

Gyümölcsfákat fertőző vírusok molekuláris jellemzése

Szakdolgozat
biológia alapszak

készítette:
Mátyus Nikolett

témavezető:
Bóka Károly
egyetemi docens
Növény szervezettani Tanszék

külső konzulens:
Várallyay Éva
tudományos főmunkatárs
NAIK MBK

Baráth Dániel
PhD hallgató
SZIE Biológia doktori
iskola

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2020.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Fás szárúakat fertőző kórokozók	4
2.1. Vírusokról és viroidokról általában	4
2.2. Vírusok terjedése	5
2.2.1. Vektor nélküli vírusátvitel	6
2.2.2. Vektor mediált fertőzések.....	6
2.3. Vírusos megbetegedések jellemzői /tünetei gyümölcsfákon.....	9
2.3.1. Lokális tünetek	10
2.3.2. Szisztémikus tünetek	10
2.4. Szélmalomharc, a növények védekezése vírusokkal szemben	11
2.4.1. Antivirális RNS interferencia	14
2.5. Viroid és vírus példák a <i>Prunus</i> nemzetségből	14
2.5.1. Alma gyümölcshegesedés viroid (ASSVd)	14
2.5.2. Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (PNRSV)	15
2.5.3. Szilvahimlő (PPV).....	16
3. Gyümölcsfák védelme és tesztelése	17
3.1. Preventív eljárások, a terjedés korlátozása	17
3.2. Hagyományos vírusdiagnosztikai eljárások	18
3.2.1. Szerológiai módszerek, ELISA	19
3.2.2. Nukleinsav analízisen alapuló technikák, PCR	20
3.3. Nagy-áteresztőképességű szekvenálás	21
4. Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (LChV1)	22
4.1. Cseresznye aprógyümölcsűség (LChD)	22
4.2. LChV1 kutatása napjainkban.....	24
5. Következtetések	25
6. Összefoglaló.....	27
Summary	28
7. Köszönetnyilvánítás.....	29
8. Irodalomjegyzék	30
9. Elektronikus hivatkozások jegyzéke	33
NYILATKOZAT	34

1. Bevezetés

Hazánk agrártevékenységében fontos szerepet játszanak fás szárú gyümölcsseink. Ezeket ugyanakkor számos vírus fertőzheti meg. A csemeték ültetésekor évekre előre tervezünk, és ezért a kórokozók felszaporodásának elkerülése érdekében kiemelt jelentőséget kell tulajdonítanunk a vegetatív szaporítóanyag vírusmentesítésének, hiszen jelenlegi tudásunk szerint a gombák és baktériumok ellen effektíven működő növényvédő szereink nem hatnak rájuk. A kiválasztott jó tulajdonságú fafajták szaporítóanyagának előállítását és nevelését kormányrendeleteknek megfelelően, általában izolátorházakban végzik, hiszen ezek védővonalat biztosítanak a rovarvektorok és más forrásból származó fertőzések ellen. A rendeletek továbbá tartalmazzák a hazánkban is előforduló vírusok, viroidok és betegségek magyar nyelvű jegyzékét. A dolgozatomban leírt patogén és kórság megnevezések eszerint lettek feltüntetve. A kórokozó mentes környezet fenntartása érdekében a növényeket időszakosan ellenőrzik hagyományos vírusdiagnosztikai módszerekkel, mint például a szerológiai tesztek és RT-PCR. Ugyanakkor ezek a technikák és a biotesztek csak a vizsgálandó vírusra specifikusan alkalmazhatóak. Ezért is nyitott teljesen új távlatokat a vírusdiagnosztikában a nagy-áteresztőképességű szekvenálás, hiszen használatával a mintában lévő összes kórokozó kimutatható.

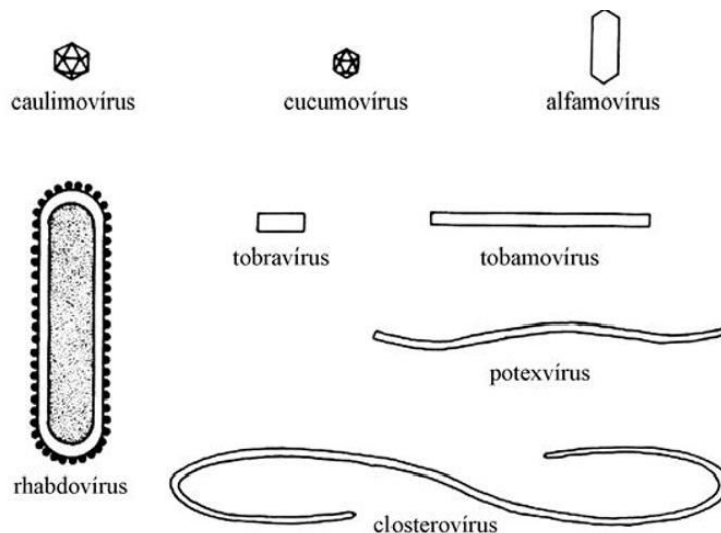
Szakdolgozatom témája a gyümölcsfákat fertőző vírusok és a jelenleg használt diagnosztikai eljárások általános jellemzésén túl, egy, hazánkban egészen újonnan leírt cseresznye vírus, a cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (*Little Cherry Virus 1* - LChV1), bemutatása a korábban említett technikák alkalmazásán keresztül. A vírus cseresznyén, nevéhez híven a termés kis méretét, elszíntelenedését, édességének elvesztését okozza. Láthatóan rendellenesség lép fel a gyümölcserés folyamán, ami tartós éretlenségben nyilvánul meg. A vírusfertőzöttség molekuláris diagnosztikai módszerek használata nélkül, csak nagyon későn, az első terméshozattal detektálható e tünetegyüttes révén, ami a profitábilis gyümölcsstermesztést évekkel hátráltathatja. A NAIK MBK Molekuláris Növénykórtan csoportja 2016-ban detektálta a kórokozót érdi izolátor házból gyűjtött kajszibarack mintákban, így egy új gazdanövényen.

2. Fás szárúakat fertőző kórokozók

2.1. Vírusokról és viroidokról általában

Mindennapjainkban is gyakran használt fogalom a vírus. De vajon egy hétköznapi ember tudja-e mit is rejt ez a szó igazából? Már jó ideje befolyásoló tényezői az életünknek ezek a kórokozók, gondolhatunk itt a 20. században megjelent három, nagy morbiditással és gyors terjedéssel járó influenza vírus pandémiára, mint a spanyolnátha, ázsiai influenza vagy az úgynevezett hongkongi influenzajárványokra. A jelenlegi, a világ és Magyarország szintjén is meghatározó koronavírus fenyegetés pedig olyan gyors gazdasági és társadalmi átrendeződéseket generál, amelyek következményeit még felmérni sem tudjuk egyelőre.

A vírusokkal kapcsolatban inkább az állatokat és ezzel egyetemben az embert fertőző szervezetekről hallunk a legtöbbet, ugyanakkor ezek az élővilág minden szintjén, növényekben, gombákban, akár más mikroorganizmusokban is előfordulnak. Önálló anyagcserére és mozgásra képtelenek és mégis talán az egyik legizgalmasabb és legkiszámíthatatlanabb társaságról van szó, akik választóvonalat képeznek élő és élettelen között. Felépítésük szerint két csoportra oszthatóak. A “burok nélküliek” csak az információt hordozó RNS vagy DNS nukleinsavból és az ezt védő fehérjeburokból, avagy kapszidból állnak, melyek együttesen hozzák létre a nukleokapszidot. Ilyen például a dohánymozzaik vírusa. A másik típusban a “burokkal rendelkező” vírusok esetében ezt a nukleokapszid struktúrát még körbeveszi egy glükoproteid burok is, mint például a paradicsom bronzfoltosság vírusa esetében (Horváth és Gáborjányi, 1999). A vírusok életmódjuktól függően két formát ölthetnek, a nukleinsavat és köpenyfehérjét is tartalmazó nyugalomban lévő komplett formát, azaz virion állapotot és a gazdanövényben szaporodó vegetatív vírust, amely már elvesztette kapszid komponensét. A növényeket megbetegítő vírusok virionjai változatos formákban fordulnak elő. Lehetnek anizometrikusak, mint a pálcika, fonál és henger alakúak tartozó fajok. Illetve izometrikusak, mint a gömb vagy szférikus alakú vírusok (1. ábra). Küllemük azonban csak látszólag sima gömb, igazából poliéder geometriai idomok, melyek közül a leggyakoribb az ikozaéder, vagyis a 20 oldallapú alakzat. A fenti típusok közül a növényeket fertőző vírusok legtöbbször fonál alakúak (Glits és Folk, 2000).



1. ábra: Vírusok morfológiája (Glits és Folk, 2000).

A növények egészségét ugyanakkor nemcsak a vírusok veszélyeztetik. Specifikus kórokozók között tartjuk számon a viroidokat, amelyek neve bár kísértetiesen hasonlít az előbb tárgyalt kórokozókéhoz, semmilyen funkcionális, evolúciós vagy strukturális kapcsolat nem mutatható ki közöttük (Flores és mtsai, 2015). A viroidok kisméretű, köpenyfehérje nélküli, egyszálú cirkuláris ribonukleinsavak (Glits és Folk, 2000). Az első viroidot közel 70 évvel később fedezték fel, mint az első vírust, aminek oka rövid RNS láncuk lehetett, hiszen ezeket 246–434 nukleotid építi fel (Di Serio és mtsai, 2018). Különös érdekességük, hogy a vírusokkal ellentétben nem kódolnak fehérjéket, ezáltal saját életciklusuk minden eleme a gazda sejt fehérjétől függ. Tehát amíg egy vírus bekerülve a sejtbe, annak riboszómáihoz kapcsolódva megtermelteti az általa kódolt fehérjéket, egy viroidnak ahhoz, hogy replikációja elkezdődhessen, hozzá kell férnie gazdájának specifikus enzimeihez, például RNS polimerázokhoz (Flores és mtsai, 2015). Felfedezésük óta nagyjából 30 viroidot írtak le. Rendszerezésük során, alakjuk és replikációs helyük figyelembevételével, két családba: Pospiviroidae és Avsunviroidae, sorolták be őket (Glits és Folk, 2000; Di Serio és mtsai, 2018).

2.2. Vírusok terjedése

A vírusok önálló mozgásra képtelenek és nem tartalmaznak olyan saját enzimeket, melyek segítségével aktívan képesek lennének bejutni a sejtekbe. Ezért passzív módon, legtöbbször külső faktorok segítségével kerül sor az átvitelre. A terjedés alapvetően két

úton valósulhat meg, vektorok nélkül vagy vektorok segítségével zajló vírus transzferrel. Ezen vírusátviteli módok, vírusoktól függően eltérő módon, akár a lehetőségek kombinálásával is lefolyhatnak (Horváth és Gáborjányi, 1999).

2.2.1. Vektor nélküli vírusátvitel

A vektorok nélküli vírusátvitel lefolyhat emberi közvetítéssel, vagy anélkül. A növény, saját szaporodása során, vegetatív vagy reproductív szervein keresztül képes saját utódait is megfertőzni. Tehát a gumók, hagymák, bizonyos esetben a magok és akár a pollen is révésszé válhat a vírusátvitelben. A maggal történő vírusátvitel jelentős gazdasági problémákat okoz. Igaz, az átvitel ezen formája csak egyes vírusoknál lehetséges, de a floémet fertőző vírusok kivételével számos kórokozó használja ki ezt az útvonalat (Horváth és Gáborjányi, 1999).

A sebzéseken keresztül történő mechanikai átvitel természetes és mesterséges módon is végbe mehet. Ez a legegyszerűbb módja a vírusok átjutásának. A sebzésen keresztüli átvitel eredményességét sok tényező, mint például a gazdanövény tulajdonságai, és az adott vírussal szembeni ellenállósága is befolyásolhatja, de a kis koncentrációban előforduló vírusok is sikeresen használhatják az átvitel e módját. A természetes mechanikai átvitel klasszikus példája a dohánymozaik vírus, amely csupán a szomszédos növények leveleinek érintkezésével is képes terjedni (Horváth és Gáborjányi, 1999).

A kedvező tulajdonságokkal rendelkező fajták szaporítása során a kertészek által is gyakran használt módszerek, mint az oltás, szemzés és dugványozás során is lehetőség nyílik a kórokozók transzferére. Sőt a fertőzöttség, ezen folyamatok során az egész leszaporított növényre áterjedhet. A vírustranszfer veszélye az ilyen vegetatív szaporítással nagyon megnő, hiszen oltással alapvetően minden szisztemikus megbetegedést okozó vírus átvihető (Horváth és Gáborjányi, 1999).

2.2.2. Vektor mediált fertőzések

A növényi vírusok terjedésének legjelentősebb formája az állatvektorokkal történő vírusátvitel. Ilyen állatvektorok, tehát közvetítők lehetnek a rovarok, férgek, vagy akár a csigák is. A leggyakoribb vírushordozók a rovarok, amelyek szinte felmérhetetlen fajsza-mukkal, széles elterjedésükkel és mobilitásukkal szinte mindenütt megjelen(het)nek. Általában táplálkozásuk során fertőződnek meg, majd más növényeken folytatva

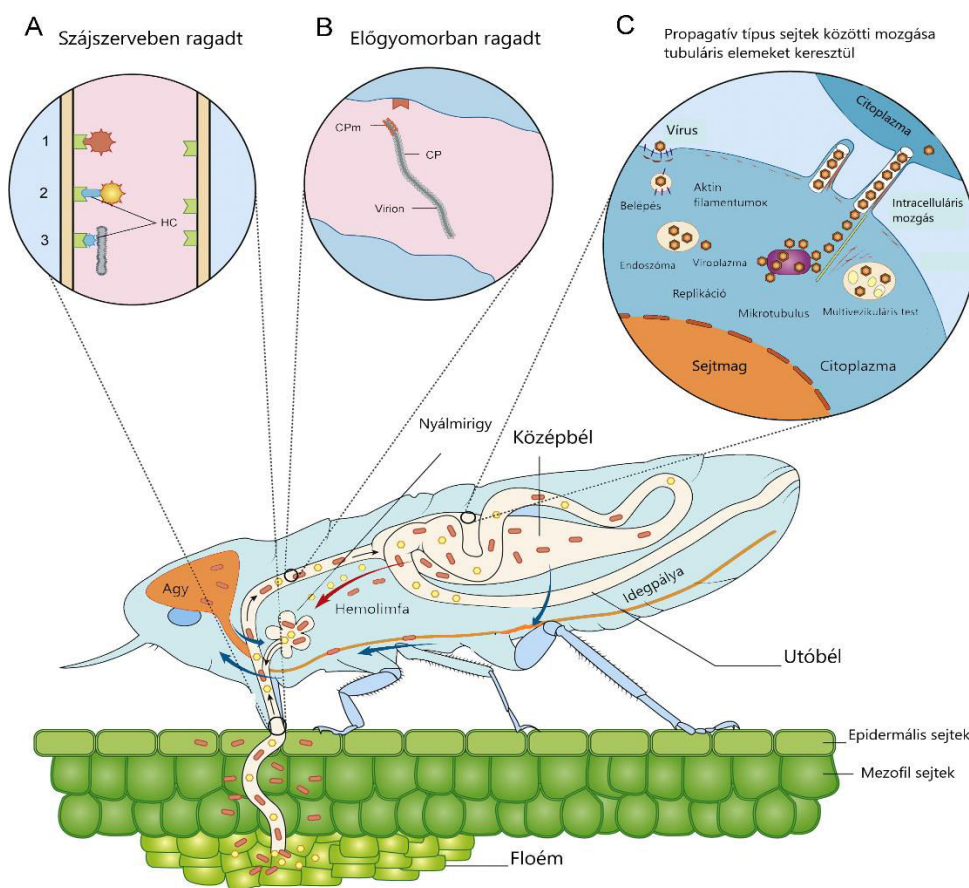
táplálkozásukat, azokat képesek tovább fertőzni. Általánosan elmondható, hogy a szűrőszívó szájszervvel rendelkező rovarok vírusátvitelére nagyobb jelentőségű a rágószájszervűekéhez képest. Ezt mutatja az is, hogy a levéltetvek kiemelkedő szerepet játszanak a vírusok terjesztésében (Horváth és Gáborjáni, 1999).

Attól függően, hogy a vírus mennyire alkalmazkodott a vektorához négy különböző vírusátviteli mechanizmust különböztetünk meg: **1/nem perzisztens** (stylet-borne), **2/szemiperzisztens**, **3/cirkulatív perzisztens** és **4/propagatív** átvitelt. A nem perzisztens és szemiperzisztens átvitelkor a vírus nem kerül be a rovar gyomrába, inkább a szájszerven és az előbél tájékán marad, ezáltal elősegítve a megfertőződést követő gyors, akár másodpercekkel későbbi átadást (Whitfield és mtsai, 2015). A perzisztens és a propagatív átvitel során a vírusok bekerülnek a gyomorba és együtt keringenek az állat hemolimfájával, így átadási idejük pár másodpercről napokra, akár hetekre is meghosszabbodik (2. ábra). A vírusok sokszorozódása a vektorban viszont csak a propagatív mechanizmus során történik (Wang és mtsai, 2019).

Izgalmas és kiemelendő téma, hogy ugyan a vírusok nem individuális "élőlények", mégis képesek kifejleszteni olyan stratégiákat, amellyel megnövelik saját szaporodásuk sikerességét. Ehhez először is magukhoz kell csalogatniuk a megfelelő vektort, majd miután megfertőződött, rábírní arra, hogy egy egészséges növényt válasszon táplálkozás céljából. Bár a fertőzés alapsémája ugyanaz, a megvalósítás merőben különböző a négy típusnál. A vektor alkalmassága is eltérő, hiszen a perzisztens módon terjedő vírusok átviteléhez nem elegendők az epidermális fehérjék. Ehhez vektorként olyan állatra van szükségük, ami a gazdanövény floémájából táplálkozik, ezáltal a növény ezen részével kerül kapcsolatba táplálkozása során (Wang és mtsai, 2019). Mivel az ilyen átvittel terjedő vírusok hosszabb időt töltenek vektoruk testében, előnyüket szolgálja annak fenntartása, szaporulatának megnövelése, és ugyanígy viszonyulnak gazdanövényükhöz is. Ezzel ellentétben a nem perzisztens mechanizmussal terjedő vírusok a fertőzés során elpusztítják gazdanövényüket. Ennek során érik el azt, hogy a pusztuló növény több attraktáns anyagot kibocsátva magához vonzza a vektort, majd mivel a rovar felismeri, hogy ez a növény nem megfelelő táplálkozásra, célirányosan egészségeset fog keresni, amin táplálkozva meg is történhet a vírus terjedése. Ezeknek a vírusoknak a fertőzése a gazdanövényen legtöbbször gyorsan kialakuló látványos tüneteket okoznak, mint a levélfoltosság. Mivel a levéltetvek ilyen típusú vírusátvitel vektorai, igen gyakran okoznak nagymértékű gazdasági károkat (Mauck és mtsai, 2014; Wang és mtsai, 2019).

A szemiperzisztens vírusokról és kifejezetten arról, hogy ezek hogyan befolyásolják vektoruk táplálkozási szokásait kevés leírás van. Fontos közvetítőik a liszteskék (*Aleyrodidae*), melyekre nemüktől és fajuktól függően különböző hatást gyakorolnak. Mint a legtöbb rovarra, a liszteskékre is jellemző, hogy a hím egyedek kisebbek, mozgékonyabbak, ezáltal a vírusok számára kedvezőbb vektorokként szolgálnak. A megfigyelt rovaroknál általános jelenséggé fordult elő, hogy a hím egyedek táplálkozási szokásait jobban befolyásolták a vírusok, mint a nőstényekét. Sokkal több növényt látogattak meg, a floém elérése gyorsabban, míg maga a táplálkozás lassabban zajlott. Tehát nagyobb mennyiségű növényt tudtak ezáltal sikeresen megfertőzni, nőstény társaikhoz képest. Az a tény, hogy a vírusok terjedésük során jobban támaszkodnak a hím liszteskékre, alátámasztja a feltételezést, miszerint a háttérben bizonyos mértékű koevolúciót is sejthetünk (Lu és mtsai, 2017).

Egy vektor vagy növény élete során nemcsak egy vírusnak van kitéve. Milyen befolyásoló tényezők állnak a háttérben, hogy ezek az élőlények melyik vírust mikor, milyen sorrendben adják tovább? Természetesen erről sem ők dönthetnek. Ebben szerepet játszhat az, hogy a kórokozók versengenek az adott gazdáért, továbbá előfordulnak olyan közös fertőzési stratégiák, amelyek egyedül nem, csupán együtt képesek fertőzni. Ez megtörténhet egyenrangú partnerként, ezáltal együtt kialakítva a betegségre jellemző szimptómát. Illetve lehetséges az is, hogy a vírusnak szüksége van egy segítő mikróbára az átadás végbemeneteléhez. A vírusok közötti kompetíció, mind a vektoron és a gazdanövényen belül is fennáll. Azonban érdemes megjegyezni, hogy ez csak a nem perzisztens esetekben tud lezajlani, ahol a vírus bejutása a vektorba és továbbadása a gazdanövénybe rövid időn belül megtörténik. Ekkor a vektorok nagyobb eséllyel lesznek újabb kórokozó fertőzésének kitéve, ami kompetíciót eredményezve eldöntheti, hogy melyikük adódhat tovább elsőként. Ilyenkor az elsőként a gazdaszervezetbe jutott vírus jelenléte gátolhatja a második és a később vektorba jutott vírusok inokulálódását (Allen és mtsai, 2019).



2. ábra: Vírusok elhelyezkedése a rovarokban átviteli típusuk alapján

A: nem perzisztens és szemiperzisztens átvitelű vírusok a rovar szájszerve körül maradnak.

B: a cirkulatív perzisztens és propagatív átvitelű vírusok bekerülnek a gyomorba és együtt keringenek a hemolimfával. C: perzisztens átvitelű vírusok sejtközi mozgása tubuláris

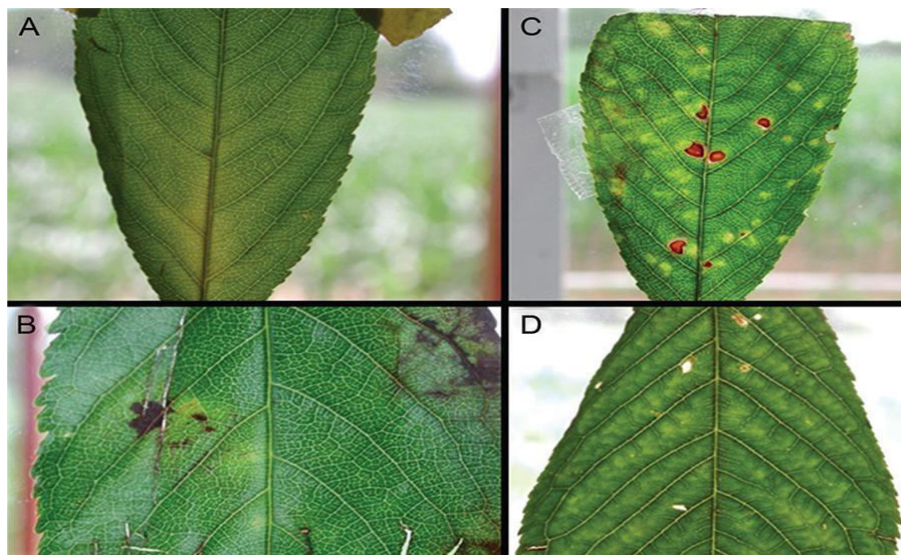
elemeken keresztül. „HC” - vírus protein, „CPm” - kis köpenyfehérje, „CP” – köpenyfehérje (Whitfield és mtsai, 2015 után).

2.3. Vírusos megbetegedések jellemzői /tünetei gyümölcsfákon

A vírusos megbetegedések a legtöbb esetben tüneteket okoznak a növény különböző szervein, melyek lehetnek makroszkóposak (levélfoltosság), vagy ha szabad szemmel nem láthatóak, mikroszkóposak, például a vezikulák felszaporodása a sejtben (Horváth és Gáborjányi, 1999). A vírusok egy része azonban nem generál tüneteket, látens módon fertőznek, melyek kimutatásához speciális diagnosztikai módszereket kell használnunk (Glits és Folk, 2000).

2.3.1. Lokális tünetek

Az ebbe a csoportba sorolható megjelenő tünetek a fertőzés helyén hamar láthatóak lesznek. Ezek kialakulásához a vírusnak a fertőzés helyétől csak pár szomszédos sejtre kell rövid távon mozogniuk. Ezen szimptómák a sikeres vírusfertőzést követő pár órában, legkésőbb egy napon belül már megjelennek. A leveleken lokális elszíneződésekként, léziókként manifesztálódnak. A zöldes-sárgás árnyalatú területek klorotikusak vagy vöröses-barnás léziókban nekrotikusak lehetnek (Horváth és Gáborjányi, 1999). Az elszíneződések mértéke lehet részleges vagy általános, a klorofillképzés nagymértékű csökkenését mutatra (3. ábra). Gyakori részleges tünet a foltosság, ami lehet kerek, csíkszerű, sávós, gyűrűs vagy akár szögletes is (Glits és Folk, 2000).



3. ábra: Virális fertőzés okozta lokális tünetek cseresznye levélen.

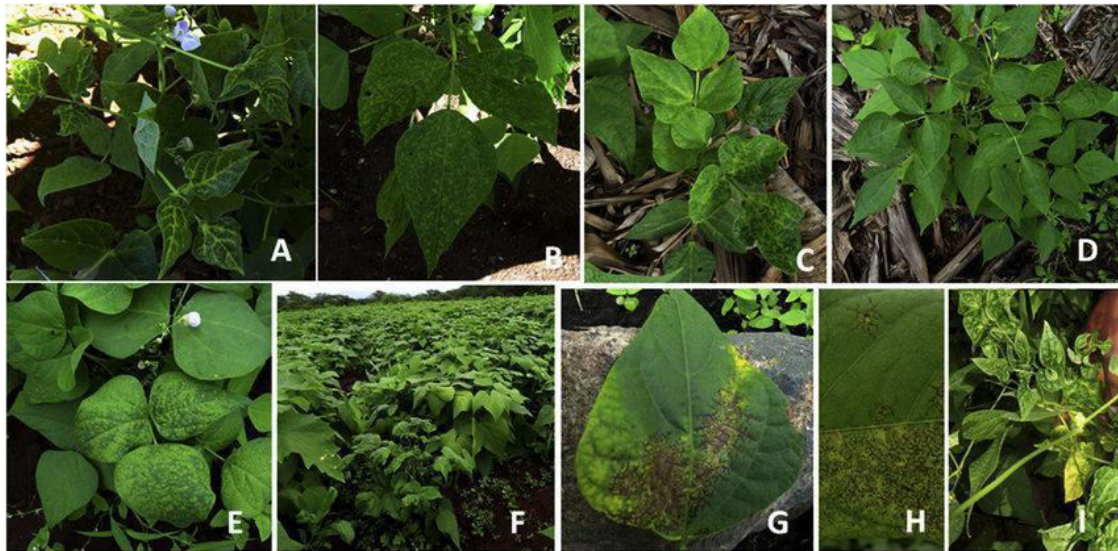
A: *Szilva törpülés vírus* (PDV) okozta általános klorózis. B: *Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus* (PNRSV) okozta klorotikus és nekrotikus foltok. C: *Alma klorotikus levélfoltosság vírus* (ACLSV) okozta klorotikus és nekrotikus foltok. D: *Szilva törpülés vírus* (PDV) és PNRSV által együttesen okozott általános klorózis.

(http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162015000100083)

2.3.2. Szisztémikus tünetek

Ha a vírus bejut a növény szállítószövet rendszerébe, a növény távolabbi részébe is el tud terjedni, a fertőzés szisztémizálódik (4. ábra). A tünetcsoport megjelenése ez esetben hosszabb időt, az inokulációt követően napokat, de inkább heteket, sőt, egyes esetekben

éveket vesz igénybe. Általában a fiatal, lágyszárú növények gyorsabban reagálnak a fertőzésre, hiszen rendszerint fogékonyabbak idősebb vagy fásszárú társaiknál. A megjelenés időtartamától függően beszélhetünk látens, illetve akut fázisról. Legjellegzetesebb tünetei közé tartoznak a mozaikosság, érnekrózis, márványozottság és a kinövések (Horváth és Gáborjányi, 1999).



4. ábra: BCMV vírus okozta szisztemikus szimptomák bab növényeken.

A: érklorózis. B: sárga márványozottság. C-F: mozaikosság. G-H: nekrotikus foltok I: levéldeformáció

(https://www.researchgate.net/figure/Some-symptoms-observed-on-common-bean-plants-in-fields-during-2015-to-2017-A-Vein_fig2_325211749)

2.4. Szélmalomharc, a növények védekezése vírusokkal szemben

A növények számos stresszhatásnak vannak kitéve nap mint nap. Ilyen stresszhatás egy vírusfertőzés is. Növények és vírusok folyamatos versengésben állnak egymással, hiszen a növények próbálnak védekezni a vírusfertőzés ellen, míg a vírusok ezt igyekeznek mindenáron megakadályozni. Ezért feltételezhetően, koevolúciós folyamatok révén rengeteg új tulajdonság, megtevesztési taktika és kölcsönhatási lehetőség alakult ki mindkét félnél (Fraile és Garcí'a-Arenal, 2010).

A növények védekezési stratégiáiban fordulópontként jelenik meg a fertőzés. A védő mechanizmusok koncentrálódhatnak a megelőzésre, tehát a rezisztenciára vagy a fertőzés utáni tünetek csökkentésére, ezáltal növelve a szervezet toleranciáját (Fraile és Garcí'a-Arenal, 2010). Elsődlegesen a növények is a megelőzésre fókuszálnak. A

rezisztencia sok formában létrejöhet, veleszületett, azaz gének által vezérelt módon, vagy adaptív formában, akár csak az emberi immunrendszerben. Ugyanakkor a növényeknek nincsenek immunsejtjeik, antitestek, egyetlen adaptív “immunválaszként” a géncsendesítést tudjuk megemlíteni. Ennek kialakulásában kulcsszerepe van a fertőzés során a növény védekezési folyamataiban résztvevő enzimek termékeiként létrejött, a vírus szekvenciájával megegyező szekvenciájú duplaszálú kis RNS molekuláknak. A géncsendesítés és a többi, genetikailag kódolt folyamat azonban nem egymástól elkülönülten zajlik. Erősíthetik, segítik egymás létrejöttét, lefolyását, ezáltal segítve a rezisztencia kialakulását (Carr és mtsai, 2018).

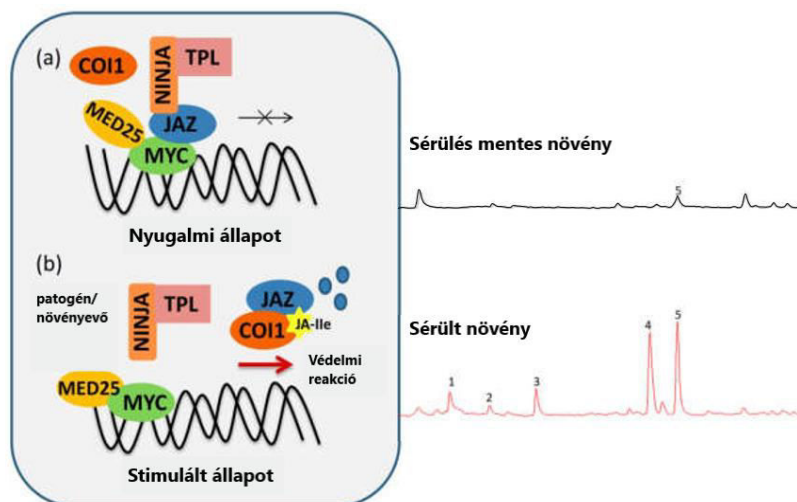
A “veleszületett immunrendszert” rengeteg gén, fehérje és hormon együttes működése alkotja. Legismertebb rezisztencia gének közé tartoznak a domináns R és a recesszív r gének. A domináns allél által kódolt faktorok inhibitoroként szolgálhatnak a vírusok fertőzési ciklusának egy fázisában, vagy Nucleotide-Binding and Leucine-Rich Repeat domain proteinek (NLR) kódolhatnak. Ezen fehérjék direkt vagy indirekt módon ismernek fel specifikus effektor molekulákat, ezáltal beindítva az effektor indukált immunválaszt. E génszabályozási folyamatoknak köszönhetően a növények tartós védelmet képesek fenntartani még a vírusok nagy mutálódási képességét is figyelembe véve (Carr és mtsai, 2018).

A patogén támadások során nagymértékben szintetizálódnak a patogenezis során indukált (pathogenesis-related - PR) fehérjék. Az, hogy milyen mértékben van szerepük a vírus elleni védelemben még vitatott, de az biztos, hogy gátolják a vírusok sejtek közötti szimplasztikus mozgását (Carr és mtsai, 2018).

A rezisztencia kialakulásában szerepet játszó hormonok közül megemlítendő a jazmonsav, hiszen ennek szintetizálódása aktiváló jelként szolgál a védőmechanizmusok elindításában egyes biotikus támadások során. Továbbá számos jazonát játszik szerepet a növények egymás közötti kommunikációjában is. Szigénálútvonalainak aktivációja nagyban függ a COI1 F-box fehérje regulációjától. Ezen útvonalak által rengeteg olyan speciális metabolit szabadul fel, például terpenoidok és alkaloidok, amelyek toxikus hatásúak vagy proteínáz inhibitoroként működnek és így hatékonyak a floémből szívogató és rágó rovarok ellen egyaránt. Rizs mintanövényt használva, jazonátos kezelésekkel jelentősen visszaszorítható volt a DNS és RNS vírusos megfertőzések száma (Wu és Ye, 2020).

A megelőző bekezdésekben felsorolt védelmi mechanizmusok egy, vírusfertőzéseket és a hozzájuk kapcsolódó stresszhatásokat el nem szenvedett növényben inaktívak, vagy csak nagyon alacsony szinten működnek. Ez nem meglepő, hiszen ezek a

folyamatok nagy energiabefektetést igényelnek, ezáltal a növénynek nem érni meg az állandó készülségi állapotot megőriznie (Carr és mtsai, 2018). A védelem elhúzódó fenntartása legtöbbször a növekedés visszamaradását okozza. Ugyanakkor előfordulhat olyan helyzet, hogy a növénynek nem marad más választása, folytonos nyomás alatt kénytelen tartani “készenléti állapotát”. Erre az esetre rendelkeznek egy szintén jazmonsavra épülő mechanizmussal, mellyel biztosítani tudják fennmaradásukat és szaporodásukat. A kulcsfehérje a JAZ protein, amely képes ideiglenesen gátolni bizonyos immunfolyamatokat a növekedés serkentése érdekében. Sőt, a jazmonsav más hormonok szignálútvonalaival is képes szinergisztikusan együttműködni a védelem és növekedés egyensúlyának optimalizálása érdekében. *Arabidopsis* növényekben megfigyelték, hogy a giberellinsav jelenléte represszálja a DELLA fehérjét, így aktiválva a fitokróm interakciós faktorokat (PIF), ami a növekedésnek kedvez (5. ábra). Ugyanakkor a jazmonsav aktiválja a DELLA fehérjét, ezáltal megkötve a PIF molekulákat. Ennek hatására elindul a JAZ proteinek degradációja tehát az egyensúly ebben az esetben a védelem felé csúszik el (Wu és Ye, 2020).



5. ábra: Jazmonsav aktivált válasz biotikus stresszhatásra.

(a) A sérülésmentes növényben nyugalmi állapot marad fent, amely alatt a JAZ protein transzkripció faktorokhoz köt, ezáltal megelőzve a jazmonsav útvonala aktiválását. (b) A sérült növény külső stresszhatásra stimulált állapotba kerül. A JAZ fehérje a COI1 F-box proteinekhez kapcsolódva aktiválja az útvonalt, ezáltal elindítva a védelmi reakciót (Wu és Ye, 2020 után).

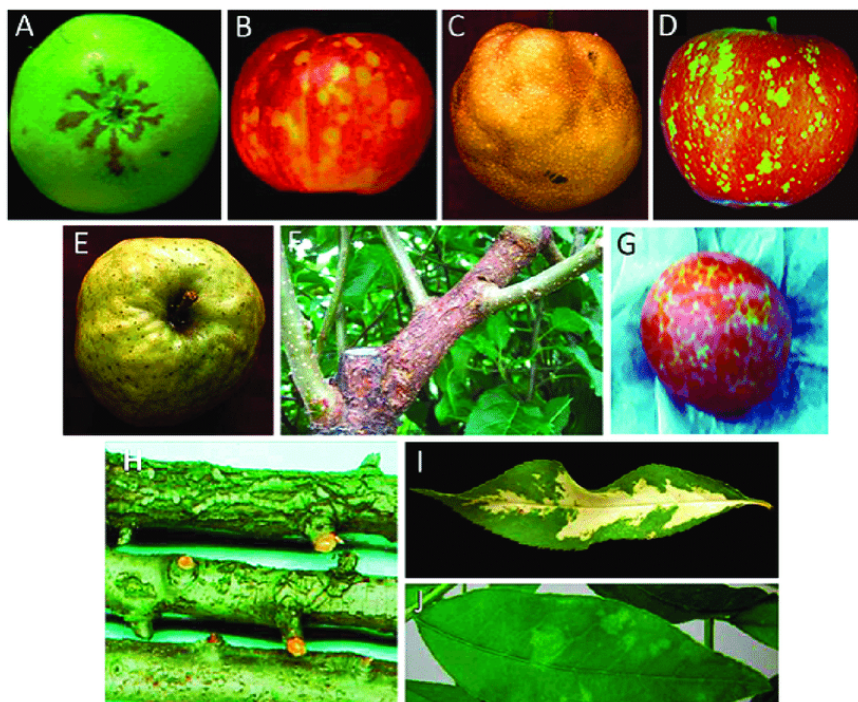
2.4.1. Antivirális RNS interferencia

Az élőlények sejtjeiben jelenlevő RNS információhordozó és szabályozó feladatokat is ellát a génkifejeződés folyamataiban. Regulációs tevékenységét elsősorban a transzkripció és transzláció szintjén működő géncsendesítés, más néven RNS interferencia (RNSi) során figyelhetjük meg. A folyamatra jellemző a duplaszálú (ds)RNS-ek képzése, majd ezek feldarabolása Dicer enzimek által 21-24 nt hosszúságú kis interferáló (small interfering - si) RNS-ekre. Ezek a későbbiekben effektor komplexekbe épülve, azokhoz kötve képesek a velük részben vagy teljesen komplementer RNS és DNS szálakat felismerni, majd az enzimkomplex aktivitásával ezeket hasítani vagy transzlációjukat gátolni. Ilyen effektor komplex az RNS-indukált csendesítő komplex (RISC), amelynek Argonauta családba tartozó fehérjéihez (Ago) tud kapcsolódni a siRNS. Az RNSi jelensége ezért fontos szerepet játszik a növények vírusok elleni védelmében (Brodersen és Voinnet, 2006).

2.5. Példák a *Prunus* nemzetséget fertőző viroidokra és vírusokra

2.5.1. Alma gyümölcshegesedés viroid (ASSVd)

Az Alma gyümölcshegesedés viroid (*Apple scar skin disease viroid* - ASSVd) az 1930-as éveket követően jelent meg távol keleti országokban. Elsősorban alma és körte fajokat fertőz, de leírták már őszi- és sárgabarackban, illetve cseresznye fajtákban is. A *Pospiviroidae* családba tartozik és három leírt gyümölcsbetegség tüneteit képes okozni. A *Dapple apple disease*-t, amely zöldes foltokban manifesztálódik, az Alma gyümölcshegesedést (*Apple scar skin disease*), amely barnás sebszerű léziókat okoz és a *Japanese pear fruit dimple*-t, amely az érett gyümölcs deformálódását, gödrössé válását eredményezi (6. ábra). Fertőzött fák mintáiból könnyen tisztíthatóak a viroid RNS-ek, kis méretüknek és cirkularitásuknak köszönhetően (Di Serio és mtsai, 2018).

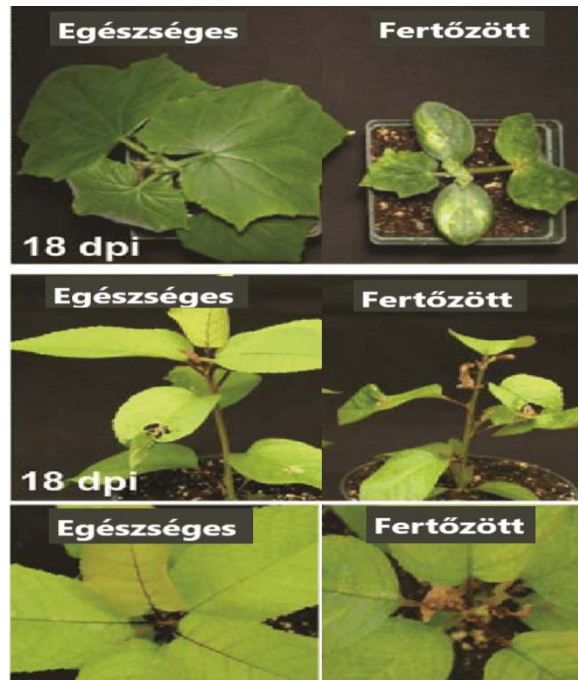


6. ábra: Viroidok által okozott tünetek gyümölcsfákon.

A-B: ASSVd okozta barnás sebszerű léziók és zöldes foltok almán. C: ASSVd okozta gödrösödés körten. D: Alma gyümölcs-göndörödés viroid (ADFVd) okozta tünetek almán. E-F: Apple Fruit Crinkle Viroid (AFCVd) okozta ráncosodás alma ágon- és termésen. G: Komló törpülés viroid (HSVd) okozta tünetek szilván. H: Körte terméshólyagosodás viroid (PBCVd) okozta felhólyagosodás körte ágon. I-J: Őszibarack látens mozaik viroid (PLMVd) okozta albinizmus és klorózis őszibarack levélen (Di Serio és mtsai, 2018).

2.5.2. Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus

A Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (*Prunus necrotic ringspot vírus* - PNRSV) a legelterjedtebb és legnagyobb gazdasági károkat okozó vírus a *Prunus* nemzetségben, hiszen pollennel is képes terjedni. Tünetei közé tartoznak a rügyek és gyökerek elhalása, növekedés elmaradása fiatal csemetéknél és a gyümölcs hozam csökkenése (7. ábra). Gyakran más vírusokkal együtt található meg például, a Szilva törpülés vírus (*Prune dwarf virus* - PDV) és a Szilva vonalas mintázottság vírus (*Plum line pattern virus* - PLPV). Ezen kórokozók koncentrációja évszakosan változó, így nem elég egy időpontban mintát gyűjteni, hiszen az eredmények ezáltal megtévesztőek lehetnek. Ezért általában egy szerv két vagy több fenológiai stádiumában szokás mintát gyűjteni, például egy nyugvó állapotban lévő rügyből, majd az új ágakból (Zotto és Nome, 1999).



7. ábra: PNRSV vírus okozta tünetek.

Tisztán megfigyelhető a növekedés elmaradása és a rügyek elhalása a jobb oldalon lévő vírusfertőzött növényeken a bal oldali kontroll növényekhez képest.

(https://www.researchgate.net/figure/Pathogenicity-test-of-two-Prunus-necrotic-ringspot-virus-isolates-Chr3-and-Pch12-in-their_fig2_8404903)

2.5.3. Szilvahimlő vírus

A csonthéjas gyümölcs állományt világszerte hatalmas mennyiségben csökkenti a szilvahimlő vírus (*Plum pox virus* - PPV). Rengeteg időt és munkát fektettek a kutatók a vírus eliminálásába, eddig sikertelenül. A gyümölcsfákon megjelenő tünetei nagyon változatosak ezáltal könnyen összetéveszthető más vírusok szimptomáival is, mint az Alma klorotikus levélfoltosság vírus (*Apple chlorotic leaf spot virus* - ACLSV) okozta tünetekkel. Általában világos, sárgás-zöldes gyűrűk, foltok jelennek meg a leveleken vagy akár a termés felszínén. Képes deformálni magát a gyümölcsöt, vagy akár pöttyöket hagyni a magon is. Szilván, de más csonthéjasoknál is megjelenik, mint az őszi-és sárgabaracknál, vagy a cseresznyénél (8. ábra). Különböző biológiai és molekuláris biológiai tulajdonságaikat figyelembe véve kilenc különböző PPV vírus változatot írtak le eddig. A vírus terjedése megtörténhet vegetatív szaporítás során, vagy akár levéltetvek által, nem perzisztens módon (Umer és mtsai, 2019).



8. ábra: PPV vírus okozta tünetek csonthéjas növényeken

(https://www.researchgate.net/figure/Plum-pox-virus-sharka-symptoms-in-fruits-endocarps-and-leaves-of-different-Prunus_fig3_325745964 után)

3. Gyümölcsfák védelme és tesztelése

3.1. Preventív eljárások, a terjedés korlátozása

A gyümölcsfákat fertőző vírusok világszerte komoly gazdasági problémákat okoznak. Az országok közötti kereskedelem révén új, addig a térségben nem ismert vírusok bukkannhatnak fel, amelyek mutálódással alkalmazkodhatnak az új környezethez. Ezáltal kiemelkedő fontosságúvá vált a szaporítóanyagok vírusmentesítése és olyan korlátozások bevezetése, amelyekkel visszaszoríthatóvá válhat a vírusok terjedése. Az Európai Unióban az Európai és Mediterrán Növényvédelmi szervezet (European and Mediterranean Plant Protection Organization - EPPO) ad javaslatokat a vírusmentesítés mikéntjéről és a szaporítóanyag minősítéséről a kormányok számára. Hat fő vírus kontroll stratégiát alkalmaznak a gyümölcsfákat szisztemikusan fertőző vírusok ellen: **1/fertőzött növények karantén alá helyezése, 2/vírusmentes szaporítóanyag minősítése, 3/fertőzött növények kiirtása, 4/patogén vektorok csökkentése, 5/kórokozók eltávolítása a növényből és 6/rezisztens vagy toleráns növény állomány szelektálása** (Barba és mtsai, 2015).

A gyümölcsfák fajtaazonosságát vegetatív szaporítással őrzik meg. A kiszelektált anyanövény, ha nem is mutat vírusfertőzésre utaló tüneteket, még nem tekinthető vírusmentesnek, hiszen szimptomákat nem okozó látens kórokozókat is tartalmazhat.

Vírusmentesítésre hőterápiával kombinált szövettenyésztési eljárásokat alkalmaznak, mely során merisztéma- vagy hajtáscsúcs tenyészeteket hoznak létre, amellyel a fertőzött növényből vírusmentes nyerhető, hiszen ezen pontokon vírusok nem, vagy csak nagyon ritkán jutnak át. Az így vírusmentesített növényt biztonsági okokból tesztelik, legtöbbször ellenanyagon alapuló ELISA módszerrel. A vírusmentes szaporítóanyag minősítését a bizonylat (certifikátum) tartalmazza, amely a szaporítóanyagon lévő sorszámozott címkén jelenik meg. Ez a minőségi bizonyítvány a szaporítóanyag vírusmentességét és származását jelöli, illetve sorolja fokozatokba (Glits és Folk, 2000).

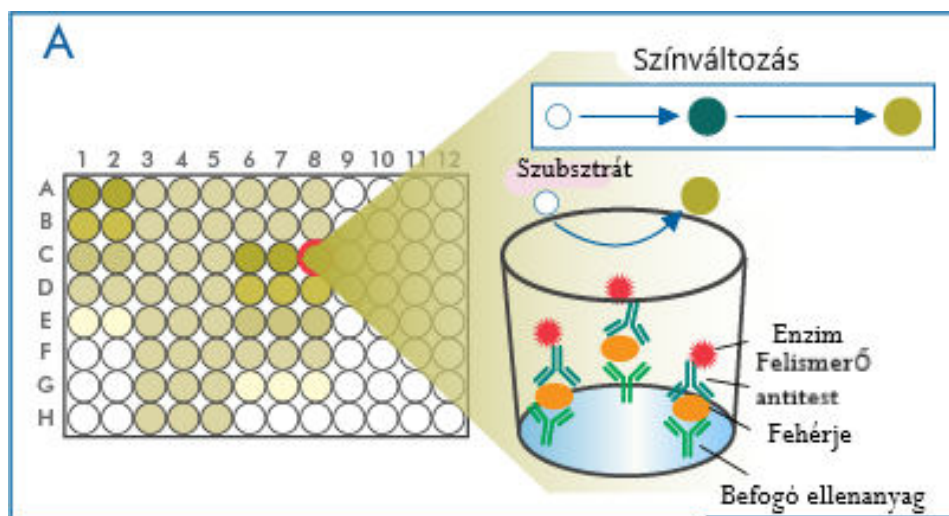
Gyümölcsfáknál, mivel évekkal előre tervezünk, nemcsak a szaporítóanyag vírusmentességére kell figyelmet fordítanunk, hanem a csemeték és a kifejlett növény élethosszon át tartó védelmére. Ennek érdekében minimálisra kell csökkentenünk a lehetséges vírusfertőzési lehetőségek számát. Ahogy már a korábbi fejezetekben említettem, a fertőzés leggyakrabban állat vektor mediált átadással történik. A vektorok számát csökkenthetjük kémiai eljárások, repellens anyagok és viricidek használatával vagy a gazdanövény izolációjával (Barba és mtsai, 2015). Izoláció történhet időben és térben. Időbeli, ha a gazdanövényt más-más időszakokban termesztik, például téli és nyári vetéseknél. Gyümölcsfáknál ugyanakkor csak térbeli izolációra van lehetőség. Ez megvalósulhat izolációs távolságok betartásával, azonban ez a gyomnövények és a fák közötti szükség szerint akár kilométeres távolságok kihagyása miatt egy gazdaságban nem megvalósítható. Ezért általában izolátorházakban helyezik el és nevelik a csemetéket, ezáltal megelőzve a rovarvektorok közvetítette megbetegedéseket (Glits és Folk, 2000).

3.2. Hagyományos vírusdiagnosztikai eljárások

A vírusmentesnek ítélt szaporítóanyagok és anyanövények tesztelése vírusdiagnosztikai eljárásokkal történik. Ezen technikák képezik a vírus kontroll alapját. Rengeteg módszer tartozik ide, a rutinszerű használatba ugyanakkor csak kevés integrálódott be (Boonham és mtsai, 2013). Ma még mindig alapvetően szerológiai és nukleinsav analízisen alapuló technikákkal állapítják meg egy adott vírus jelenlétét (Glits és Folk, 2000). Ugyanakkor e módszerek megjelenése előtt a kutatók a tünetek felisméréssel, transzmissziós elektronmikroszkópiával és biotesztek segítségével azonosították a vírusokat (Boonham és mtsai, 2013).

3.2.1. Szerológiai módszerek, ELISA

Az első nagy lépést a vírusdiagnosztikában a szerológiai módszerek, ezen belül is az enzim kötött immunosorbens/ellenanyag vizsgálat (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA) megjelenése jelentette. A módszer műanyag felületen történő antigén és a hozzá tartozó antitest reakciójának közvetett kimutatásán alapszik (9. ábra). Az antigén ebben az esetben a vírus valamely fehérjéje, ezekből is a legalkalmasabb a köpenyfehérje, amelyet színváltozásként követhetünk nyomon (Glits és Folk, 2000). A technika folyamatos fejlesztéseken megy keresztül a mai napig. Vírusspecifikus monoklonális antitestek termeltetésével sikeresen megnövelték a folyamat érzékenységi- és eredményességi fokát (Vidal és mtsai, 2012). Költséghatékony, könnyű használata mellett rengeteg minta egyidejű tesztelését teszi lehetővé, ezáltal hamar helyettesítette elődeit a rutinszerű vírus tesztelések és a certifikáció folyamataiban (Boonham és mtsai, 2013). Sőt, nem csak kifejlett növények, de rovar vektorok és szaporító képletek tesztelésére is alkalmazzák (Jeong és mtsai, 2014).



9. ábra: DAS-ELISA avagy kettős szendvics módszer.

A hagyományos ELISA módszertől eltérően poliklonális antitestet használnak. A folyamat során a műanyag hordozó mélyedéseit feltöltik a vizsgálandó mintákkal. A bennük lévő vírusok köpenyfehérjéi kapcsolódnak a rögzített “befogó ellenanyagokhoz”. A szendvics másik felét egy felismerő antitest alkotja, amely a vírusfehérje más epitópját detektálja és köti meg. Végző lépésként hozzáadjuk az enzim szubsztrát oldatot, amely előidézi a színváltozást. A minták színének árnyalata információt szolgáltat a vírus koncentrációjáról.

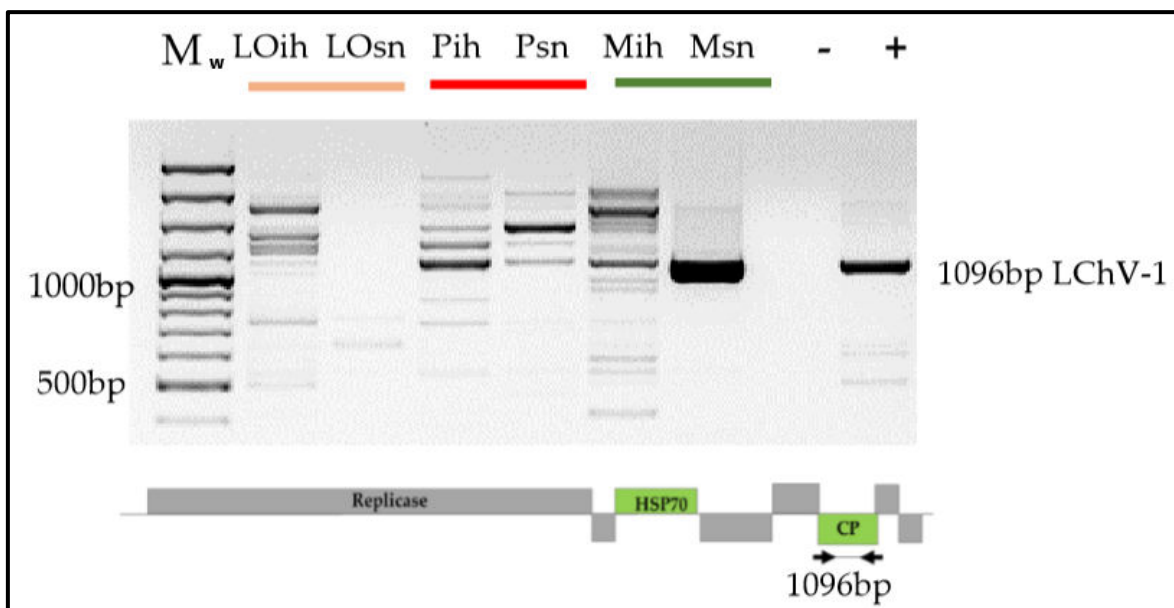
(<https://www.novusbio.com/application/elisa> után)

3.2.2. Nukleinsav analízisen alapuló technikák, PCR

A vírusdiagnosztika következő lépcsőfokát a nukleinsav analízisen alapuló technikák kifejlesztése jelentette. Ezen módszerek a virális RNS vagy DNS felismerésén alapulnak. Kezdetben, az ellenanyagokhoz hasonló hibridizálási folyamatok során enzimmel vagy izotóppal jelölt, a vírus nukleinsavával komplementer DNS vagy RNS „próbával” végeztek hibridizálást. Ennek során a mintanövény szövetnedvét, vagy az abból tisztított nukleinsavat egy membránhoz kötik, amit aztán hibridizálnak a komplementer, jelölt nukleinsavval. A membránt ezután mossák, így eltávolítják a specifikusan kötődő jelölő molekulákat (Glits és Folk, 2000).

Szintén a vírus szekvencia specifikus nukleinsavának kimutatására alkalmas a polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction - PCR), ami a vírusdiagnosztikában talán leggyakrabban használt módszer. A művelet során használt hőstabil DNS polimeráz enzim szekvencia specifikus indító szekvenciák (primerek) jelenlétében több amplifikációs lépésben sokszorozza meg a vírus egy adott régióját, amely ez által a folyamat végére kimutathatóvá válik (Jeong és mtsai, 2014). Első lépésként inkubációs elegyet készítenek, amely a cDNS-t, megfelelő mennyiségű vizet, dNTP-t, a vírus genomjának kimutatni kívánt, konzervált régiójára írt két oligonukleotid primert (forward és reverse), puffert, illetve a hozzá tartozó polimeráz enzimet tartalmazza. Az inkubáció három fő fázisból áll: **1**/denaturáció (90°C felett), **2**/anelláció (a primerektől függő hőmérsékleten, általában 60°C körül) és **3**/elongáció (optimális hőmérsékletét a használt DNS polimeráz működésének hőmérséklet optimuma határozza meg, ez általában 72 °C). A kimutatásra általában agaróz vagy poliakrilamid gélelektroforézist használnak (10. ábra). Az eljárás végén a reakció során keletkezett termékek méret szerint elválaszthatóak, ezáltal azonosíthatóvá válnak (Wetzel és mtsai, 1991).

Az RNS vírusok esetében az általános PCR folyamatot egy reverz transzkripció lépés előzi meg, amely során cDNS íródik a virális RNS-ről, mivel az RNS-ről a PCR-ben használt DNS polimerázok nem képesek szintézist indítani. Ezt a tesztet nevezzük RT-PCR-nek (Jeong és mtsai, 2014)



10. ábra: Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (LChV1) kimutatása RT-PCR-rel kajsziabarack fajtákból.

A képen a PCR reakciótermékek agaróz gélelektroforézissel történő elválasztásáról készült kép látható, “-”: negatív kontroll, “+”: pozitív kontroll. A pozitív kontroll és a köpenyfehérjéből (CP) nyert szekvencia hosszúsága alapján biztosan megállapítható a vírus jelenléte a mintában. LO-Ligeti óriás, P – Pannónia, M-magyar kajszi, ih – izolátorház, sn – törzsültetvény (stock nursery), Mw- Molekula méret (Molecular weight) (Baráth és mtsai, 2018).

3.3. Nagy-áteresztőképességű szekvenálás

A vírusdiagnosztika alapját képező szerológiai és nukleinsav analízisen alapuló technikák bár rengeteg előnnyel szolgálnak, használatukkal egy mintából csak egy specifikusan keresett vírus mutatható ki (Adams és mtsai, 2009). Ezért is nyitott teljesen új távlatokat az elmúlt évtizedben kifejlesztett nagy-áteresztőképességű szekvenálás (High throughput Sequencing- HTS), hiszen általa feltárhatóvá vált a minta és a benne lévő összes kórokozó genetikai állománya (Baráth és mtsai, 2018). A módszer alkalmazásán keresztül nemcsak több vírus szimultán kimutatása, hanem új, eddig nem ismert patogének „felfedezésére” is lehetőség nyílik. A módszer alkalmazása előtt egy már ismert vírus új gazdanövényben való felismerése hónapokra, míg egy teljesen új betegség okozójának azonosítása akár évekre is elhúzódhatott, mint például a ribizlit fertőző Ribiszke atavizmus vírus (*Blackcurrant reversion virus* - BRV) leírása is (Adams és mtsai, 2009).

A különböző HTS módszerek folyamata alapvetően azonos. A minták előkészítésének lépései: nukleinsavak tisztítása, darabolása vagy méretbeli szelekciója, a szekvenciák felszaporítása, cDNS könyvtár készítése, majd a szekvenálási folyamat és a bioinformatikai analízis elvégzése. Az eljárás egységessé tételének és futamidejének csökkentése érdekében több elkészítési protokoll és számítógépes program áll a kutatók rendelkezésére (Maliogka és mtsai, 2018). A kis RNS HTS protokollok optimalizálásában Magyarországon a NAIK MBK Molekuláris Növénykórtan csoportja is részt vesz. E során 2018-ban Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 azaz Little Cherry Virus 1 (LChV1) -et mutattak ki kajszibarackban. Ehhez, a cDNS könyvtár elkészítésére a Truseq kis RNS könyvtár előkészítési készletet (Truseq Small RNA Library Preparation Kit - Illumina, San Diego, CA, USA), míg a bioinformatikai analízis elvégzésére többek között a Trimmomatic és MegaBLAST programot használták (Baráth és mtsai, 2018).

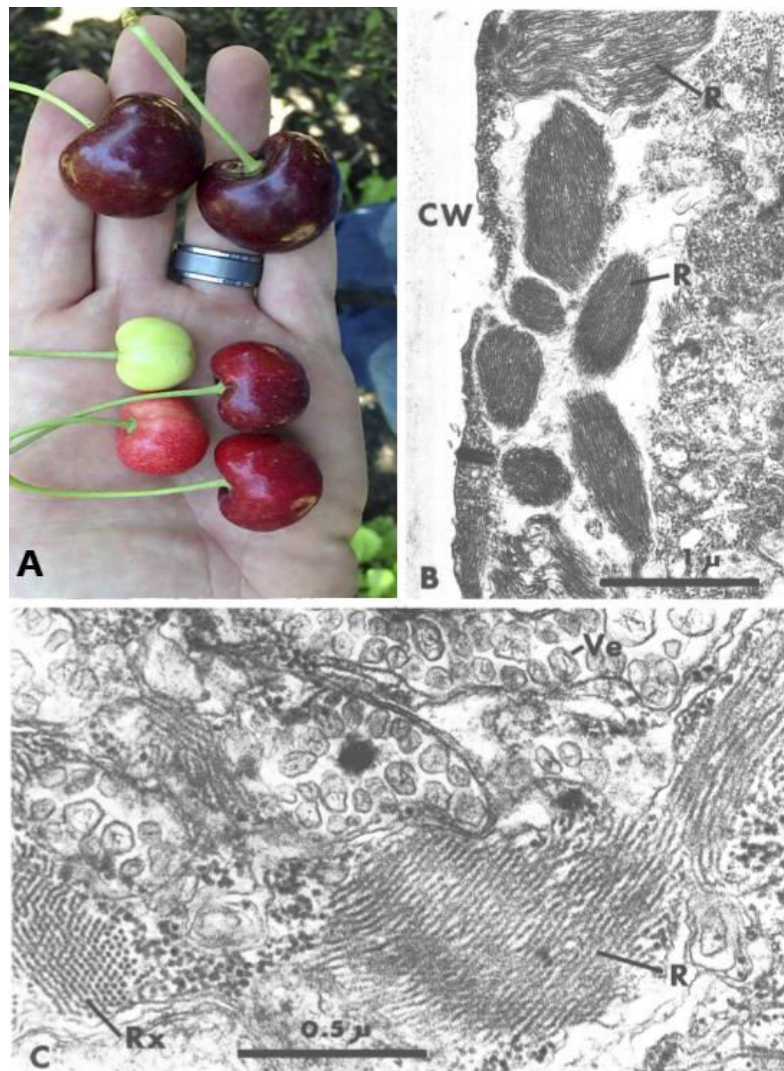
HTS-sel különböző módon előkészített nukleinsavak szekvenciája is megállapítható, melyek közül több is alkalmas vírusdiagnosztikára. Gyümölcsfák vírusdiagnosztikája során használják a siRNS-ek mellett a duplaszálú RNS-ek (dsRNA), virion- asszociált nukleinsavak (Virion-associated nucleic acids- VANA) és a teljes DNS vagy RNS szekvenálását is. A technika gyors, érzékeny és pontos eredményeinek köszönhetően hamar általánosan használt módszerré vált a vírusok detektálása során. Rutinszerű alkalmazása azonban még várat magára, amiben a jelenlegi magas ár mellett szerepet játszik, hogy nagyon fontos figyelni a minták előkészítésére, hiszen a szennyeződések és inhibitorok jelenléte megtevésztő eredményeket generálhat (Maliogka és mtsai, 2018).

4. Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (LChV1)

4.1. Cseresznye aprógyümölcsűség (LChD)

A ma már világszerte előforduló vírus okozta betegség, a cseresznye aprógyümölcsűség (Little Cherry Disease - LChD) az 1930-as évek elején ütötte fel a fejét Kanadában (Raine és mtsai, 1975). Elsőként cseresznye és meggy fajtákban írták le, azonban kimutatták azóta szilva, mandula és barack fajokban is (Baráth és mtsai, 2018). Gyors terjedése miatt a feltűnését követő 40 évben szinte teljesen megbénította a kanadai cseresznye termesztést (Harper és mtsai, 2019). A betegséget két vírus, a Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (*Little Cherry Virus 1* - LChV1) és a Cseresznye

aprógyümölcsűség vírus 2 (*Little Cherry Virus 2* - LChV2) okozza. Mindkét vírus a *Closteroviridae* családba tartozik. Ugyanakkor az LChV1 a *Velarivirus* míg az LChV2 az *Ampelovirus* genuszba sorolható. Mindkét vírus átvihető oltással, továbbá lehetséges útja a terjedésnek az állatvektor mediált fertőzés is. Az LChV1-nek ugyan még nem találták meg a vektorát, de az LChV2 viaszos pajzstetveken (*Pseudococcidae*) keresztül képes átadódni szemiperzisztens módon (Tahzima és mtsai, 2019)



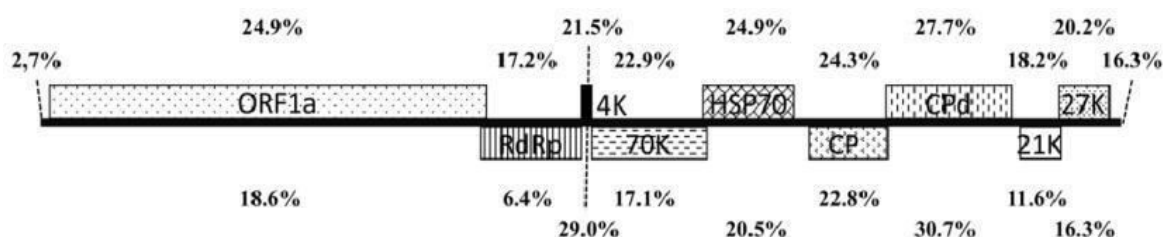
11. ábra: LChD tünetei.

A: Cseresznye termésen okozott szimptómák. (Harper és mtsai, 2019) B: Elektronmikroszkópos kép a floém parenchima sejtben lévő pálcika alakú vírus részecskékről. C: A sejtben lévő felszaporodott vezikulák és vírus részecskék “CW” - sejtfal (cell wall), “R” - pálcika alakú vírus részecskék, “Ve” - vezikula. (Raine és mtsai, 1975).

A fertőzést követő szimptómák elsősorban a termésen manifesztálódnak. A vírus jelenléte okozhatja a gyümölcs elszíntelenedését, kis méretét, szögletes alakját, édességének elvesztését, továbbá a levelek barnulását. Alkalmanként tünetmentesség is előfordulhat. A modern vírusdiagnosztikai módszerek megjelenése előtt a látható tünetek által LChD fertőzöttnek ítélt fák leveleiből és terméséből mintát gyűjtöttek és elektronmikroszkópos vizsgálatok alá vetették a floém parenchima- és az azt kísérő sejteket (11. ábra). A kontroll mintákhoz képest két abnormális struktúra általános jelenlétét észlelték.: a *Closteroviridae* családra jellemző flexibilis pálcika alakú vírus részecskéket és a vezikulák felszaporodását (Raine és mtsai, 1975; Rott és Jelkmann, 2001)

4.2. LChV1 kutatása napjainkban

A hagyományos és nagy-áteresztőképességű vírusdiagnosztikai módszerek használatával sikerült mélyebb megértést nyernünk az LChD-t okozó vírusokról. Candresse és mtsai 2012-ben sikeresen izolálták nagy-áteresztőképességű duplaszálú RNS (dsRNS) szekvenálással az LChV1 pozitív irányú egyszálú RNS genomját meggy mintából, amellyel tovább kutatva összefüggésbe hozták más betegségekkel, például a Shirofugen stunt disease betegséggel is (Candresse és mtsai, 2013). A genom 8 ORF, azaz nyitott leolvasási keret (Open Reading Frame) tartalmaz, melyek közül a 3' végénél található p21 fehérje feltételezhetően szupresszorként működhet a virális RNS okozta géncsendesítés során (Katsiani és mtsai, 2018).



12. ábra: LChV1 genom.

“ORF1a” - nyitott leolvasási keret, “RdRp” - RNS függő RNS polimeráz, “CP” - köpenyfehérje, “CPd”- köpenyfehérje gén másolat (Candresse és mtsai, 2013).

További részleges vagy teljes genom szekvenálások során vizsgált LChV1 izolátumok nagy genetikai változatosságot mutatnak (12. ábra). A szekvenciák összehasonlításán alapuló filogenetikai analízis az izolátumokat négy csoportba sorolta. Az

így nyert információ alapján a vírus több konzervált régiójára primereket terveztek, így lehetőség nyílt a minták nagyszámú tesztelésére (Katsiani és mtsai, 2018). A vírus kimutatására főként HTS technikákat alkalmaznak, ugyanakkor a nagy genetikai variabilitásból és a módszer érzékenységéből adódóan, hamis pozitív eredmények is előfordultak. Ezért hagyományos vírusdiagnosztikai módszerekkel (például RT-PCR) ellenőrző teszteléseket végeztek (Baráth és mtsai, 2018).

A vírus gyors és egyelőre nem tisztázott úton történő terjedése, és az általa okozott nagymértékű termés kiesés indokolta a hazánkban is a gyümölcsfák és a vegetatív szaporítóanyagok előállítására használt anyafák tesztelését. A NAIK MBK Molekuláris Növénykórtan csoportja 2016-ban detektálta a kórokozót érdi izolátor házból gyűjtött kajszibarack mintákban. A kimutatás során RT-PCR, Northern hibridizáció és kis RNS HTS technikákat alkalmaztak (Baráth és mtsai, 2018). Az eredmények azért is igen fontosak, mert egy cseh leírással egyidőben azonosították a vírus egy új gazdanövényét, a kajszibarackot. A vírus kutatása a csoport számára azonban még nem ért véget, mivel több, a diagnosztikát megkönnyítő és alapkutatási szempontból is érdekes probléma még megoldásra vár.

Az elmúlt egy évben lehetőségem nyílt csatlakozni különböző cseresznye, meggy és kajszibarack fajták tesztelésébe, mely során a LChV1 jelenlétét RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. Ezáltal betekintést nyertem a vírusdiagnosztika folyamatába és azon túl, egy molekuláris biológiai labor működésébe. A tesztelések során találtunk olyan fajtákat, melyek LChV1 fertőzöttnek bizonyultak.

5. Következtetések

A közelmúltban, a vírusok terjedése nagymértékben felgyorsult az országok közötti kereskedelem és a térségekre eddig nem jellemző új fajok betelepítése révén. Ahogyan a kanadai cseresznyeültetvényénél is láthattuk, az általuk okozta szimptomák felmérhetetlen gazdasági károkat képesek okozni a megfelelő megelőzési és kezelési technikák híján. Ezáltal kijelenthetjük, hogy az országok agrártevékenységében kiemelkedő fontosságú a vírusdiagnosztika alkalmazása. Ennek felismerését követően több országos és nemzetközi szervezet is alakult, mint például a már említett Európában működő EPPO szervezete, amelyek javaslatokat tesznek az országok kormányai számára a vírusmentesítés mikéntjéről. Mivel a már vírusfertőzött növények növényvédő szerekkel való kezelése nem

hozott kecsegtető eredményeket, az intézkedések főként a fertőzöttség megelőzésére koncentrálnak. Gyümölcsfaültetvényeken általánosan alkalmazzák a certifikációt és az izolátorházakban való elhelyezést, hiszen ez hatékony védővonalat biztosít a vírust közvetítő rovarvektorokkal szemben. Elengedhetetlen feladattá vált a kórokozók minél gyorsabb felismerése és a vegetatív szaporítóanyagok vírusmentesítése. Ezek viszont a bioteszteléseknél és elektronmikroszkópos megfigyeléseknél modernebb technikák kifejlesztését igényelte. A szerológiai (ELISA) és a nukleinsav analízisen (PCR) alapuló technikák a minták egyidejű tömeges tesztelését tették lehetővé, azonban ezek használatával csak egy specifikusan keresett szekvencia kimutatása lehetséges. A vírusdiagnosztika legújabb eszköze, a nagy-áteresztőképességű szekvenálási módszerek alkalmazásával azonban feltárhatóvá vált a mintákban lévő összes kórokozó genetikai állománya, ezáltal felgyorsítva az ismert és új kórokozók karakterizálását, filogenetikai analízisét. Ugyanakkor az ide tartozó módszerek rutinszerű használata még várat magára. A technikák fejlesztése és optimalizálása nemzetközi együttműködéssel zajlik. Magyarországon a NAIK MBK Molekuláris Növénykórtan csoportja a kis RNS HTS protokollok optimalizálásában vesz részt. Mindezt figyelembe véve elmondható, hogy jó úton járunk növényeink vírusok elleni védelmének megerősítésében, azonban technikáink fejlesztése és a vírusok terjedési és szaporodási dinamikáinak megértése, további kutatásokat igényel.

6. Összefoglaló

A vírusok bár önálló anyagcserére és mozgásra képtelenek, mégis jelentősen befolyásolják mindennapjainkat. Felépítésükben az információt hordozó RNS vagy DNS nukleinsavból és az azt körülvevő kapszidból állnak. Burokkal rendelkező csoportjuk ezen felül még a nukleokapszidot körbefogó glükoproteid burokkal is rendelkezik. Alakjuk változatos, lehet pálcika, fonál akár gömb is. Nem összetévesztendőek a nevükben nagyon hasonló viroidokkal, amelyek kisméretű, köpenyfehérje nélküli, egyszálú cirkuláris ribonukleinsavak. Ráadásul a vírusokkal ellentétben nem kódolnak saját fehérjéket.

A vírusok terjedése alapvetően két útvonalon valósulhat meg, vektorok segítségével vagy anélkül. Vektor közbelépése nélkül az átadás lezajlhat a növény vegetatív és reprodukív szervein vagy akár sebzéseken keresztül. Továbbá emberi közbeavatkozások során oltással, szemzéssel. Mégis a vírusok terjedésének legjelentősebb módja a vektor mediált átadás. Ennek leggyakoribb közvetítői a rovarok. A vírusokat átadási módjuk szerint négy csoportba sorolhatjuk: nem perzisztens, szemiperzisztens, cirkulatív perzisztens és propagatív típusokba. A sejtekbe passzív módon jutnak be és az inokulációt követően legtöbbször tüneteket generálnak a gazdanövényen. Ezek lehetnek makroszkóposak (klorózis, mozaikosság) vagy ha szabad szemmel nem láthatóak, mikroszkóposak (vezikulák felszaporodása a sejtben). Azokat a vírusokat, amelyek nem okoznak detektálható tüneteket, látens vírusoknak nevezzük.

A növények és vírusok állandó versengésben állnak egymással. Amíg a vírusok célja minél több növény megfertőzése, a növényeké pontosan ennek a megakadályozása. Céljuk elérése érdekében a vírusok képesek megváltoztatni vektoruk viselkedését vagy akár gazdanövényük állapotát. A vírusok elleni rezisztencia, növényekben adaptív- vagy akár gének által vezérelt módon (jazzonsav aktivált immunválasz) is létrejöhet. Érzékeny növényeknél a vírusok képesek elterjedni az egész növényben, de eközben indukálódnak a növény védekezőfolyamatai, köztük az RNS interferencia. Mivel a vírusok ellen növényvédő szerekkel nem védekezhetünk, a növények tesztelése és a vegetatív szaporítóanyagok vírusmentesítése alapvető feladatává vált a vírusdiagnosztikának. A szerológiai és nukleinsav analízisen alapuló technikái nagyszámú minta egyidejű tesztelését tették lehetővé. Az elmúlt évtizedben kifejlesztett HTS technikákkal azonban a mintában lévő összes kórokozó genetikai állománya kimutathatóvá vált, ezáltal felgyorsítva az ismert és új kórokozók karakterizálását, filogenetikai analízisét. Ugyan felhasználásuk egyre elterjedtebbé válik, a jövőben továbbra is szükség van optimalizálásukra és fejlesztésükre.

6. Summary

Although viruses are unable to metabolize and move on their own, they still significantly affect our daily lives. Concerning their structure, they are composed of an RNA or DNA nucleic acid core and a protein coat surrounding it. Some viruses possess an additional protein coat on top of that. Their morphology is quite diverse, as they can have multiple shapes, rod, linear/filamental or even spherical. Because of their similar names, viroids are often mistaken for viruses, even though there are no evolutionary, structural or functional relation between them. Viroids are small circular RNAs and they do not code for proteins, in contrast to viral RNAs.

Plant infecting viruses can be transmitted by vectors, propagative materials (seeds, pollen) or vegetative reproduction, such as rootstocks or grafts. However, the majority of these viruses are transmitted to their host plant through insect vectors. Based on acquisition and inoculation thresholds, four types of transmission relationships were established: non-persistent, semipersistent, persistent circulative and propagative. Viruses enter cells by passive transport and after infection they often generate serious symptoms in the host plant. These symptoms can be macroscopic (chlorosis, mosaic) or microscopic (the sudden enrichment of vesicles). Latent viruses do not cause visually detectable symptoms.

Plants and viruses are constantly competing against one another. Viruses endeavour to infect as many hosts as they possibly can, on the other hand plants are developing new strategies to prevent it. To reach their goal, viruses are capable of altering their vectors behaviour and the host plant's physical state. Resistance in plants can take different forms, it can be adaptive or genetically determined (jasmonate-mediated defense). In susceptible plants, viruses are able to spread throughout the entire plant, but in the process, plant defense mechanisms, including RNA interference, are induced. Virus diagnostics play an essential role in the detection of viruses and the elimination of them during the production of the propagation material. Serological and nucleic acid-based techniques made it possible to test large number of samples simultaneously. However, in the last decade HTS techniques were developed, and by them the genetic material of all pathogens became detectable in samples, thus accelerating the characterization and phylogenetic analysis of known and new pathogens. Although, we are on the right path of protecting our crops against viruses, our techniques are still in need of further developments.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom Várallyay Évának és Baráth Dánielnek rengeteg rám áldozott órájukért, szakmai fejlődésem elősegítéséért és folytonos támogatásukért. Köszönöm a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézete, Genomika Főosztály, Növénykórtan Csoportjának, hogy lehetőséget biztosítottak számomra több módszer gyakorlati elsajátítására.

Hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Bóka Károlynak készségéért, tanácsaiért, amellyel hozzásegített szakdolgozatom elkészítéséhez.

Továbbá köszönöm Dr. Kovács M. Gábor tanszékvezetőnek, hogy engedélyezte szakdolgozatom elkészítését a Növény-szervezettani tanszéken.

8. Irodalomjegyzék

Adams I P, Glover R H, Monger W A, Mumford R, Jackeviciene E, Navalinskiene M, Samuitiene M, Boonham N (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plantvirology. *Molecular Plant Pathology* 10 (4), 537–545; doi: 10.1111/J.1364-3703.2009.00545.X

Allen L J S, Bokil V A, Cuniffe N J, Hamelin F M, Hilker F, Jeger M J (2019). Modelling Vector Transmission and Epidemiology of Co-Infecting Plant Viruses. *Viruses* 11, 1153; doi:10.3390/v11121153

Baráth D, Jaksa-Czotter N, Molnár J, Varga T, Balássy J, Szabó L K, Kirilla Z, Tusnády G E, 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, 318; doi:10.3390/v10060318

Barba M, Ilardi V, Pasquini G (2015). Control of Pome and Stone FruitVirus Diseases. *Advances in Virus Research* 91. 47-83, ISSN 0065-3527; <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.001>

Boonham N, Kreuze, J, Winter S, Van der Vlugt R, Bergervoet, J, Tomlinson J, Mumford R (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generations equencing. *Virus Research* 186, 20–31; <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>

Brodersen P, Voinnet O (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *TrendsS in Genetics* 22 (5), 268-280; doi: 10.1016/j.tig.2006.03.003

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. *The American Phytopathological Society, Phytopathology* 103, 293-298; <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-10-12-0275-R>

Carr J P, Murphy A M, Tungadi T, Yoon J Y (2018). Plant defense signals: Players and pawns in plant – virus – vector interactions. *Plant Science* 279,) 87–95; <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.011>

Di Serio F, Ambrós S, Sano T, Flores R, Navarro B (2018). Viroid Diseases in Pome and Stone Fruit Trees and Koch's Postulates: A Critical Assessment. *Viruses* 10, 612; doi:10.3390/v10110612

Flores R, Minoia S, Carbonell A, Gisel A, Delgado S, López-Carrasco A, Navarro B, Di Serio F (2015). Viroids, the simplest RNA replicons: How they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Research* 209, 136–145; <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.027>

Fraile A, Garcí'a-Arenal F (2010). The Coevolution of Plants and Viruses: Resistance and Pathogenicity. *Advances in Virus Research* 76, 1-32; doi: 10.1016/S0065-3527(10)76001-2

Glits M, Folk Gy (2000). Kertészeti növénykórtan. Mezőgazda Kiadó – Budapest

Horváth J, Gáborjányi R (1999). Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó - Budapest

Jeong J J, Ju H J and Noh J J (2014). A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease* 20 (3), 173-181; <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>

Katsiani A, Maliogka V I, Katis N, Svanella-Dumas L, Olmos A, Ruiz-García A B, 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* 2018, 10, 385; doi:10.3390/v10070385

Lu S H, Li J J, Wang X L, Song D Y, Bai R, Shi Y, Gu Q S, Kuo Y W, Falk B W, Yan F M (2017). A Semipersistent Plant Virus Differentially Manipulates Feeding Behaviors of Different Sexes and Biotypes of Its White fly Vector. *Viruses* 9, 4; doi:10.3390/v9010004

Maliogka V I, Minafra A, Saldarelli P, Ruiz-García A B, Glasa M, Katis N, Olmos A (2018). Recent Advances on Detection and Characterization of Fruit Tree Viruses Using High-Throughput Sequencing Technologies. *Viruses* 2018, 10, 436; doi:10.3390/v10080436

Mauck K E, De Moraes C M, Mescher M C (2014). Evidence of Local Adaptation in Plant Virus Effects on Host–Vector Interactions. *Integrative and Comparative Biology*, 54 (2), 193–209; doi:10.1093/icb/icu012

Raine J, Weintraub M, Schroeder B (1975). Flexuous rods and Vesicles in leaf and Petiole Phloem of Little-Cherry Diseased *Prunus* spp. *The American Phytopathological Society, Phytopathology* 65, 1181-1186.

Rott M E, Jelkmann W (2001). Detection and Partial Characterization of a Second Closterovirus Associated with Little Cherry Disease, Little cherry virus-2. *The American Phytopathological Society, Phytopathology* 91, 261-267.

Tahzima R, Foucart Y, Gertie P, Beliën T, Massart S, De Jonghe K (2019). High-Throughput Sequencing Assists Studies in Genomic Variability and Epidemiology of Little Cherry Virus 1 and 2 infecting *Prunus* spp. in Belgium. *Viruses* 11, 592; doi:10.3390/v11070592

Umer M, Liu J W, You H F, Xu C A, Dong K L, Luo Ni, Kong L H, Li X P, Hong Ni, Wang G P, Fan X D, Kotta-Loizou I, Xu W X (2019). Genomic, Morphological and Biological Traits of the Viruses Infecting Major Fruit Trees. *Viruses* 11, 515; doi:10.3390/v11060515

Vidal E, Yokomi R K, Moreno A, Bertolini E, Cambra M (2012). Calculation of Diagnostic Parameters of Advanced Serological and Molecular Tissue-Print Methods for Detection of Citrus tristeza virus: A Model for Other Plant Pathogens. *The American Phytopathological Society, Phytopathology* 102, 114-121; <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-05-11-0139>

Wang R L, Zhu-Salzman K, Elzaki M E A, Huang Q Q, Shi C, Ma Z H, Liu S W, Zhang J E (2019). *Mikania Micrantha* Wilt Virus Alters Insect Vector's Host Preference to Enhance Its Own Spread. *Viruses* 11, 336; doi:10.3390/v11040336

Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Dunez J (1991). A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 33, 355-365

Whitfield A E, Falk B W, Rotenberg D (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479-480, 278–289; <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>

Wu X J, Ye J (2020). Manipulation of Jasmonate Signaling by Plant Viruses and Their Insect Vectors. *Viruses* 12, 148; doi:10.3390/v12020148

Zotto A D, Nome S F (1999). Fluctuations of Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) at Various Phenological Stages in Peach Cultivars. *Plant Disease* 83. (11), 1055-1057.

9. Elektronikus hivatkozások jegyzéke

3. ábra:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162015000100083

4. ábra:

https://www.researchgate.net/figure/Some-symptoms-observed-on-common-bean-plants-in-fields-during-2015-to-2017-A-Vein_fig2_325211749

7. ábra:

https://www.researchgate.net/figure/Pathogenicity-test-of-two-Prunus-necrotic-ringspot-virus-isolates-Chr3-and-Pch12-in-their_fig2_8404903

8. ábra:

https://www.researchgate.net/figure/Plum-pox-virus-sharka-symptoms-in-fruits-endocarps-and-leaves-of-different-Prunus_fig3_325745964

9. ábra:

<https://www.novusbio.com/application/elisa>

(Harper és mtsai, 2019):

Harper S, Brosi A B, Beers B, DuPont T (letöltés: 2020.02.18) Little Cherry Virus. <http://treefruit.wsu.edu/crop-protection/disease-management/little-cherry-disease/> (6 screens)

NYILATKOZAT

Név: Mátyus Nikolett

Neptun azonosító: R2VQDD

ELTE Természettudományi Kar, **biológia alapszak**

Szakdolgozat címe: Gyümölcsfákat fertőző vírusok molekuláris jellemzése

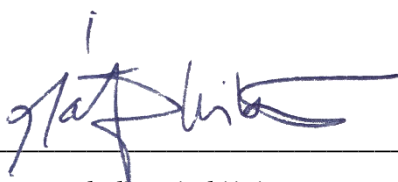
A szakdolgozat szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül;
- más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Kijelentem továbbá, hogy a szakdolgozat leadott nyomtatott példányai és elektronikus változata szövegükben, tartalmukban megegyeznek.

Budapest, 2020. 05. 05.



a hallgató aláírása