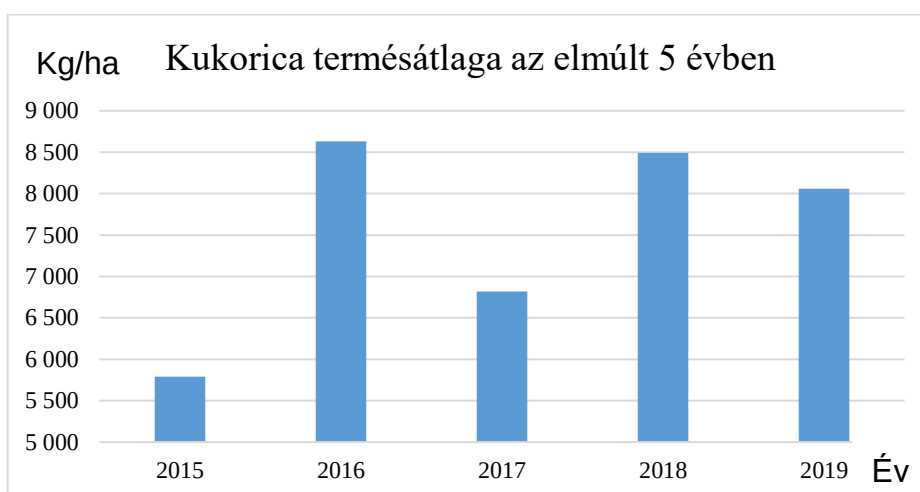
Munkám során, az ország két különböző pontján feltárt érdekes kórfolyamat vizsgálatát végeztem biotechnológiai módszerekkel. Modern laboratóriumi körülmények között elemeztem a gyűjtött növénymintákat. Törekedtem a jelenlévő összes patogén vírus és fitoplazma egyértelmű kimutatására.

Céлом az volt, hogy egy évről évre jelentkező kukorica vörösödésére, lilulására tudományos magyarázatot nyújtsak és hitelt érdemlően kimutassam a fitoplazma jelenlétét, melyekre a tünetegyüttes utalt. Továbbá, hogy a köles vírusrezervoár szerepét vizsgálva visszaigazoljam az egyszikűek nagy-áteresztőképeségű szekvenálásával kapott vírusdiagnosztikai eredményeit. A két teljesen különböző eset felderítése és tanulmányozása szolgáltatta a dolgozatom témáját.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A kukorica jelentősége

Az általam vizsgált két esettanulmányban olyan kórokozók szerepelnek, melyek a kukorica termesztését veszélybe sodorják. Ezért indokoltnak tartom, hogy a kukorica jelentőségéről és a világgazdaságban betöltött szerepéről is szót ejtsek. A kukorica termésátlaga az elmúlt öt évben jelentősen ingadozott hazánkban, ezt az 1.ábra szemlélteti. A függőleges tengelyen a hektáronkénti termésátlag látható kilogrammban kifejezve, a vízszintes tengelyen a vizsgált évek láthatóak. Az ingadozás oka a klímaváltozás, a száraz, aszályos évek számának növekedése.



1.ábra: A kukorica termésátlaga az elmúlt 5 évben hazánkban (Forrás: <http1>)

A magyarországi vetésterülete nem változott jelentősen az elmúlt 5 évben, termőterülete egy millió hektár körül alakul évente, ez idén sem volt másképp. 2020-ban 989.000 hektáron termeltek megközelítőleg kukoricát (<http2>).

2019-ben a világ legtöbbet termelő országa az Egyesült Államok volt 345.894.000 tonnával, ezt Kína követte 260.770.000 tonnával és a harmadik legnagyobb volumenben termelő ország Brazília volt 101.000.000 tonnával (<http3>). Ezt a mértékű termelést a kukorica sokrétű felhasználása magyarázza. A világ kevésbé fejlett térségeiben, mint például Közép- és Dél-Amerika, Afrika egyes országai és Ázsia egyes részei, a megtermelt kukorica 75-80% emberi fogyasztásra kerül. A maradék pedig takarmányként szolgál. Hazánkban ez az arány másként alakul, a termés jelentős részét takarmányként hasznosítják, kiváló beltartalmi tulajdonságai miatt. Az alacsony fehérje és magas szénhidrát tartalmának köszönhetően energiaforrásként szolgál az abrakot fogyasztó állatok számára. A második legjelentősebb felvevő piac az ipar, mely keményítőt, alkoholt és invert cukrot állít elő belőle. A melléktermékek felhasználásában is jelentős potenciál van. Az alacsony víztartalma miatt alapanyagként szolgálhat a szár és a

csuhé a biobrikett gyártáshoz. A rosttartalma felhasználható „zöld”, lebomló műanyag előállításához (Csajbók, 2012).

2.2 A fitoplazmák jelentősége

Az elmúlt évtizedben nagy figyelmet kaptak a baktériumszerű, növényeket megbetegíteni képes prokarióta szervezetek, a fitoplazmák. Számos új publikáció jelent meg a vektorokkal és a fertőzött növényekkel való kapcsolatukról, a földrajzi terjedésükről és a rendszerezésükről. Dolgozatomban ezen patogének jellemzőit tárgyalom részletesebben.

Fitoplazmák története

Az első fitoplazma okozta tünetekre utaló feljegyzésnek, az eperfa törpüléssel betegségének 1603-ban Japánban született leírását tekinthetjük. Akkoriban ez a betegség széles körben elterjedt volt és jelentős gazdasági kárt okozott a szigeten (Hogenhout et al., 2008). Ehhez hasonlóan vírusos megbetegedésnek tartották a fogazott boszorkány seprűsödés betegséget, a rizs sárga törpülés betegségét és általában a sárgulások betegségeket 1967-ig. Ezt az indokolta, hogy a tünetek nagyon hasonlítottak már ismert, vírusok okozta tünetekre. A kórokozókat nem lehetett mesterségesen szaporítani és az is bebizonyosodott, hogy rovarok terjesztik. 1967-ben egy japán kutató, Yoji Doi és kutató csapata elektronmikroszkóp segítségével olyan növényi szövetekben, melyekről addig azt gondolták, hogy vírus fertőzöttek, azonosított baktériumhoz, vagy inkább mikoplazmákhoz hasonlító részeket, amik nagy számban voltak jelen a hánccszövetekben és a rostacsövekben. Ez a felfedezés óriási áttörést hozott a fitoplazmák kutatásában, innentől kezdve MLO (Mycoplasma-Like Organism) szervezeteknek nevezik őket (Strauss, 2009). Később molekuláris elemzésekkel kimutatták, hogy nem állnak filogenetikai kapcsolatban a Mycoplasma nemzetséggel, így 1994-ben javasolták, hogy nevezzék át őket. 1994-ben B.B. Sears és B.C. Kirkpatrick kutatók javasolták az International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB) szervezetnek a fitoplazma nevet, ami még abban az évben elfogadásra került. A *Candidatus phytoplasma* genus név használatára, mint a fitoplazmák új elnevezésére 2004-ben tettek javaslatot. A „*Candidatus*” jelentése jelölt, azaz besorolásra vár. Az ideiglenes státuszt az indokolja, hogy csak bizonyos tulajdonságok alapján lehet elkülöníteni őket: gazdanövény kör, morfológiai bélyegek és bizonyos nukleinsav és membrán tulajdonságok. Biokémiai és genetikai módszerekkel viszont nem lehetséges (Firrao et al., 2005).

Fitoplazmák jellemzői

A fitoplazmák prokarióta szervezetek, melyek a baktériumok doménjébe, *Firmicutes* törzsbe, *Mollicutes* osztályba, *Candidatus Phytoplasma* nemzetségbe tartoznak. Sejtfallal nem rendelkező (3-rétegű sejthártya), pleomorf baktériumok, méretük 200-800 nm közé esik, a genomjuk 680-1600 kbp nagyságú. Mesterséges körülmények között, táptalajon nem tarthatók fenn, emiatt tiszta tenyészetek nem hozhatók létre belőlük és így nehezen teljesíthető velük a Koch-féle posztulátum. Obligát biotrófok, a növények háncsszövetében élnek (Bertaccini, 2007).

A jelenlegi nemzetközileg elfogadott álláspont szerint, egy fitoplazma abban az esetben tekinthető új fajnak, ha a következőkben felsorolt szempontok teljesülnek: 1200 bp-nál hosszabb 16S nukleotid-szekvenciája kevesebb, mint 97,5%-os hasonlóságot mutat más, korábban már leírt '*Candidatus*' fajával, ha bizonyított a molekuláris eltérés, más vektorral terjed és különbözik a tápnövény körük (IRPCM, 2004).

A növényt megfertőző fitoplazma fajoktól függően, a fertőzött növények változatos tüneteket, tünetegyütteseket mutatnak. Több kórokozó együttes előfordulása is befolyásolja a kialakuló tüneteket. A virágon előfordulhat pigment vesztés, ennek okán zöldek lesznek a szirmok. Jellemző még levélszerű képződmények kialakulása a virágon, a porzó és a bibe is deformálódhat. Gyakori a steril virágzat kialakulása (Cousin et al., 1982).

Jellemző a levelek sárgulása a megváltozott szénhidrát szintézis és transzport miatt, satnyaság, burjánzás és az úgynevezett boszorkány seprűsödés a megváltozott növekedési módusok miatt (Lee et al., 2000).

A fitoplazmák átvitele lehetséges oltással, vegetatív úton szaporított növényi részekkel és vektorokkal (Glist et al., 2000), ezek közül a legfontosabbak a rovarok. A 3 legfontosabb család a *Cicadellidae* (mezei kabócák), *Fulgoridae* (lámpás kabócák) és a *Psyllidae* (levélbolhák). Ezek a szűrő-szívó szájszervvel rendelkező rovarok a floémból táplálkoznak, a szájszervükre speciális fehérjék segítségével tapadnak a fitoplazma sejtek. Innen a kórokozók bejutnak a rovar hemolimfájába, innen a nyálmirigybe kerülve megkezdődik a szaporodásuk. Ahhoz, hogy a következő növényt meg tudják fertőzni egy bizonyos –fitoplazma fajra jellemző- sűrűséget el kell érjenek osztódás segítségével, az ez alatt eltelt időt látens periódusnak nevezik, ez az időtartam 2 naptól 13 hétig változhat. Ezután a rovar örök életére megtartja fertőzőképességét és bizonyos esetekben utódaiba is átörökíti ezt (Christensen et al., 2005).

A rovar és a fitoplazma közötti kapcsolat igen bonyolult és nem is minden részlete ismert, de az bizonyos, hogy hatnak egymásra. Egyes esetekben a fitoplazma legyengíti a gazda rovar

szervezetét, így romlik a fitnessa. Az is bizonyított, hogy a fitoplazma javítja a rovar télállóságát, szaporodó képességét és meghosszabbítja az állat élettartamát (Bressan et al., 2005).

A növényekkel történő átvitelben a *Cuscuta* fajoknak van jelentősége. Néhány fitoplazma *Cuscuta* fajokkal vihető át, mint például a stolbur fitoplazma (Glits et al., 2000). A *Catharanthus roseus* a fitoplazma kutatás általános tesztnövénye, mert nagyszámú fitoplazma képes megfertőzni és rajta jellemző tünetet kialakítani. *Cuscuta* fajok használatával taxonómiai távol álló növényekről, még fás szárú és gyógynövényekről is átvihető a fitoplazma a tesztnövényre. Ezután a növényről visszavihető e módszerrel az eredeti fajra a fertőzés, és a fitoplazma fajra jellemző tünetek szintén kialakulnak (Příbylová et al., 2012). A világ számos részéről érkezett jelentés, hogy egyes fitoplazma fajok mag segítségével is tudnak terjedni. Többek között lucerna, kókusz, lime és paradicsom esetében már bizonyított tény (Galitelli, 2010).

Fitoplazmák elleni védekezés

A fitoplazmák elleni védekezés ma még nagyon kezdetleges és kis hatékonyságú technológia, de egyre többet foglalkozik vele a tudomány. Egyéves szántóföldi kultúrákban anyagi megfontolásból nem vált bevett gyakorlattá a védekezés. A jövőben viszont komoly gazdasági gondokat okozhat például a terjedőben lévő és egyre többet kutatott kukorica vörösödés (Maize Redness (MR)) kukorica betegség. Mivel a kórokozó leggyakrabban rovarvektor közvetítésével terjed, ezért ezeknek a fajoknak a gyérítése adhat megoldást a problémára. A pontos vektor fajok megállapítása további kutatásokat igényel. Szem előtt kell tartani az integrált növényvédelem alapköveit, amelyben kiemelkedő szerepet játszhat a vetésváltás, amely kukorica esetében minimum 3 év és a monokultúra szigorú kerülése ajánlott. A fajtaválasztás jelen esetben nem nyújt kellő védelmet, mert jelenleg nem ismert rezisztencia egy fitoplazma ellen sem. Megfigyelésekkel alátámasztható, hogy az eltérő FAO számú, vagyis különböző tenyészidejű hibridek fogékonysága eltérő a MR betegséggel szemben. A kisebb FAO számúak kevésbé fogékonyak a nagyobb FAO számúakéhoz képest, ennek okát a vetésidőben kell keresni. Lehetséges az is, hogy az évelő gyomokban telelnek át a fitoplazmák és tavasszal innen indul a fertőzés. Fontos a területen pangó víz elvezetése is, csatornák vagy drén csövek segítségével (<http4>).

A fitoplazmák elleni védekezésnek a gyakorlatban a több évig adott területen lévő gyümölcs és szőlő ültetvényekben van jelentősége. A védekezés alapja a megelőzés, vagyis a prevenció. A faj kiválasztása után nagyon fontos a fajta megválasztás, ugyanis itt is eltérő a tolerancia szintje.

Szaporító anyagot csak megbízható forrásból érdemes beszerezni, mert a már fertőzött egyedek kezelése nem jár sikerrel. A fertőzés nem mindig jár tünetekkel, látens is előfordulhat, így különösen fontos a fertőzés megállapítására használt megfelelő diagnosztikai módszer. Az ültetvény gondozása is kiemelten fontos feladat, a sarjhajtások eltávolítása csökkenti a fertőzés kialakulásának esélyét, a gyomrezervoárok gyérítése kiemelkedő jelentőséggel bír. Rendkívül fontos a vektorok elleni védekezés, ez történhet inszekticidekkel és a bűvő-táplálkozó helyeinek szabályozásával (Süle, 2014).

Sztołbur fitoplazma / Potato stolbur (16Sr-XII) (Candidatus phytoplasma Solani)

Dolgozatomban a kukorica vörösödés betegségért felelős sztołbur fitoplazmával foglalkozom. Magyarországon először hibásan azonosították a betegséget, Szirmai János vírusként írta le 1956-ban. A kórt csattanó maszlagon, burgonyán, paradicsomon, paprikán és dohányon is felismerte (Szirmai, 1956). Dohányban történő azonosítása Petrőczy nevéhez fűződik 1958-ban. Az 1960-as évek végén Horváth egy új kultúrnövényen, repcén írta le a sztołbur fitoplazma jelenlétét. Ugyanebben az időszakban indultak meg a sztołbur fitoplazma vektorainak vizsgálatai, legnevesebb kutatója, Kuroli Géza, aki a sárgalábú recéskabóca (*Hyalesthes obsoletus*) jelentőségét ismerte fel a terjesztésben (Kuroli, 1970).

A sztołbur fitoplazma csakúgy, mint minden ismert fitoplazma obligát biotróf, tehát csak élő szervezetben tud fent maradni. Ez lehet akár rovarvektor, akár gyom gazda vagy évelő kultúra is. Európában és Ázsiában elterjedt kórokozó. Gyom rezervoárjaival régóta foglalkozik a tudomány, számos írás született ennek kapcsán, ugyanis a szántóföldi kultúrnövényeket termelő területeken ez a legjelentősebb fertőzési forrás. A kukorica gyomok közül az alábbi fajokban bizonyított, hogy fenn tud maradni a *Candidatus phytoplasma solani*: *Convolvulus arvensis*, *Polygonum aviculare*, *Rubus caesius*, *Solanum nigrum*, *Datura stramonium*, *Lepidium draba*, *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Cirsium arvense*, *Prunus* spp. (Viczián, 1998).

Kukorica vörösödés

A világon nagyjából 1 milliárd tonna termést takarítanak be belőle, ezzel a legnagyobb volumenben termelt növény a bolygón (http5). Éppen ezért kiemelkedő fontosságú a kultúra védelme a különböző biotikus és abiotikus károsítók ellen. A tudomány igyekszik lépést tartani a folyamatosan változó és terjedő kórokozókkal, erre egy kiváló példa az alig egy évszázada ismert kukorica vörösödés, melyet fitoplazma okoz.

A kórokozó vörösödést okoz a levélen az erek között, velük párhuzamosan és a száron, a csövek rendellenesen fejlődnek, csökken a szem kötődés mértéke, így hiányos, töppedt csövek

fejlődnek, ezáltal szignifikánsan csökken a termés mennyisége. Ezt a tünetegyüttest mutatja be a 2. ábra.



2.ábra: *Stolbur* fitoplazma tünetei kukoricán Fotó: Baráth D.

A tudomány jelen állása szerint nem okoz a fitoplazmákra jellemző leveles virágzatot vagy törpülést. 1950-től szórványosan, kis jelentőséggel kezdett megjelenni a Balkánon, elsősorban Szerbiában, Romániában és Bulgáriában, ezzel párhuzamosan kezdték leírni a tüneteket és kutatni a kórokozót. Kezdetben nem tudták egyértelműen azonosítani a tünetek kiváltóját, tápanyag hiányra (P, Zn, Mg), vízhiányra, *Fusarium* fajokra és *Fastidious* baktériumokra gyanakodtak (Šutić et al., 2002). Nem sokkal az ezredforduló után, Szerbiában járványt okozott az akkor még ismeretlen kórokozó. A fertőzött területeken 40-90%-os termésveszteséggel lehetett számolni, ezzel jelentős anyagi kárt okozva a gazdáknak (Bekavac et al., 2011). A megoldást a molekuláris diagnosztikai módszerek alkalmazása hozta, így sikerült azonosítani a “stolbur” fitoplazmát (subgroup 16SrXII-A, ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ (Duduk et al., 2006). Jelenleg a következő rendszertan szerint sorolják be:

1. Ország: *Bacteria*
2. Törzs: *Firmicutes*
3. Osztály: *Mollicutes*
4. Rend: *Acholeplasmatales*
5. Család: *Acholeplasmataceae*
6. Nemzetség: *Phytoplasma*
7. Faj: *Candidatus Phytoplasma solani*

Az EPPO Alert (figyelmeztető) listáján 2016 óta szerepel, ezzel kívánja felhívni a szervezet a tagállamok figyelmét a terjedőben lévő és veszélyt jelentő kórokozóra (<http4>).

Egy szerbiai kísérlet során megtalálták a régiókban jelenlévő vektort, amely a *Reptalus panzeri* kabóca. A kutatók erős korrelációt találtak az említett kabóca populáció dinamikája és a tünetek megjelenése között. A *R. panzeri* életciklusát és fejlődésmentét a 3. ábra szemléltet.



3.ábra A *Reptalus panzeri* életciklusa (Kölber et al., 2016)

A kísérlet rengeteg, a gyakorlat számára is hasznos eredményt hozott, megállapították, hogy a kukorica vörösödés betegség évente eltérő erősséggel jelentkezik és a fertőzött területek mérete sem azonos. Mivel adott körülmények között a fitoplazma rovar vektorral terjed, ezért a fertőzés mértéke közvetve függ az időjárástól, keményebb telek után, csapadékosabb időben, amikor nagymértékű a rovarok elhullása, a betegség sem okoz olyan jelentős károkat. Ha azonban az időjárás kedvez a rovarok mozgásának és szaporodásának, akkor intenzívebben terjed a kór. A vektor gabona táblák talajában telet, és innen indulva fertőzi a kukoricát, tehát nem kedvező a kalászos-kukorica vetésforgó kórtani szempontból (3. ábra). Azt is megállapították, hogy eltérő hibridek nem azonos fogékonysággal rendelkeznek a kórokozóval szemben, továbbá a kukorica fenológiája is számít a fertőzés idejében, a fiatalabb kukorica fogékonyabb a fertőzésekkel szemben (Jovic, 2007).

Fitoplazmák kimutatása PCR (Polimerase chain reaction) és Nested-PCR segítségével

Munkám során nagyban támaszkodtam a PCR technológiára, mert megfelelő pontosságú és alkalmazása könnyen elsajátítható. A technika lényege, hogy kis mennyiségű DNS-t gyorsan,

in vitro körülmények között lehet nagy számban sokszorozítani. Ha a DNS-t előre meghatározott melegítési ciklusok alá vetjük, akkor a kettős szálú DNS denaturálódik és a szálak elválnak egymástól. Megfelelő polimeráz enzimet és előre tervezett primer párt alkalmazva egy adott szakasz felszaporítható, így kis mennyiségű mintából nagy mennyiségű és könnyebben vizsgálható termék keletkezik (Schleif, 1993).

A Nested PCR annyiban tér el a hagyományos PCR-től, hogy itt 2 lépcsőben alkalmaznak indító szekvenciákat így megnő az eljárás érzékenysége és pontossága. Az első primer pár (outer primers) egy nagyobb méretű fragmentumot amplifikál. A második pár primer (inner primers) ezen a már sokszorozott szakaszon belül kapcsolódik a kívánt régióhoz és ezt sokszorozítja, így teszi lehetővé a fitoplazma pontos azonosítását, illetve detektálható mennyiségű termék keletkezését. (Clair, 2003).

2.3 A vírusok jelentősége

A vírusfertőzések komoly gondot okoznak az agráriumban. A növénytermesztés minden területén megjelenhetnek, ugyanis mind az egyéves, mind az évelő kultúrákat számos vírus fertőzi. A fertőzött növény termésének mennyisége jelentősen csökken, és a minőségük romolhat, de súlyosabb esetben a vírusok ültetvények egészének pusztulását is okozhatják.

Növénypatogén vírusok jellemzése

A vírusok olyan obligát, intracelluláris paraziták, melyek magasszintű gazdaspecifitással rendelkeznek. Felépítésük igen egyszerű, genetikai információt (valamilyen nukleinsavat) hordoznak fehérje burokba zárva. Méretük a 30-450 nanométeres tartományba esik, ezért fénymikroszkóppal nem is láthatók. Örökítőanyaguk egyaránt lehet DNS vagy RNS, egy, vagy több darabból álló (osztott vagy osztatlan), egyszálú vagy kétszálú, egyenes vagy cirkuláris alakú. A növényeket fertőző vírusok általában egyszálú RNS genommal rendelkeznek. Reprodukcióra nem képesek gazdaszervezet nélkül, anyagcseréjük szempontjából sem nevezhetjük őket szabadon élő szervezeteknek, ugyanis a gazdaszervezettel állítatják elő saját genomjukat és a szükséges fehérjéket (Lázár, 2011).

A nyugalmi állapotban lévő, a gazdasejteken kívül található egységeit virionnak nevezzük, ezek akár kitartóképletként is fennmaradhatnak. Alakjukat az őket körülvevő fehérje burok (kapszid) határozza meg, ez alapján lehetnek pálcika, fonál, helikális és ovális alakúak is. A vírusok replikációja hat szakaszra osztható: adszorpció, penetráció, dekapszidáció, eklipszis, maturáció, kiszabadulás (Horváth, 1999).

Vírusok terjedése

A vírusok terjedése más mechanizmussal történik attól függően, hogy az egyik növényről a másikra, vagy pedig, a már megfertőzött növényen belül való terjedésről van-e szó. Ahhoz, hogy a vírus túléljen, nagyon hatékony stratégiával kell terjednie növényen belül, lokálisan és szisztémikusan is. A gazdaszervezet minél magasabb szintű kolonizálása a végső cél. A növényi gazdaszervezet, amint észlelte a vírust, számos mechanizmust indít be és törekszik a patogén korlátozására, sőt mi több elpusztítására. A vírus igyekszik kikerülni vagy legyőzni ezt a rendszert. Ez a versengés vagy a növény pusztulásával jár, vagy a vírussal szemben nagymértékű tolerancia, és akár rezisztencia is kialakulhat (Hipper et al., 2013).

A vírus, a többi növény patogénnel szemben, a gazdaszervezet sejtjeiben, pontosabban sejtplazmájában él. A növényi sejtek védettebbek, mint az állati sejtek, mert a plazmamembránon kívül sejtfal is határolja őket. A sejtfalon található nyílást plazmodezmának nevezzük. A sejtek közötti információ és anyagáramlás és a vírus sejtről sejtire való mozgása is ezen keresztül valósul meg, méretük 30 és 60 nanométer között változik (Tuba et al., 2007). A fehérje burokba zárt vírus, de még a lecsupaszított nukleinsav genom is túl nagy ahhoz, hogy a plazmodezmán átférjen, a patogén viszont mégis ezen a nyíláson keresztül terjed sejtről sejtire. Ez úgy lehetséges, hogy a 3 és 15 közötti vírus genom kódolta fehérjéből egynek, vagy többnek is az a feladata, hogy a vírus mozgását segítse, ezek az ún: mozgási fehérjék. Ezek a fehérjék, a plazmodezmát felépítő fehérjékhez kötődve módosítják azok méretét és segítik a vírus átjutását (Schoelz et al., 2011). Ez a folyamat rendkívül lassú, sebessége 5–15 $\mu\text{m}/\text{óra}$, de függ a környezettől és a vírus replikálódó képességétől is (Gibbs, 1976).

A szisztémikus fertőzés kialakításához túl lassú folyamat lenne a sejtről sejtire való terjedés, ehhez a növény egészét behálózó rendszer, a floém fertőzése jelenthet megoldást. A floém rostacső tagokból áll, melyek elvesztették sejtmagjaikat és a többi sejtalkotójuk is degradálódott, így valósítják meg az asszimilátum szállítást a termelődéssel felől a felhasználás felé (Tuba et al., 2007). A vírus számára a rostacsővekbe való bejutás bonyolultabb, mint a lokális fertőzés, mivel itt öt nagyon különböző sejttypuson kell átjutnia a kórokozónak. A folyamat során be kell jutnia, utazni kell benne és a még nem fertőzött területeken ki kell jusson a rostacsőből. Ezért a terjedési sebessége exponenciálisan nő, egyes irodalmi források szerint akár 50-80 mm/óra is lehet, de ez nagyban függ a szállítódó fotoasszimilációs termékektől (Ueki et al., 2007).

A növények közötti vírus átvitel mindig valamilyen vektor segítségével történik, ezek lehetnek élő és élettelen dolgok egyaránt. A vektorok sokszínűsége jól mutatja a vírusok magas szintű alkalmazkodását és kiváló túlélőképességét. A legfontosabb aktív mozgásra képes

organizmusok, melyek növényről növényre terjesztik a fertőzést a rovarok, atkák, gombák, fonálférgek és a plasmodiophoromycoták törzsébe tartozó szervezetek. A vektor szervezetek és a vírusok között bonyolult és részben ismeretlen reakciók játszódnak le, viszont minden átvitelnek van pár közös tulajdonsága. A folyamat a fertőzött növénygel indul, ezzel fizikai kapcsolatba lép a vektorszervezet. A vírus kapszid, vagy burok különleges glikoproteidjei és mozgásfehérjéi segítik a vektor szervezetében vagy felületen való megtelepedést. A vektor szervezet is rendelkezik speciális receptorokkal és fehérjékkel mely segíti a kórokozó rögzülését. Az átvitel azzal zárul, hogy a vektor megsérti a még nem fertőzött növény epidermiszt és egyes sejtjeit, így a vírusok rögtön a sejtplazmába kerülnek (Whitfield et al., 2015).

A terjedési módok közül ki kell emelni a legegyszerűbbet, a mechanikai átvitelt. Természetes (homokverés, levelek összedörzsölődése) vagy mesterséges (kaszálás, művelő eszközök) sebeken keresztül valósul meg. Ezt a terjedési módot használják ki a vírus mesterséges átvitelére a tudományos kísérletekben (Fischl et al., 1995). A vegetatív növényi részekkel végzett manipuláció: az oltás, szemzés és a dugványozás is elősegíti a vírus terjedést. Akár az alany, akár az oltóvessző fertőzött, a betegség az egész növényre áterjed (Németh, 1979).

A vírusok terjedése ezen kívül generatív elemekkel és szaporítóanyaggal is történhet. Szerencsére nem sok vírus képes bejutni a növény generatív szerveibe és pollennel, maggal terjedni. Mivel azonban a szisztémásan fertőzött növény minden vegetatív sejtjében jelen vannak, ha a szaporítóanyag vegetatív szaporítással keletkezik: gumó, oltáshoz felhasznált növényi rész, a szaporítóanyag is fertőzött lesz (Jones, 2014).

Vírusok elleni védekezés

A vírusok elleni védekezést az a tény nehezíti meg, hogy a gyakorlatban csak prevenciós módszerek léteznek. A preventív eljárások, technikák képezik a védekezés gerincét. A rezisztens vagy toleráns fajták kiválasztása az első lépés a védekezés során. A virológusok akkor tekintik a növényt rezisztensnek, ha a vírus nem tud a fertőzött sejtben replikálódni vagy sejtről sejtre terjedni. A gyakorlatban nem lehet olyan fajtát vagy hibridet választani, mely teljes mértékben vírusrezisztens, mert egyszerre több patogén vírus van jelen. Ezekkel szemben a növény fogékonysága eltérő. A nemesítők a főbb, nagyobb gazdasági kárt okozó vírusok ellen próbálnak rezisztenciát létrehozni, új törzsek megjelenése miatt ez egy nehéz feladat. A vírusmentes szaporítóanyag előállítás fontosságát a Magyar Állam is felismerte és szigorú szabványokat állított fel, melyet a 48/2004 (IV.21) FVM rendelet tartalmaz. Ebben kultúránként kitér a mintaterekben maximum megtalálható vírussal fertőzött növényszámra és

rendelkezik a karantén vírusokról (http6). Ha fellép a fertőzés akkor -egyes jogszabályban leírt vírusok esetén- karantén intézkedéseket kell fogantatosítani, ezt a szakhatóság rendeli el és ellenőrzi.

Nagyban csökkentheti a tábla vírus terheltségét, ha időben és megfelelő módon védekezünk a betelepülő rovarvektorokkal szemben. Fontos, hogy a hosszabb hatású inszekticidek nem hozzák a várt eredményt a perzisztensen terjedő vírusokkal szemben, ugyanis a rovar ilyenkor intenzívebb táplálkozásba kezd és megnő a próbaszívások száma, ami segíti a vírus terjedését. Az adott patogénnel fertőzött gyomok irtása is eredményes lehet, mivel a vírusok obligát biotrófok, ezért csak élő szervezetben képesek fennmaradni, ha a szervezetet erőteljesen szabályozzuk, akkor megszakítjuk a vírusátvitel körét. A mag fertőtlenítésével a mag felszínén található fertőző ágensek ellen tudunk védekezni (Takács, 2019).

A biotechnológiai módszerek közül figyelmet érdemel a köpenyfehérjéjével, a szatellit RNS-sel, az antiszensz (a vírus komplementer RNS-ének reverz komplementer szakaszával) nukleinsavval és a defektív interferáló molekulákkal kialakított indukált rezisztencia.

A védekezés második szegmense a terápiás eljárások: hőterápia és regenerációs terápia (merisztéma kultúra), kemoterápia (vírusellenes anyagok). A vírusoknak nincs önálló anyagcseréjük, ezért az *in vivo* végzett kemoterápiák nemcsak a kórokozót, hanem a gazdasejtet is károsítják. Ennek ellenére egyes vírusellenes szerek (pl. Ribavirin, Tiazofurin, Pyrazofurin) tápoldatba adásával sikerült egyes vírusok [pl. burgonya X-vírus (potato X *potexvirus*), burgonya S-vírus (potato S *carlavirus*)] szaporodását merisztéma kultúrában gátolni, vagy megszüntetni. Egyes irodalmi források szerint, metil-benzimidazol-2il-karbamát tartalmú gombaölő szerekkel is (pl. Benlate, Bartstin) sikerült mérsékelni egyes növényvírusok tünettan hatását (Horváth et al., 1999).

Általános antivirális rendszerek

A növények is, mint a legtöbb eukaróta szervezet rendelkezik egy belső védekezési rendszerrel, mely feladata a növény épségének megőrzése. A rendszer alapelve, hogy különbséget tud tenni saját és idegen anyag között. A külső forrásból származó sejtet a szervezet elkülöníti és/vagy megsemmisíti. A virális fertőzésre a növény veleszületett és adaptív immunválaszt vált ki. A felismerő mechanizmus egy komplex biokémiai folyamat, mely során a vírusok molekuláris jellegzetességeit az ún. mintázat felismerő receptorok ismerik fel (Pepó, 2011).

Az egyik ilyen úgynevezett antivirális rendszer az RNS alapú géncsendesítés másnéven RNS interferencia (RNAi), mely minden eukarióta szervezetben működik, feladata a

génszabályozás. Kétszálú RNS-ek hatására lép működésbe, ezeket ismeri fel és darabolja, ami a folyamat végén a kétszálú RNS-sel homológ nukleinsavakat inaktíválja. Amikor a vírus a növényben sokszorozódik, az örökítőanyagáról átmenetileg kétszálú RNS-molekulák képződnek. Ezt ismeri fel a növény védekező rendszere és darabolja fel kicsi, 21–25 nukleotid (nt) hosszúságú kétszálú kis interferáló (small interfering; si) RNS-sé. Ezek egyik szála beépül egy enzim-komplexbe. Utóbbi a siRNS nélkül nem működik, de amint egy siRNS kötődik hozzá, működése értelmet nyer, s ettől kezdve az enzim-komplex felismer minden olyan RNS-t, amely a beépült kis RNS-sel bázispárosodásra képes, és inaktíválja azok működését vagy úgy, hogy elhasítja őket, vagy gátolja a róluk induló transzlációt. Mivel a kis RNS a vírusról keletkezett, így ez a komplex a vírus RNS-eit fogja felismerni, és gátolni azok működését.

Az RNSi védelmet nyújt a molekuláris paraziták ellen, tehát a vírusok ellen is. Emellett pedig fontos szerepet tölt be az átíródott gének szabályozásában is. A rendszer felfogható egy nagy speciális és finomra hangolt, RNS alapú minőségbiztosítási rendszernek (Shou-Wei et al., 2004).

2.3.1 Vírusdiagnosztika

A víruskutatás és ezzel a diagnosztika első alapkövét az orosz származású Ivanovszky mikrobiológus és növényfiziológus tette le a dohány mozaik vírus (TMV) vizsgálatával. Kutatásaival 1892-ben igazolta a „mozaik betegség” szövetnedvvel történő terjedését (Glits et al., 2000).

Szerológiai módszerek, ELISA

Ma leggyakrabban szerológiai módszert alkalmaznak a vírusok kimutatására, alapja az antigén-antitest reakció. A reakció lényege, hogy az adott vírus különböző fehérjéi, elsősorban a köpenyfehérjéi alkalmasak antigénként való azonosításra. Ezt a tesztelni kívánt növény szövetnedv kivonata tartalmazhatja. Az adott vírus vizsgálatára specifikus antitesteket termeltetnek. Ha megfelelő mennyiségű és minőségű antigén és antitest találkozik, akkor az szabadszemmel vagy fénymikroszkóppal jól vizsgálható csapadékot eredményez, mely egy pelyhes anyag. A reakció erősen függ az oldhatósági viszonyoktól, hőmérséklettől és a pH-tól. Ez az érzékenység okozza a legnagyobb hátrányát ezeknek a módszereknek. Ezen ismeretek birtokában Clark és Adams az 1970-es évek végén kifejlesztette az ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) módszert, ezzel forradalmasították a növényvédelmi vírusdiagnosztikát (Clark et al., 1977).

Az enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat folyamata egyszerű, ez is indokolhatja a széleskörű alkalmazását. Továbbá, szinte végtelen számban módosítható és esetre szabható. Az eljárás lényege, hogy az alap reagenseket egy speciális műanyag eszköz felületére kötik, utána történik a szövetnedv hozzáadás majd mosás és mérés. Az eredményeket a megfigyelhető színváltozásokkal tudjuk nyomon követni. A módszer hátránya, hogy, mivel a reakcióhoz a vírust felismerő ellenanyagra van szükség, csak ismert vírus jelenléte vizsgálható a mintában (He, 2013).

RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

A PCR technika egyik változata az RT-PCR, mely lényege, hogy a PCR amplifikáció templátja egy, az RNS templátról készült cDNS (komplementer DNS), ami reverz transzkriptáz enzim segítségével szintetizálható. Mivel a növénypatogén vírusok jelentős részének RNS az örökítő anyaga, és a PCR reakció azonban csak DNS templáton működik, az RNS vírusok kimutatásánál is ezt használják. Az ELISA-nál érzékenyebb rendszer, emiatt válhatott széleskörűen elterjedté. Ezzel a technikával vizsgálhatóak az RNS vírusok és viroidok is. A módszer hátránya, hogy mivel a PCR reakcióhoz a templátra specifikus indítószekvenciákat kell használni, csak ismert szekvenciájú vírus jelenlétét lehet vele detektálni a mintában (Fésűs, 1999).

Új generációs szekvenálás

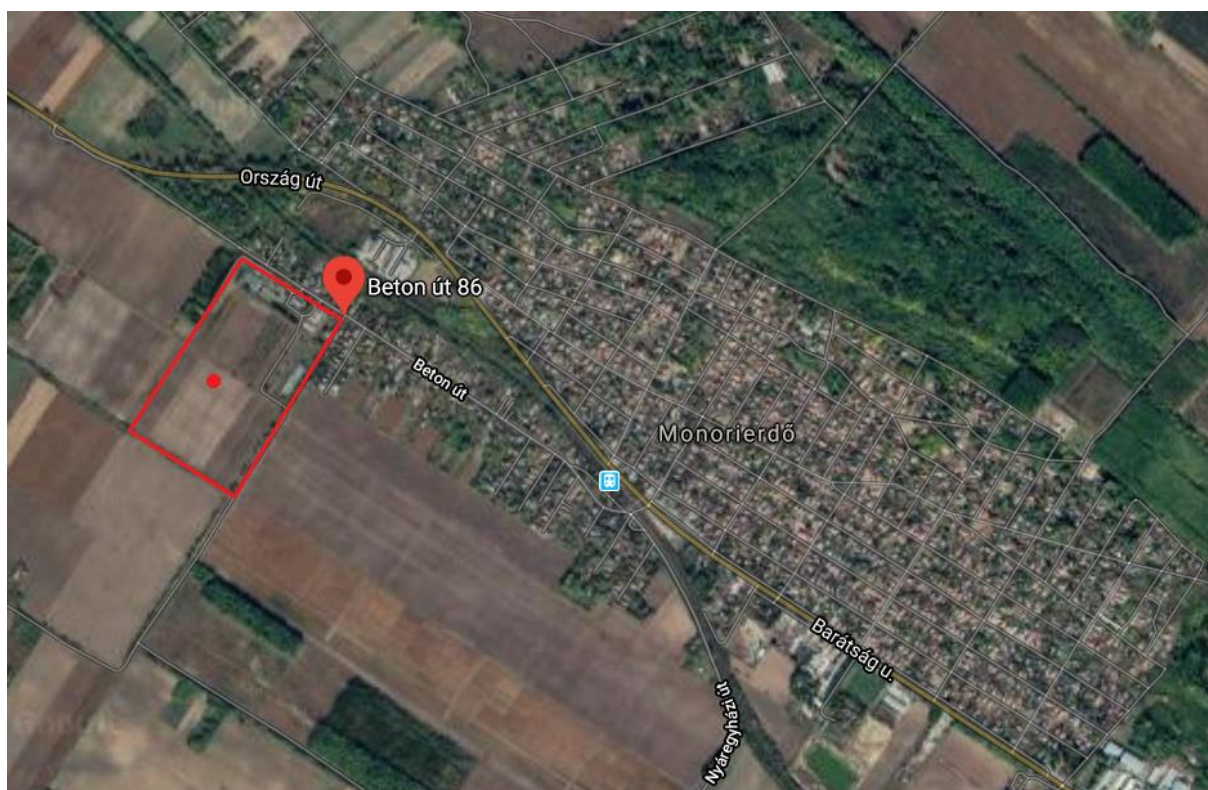
A hagyományos vírusdiagnosztikai eljárásokkal szemben ez egy egész más, újabb megközelítési mód. A modern biokémia, bioinformatika és fizika ötvöztetésével jött létre az új generációs, vagy nagy-áteresztő képességű szekvenálás. Elődjének a Sanger szekvenálás tekinthető. Azzal összehasonlítva azonban ez egy sokkal nagyobb hatékonyságú eljárás. Míg a Sanger szekvenálás esetében egyszerre egy nukleinsav szekvenciájának meghatározása történik, a nagy-áteresztőképességű szekvenálásnál ez egyszerre több, akár száz millió molekula is lehet. A technika képes megállapítani az egy mintában található összes örökítőanyag nukleinsav sorrendjét, így az előbb ismertetett két diagnosztikai eljárással szemben nagy előnye, hogy eddig ismeretlen vírus is kimutatható a mintából (Massart et al., 2014).

3 Anyag és módszer

3.1 Kukoricavörösödés tüneteit mutató kukorica fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

3.1.1 Mintavételi terület

A kukorica vörösödését a NÉBIH-hez tartozó fajtakitermesztő állomáson vizsgáltuk. Ezen a területen végzi az állami szervezet, a forgalomba hozott vetőmag minősítéshez kapcsolódó kispercellás faj- és fajtaazonosító kitermesztést. Az állomás Pest megye közepén található Monorierdő településen. A szervezet nagy területen végzi a feladatát, a fenotípusosan fitoplazma tüneteket mutató sorok, vonalak (ahonnan a mintavétel történt) viszont csak néhány száz négyzetmétert foglaltak el az állomás teljes területéből, melyet a 4. ábra szemléltet.



4. ábra Monorierdőn található NÉBIH fajtakitermesztő állomásának hozzávetőleges területe és a mintavétel pontos helye (Forrás: Google Maps alapján saját szerkesztés)

3.1.2 Fertőzött egyedek kiválasztása

Az állomás területén több száz-ezer vonal, fajta, hibrid, fajtajelölt kitermesztését végzik. Mégis csak egy kis területen egymás mellett lévő sorokban fordultak elő a Stolbur fitoplazmára utaló tünetet mutató egyedek, ezt az 5. ábra szemlélteti. A pontos fajta beazonosítása nem volt lehetséges, mert a tulajdonosi adatokat bizalmasan kezelték. Ezek kiderítésére további vizsgálatokra lenne szükség. A területet bejárva kerestünk rendellenes növekedésű

gyomnövényeket is, melyek tünetei fitoplazma fertőzésre utalhatnak. 6.ábra mutatja be az általunk gyűjtött aprószulák (*Convolvulus arvensis*) 2 különböző egyedét.



5. ábra Erős tüneteket mutató, egymás melletti sorok (Fotó: Baráth D.)



5. ábra Rendellenes növekedésű apró szulák (*Convolvulus arvensis*) (Fotó: Baráth D.)

3.1.3 Minták begyűjtése és tüneti vizsgálata

A tüneteket mutató 5 sorból reprezentatív mintavétel történt 2019.09.19-én. Az alábbi tüneteket mutató egyedekből történt a mintavétel:

1. Abnormális bibe növekedés, pollen hiány, deformált porzó, apró, gyengén telítődött csövek
2. Vörös elszíneződés a levéllemezen, levéléren
3. Koraérett, elszáradt, satnya egyedek

Mintákat gyűjtöttünk több gyomfajról is, melyek az alábbi tüneteket mutatták:

1. Klorotikus elszíneződés
2. Megrövidült ízközök, apró bokros növekedés
3. Gyengén fejlődő hajtásrendszer

Mintázott fajok: fenyércirok (*Sorghum halepense*), apró szulák (*Convolvulus arvensis*), kakaslábfi (*Echinochloa crus-galli*) és fekete csucor (*Solanum nigrum*) összességében 7 gyomnövény egyedből történt mintavétel. Korábbi tapasztalatok alapján a DNS kivonás a nem túl száraz, de tüneteket mutató levelekből a leghatékonyabb. A mintavételben a NAIK-MBK Diagnosztikai csoport munkatársai és egy a területet jól ismerő korábbi alkalmazott segédkezett. A leveleket alufóliába csomagoltuk, majd sorszámmal láttuk el, ennek alapján egyértelműen nyomon lehetett követni a minta útját. A felvett adatokat az 1. táblázat foglalja össze. Az összes minta a fertőzöttség tüneteit mutatta kivéve a 9. minta. A mintákat -70°C-on tároltuk a felhasználásig.

Minta kódja	Sorszám	Faj	Egyedek sorszáma	Gyűjtés helye	Minta mennyisége	Tünet
K1	1	kukorica	1-5	11-es sor	5 egyedről levélminta	+
K2	2	kukorica	6-10	50-es sor	5 egyedről levélminta	+
K3	3	kukorica	11-15	51-es sor	5 egyedről levélminta	+
K4	4	kukorica	16-20	52-es sor	5 egyedről levélminta	+
K5	5	kukorica	21-25	63-as sor	5 egyedről levélminta	+
Gy1	6	aprószulák	26	63-as sor sorköz	1 egyedről levélminta	+
Gy2	7	aprószulák	27	64-es sor sorköz	1 egyedről levélminta	+
Gy3	8	aprószulák	28	63-as sor sorköz	1 egyedről levélminta	+
Gy4	9	aprószulák	29	63-as sor sorköz	1 egyedről levélminta	-
Gy5	10	kakaslábfi	30	30-as sor sorköz	1 egyedről levélminta	+

Gy6	11	fenyércirok	31	Hibrid kukorica tábla 1270-es sor mellett	1 egyedről levélminta	+
Gy7	12	fekete csucsor	32	Hibrid kukorica tábla 1270-es sor mellett	1 egyedről levélminta	+

1.táblázat: begyűjtött minták adatai

3.1.4 DNS kivonás

1. A DNS kivonás a Macherey-Nagel, NucleoSpin Plant II DNS izoláló kit segítségével történt, a gyártó által megadott protokoll alapján, a mintázott levelekből.
2. Előkészítettem egy steril dörzsmozsarat és hozzá egy pisztillust, folyékony nitrogént töltöttem bele és ebben elporítottam a 20mg körüli fagyott levéldarabot. A levéldarab kivágásakor törekedtem arra, hogy levéllemez és levélér is kerüljön a mozsárba.
3. Ezt a port 400 µl PL1-es pufferrel hoztam folyékony állapotba, az oldatot egy steril eppendorf csőbe pipettáztam át. Vortex segítségével átkevertem a mintát.
4. Majd hozzámértem 10 µl RNase enzimet. 10 percet kellett inkubálni 65°C-on. Inkubáció után a csövet 5 percig centrifugáltam maximális fordulatszámon, a következő lépéshez a felülúszót használtam fel.
5. A Kitben található speciális lila színű szűrőre mértem a folyadékot majd 2 percig centrifugáltam maximális fordulatszámon, ami 13.000 x g volt.
6. 450 µl PC puffert adtam hozzá, ezt óvatosan össze kellett keverni.
7. Előkészítettem egy szintén a csomagban található zöld szűrőt és erre rámértem az így kapott folyadékot. Megint 1 perc centrifugálás következett maximális fordulaton.
8. Mosás következett, három lépésben először 400 µl PW1, majd 700 µl PW2, végül 200 µl PW2 majd centrifugálni az első két mosásnál 1 percig, az utolsó esetében, pedig 2 percig.
9. Új steril eppendorf csőbe helyeztem a membránt, amiben megkötődött a DNS. Ezt a már 65°C-ra előmelegített PE pufferbe lehetett leoldani, mintánként 40 µl-t kellett kimérni. 5 perc inkubációs idő után, a szer kioldja a szűrőből a DNS-t, centrifugálás után megkaptuk az oldott DNS-t.
10. Az utolsó lépés a folyamat eredményének ellenőrzése volt, agaróz gélen történő futtatással. Az izolált DNS mintákból 2 µl-t 3 µl brómfenolkéket tartalmazó DNS festékkel elegyítettem, majd EtBr-dal festett 1,2%-os agaróz gélen megfuttattam.

Elektroforézis után a géleket lefotóztam. Ez az általam izolált DNS minőségének ellenőrzésére szolgált.

Összességében K1-K5 mintákból 25 egyedben található DNS került kivonásra és Gy1-Gy7 mintákból 7 egyedből. Tehát a kiinduló „alapanyag” ez a 32 darab minta volt.

3.1.5 Pool-ok elkészítése

A totál nukleinsav kivonás után, könnyen vizsgálható és kezelhető mintákat kellett létrehozni, mely hűen tükrözi egy-egy vonal terheltségét. Kutatásunk során nem az egyes különálló kukorica egyedek fertőzöttségét kívántuk kimutatni, hanem inkább a vonalakban, teljes növényállományban akartuk diagnosztizálni a kórokozó jelenlétét. A kukorica vonalakból „keveréket”, pool-t állítottunk elő, mely egyenlő arányban tartalmazta a különálló növényekből kivont DNS-t, a gyomokat önállóan kezeltük. Tehát a diagnosztikát 12 darab mintával kezdtük meg 5 darab kukorica pool-lal és 7 darab gyom mintával. Továbbá, a vizsgálati sorba betettünk egy korábban igazoltan pozitív mintát (pozitív kontroll) és egy egységnyi sterilizált desztillált vizet, mely a negatív kontroll szerepét töltötte be.

3.1.6 Nested PCR

A nested PCR egy kétlépésben elvégzett polimeráz láncreakció (ld. 2.2 fejezet). A módszer lényege, hogy a két lépés során különböző indítószekvencia párokat alkalmazunk, így csak a fitoplazmára utaló végterméket amplifikáljuk, sokszorozítjuk fel, ezáltal pontos eredményt kapunk a kórokozó jelenlétéről. Vizsgálataim során kettő különböző primerpár kombinációval kíséreltük meg a fitoplazma kimutatást, annak érdekében, hogy az esetlegesen mutálódott fitoplazma kimutatásának esélyét növeljük. Kíváncsiak voltunk, hogy a két eltérő módszer mennyire más eredményt hoz és, hogy vajon igazolják-e a fenotípusosan megjelent tüneteket és ezzel kapcsolatban a kórokozó jelenlétét. Minden esetben a 14 darab minta volt a kiindulási templát és Q5 DNS polimerázt használtunk. A PCR összeállítása, egy steril boxban történt a kontamináció megelőzése érdekében.

Indító szekvenciák (primerek)

Az általunk használt primer párokat a 2. táblázat tartalmazza.

Alkalmazás	Név	Primer szekvencia (5'-3')	Bp	Referencia
PCR lépés	STOL 11 F2	TAT TTT CCT AAA ATT GAT TGG C	22	Claire et al., 2003
	STOL 11 R1	TGT TTT TGC ACC GTT AAA GC	20	

	P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T	25	Smart et al. 1996
	P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	18	
Nested-PCR lépés	fU3	TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA	20	Lorenz et al. 1995
	rU5	CGG CAA TGG AGG AAA CT	17	
	STOL 11 F3	ACG AGT TTT GAT TAT GTT CAC	21	Claire et al., 2003
	STOL 11 R2	GAT GAA TGA TAA CTT CAA CTG	21	

2. táblázat A felhasznált primerek jele, nukleotid sorrendje és mérete

A nested PCR reakciók során első lépésben univerzális primereket használtunk, majd második lépésként, hogy szűkítsük a kört és növeljük a kimutatás érzékenységét a 16Sr-XIIcsoport specifikus indítószekvenciákat alkalmaztunk.

3.1.6.1 PCR: P1-P7, nested PCR: U3,U5 pimer

Első lépésben alkalmazott PCR MIX összetétele egy mintára számolva:

- 1.MQ: 9 µl (steril desztillált víz)
2. 5x Q5 puffer: 3µl
3. Forward primer (P1):1 µl
Reverz primer (P7):1 µl
4. 10mM dNTP: 0,3 µl
5. Q5 DNS polimeráz enzim: 0,2 µl
6. templát: 2 µl

A templát DNS-ekhez 13 µl PCR mixet adtunk.

A PCR készülékben használt protokollt a 3. táblázat szemlélteti

	Elő-denaturáció	Denaturáció	Annealing	Elongáció	Végső elongáció
Hőmérséklet (C°)	98	98	55	72	72
Időtartam (sec.)	30	10	20	60	120

40-szer ismétlődik

3.táblázat: Az univerzális fitoplazma primerek használata esetén használt PCR protokoll

Második lépésben az első PCR reakció terméket 40-szeresére hígítottuk és ezt használtuk a nested PCR reakció templatjaként. Alkalmazott PCR MIX összetétele egy mintára számolva:

1. MQ: 9 µl (steril desztillált víz)
2. 5x Q5 puffer: 3µl
3. Forward primer (U5): 1 µl
Reverz primer (U3): 1 µl
4. 10mM dNTP: 0,3 µl
5. Q5 DNS polimeráz enzim: 0,2 µl
6. templat: 1 µl

Az 1 µl templatához 14 µl PCR mixet adtunk. A használt protokoll annyiban tér ez az első lépésben leírtaktól, hogy ez a primer pár 53C°-os anellálási hőmérsékleten működik a leghatékonyabban, így ezt alkalmaztuk.

3.1.6.2 PCR: STOL 11 F2, R1, nested PCR: STOL 11 F3,R2

Első lépésben alkalmazott PCR MIX összetétele egy mintára számolva:

1. MQ: 8 µl (steril desztillált víz)
2. 5x Q5 puffer: 3µl
3. Forward primer (STOL 11 F2): 1 µl
Reverz primer (STOL 11 R1): 1 µl
4. 10mM dNTP: 0,3 µl
5. Q5 DNS polimeráz enzim: 0,2 µl
6. templat: 2 µl

Az 2 µl templatához 13 µl PCR mixet adtunk. A stolbur specifikus primerek használatakor használt PCR protokollt a 4. táblázat szemlélteti

	Elő-denaturáció	Denaturáció	Annealing	Elongáció	Végső elongáció
Hőmérséklet (C°)	98	98	60	72	72
Időtartam (sec.)	30	10	20	60	120

40-szer ismétlődik

4. táblázat: PCR protokoll

A nested PCR lépésben az első PCR reakció termékek százszoros hígítását használtuk templátként a nested PCR reakcióhoz. Az itt alkalmazott PCR MIX összetétele egy mintára számolva:

1. MQ: 9 μ l (steril desztillált víz)
2. 5x Q5 puffer: 3 μ l
3. Forward primer (STOL 11 F3): 1 μ l
Reverz primer (STOL 11 R2): 1 μ l
4. 10mM dNTP: 0,3 μ l
5. Q5 DNS polimeráz enzim: 0,2 μ l
6. templát: 1 μ l

Az 1 μ l templáthoz 14 μ l PCR mixet adtunk. A PCR protokoll megegyezett az első lépésben leírtakkal.

3.1.6.3 Végtermék elemzése

A reakciók után a végterméket gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk. Az agaróz gél etidium-bromiddal festettük meg, ami egy fluoreszcens festék, amely a DNS és RNS molekulák bázisai közé interkalálódik. A megszilárdult gél 1xTBE oldatot tartalmazó futtató kádba helyeztem. A gél első zsebébe DNS markert vittem fel (Gene-Ruler 100 bp Plus (3 μ l)). A marker különböző, de ismert méretű DNS darabot tartalmaz, melyek a gélelektroforézis során méretüknek megfelelően válnak szét, és így ezzel összehasonlítva a PCR reakció során kapott termék mérete pontosan leolvasható volt. A többi zsebbe a Nested PCR lépés végtermékét vittük fel 3 μ l mennyiségben, hogy az elválasztás közben is jól látható legyen 3 μ l DNS festékkel festettük meg. Ezután áram alá helyeztük a futtató kádat, nagyjából 130V feszültséget kellett beállítani. Az elektromos áram hatására a különböző méretű DNS-ek szétválnak és méretüknek megfelelő sebességgel vándoroltak. Mivel a primerek kötődési helye ismert volt, ezért tudtuk, hogy milyen méretű termék jelzi számunkra a teszt pozitív voltát, azaz a fitoplazma jelenlétében specifikus termék keletkezését.

3.2 Köles, mint vírusrezervoár gyom vizsgálata

3.2.1 Minták begyűjtése

A mintákat a kutatócsoport két különálló takarmány kukoricával bevetett területről (Újmajor susnyás, Büdös árok, továbbiakban: US és BA) gyűjtötte be. A mintavételi pontok pontos helyét a 7. ábra szemlélteti.



7.ábra: Mintavételi helyek a köles vizsgálata során (Google Maps alapján saját szerkesztés)

10 *Panicum miliaceum* egyedről random módon gyűjtöttek be levél, gyökér és termés darabokat. A növények nagyrésze valamilyen jellegzetes vírustünetet mutatott: csavarodott levél, satnyulás vagy klorotikus elszíneződés. A minták tételes tartalmát az 5.táblázat szemlélteti

Terület	Minta kódja	Növényi rész (db)			tünet
		levél	gyökér	termés	
BA	1	4	2	2	törpülés, csíkozottság
	2	4	2	2	törpülés, csíkozottság
	3	3	2	2	törpülés, csíkozottság
	4	2	0	2	csíkozottság
	5	4	2	2	törpülés, csíkozottság
	6	4	2	2	törpülés, csíkozottság
	7	3	1	1	törpülés, csíkozottság
	8	4	1	2	törpülés, penész
	9	2	1	1	törpülés, klorotikus foltok

	10	4	2	0	törpülés, meddő virágzat
US	11	4	2	2	nincs
	12	4	1	1	enyhe klorózis
	13	3	1	1	enyhe csíkozottság
	14	3	1	1	enyhe klorózis
	15	3	1	1	enyhe csíkozottság
	16	4	1	1	enyhe csíkozottság
	17	2	0	1	enyhe csíkozottság
	18	3	1	1	törpülés
	19	4	1	1	törpülés, klorózis
	20	3	0	1	törpülés, csíkozottság

5.táblázat: A gyűjtött minták tételes felsorolása (Pasztor et al. 2020)

3.2.2 RNS tisztítás

A gyűjtött mintákból fenol-kloroform kivonási technikával tisztítottam RNS-t. A fagyasztott mintákat kerámia mozsárban homogenizáltuk. 650 µl extrakciós puffert (100mM glicerin, pH 9,0, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 2% SDS, 1% SLS) és 650 µl fenolt adtunk hozzá. Az így keletkezett elegyet, 5 percig centrifugáltuk. A vizes fázishoz vele megegyező mennyiségű fenolt, kloroformot és izoamil-alkoholt (25:24:1) adtunk. 5 perc centrifugálás után a felül lévő fázishoz 24:1-es arányban levő kloroformot és izoamil-alkoholt adtunk majd újabb 5 perc centrifugálás következett. A könnyebb fázist etanol segítségével kicsaptuk majd steril desztillált vízben visszaoldottuk. Az így kinyert RNS-t -70°C-on tároltuk felhasználásig.

3.2.3 Elegy létrehozása a különálló mintákból

Vizsgálatunk célja nemcsak az volt, hogy a különálló egyedek vírusfertőződöttségét bizonyítsuk, hanem hogy megvizsgáljuk, az adott területen növekvő kölesek vírusfertőzöttségét nagy-áteresztőképességű szekvenálással. Ehhez olyan mintákat készítettünk, melyek jól reprezentálják az adott gyűjtési helyen megtalálható köles egyedeket. Első lépésben az egy növényből származó a különböző föld feletti és alatti szervekből kinyert RNS mintákat mértük össze egyenlő arányban. Majd az így kapott egy egyedet reprezentáló keveréket vegyítettük a többi egyedet jól tükröző mintával. Így jött létre az adott állományt képviselő pool termék.

3.2.4 Vírus diagnózis RT-PCR alkalmazásával

A mintakeverékek és az egyedi minták RNS-ei szolgáltak templátként a cDNS szintéziséhez, melyhez a RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit-tet használtuk, random primer párral. A vírusdiagnosztikához az RT-PCR eljárás során Q5 Hot Start DNS polimerázt használtunk. A felhasznált primereket a 6. táblázat szemlélteti.

Vírus	Primer neve	Primer Szekvencia (5'-3')	Termék mérete	Annealing hőmérséklet Q5 DNS polimerázzal
WSMV	WSMV_8175F	ACTGCGTGACGAATCGAGTGAG	1078 bp	55°C
	WSMV_9253R	TAGTTTCTACTGTGCTCACGCAAG		
BYSMV	BYSMV_158F	ATGGCAAAAGAAGATCATGGATTG	1286 bp	65°C
	BYSMV_1444R	CCTTTAGGAGAAGATCTGGTCAGC		
BVG	BVG_3508F	ATGAATACGGGAGGTAGAAATGG	607 bp	50°C
	BVG_4115R	GATGCTCCGTCTACCTATTTCGG		

6.táblázat: felhasznált primerek és azok különböző tulajdonságai (Pásztor et al, 2020)

A lefuttatott RT-PCR ciklusokat a 7. táblázat szemlélteti.

	30 mp	98°C
40x	10 mp	98°C
	20 mp	Annealing hőmérséklet
	60 mp	72°C
	2min	72°C

7.táblázat: A PCR sokszorozás során használt ciklusok idő és hőmérséklet adatai (Pásztor et al, 2020)

Az így keletkezett RT-PCR termékeket agaróz gélen választottuk el és a megtisztításához GeneJet Gel Extraction Kit-tet használtunk. Az tisztított DNS terméket klónoztuk és nukleinsavsorrendjét meghatároztattuk.

3.2.5 PCR termékek tisztítása

A nested PCR reakció adott méretű termékeinek bázispár sorrendjét meg szeretnénk volna határozni, ehhez ki kellett tisztítani a többi termék közül. Így tudunk megbizonyosodni arról, hogy valóban fitoplazmáról keletkezett a termék.

Thermo Scientific Gene Jet Gel Extraction Kit-et használtam a tisztításhoz, a már kidolgozott protokollt követve.

1. A PCR terméket agaróz gélen, elektromos áram segítségével szétválasztottam és a megfelelő méretű terméket szikével kivágtam és Eppendorf csőbe helyeztem, mely súlyát megmértem, majd meghatároztam a gél feloldásához szükséges Binding puffer mennyiségét.
2. A már ismert tömegű termékhez arányos mennyiségű Binding Buffert adtam. Majd 10 percre 65°C-os vízfürdőbe tettem a mintákat, teljes oldódásig hagytam benne. Ezzel egy időben az Elution Buffert is a 65°C-os vízfürdőre helyeztem, előmelegítés céljából.

3. Az így létrejött oldatot, a megadott jelű szűrővel ellátott csőbe mértem és egy percen keresztül centrifugáltam.
4. A szűrőn átfolyt anyagra a továbbiakban nem volt szükségem ezért kidobtam, majd 100 μ l Binding Buffert adtam hozzá, majd egy percnyi centrifugálás után lefolyt mellékterméket is kidobtam.
5. Ötödik lépésként 700 μ l Wash Buffert mértem bele a mintába, majd 1 percig centrifugáltam.
6. A DNS leoldása volt a továbbiakban a feladat. Ez után egy új Eppendorf csőbe helyeztem a szűrőt, rámértem 23 μ l Eluation Buffert, mely oldószerként szolgált, a hatás kifejtéséhez vártam 1 percet, aztán centrifugáltam 1 percig.
7. Ezt a lépést megismételtem, hogy minden lehetséges DNS-t leoldjak a szűrőről, és töményebb terméket kapjak.
8. A folyamat sikerességét egy újabb agaróz géles futtatással ellenőriztem, ehhez 3 μ l termékhez 1 μ l DNS festéket adtam.

3.2.6 Klónozás

Klónozásra azért volt szükség, mert így egy adott DNS-t tudunk felsokszorozítani, így a későbbi szekvenálás pontos eredményt hoz. A kiinduló anyag a tisztított PCR termék volt. A klónozáshoz a CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) gyári szettet használtuk. A reakcióhoz összemértem:

- 3 μ l tisztított PCR terméket
- 0,5 μ l pJET1.2 blunt klónozó vektort
- 2X reakció puffert
- 0,5 μ l T4 ligázt
- 1 μ l MQ vizet

Ligálási reakció transzformálása E coliba:

1. Az elkészült elegyet 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd 100 μ l DH5 α kompetens baktérium sejtbe transzformáltam.
2. 5 μ l ligátumra rápipettáztam a kompetens sejteket és 20 percig hagytam jégen, majd 30másodpercig 42 °C-on hő sokknak tettem ki őket.
3. 0,5 ml SOC táptalajt mértem hozzá
4. A sejtek regenerálása 37 °C-on 40 percig tartó rázatással történt.
5. Az így létrejött szuszpenzióból, LAF boxban 150 μ l-t szélesztettem LB és ampicillin tartalmú petricsészébe, majd egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltam.

6. A létrejött telepek közül kiválasztottuk 4-et és átoltottuk egy szilárd agarlemezre, továbbá ampicillines folyékony LB táptalajba.

Plazmid tisztítása

NucleoSpin Plasmid DNA purification Kit-tel nyertük ki a baktériumokkal felszaporított plazmidot.

1. LB kultúrát centrifugáltuk 30 másodpercig (13000 rpm), a felülúszó frakciót lepipettáztam.
2. 250 µl A1 puffert adtam hozzá és vortex segítségével újra oldat formába hoztam.
3. 250 µl A2 puffert mértem hozzá és óvatosan kevertem, ezután 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltam.
4. A3 pufferből 300 µl-t mértem az elegyhez, óvatosan keverés után 5 percig centrifugáltam.
5. A felülúszót a speciális előre megadott oszlopra mértem majd 1 percig centrifugáltam.
6. 600 µl A4 puffer hozzáadásával átmostam az oszlopot, 1 percig centrifugáltuk, a szűrletet eltávolítottam.
7. 2 perc centrifugálás után az oszlopot Eppendorf csőbe helyeztem át, 30 µl AE pufferrel eluáltam a megtisztított plazmidot.

Plazmidok restrikciós emésztése

Az utolsó lépésben le kellett ellenőrizni, hogy sikerülte a ligálás, ezért a pJET konstrukciót XbaI és XhoI enzimekkel emésztettük.

Ehhez 2 µl plazmidot használtunk fel, melyhez hozzáadtam:

- 10 µl 10X Tango Puffert
- 0,4 µl XbaI enzimet
- 0,2 µl XhoI enzimet
- 5,4 µl MQ vizet

Egy órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, az emésztett és emésztetlen mintákat 1,2%-os agaróz gélen választottuk el.

4 Eredmények és értékelésük

4.1 Stolbur fitoplazma vizsgálata kukoricában

A kukorica vörösödést mutató egyedek biotechnológiai vizsgálatát végeztük és ezen fejezet ezeket az eredményeket tárgyalja.

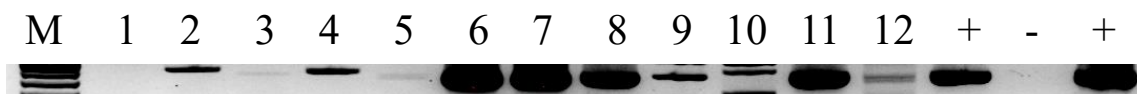
4.1.1 Nested PCR P1-P7 és U3-U5 primerekkel

Ezt a primer választást az indokolta, hogy az U3 és U5 primer úgy lett tervezve, hogy a fitoplazmák DNS-ének konzervatív szakaszához kapcsolódjon. Ez a módszer alkalmas a fitoplazmák jelenlétének általános kimutatására.

1.Lépés PCR reakció P1-P7 primerrel

2.Lépés Nested lépés U3-U5 primerrel

A nested PCR lépés eredményét a 8. ábra szemlélteti, melyből a jobb értelmezhetőség véget csak azt a mérettartományt mutatom be ahova a terméket vártuk.



8.ábra: P1-P7 és U3-U5 primerpárokkal végzett nested PCR gélfotója

Jelmagyarázat:

M: 100bp plus marker

1-12: minták

+: pozitív kontroll

-: negatív kontroll

Érdekes eredmény, mert a szemmel jól látható tüneteket produkáló kukorica egyedek, ezen primerpárral végzett PCR tesztje nem mutatta a fitoplazma jelenlétét. Továbbá a vizsgált 7 gyom egyedből, melyek különböző fajok is voltak, 4 igen erős pozitív jelet mutatott míg a 9. minta is pozitívként értékelhető. Ez a primer pár a vizsgált gyomok fitoplazma terheltségét mutatta ki.

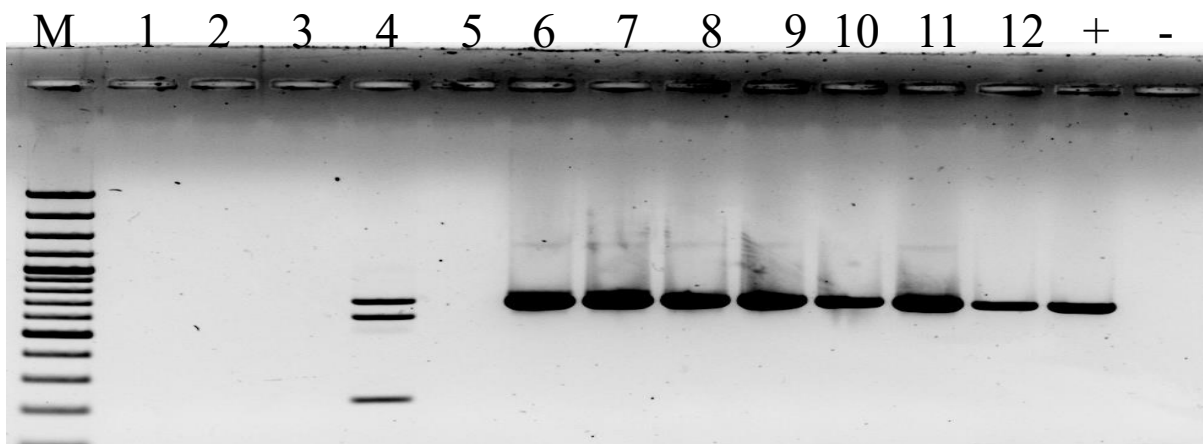
4.1.2 Nested PCR STOL 11 F2-R1 és STOL 11 F3-R2 primerekkel

Az első primerpárra szemben az F3-R2 kombináció specifikusan a stolbur fitoplazmára lett tervezve, így pontosabb eredményt kaphatunk. Logikailag ez a lépés következik az általánosabb primerek után.

1.Lépés STOL11 F2-R1

2.Lépés STOL 11 F3-R2

Az eredményét a 9. ábra szemlélteti, melyen egyértelműen azonosíthatók a pozitív minták.



9. ábra: STOL 11 F2-R1 és STOL 11 F3-R2 primer párral végzett Nested PCR gélfotója
 Jelmagyarázat:
 M: 100bp plus marker
 1-12: minták
 +: pozitív kontroll
 -: negatív kontroll

Ezen Nested PCR vizsgálata kimutatta a Stolbur fitoplazma jelenlétét az összes gyomból származó mintában (6-12). Egy kukorica minta is pozitívnak bizonyult.

A két Nested PCR eredményeit a 8.táblázat-ban foglaltam össze.

	minta sorszáma:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
primer összeállítás:	P1-P7 és U3-U5						+	+	+	+		+	
	STOL 11 F2-R1 és STOL 11 F3-R2				+		+	+	+	+	+	+	+

8.táblázat: A két eltérő primer összeállítás során kapott eredményeket összefoglaló táblázat.

Jelmagyarázat :

Sárga rubrika illetve + jel: Az adott mintából kimutatható a stolbur fitoplazma

A 8. táblázatból jól látszik, hogy a 6-os, 7-es, 8-as, 9-es és a 11-es gyom minta mindkét primer kombinációban is pozitívnak bizonyult, tehát nagy valószínűséggel megtalálható benne a stolbur fitoplazma. A 4-es, 10-es és 12-es minta csak a STOL 11 F2-R1 és STOL 11 F3-R2 primer összeállításban bizonyult pozitívnak.

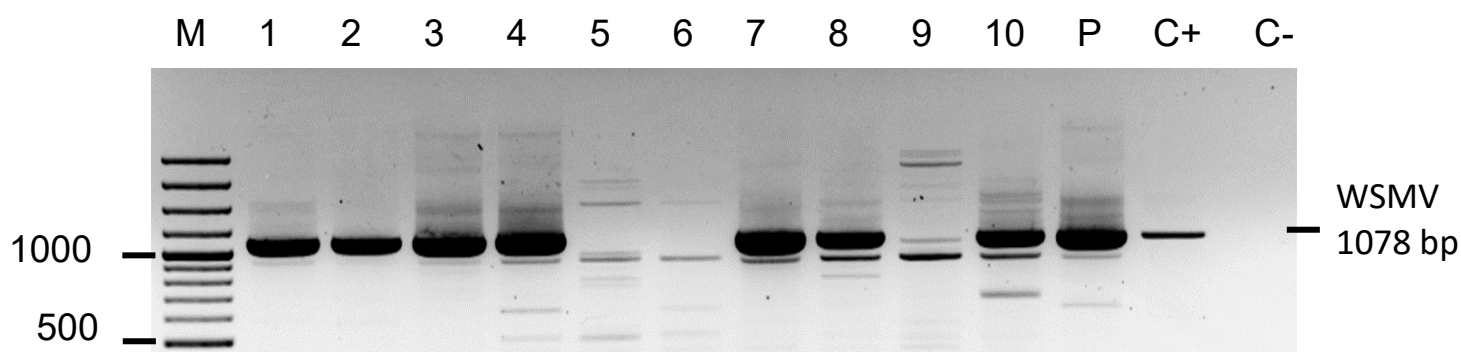
4.2 Köles, mint vírus rezervoár gyom

A kutató csoportunk *Panicum miliaceum* növényekből gyűjtött mintát két Balatonhoz közeli kukoricatábláról. A köles, mint gyomnövény volt jelen a parcellákban és a rudarás területeken, tipikus vírus specifikus tüneteket mutatott. A mintázott térségben nagymértékű egyszikű borítottság volt megfigyelhető. A „Büdös-árok” (BA) nevű területen a megelőző évi burgonya után vetettek kukoricát. Az „Újmajor-susnyás” (US) táblán búzát termeltek az előző évben. Kollegáim a tüneteket mutató növényekből random mintákat gyűjtöttek, azokból RNS-t tisztítottak, majd területenként egy-egy HTS-re alkalmas szekvenálható kis RNS könyvtárat készítettek BA és US néven és ezeket a könyvtárat Illumina platformon szekvenáltatták (ezt az UD Genomed végezte). A szekvenálás bioinformatikai elemzése 3 különböző vírus jelenlétét jelezte: Wheat streak mosaic virus (WSMV), Barley yellow striate mosaic virus (BYSMV), Barley virus G (BVG). Az imént felsorolt 3 vírusból az első kettőt mindkét vizsgált területen, a BVG vírust csak az US területen mutatta ki. A kutatásba itt kapcsolódtam be. Feladatom a kapott eredmények független módszerrel való visszaigazolása volt. Munkánkból, egy cikk is

született, mely az MDPI kiadó *Plants* folyóiratában jelent meg „*Millet Could Be both a Weed and Serve as a Virus Reservoir in Crop Fields*” címmel, melyben társszerzőként szerepelek.

4.2.1 WSMV határozott jelenléte a kölesben

A WSMV előfordulása mindkét helyszínen detektálható (10. ábra szemlélteti a Büdös-árokából származó eredményeket a 11. ábra pedig az Újmajor-susnyás eredményeit mutatja) volt. RT-PCR vizsgálatokkal a köpenyfehérjét kódoló virális genom szakaszt sikerült amplifikálni. 7, illetve 9 minta volt fertőzött a BA és US területen a 10-10 mintázottból.



10. ábra: WSMV kimutatása a BA területen, pozitív minta mely terméke 1078bp mérettartományban van

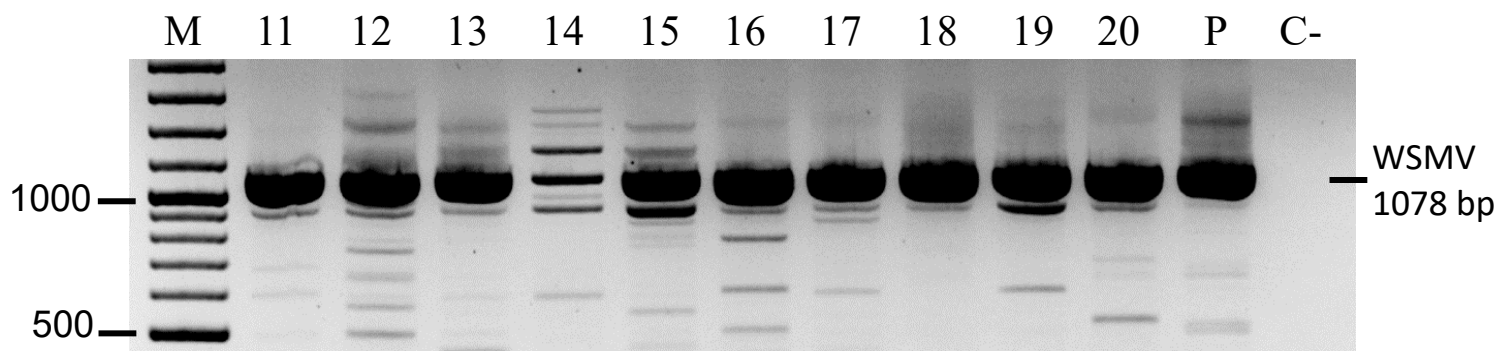
Jelmagyarázat:

M: 100bp plus marker

1-10: minták

P, C+: pozitív kontroll

C-: negatív kontroll



11. ábra: WSMV kimutatása a US területen, pozitív minta mely terméke a 1078bp mérettartományban van

Jelmagyarázat:

M: 100bp plus marker

11-20: minták

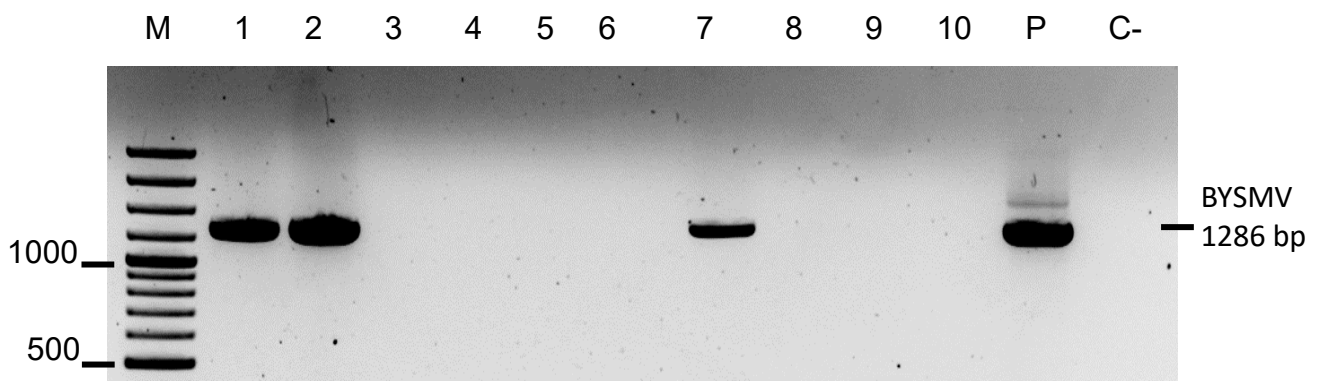
P: pozitív kontroll

C-: negatív kontroll

A poolokban amplifikált terméket tisztítottam agaróz gélből és klónoztam, és ennek határoztattuk meg a szekvenciáját, ami bizonyította, hogy a WSMV jelen van.

4.2.2 Különböző BYSMV törzsek a két különböző helyszínen

A Barley yellow striate mosaic virus-t még nem írták le hazánkban, de a csoportunk a kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzésével megállapította, hogy mindkét helyszínen megtalálható az említett vírus. Továbbá azt is bizonyítottuk, hogy a genomjuk némi eltérést mutat. Ezt vizsgáltam én RT-PCR segítségével (a Bűdös-árokából származó eredményeket a 12. ábra, az Újmajor-susnyásból származókat a 13. ábra szemlélteti). A köpenyfehérjét kódoló szakaszt amplifikáltuk három BÁ és egy ÚS mintában, ez bizonyította a jelenlétét. A PCR termékeket tisztítottam, klónoztam és szekvenáltattam. A szekvenciák elemzése azt mutatta, hogy a genomjuk amplifikált szakasza csak kis mértékben különbözik.



12. ábra: BYSMV kimutatása a BA területen, pozitív minta mely terméke 1286bp mérettartományban van

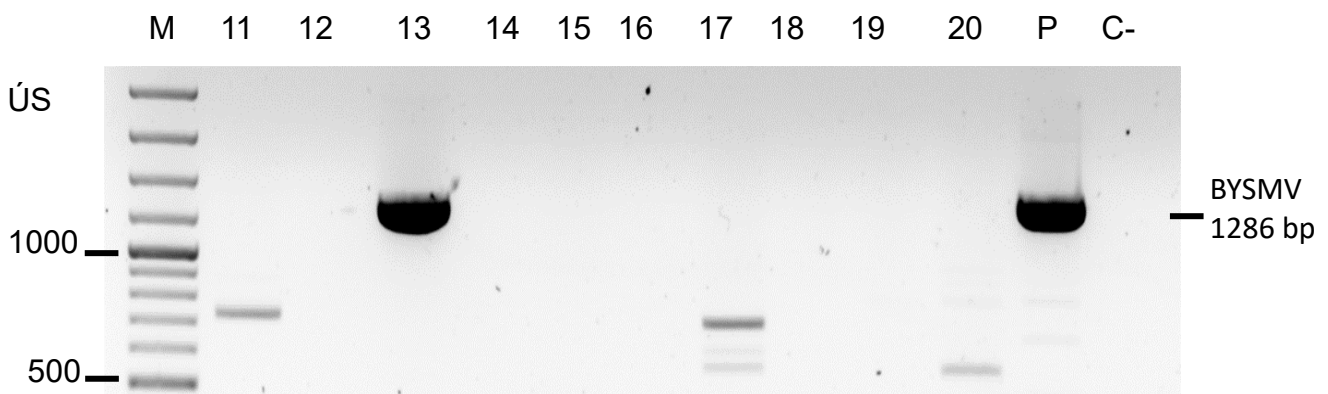
Jelmagyarázat:

M: 100bp plus marker

1-10: minták

P: pozitív kontroll

C-: negatív kontroll



13. ábra: BYSMV kimutatása a US területen, pozitív minta mely terméke a 1286bp mérettartományban van

Jelmagyarázat:

M: 100bp plus marker

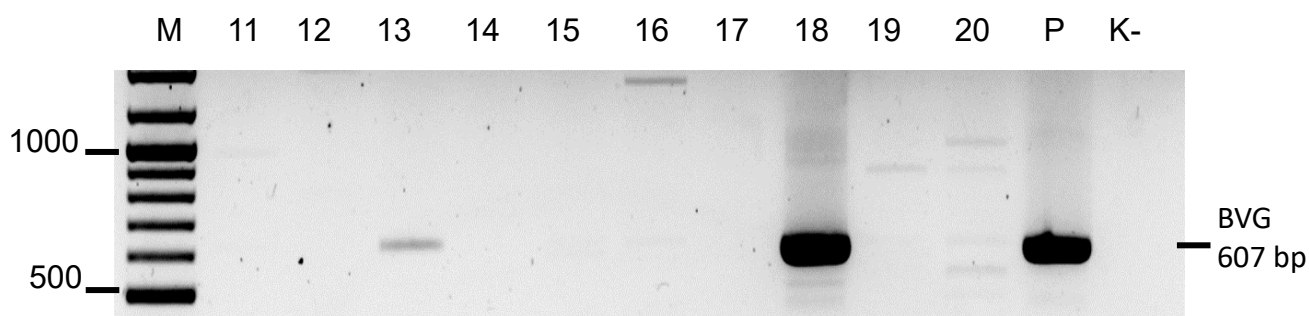
11-20: minták

P: pozitív kontroll

C-: negatív kontroll

4.2.3 BVG, amit még nem írtak le Magyarországon

Az Újmajor-susnyás területéről készült a kis RNS könyvtár elemzése a BVG jelenlétét mutatta ki. RT-PCR alkalmazásával, BVG specifikus primereket felhasználva, sikerült a köpenyfehérjét kódoló szakaszt sokszoroznom, de csak egyetlen mintában, a 18-as számú növényben (ezt a 14. ábra szemlélteti). Legjobb tudásunk szerint, egy holland publikációt leszámítva ezt a vírust még nem írtak le Európában. A növény melyről a 18-as minta származik nem mutatott semmilyen szemmel látható tünete. A termék tisztítását itt is elvégeztem, majd klónoztam és ezt szekvenáltattuk, ami teljes mértékben igazolta a vírus jelenlétét.



14. ábra: BYSMV kimutatása a US területen, pozitív minta mely terméke a 607bp mérettartományban van

Jelmagyarázat:

M: 100bp plus marker

11-20: minták

P: pozitív kontroll

K-: negatív kontroll

5 Következtetések

5.1 Fitoplazma vizsgálata kukoricában

A szemmel jól látható tüneteket produkáló kukorica egyedek biotechnológiai elemzése során nem sikerült teljes bizonyossággal kimutatni a stolbur fitoplazma fertőzést. PCR reakciók eredményei nem egyértelműek, az utóbbi esetekben nem jelenthető ki teljes bizonyossággal, hogy az adott egyed fertőzött-e vagy sem. Ennek oka lehet az, hogy a fitoplazmák növényen belüli eloszlása nem mindig egyenletes, így előfordulhat, hogy ugyan a levélben a fitoplazma jelen volt és kialakította a kukorica levelének vörös elszíneződését, de később koncentrációja annyira lecsökkent, hogy már nem volt kimutatható. Azt, hogy a fenotípusosan fertőzöttnek tűnő kukorica egyedek stolbur fitoplazma terheltségét nem tudtuk egyértelműen igazolni, azzal is indokolható, hogy ha az 5 mintából csak 1-2 lenne fertőzött akkor a minták keverékében ennek DNS-e felhígulna és így ez a módszer már nem elég érzékeny a kimutatásukra. Ez azonban az egyedi minták tesztelésével ellenőrizhető hipotézis.

A P1P7_U5U3 primerekkel végzett nested PCR reakció során kapott pozitív minták PCR termékeit gélből tisztítottuk és bázissorrendjüket hagyományos Sanger szekvenálással is megállapítottuk. A termékek szekvenciáját egymáshoz és az NCBI GenBank adatbázisban található fitoplazma referenciaszekvenciákhoz is hasonlítottuk. Ezen eredmények bioinformatikai elemzése választ adhat a kérdésre.

5.2 Köles, mint vírusrezervoár gyom

Vizsgálataink során három különböző vírus jelenlétét sikerült kimutatni a kisRNS könyvtár elemzésével, és ezt visszaigazolni RT-PCR-rel. Ez a tény felveti azt a lehetőséget, hogy a kultúrnövényeinket fertőző vírusok a természetes gyomflórában maradnak fenn és innen fertőznek a vektorok segítségével. A WSMV esetében a fertőzés forrása lehetett akár az előző évben termelt kalászos gabona, az áttelelő természetes flóra vagy akár az egyszikű gyomok is. Sajnos az elővetemény fajtája ismeretlen volt, ezért ezek közül a hipotézisek közül mind elképzelhető. Ismereteink a köles vírus megőrző és fenntartó szerepéről a WSMV tekintetében igen szűkösek. A magas fertőzöttség miatt kutatócsoportunk valószínűsíti a köles ezen vírus rezervoár szerepét, de azt, hogy ennek van-e szerepe a kukorica fertőződésének nem tudtuk bizonyítani. Ehhez további vizsgálatok szükségesek.

A BYSMV-t kevesebb alkalommal sikerült visszaigazolni, ez azt jelenti, hogy ez a vírus nem volt olyan elterjedt, mint a WSMV, mégis jelen van.

Az információ szűkössége miatt nehezen magyarázható a BVG jelenléte és hipotézis is nehezen állítható fel a fennmaradására és terjedésére. A BVG fertőzés jelei ismeretlenek,

valószínűsíthető a csökkent termés és biomassza produkció. Ahhoz, hogy a gyomok vírusrezervoár szerepét tisztázzuk, átfogó széleskörű országos kutatásra lenne szükség, több gyomfaj bevonásával.

6 Összefoglalás

6.1 Fitoplazma vizsgálata kukoricában

Munkám során két teljesen eltérő növénykórtani esetet vizsgáltam modern biotechnológiai módszerekkel a NAIK-MBK Diagnosztikai csoportjához csatlakozva.

Az első eset a NÉBIH Monorierdőn található fajtakitermesztő állomásához kapcsolódik. Azzal keresték meg a kutatócsoportot, hogy bizonyos kukorica vonalak jellegzetes lila elszíneződést mutatnak. Itt kapcsolódtam be a munkájukba, elutaztunk a helyszínre és a tüneteket mutató kukorica vonalak és gyomok megmintázásával vette kezdetét a vizsgálat. Irodalmi kutatásunk eredménye az volt, hogy valószínűleg stolbur fitoplazma okozhatja a kukorica vörösödés betegséget, így a további vizsgálatok ezen kórokozó kimutatására irányultak. A mélyhűtött mintákból DNS-t tisztítottam, ezekből poolokat készítettem, majd ezekkel az elegyekkel dolgoztam tovább. Az általunk választott biotechnológiai eszköz a diagnosztikára a nested PCR volt. Ezt két eltérő primer összeállítással végeztük. Első alkalommal P1-P7 és a nested PCR lépésben: U3-U5 primer párosítást használtunk. Ezek a fitoplazmák általános kimutatására lettek létrehozva kevésbé specifikusak. Meglepő módon a jellegzetes tüneteket mutató kukoricák közül egyikből sem sikerült kimutatni a vizsgált kórokozót, ezzel ellentétben a megmintázott 7 gyomnövényből 5-nek pozitív lett a tesztje, tehát fitoplazmával terhelt volt. Második alkalommal STOL 11 F2-R1 és STOL 11 F3-R2 primer összeállítással dolgoztam, ez egy specifikusan stolbur fitoplazma kimutatására szolgáló primer sor. Itt azt az eredményt kaptam, hogy az összes vizsgált gyom terhelt stolbur fitoplazmával és csak a 4-es számú kukorica pool volt pozitív a kukorica minták közül. Vizsgálatainkkal nem sikerült egyértelműen kimutatni a stolbur fitoplazma jelenlétét a jellegzetes tüneteket mutató kukorica állományban. További egyedi növényvizsgálatok lennének szükségesek. A megmintázott összes gyomnövényből viszont sikerült kimutatni a kórokozót.

6.2 Köles, mint vírusrezervoár gyom

A második eset feltárása során a munkatársaim két Balaton melletti kukoricatábláról (US és BA) gyűjtöttek gyom köles (*Panicum miliaceum*) mintákat. Ezekből RNS-t tisztítottunk és kis RNS könyvtárat készítettek, ezeket bioinformatikai vizsgálatnak vetették alá és három különböző vírus jelenlétét igazolták: Wheat streak mosaic virus (WSMV), Barley yellow striate mosaic virus (BYSMV), Barley virus G (BVG). A kutatásban azt a feladatot kaptam, hogy más módszerrel igazoljam vissza a vírusok jelenlétét. Ehhez cDNS-t szintetizáltam az RNS

poolokból. Majd a különböző vírusokra RT-PCR-rel teszteltem a mintákat. A WSMV vírus 7, illetve 9 mintából volt kimutatható a BA és US területen a 10-10 mintából. A BYSMV jelenlétét a BA területen 3, az US mintákból pedig 1 esetben sikerült visszaigazolni. Ez azért számít fontos eredménynek, mert Magyarország területén eddig még nem írták le. A BVG jelenlétét csak a US területen sikerült visszaigazolni egyetlen mintában. Egyetlen európai publikációt leszámítva még nem írták le a kontinensen, ezért ez az eredmény is jelentős. Mindhárom vírus esetén a termékeket tisztítottam és az így kinyert örökítőanyagot egy baktérium segítségével klónoztam, majd a sokszorosított DNS bázissorendjét meghatároztattuk további vizsgálatok céljából. Összefoglalva elmondható, hogy az RT-PCR jól kiegészíti a bioinformatikai módszereket és teljes mértékben alkalmas az eredmények megerősítésére.

7 Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki a témavezetőimnek Dr. Bán Ritának, Dr. Várallyay Évának és Nagyné Dr. Galbács Zsuzsannának akik szakmai tudásukkal és iránymutatásukkal végig támogattak.

Továbbá, szeretném megköszönni a NAIK-MKB és a NÉBIH minden kedves munkatársának, aki bármilyen módon hozzájárult dolgozatom megszületéséhez.

Végezetül, köszönettel tartozom a családomnak, szaktársaimnak és barátaimnak akik végig mellettem álltak.

8 Irodalomjegyzék

1. **Bekavac, G., Purar, B., Jocković, Đ., Treskić, S., Mitrović, B., Đalović, I., Milovac, Ž.** (2011). Crvenilo kukuruza: pola veka kasnije. *Field Vegetable and Crop Research* 48: 25-30.
2. **Bertaccini A.** (2007) 673 Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology, *Frontiers in Bioscience* 12, 673-689, January 1, 2007
3. **Bressan, A. et al.** (2005) Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to *Flavescence doree* phytoplasma. *Entomol. Exp. Appl.* 115, 283–290
4. **Christensen N. M. , Axelsen K. B. , Nicolaisen M. , Schulz, A.** (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10(11), 526–535. doi:10.1016/j.tplants.2005.09.008
5. **Clair D. , Larrue J. , Aubert G. , Gillet J. , Cloquemin G. , Boudon-Padieu E.** (2003): A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France, *Vitis* 42 (3), 151–157
6. **Clark M. F. , Adams N.** (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *The Journal of General Virology*, 34(3), 475–483.
7. **Cousin M. T. , Abadie, M.** (1982): Action des mycoplasmes sur l’anthère. Etude en microscopies photonique et électronique. *Rev. Cytol. Biol. Végét.-Bot.* 5:41-57.
8. **Csajbók J.** (2012) : Szántóföldi növények termesztése és növényvédelme. Debreceni Egyetem Agrár- és Gazálkodástudományok Centruma Mezőgazdasági, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási intézet Kar Növénytudományi Intézet, Debrecen 2012
9. **Danet L.J. , Balakishiyeva G. , Cimerman A. , Sauvion N. , Marie-Jeanne V. , Labonne G. , Lavina A. , Batlle A. , Križanek I. , Škoric D. , Ermacora P. , Serce U.C. , Çağlayan K. , Jarausch W. , Fossiac X.** (2011): *Multicus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. -Microbiology* 438-450 p.
10. **Duduk, B. , Bertaccini A.** (2006): Corn with symptoms of reddening: new host of stolbur phytoplasma. *Plant Disease* 90: 1313-1319

11. **Fésűs L.** (1999): Biokémia és molekuláris biológia, Nyomdaipari Szolgáltató KKT. Debrecen
12. **Firrao G. , Gibb K. , Streten C.** (2005): Short taxonomic guide to the genus 'candidatus phytoplasma' Source: Journal of Plant Pathology, Vol. 87, No. 4, Special Issue (December 2005), pp. 249-263
13. **Fischl G., Horváth J., Kadlicskó S., Kiss E., Pintér Cs., Bíró K.** (1995): A szántóföldi növények betegségei. Mezőgazda Kiadó
14. **Gallitelli, D. , Mascia, T. , Conti M.** (2010): Seed transmission of viruses and phytoplasmas: facts, factors and mechanisms. Georgofili 2010 Vol.7 No.Supplemento 10 pp.73-97 ref.many
15. **Gibbs A. J.** (1976): Viruses and plasmodesmata. In: Gunning BES, Robards AW (eds) Intercellular communication in plants: studies on plasmodesmata. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 149–164
16. **Glits M., Folk Gy.** (2000): Kertészeti növénykórtan, Mezőgazda Kiadó, 2000
17. **He J.** (2013): Practical Guide to ELISA Development. The Immunoassay Handbook, 381–393. doi:10.1016/b978-0-08-097037-0.00025-7
18. **Hipper C. , Brault V. , Ziegler-Graff V. , Revers F.** (2013): Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. Frontiers in Plant Science, 4(May), 154. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154>
19. **Hogenhout S. A. , Oshima K. , Ammar E. D. , Kakizawa S. , Kingdom H. N., Namba S.** (2008): Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Mol Plant Pathol 9:403–423
20. **Horváth J. , Gáborjányi R.** (1999): Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó, 1999., 9789639239371
21. **IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team** (2004): Phytoplasma taxonomy group, Description of the genus 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 1243-1255.
22. **Jones R. C.** (2014). Trends in plant virus epidemiology: Opportunities from new or improved technologies. Virus Research, 186, 3–19.
23. **Jović J. , Cvrković T. , Mitrović M. , Krnjajić S. , Redinbaugh M. G. , Pratt R. C. , Toševski I.** (2007): Roles of stolbur phytoplasma and Reptalus panzeri (Cixiinae, Auchenorrhyncha) in the epidemiology of Maize redness in Serbia. European Journal of Plant Pathology, 118(1), 85–89. doi:10.1007/s10658-007-9105-0

24. **Kölber M. , Elek R. , Csömör Zs.** (2016): Kukorica vörösödés (Maize Redness = MR) és vektorai
25. **Kuroli G.** (1970): Adatok a sztolburt terjesztő sárgalábú recéskabóca (*Hyalesthes obsoletus* Sign.) biológiájához. Agrártudományi Egyetem Mosonmagyaróvári Mezőgazdaságtud. Kar Közleményei, 6: 5-22
26. **Lázár J. , Bisztray Gy. D.** (2011): „Virus and virus-like diseases of grapevine in Hungary.” *International Journal of Horticultural Science* 2011, 17 (3): 25–36. (2011): 25–36
27. **Lee I. M. , Davies R. E. , Gundersen-Rindal D. E.** (2000): Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:221-255.
28. **Lorenz K. H. , Schneider B. , Ahrens A. , Seemüller E.** (1995): Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85:771-776.
29. **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
30. **Németh M.** (1979): A csonthéjas termésűek vírusbetegségei. 199–422. p. In: Gyümölcsfák vírusos, mikoplazmás és rikettsiás betegségei. H.n.: Mezőgazdasági Kiadó, 630 p.
31. **Pasztor, G.; Galbacs N., Z.; Kossuth, T.; Demian, E.; Nadasy, E.; Takacs, A.P.; Varallyay, E.** (2020): Millet Could Be both a Weed and Serve as a Virus Reservoir in Crop Fields. *Plants* 2020, 9, 954.
32. **Pepó P.** (2011) : Növénynevelés. Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem
33. **Příbylová J. , Špak J.** (2012): Dodder Transmission of Phytoplasmas. *Phytoplasma*, 41–46. doi:10.1007/978-1-62703-089-2_4
34. **Schleif R.** (1993): *Genetics and Molecular Biology*, Johns Hopkins University Press. Baltimore, 1993.
35. **Schoelz J. E. , Harries P. A. , Nelson R. S.** (2011): Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol. Plant.* 4, 813–831
36. **Shou-Wei D. , Hongwei L. R. , Lua F. , Lib W. W.** (2004): RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Research: Volume 102, Issue 1*, 1 June 2004, Pages 109-115

37. **Smart C.D. , Schneider B. , Blomquist C. L. , Guerra L. J. , Harrison N. A. , Ahrens U. , Lorenz K.-H. , . Seemüller E. , Kirkpatrick B. C.** (1996): Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region * Department of Plant Pathology, University of California, Davis, California 956161 ; Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, D-69216 Dossenheim, Germany² ; and Fort Lauderdale Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Fort Lauderdale, Florida 333143 Received 22 January 1996/Accepted 28 May 1996
38. **Strauss E.** (2009): Phytoplasma research begins to bloom. *Science* 325:388–390
39. **Šutić D. , Tošić M. , Starović M. , Stanković R. , Tomić T.** (2002): O Crvenilu kukuruza. *Zaštita bilja* 53 (2-3): 57-73 (printed in 2005).
40. **Süle S.** (2014): Phytoplasma diseases on fruits in Hungary. *Acta Agraria Debreceniensis*, (62), 24-29. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/62/2158>
41. **Szirmai J.** (1956): Új vírubetegség hazánkban. *Agrártudomány*, 8: 351-354
42. **Takács A. P.** (2019): A gabonavírusok szerepe a gyakorlatban *Agrofórum Online* 2019. május 25.
43. **Tuba Z. , Engloner A.** (2007): Botanika I. - Bevezetés a növénytanba, algológiába, gombatanba és a funkcionális növényökológiába, *Sejttan – Szövettan – Alaktan*, Nemzeti Tankönyvkiadó Zrt. pp 73
44. **Ueki S. , Citovsky V.** (2007): “Spread throughout the plant: systemic transport of viruses,” in *Viral Transport in Plants*, eds E.Waigmann and M. Heinlein (Berlin: Springer), 85–118.
45. **Viczián O. , Süle S. , Gáborján R.** (1998): A sztolbur fitoplazma természetes gazda növényei Magyarországon. *Növényvédelem* 34(11): 617-620.
46. **Whitfield A. , Rotenberg D.** (2015): Disruption of insect transmission of plant viruses- *Current Opinion in Insect Science* 2015/01/22

Internetes források:

- http1:https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_omn007a.html (2020.09.)
- http2:<https://www.agrariumonline.hu/mezogazdasag/tobb-mint-2-millio-hektaron-vethetnek-az-iden-tavaszi-vetesu-novenyeket-17310/> (2020.10.)
- http3:<https://www.statista.com/statistics/254292/global-corn-production-by-country/> (2020.10.)
- http4: <https://gd.eppo.int> (2020.10.)

http5:<https://www.gabonakutato.hu/hu/kukoricatermesztesunk-a-vilag-merlegen> (2020.10)

http6:<http://www.vszk.hu/hu/jogszabalyok/vetomag-jogszabalyok.html> (2020.04.)