



Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem

Kajszi és őszibarack fajták vírusdiagnosztikai vizsgálata új generációs
szekvenálással

Baráth Dániel

Gödöllő

2021

A DOKTORI ISKOLA

MEGNEVEZÉSE: Biológia Tudományi Doktori Iskola

TUDOMÁNYÁGA: Biológia tudomány

VEZETŐJE: Dr. Nagy Zoltán

intézet vezető, egyetemi tanár, DSc

Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem

Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar

Növénytani és Ökofiziológiai Intézet

TÉMAVEZETŐ: Dr. Várallyay Éva

Csoportvezető, tudományos főmunkatárs

Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem

Növényvédelmi Intézet

Genomikai Kutatócsoport

.....

AZ ISKOLAVEZETŐ JÓVÁHAGYÁSA

.....

A TÉMAVEZETŐ JÓVÁHAGYÁSA

Tartalomjegyzék

Jelölések, rövidítések jegyzéke	1
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. Kajszi és őszibarack termesztésének jelentősége	6
2.2. Kajszi és őszibarack patogén kórokozók.....	7
2.2.1. Csonthéjas növényeket fertőző baktériumok.....	8
2.2.2. Csonthéjas növényeket fertőző gombák.....	9
2.2.3. Csonthéjas növényeket fertőző vírusok.....	10
2.2.4. Csonthéjas növényeket fertőző viroidok	19
2.4. Az RNS interferencia	22
2.3. Vírusok elleni védekezés, vírusdiagnosztikai módszerek	25
2.3.1. Vírusmentesítési technológiák.....	25
2.3.2. Vírusdiagnosztikai módszerek.....	27
3. Anyag és módszer	32
3.1. Mintagyűjtés.....	32
3.2. RNS izolálás	32
3.3. RNS keverékek (poolok) előállítása.....	33
3.4. Kis RNS könyvtár készítés.....	34
3.5. Kis RNS HTS eredményének bioinformatikai elemzése	38
3.6. Kis RNS HTS eredményének visszaigazolása RT-PCR-rel.....	39
3.6.1. cDNS szintézis	39
3.6.2. PCR vizsgálat	40
3.7. PCR-termék tisztítása és szekvenálása.....	42
3.8. Klónozás.....	42
3.9. Plazmid izolálás baktériumtenyészetből.....	43
3.10. Szekvenca elemzések	43
3.11. Northern-blot analízis.....	44
4. Eredmények.....	45
4.1. Kajszi és őszibarack fák vírusfertőzöttségének felmérése kis RNS HTS-sel.....	45
4.2. Kis RNS HTS eredményének bioinformatikai elemzése	46
4.3. Kajszi- és őszibarack fák kis RNS HTS-sel megállapított vírusfertőzöttsége.....	46
4.4. Őszibarack fajták kis RNS HTS-sel megállapított vírusfertőzöttsége.....	50
4.5. A kajszi- és őszibarack fajták kis RNS HTS-sel kapott eredményeinek visszaigazolása molekuláris biológiai módszerekkel.....	53
4.5.1. A CVA előfordulásának visszaigazolása.....	53

4.5.2. Kajsziarackból azonosított CVA variáns filogenetikai vizsgálata.....	54
4.5.3. A LChV-1 jelenlétének visszaigazolása	55
4.5.4 A Magyar kajszi fajtában azonosított LChV-1 filogenetikai vizsgálata.....	56
4.5.5. A PPV jelenlétének visszaigazolása	57
4.6. Az őszibarack fajták HTS-sel kapott eredményeinek visszaigazolása molekuláris biológiai módszerekkel.....	58
4.6.1. A PaLV jelenlétének visszaigazolása	58
4.6.2 Az NSPaV jelenlétének visszaigazolása	60
4.6.3 A PPV jelenlétének visszaigazolása	61
4.6.4 A PLMVd jelenlétének visszaigazolása	61
4.6.5 A Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet őszibarack izolátorházának virológiai felmérése	62
4.6.6 Az ősziarack fajtákban azonosított PaLV variánsok filogenetikai vizsgálata	63
4.6.7. Az őszibarack fajtákban azonosított NSPaV variánsok filogenetikai vizsgálata	64
4.6.8. Az őszibarack fajtákban azonosított PLMVd térszerkezeti vizsgálata.....	65
4.6.9. A PLMVd jelenlétének bioteszt vizsgálata GF305 indikátornövényen	68
4.7. Új tudományos eredmények.....	70
5. Következtetések és javaslatok	71
5.1. Kajsziarack vírusdiagnosztikai következtetések	71
5.2. Őszibarack vírusdiagnosztikai következtetések	74
6. Összefoglalás.....	78
7. Summary	80
8. Mellékletek.....	82
M1. Irodalomjegyzék	82
M2. Kis RNS könyvtárak statisztikája	93
M3. CVA és LChV-1 klón szekvenciák.....	93
M4. PaLV, NSPaV, PLMVd, PPV klónozott szekvenciák	94
9. Köszönetnyilvánítás	95

Jelölések, rövidítések jegyzéke

ACLSV	alma klorotikus levélfoltosság vírus (<i>Apple chlorotic leafspot virus</i>)
AGO	argonauta fehérje (argonaute protein)
ALV	kajszibarack látens vírus (<i>Apricot latent virus</i>)
ApMV	alma mozaik vírus (<i>Apple mosaic virus</i>)
APV2	ázsiai <i>Prunus</i> vírus 2 (<i>Asian prunus virus 2</i>)
ASBVd	avokádó napfoltosság viroid (<i>Avocado sunblotch viroid</i>)
ASGV	alma törzsbarázdáltság vírus (<i>Apple stem grooving virus</i>)
CCR	központi konzervált régió (central conserved region)
ChALV	cseresznye-asszociált luteovírus (<i>Cherry-associated luteovirus</i>)
CI	hengeres zárvány - cylindrical inclusion
CP	köpenyfehérje (coat protein)
CPm	köpenyfehérje kis alegység (coat protein minor)
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bromid (cetyl trimethylammonium bromide)
CVA	cseresznye vírus A (<i>Cherry virus A</i>)
DAS-ELISA	duplaellenanyag-szendvics enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)
DRB	duplaszálú RNS-kötő fehérje (Double-stranded RNA binding protein)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
ESFY	európai csonthéjas gyümölcsfák sárgulása (European stone fruit yellows)
DCL	Dicer-szerű enzimek (Dicer-like enzymes)
DUF	ismeretlen funkciójú domén (domain of unknown function)
FRET	fluoreszcencia rezonancia energia átadás (fluorescence resonance energy transfer)
HCPPro	helper komponens proteináz (helper component proteinase)
HSP70h	hősokk fehérje 70 homológ (heat shock protein 70 homolog)

HEL	helikáz (helicase)
HEN1	HUA Enhancer 1
HTS	nagy áteresztőképességű szekvenálás (high throughput sequencing)
IGR	gének közötti régió (intergenic region)
IMPDH	inozin monofoszfát dehidrogenáz (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase)
LAMP	hurok-közvetített izoterm amplifikáció (loop-mediated isothermal amplification)
LChV-1	cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (<i>Little cherry virus 1</i>)
MET	metiltranszferáz (methyltransferase)
miRNS	mikro RNS (micro RNA)
MP	mozgási fehérje (movement protein)
NA	neuraminidáz (neuraminidase)
NeVM	nektarin vírus M (<i>Nectarine virus M</i>)
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PaLV	őszibarack-asszociált luteovírus (<i>Peach-associated luteovirus</i>)
PC	őszibarack kalikó fenotípus (peach calico)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDV	szilva törpülés vírus (<i>Prune dwarf virus</i>)
PLM	őszibarack látens mozaik szindróma (peach latent mosaic)
PLMVd	őszibarack látens mozaik viroid (<i>Peach latent mosaic viroid</i>)
PNRSV	<i>Prunus</i> nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>)
P-PRO	papain-szerű proteináz (papain-like proteinase)
PPV	Szilvahimlő vírus (<i>Plum pox virus</i>)
PSTVd	burgonyagumó orsósodás viroid (<i>Potato spindle tuber viroid</i>)
PTGS	poszttranszkripcionális géncsendesítés (posttranscriptional gene silencing)
PVP	polivinil pirrolidin (Polyvinylpyrrolidone)
RdRP	RNS-függő RNS polimeráz (RNA-dependent RNA Polymerase)
RISC	RNS-indukálta géncsendesítés végrehajtó komplex (RNA-induced silencing complex)
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció (reverse transcription polymerase chain reaction)
SAH	S-adenozilhomocisztein (S-adenosyl-l-homocysteine)

SLRSV	szamóca látens gyűrűsfoltosság vírus (<i>Strawberry latent ringspot virus</i>)
siRNA	kis interferáló RNS (small interfering RNA)
SOLiD	szekvenálás oligonukleotid ligálással és detektálással (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)
SNP	egy nukleotidot érintő polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
TGS	transzkripcionális géncsendesítés (transcriptional gene silencing)
T _m	olvadási hőmérséklet (melting temperature)
VPg	virális genomhoz kötött fehérje (viral genome-linked protein)
VSR	virális RNS interferencia szuppresszor (viral suppressors of RNA silencing)

1. Bevezetés

A csonthéjas gyümölcsfák közül a kajszi és az őszibarack világszerte nagy gazdasági jelentőséggel rendelkezik. Európa szerte termesztik őket és a nemesítésnek köszönhetően ezek az alapján véve mediterrán jellegű fajok jól alkalmazkodtak hazánk klimatikus viszonyaihoz. Gyümölcsüket többnyire nyersen, vagy különböző készítmények (lekvár) formájában fogyasztják, de a pálinka készítéshez is felhasználják.

Kajszi és őszibarack ültetvényeink számos patogén kórokozó (gomba, baktérium, vírus, viroid) fertőzésének vannak kitéve. A vírusfertőzés során különböző tünetek jelentkezhetnek, amelyek jelentős termésveszteséget okoznak azáltal, hogy a termés mennyisége csökken, vagy a minőségromlás (gyümölcs íze romlik, mérete csökken, nem kívánatos elszíneződések jelennek meg a termésen) következtében a gyümölcs eladhatatlanná válik. Azonban nem minden fertőzés következtében jelennek meg fertőzésre utaló tünetek, egyes vírusok, viroidok többnyire látens fertőzést okoznak.

A gyümölcsfák a vírusok, viroidok számára rezervoárként szolgálnak és a fajta fenntartás miatt végzett vegetatív szaporításuk (szemzés, oltás) kedvez a kórokozók átjutásának. A vírusok, viroidok ellen nem rendelkezünk hatékony növényvédelmi technológiával, ezért az ellenük való védekezés során a megelőzésre helyeződik a hangsúly. Kiemelkedően fontos a vírusmentes szaporítóanyag előállítása, illetve az ellenőrzésére hatékony vírusdiagnosztikai eszközök használata, fejlesztése. A vírusdiagnosztikai vizsgálatoknak számos követelmények kell megfelelnie. A módszer érzékenysége kritikus pontnak számít, ugyanis a nem megfelelő érzékenységgű módszerek álnegatív eredményt adhatnak. Az adott módszernek nagy mennyiségű minta tesztelésére is alkalmasnak kell lennie, mégpedig rövid időn belül. A hatóságok diagnosztikai vizsgálataikat szerológiai (ELISA) valamint RT-PCR alapú technikákkal és biológiai indexeléssel (bioteszt) végzik. Az ELISA és a PCR vizsgálatokhoz szükséges az azonosítandó kórokozó ismerete, míg a bioteszt esetében az indikátornövény adott vírusra/viroidra specifikus tünetei alapján lehet diagnosztikai vizsgálatokat végezni és következtetéseket levonni.

A nagy áteresztőképességű szekvenálási technikák (high-throughput sequencing - HTS) lehetővé teszik a vizsgált növényben jelenlevő összes kórokozó kimutatását. A gyümölcsfák globális szaporítóanyag kereskedelme jelentős mértékben felgyorsult, valamint a globális klímaváltozás következtében új rovarvektorok megjelenésével a vírusok terjedése is növekvő tendenciát mutat. A HTS-alapú technikák segítségével egyre több kórokozó került azonosításra, leírásra olyan országokból, ahonnan előfordulásáról korábban nem rendelkezünk adatokkal. A

növények antivirális védekezési mechanizmusát, az RNS interferenciát a vírus replikációja során keletkező duplaszálú RNS képződése aktiválja. A duplaszálú RNS az eukarióta szervezetek számára idegen struktúra, amit az RN-áz aktivitással rendelkező DICER (DCL) enzimek 21-24 nukleotid hosszúságú kis interferáló RNS-ekre (siRNS) hasítanak. A keletkezett kis RNS-ek nagymértékben illeszkednek a patogén genomjára, ezért a kis RNS-ek HTS alapú vizsgálata diagnosztikai céllal is alkalmazható, amely során lehetőség adódik ismert vírusok elterjedésének, gazdanövényeinek pontosabb meghatározására, valamint új vírusok kimutatására is.

Fásszárú növényekből viszonylag kevés új generációs szekvenálás alapú vírusdiagnosztikai vizsgálat készült, viszont ezeknek a technikáknak az elterjedésével, a szekvenálási költségeknek a csökkenésével, valamint a diagnosztikai protokollok standardizálására való törekvések által egyre több információra tehetünk szert.

Kutatásunk során az Érdi Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet kajszii- és őszibarack fajtáinak HTS alapú vírusdiagnosztikai vizsgálatához a következő célokat tűztük ki:

1. optimalizáljuk a kis RNS HTS-st, mint vírusdiagnosztikai eszközt a kajszii- és őszibarack vizsgálatára
2. meghatározzuk a vizsgált egyedek viromját, különös tekintettel az esetlegesen hazánkban, vagy az adott fajon eddig még nem leírt vírusokra
3. az adott fajták izolátorházakban, szabadföldi ültetvényeken lévő egyedinek vírusprofiljából következtethessünk a megjelenő fertőzések forrására
4. összehasonlítsuk a bioteszt és a kis RNS HTS, mint diagnosztika eszközök hatékonyságát
5. az azonosított vírusok variánsait is azonosítsuk, annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a tömegteszteléskor az RT-PCR vizsgálatok során használt primerek milyen hatékonysággal képesek kimutatni az adott vírus hazánkban előforduló variánsait.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Kajszi és őszibarack termesztésének jelentősége

A *Rosales* rend *Rosaceae* családjába 100 különböző nemzetségből áll, melybe több, mint 3000 faj sorolható (Shulaev et al., 2008). A *Prunus* nemzetség több, mint 230 fajt foglal magába, melyek Közép- és Kelet-Ázsiából származnak, de manapság a világ minden pontján elterjedté váltak. Elterjedésüknek köszönhetően népszerű, gazdasági szempontból fontos növényekké váltak. 2015-ös adatok szerint a csonthéjas növények éves hozama meghaladja a 43 millió tonna gyümölcsöt és magot, melynek jelentős részét az őszibarack (21 millió tonna) teszi ki, a kajszi pedig összesen 4 millió tonna termés kerül értékesítésre a világ országaiban. Csonthéjas növényeket legnagyobb mennyiségben Ázsiában termesztik, Kínában már 4-5000 évvel ezelőtt is ültették. Második legnagyobb hozam Európából származik, melyet Észak-Amerika, Dél-Amerika, Ausztrália és Afrika országai követnek (Rubio et al., 2017).

A csonthéjas gyümölcsfák Ázsiából a kereskedelmi utakon keresztül érkeztek Görögországba, majd onnan a mediterrán térségben terjedtek el az időszámításunk előtti 3. században. Közép-Európába, így Magyarország területére a mediterrán országokból, vélhetőleg több útvonalon keresztül jutottak be.

A kajszi Közép-Ázsiából származik, Magyarországon régóta termesztik, az aquincumi ásatásokból következőleg az első maglelet 1600 évvel ezelőtről származik. A Közép-Európába került kajszi fajták keveredéséből kialakult egy jellegzetes közép-európai fajtakör, melyek tagjait mára Európa más térségeiben is termesztik. Magyarországon a kedvezőtlen ökológiai körülmények ellenére a Duna-Tisza közén található egy jelentős termőtáj, ugyanis a XVIII. században a kajszi fontos szerepet játszott a futóhomok megkötésében. Magyarországon a kajszi termesztésének a fennsíkok és a védett, kiegyensúlyozott mikroklímával rendelkező dombságok kedveznek. Jelentős kajszi termőtájak találhatók a Balatonnál, az Északi-Középhegység déli részén, a Pilis és a Gödöllői-dombság területén (Bubán et al., 2004).

Hazánk klimatikus viszonyaiból adódóan a hazai nemesítésű fajtákat termesztik nagyobb mennyiségben, a külföldi fajták nem megfelelő adaptációs képessége jelentősen megnehezíti a külföldi fajták honosítását. A magyar fajták közül a Magyar kajszi fajtakörhöz tartozó változatok a legnépszerűbbek jó gyümölcsminőségüknek köszönhetően. A klimatikus körülményekhez jól alkalmazkodó, jó fagyűrő képességgel rendelkező Korai piros és Kései rózsza fajtakör gyümölcsének minősége alulmarad a Magyar kajszi fajtakör változataihoz képest. Kiemelkedően jó gyümölcsminőséggel rendelkeznek az Óriás, Mandulakajszi és

Bíborkajszi fajtakörök fajtái (Pénzes & Szalay, 2003). A Központi Statisztikai Hivatal adatai alapján a Gönci magyar kajszi, a Magyar kajszi C.235, Ceglédi óriás, Bergeron, Pannónia, Goldrich, Mandulakajszi és Kyoto fajtákat termesztik legnagyobb mennyiségben Magyarországon.

Az őszibarack Kínából származik, melyet korai írásos bizonyítékok is igazolnak. Európába feltételezhetően a Fekete-tenger térségéből terjedt el. Magyarországon az őszibarack termesztés északi határán helyezkedik el, az éves termés 1970 óta csökkenő tendenciát mutat. Termesztésében a fagy a legjelentősebb kockázati tényező, csapadékmentes időszakokban az intenzív öntözés elengedhetetlen. Magyarországon a Dunántúl, a Mátra, Bükk és az Alföld déli része felel meg az őszibarack termesztéséhez szükséges környezeti feltételeknek (Bubán et al., 2004).

Magyarországon elsősorban külföldi nemesítésű őszibarack fajtákat termesztnek. A fajtahasználat tekintetében számos paramétert figyelembe kell venni az ültetvény típusának függvényében. A friss fogyasztásra termesztett fajták esetében alapkövetelmény a magvaválóság, a magas cukor és savtartalom mellett a gyümölcsöknek gömbölyű formával és nagy gyümölcsmérettel kell, hogy rendelkezzenek. Az ipari fajtáknál követelmény a közepes méret, gömbölyű alak, és a maghoz kötöttség. A fajtaválasztás tekintetében a fagyűrőképesség rendkívül fontos tényező az őszibarack esetében (Bubán et al., 2004). A Központi Statisztikai Hivatal adatai alapján a Redhaven, suncrest, Cresthaven, Early Redhaven, Dixired, Mariska, Babygold 6, Fantasia, Micheline és Champion fajtákat termesztik a legnagyobb területen hazánkban.

2.2. Kajszi és őszibarack patogén kórokozók

A baktériumok, gombák, vírusok és viroidok jelentős gazdasági károkat okozhatnak az ültetvényeken, termés mennyiségének csökkenését, minőségének romlását eredményezhetik, ezért a fertőzésük elkerülése érdekében kidolgozott védekezési stratégiák, illetve hatékony diagnosztikai módszerek alkalmazása, fejlesztése kiemelkedő fontossággal bír (Németh, 1979). Magyarországon a kajszi és őszibarackot fertőző gazdasági jelentőséggel rendelkező vizsgálatköteles kórokozókat a 14/2017. (III. 23.) FM rendelet foglalja magába.

2.2.1. Csonthéjas növényeket fertőző baktériumok

Európában a csonthéjas ültetvényeket károsító baktériumok közé tartozik az *Agrobacterium rhizogenes* és az *Agrobacterium tumefaciens*, melyek T-DNS transzfer következtében gyökérgolyvás megbetegedéseket eredményeznek, de a lombkorona területén is képesek kóros sejtosztódást eredményezni. A tumoros sejtosztódás negatív hatást fejt ki a gazdanövény növekedésére, termésfejlődésre. Nagy gazdakörrel rendelkeznek, csonthéjas növényeken kívül kimutatták többek között alma és körtefákon, szőlőn, céklán, cukorrépán (López et al., 2006). A *Pseudomonas amygdali*, *Pseudomonas syringae* és *Pseudomonas viridiflava* világszerte elterjedt kórokozónak tekinthetők, fertőzésük esetén a hajtáscsúcs nekrozis, levélen és gyümölcsön nekrotikus foltok, a törzsön kéregrák jelenhet meg (López et al., 2003). A *Xanthomonas arboricola* világszerte elterjedt kórokozó. Fertőzése során a gyümölcs- és levélfoltosság tünetegyüttes jelenhet meg. A szabálytalan alakú tünetek jellemzően először a levél fonákon jelennek meg, majd elbarnulnak és a levelek lyukacsossá válnak. A csonthéjas gyümölcsfákon jelntős károkat képes okozni, szilva, nektarin, kajszli és őszibarack gazdanövények tekinthetők a legfogékonyabbnak, viszont kimutatták cseresznyéről és meggyről is (Janse, 2009). A *Candidatus Phytoplasma prunorum* Európában jelentős károkat okoz a kajszli, őszibarack, szilva, cseresznye, japánszilva és mandula ültetvényeken (Marcone & Jarausch, 2010). A fertőzés hatásár az európai csonthéjas gyümölcsfák sárgulása (European stone fruit yellows - ESFY) tünetegyüttes jelenhet meg. A fitoplazma fertőzés legnagyobb mértékben kajszli és japánszilva esetében okozott termésveszteséget. A fertőzés esetén a gyümölcsfák ültetésétől számított nyolcadik évben az ültetvényeken akár 50%-os is lehet a termésveszteség. A *Candidatus Phytoplasma prunorum* által okozott tünetek jelentős mértékben eltérhetnek különböző gazdanövény fajokban, eltérő klimatikus viszonyok mellett, valamint a fertőzést okozó fitoplazma törzs virulenciájának mértéke is jelentős mértékben befolyásolja a tünetek megjelenését. Fitoplazma fertőzésre utalhat a korai virágzás, levelek sárgulása, kanalasodása, valamint a megnövekedett méretű pálhalevelek jelenléte (Marcone & Jarausch, 2010).

Hazánkban a kajszli és őszibarack szaporítóanyag előállításához használt anyafáknak mentesnek kell lennie a következő baktériumoktól: *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Candidatus Phytoplasma prunorum*, *Xanthomonas arboricola* (14/2017. (III. 23.) FM rendelet).

2.2.2. Csonthéjas növényeket fertőző gombák

A kajszi és őszibarackot fertőző gombák közé tartozik a *Leucostoma cinctum* ami kezdetben a fák egy-egy ágának elhalását eredményezi, későbbiekben azonban a fák részleges, vagy teljes pusztulását eredményezheti. Fertőzés esetén a kérgen rákos deformációk figyelhetők meg. A *Leucostoma* nem képes egészséges növényt fertőzni, a fagy, metszés, rovarkártétel vagy egyéb mechanikai sérülés során keletkezett sebekon keresztül képesek fertőzni a gyümölcsfákat. A *Leucostoma* fertőzés jelentős mezőgazdasági hatást fejt ki a csonthéjas ültetvényeken, legnagyobb mértékben őszibarackot károsítja. A fertőzött fák termés mennyiségében visszaesés tapasztalható, valamint fogékonyabbá válhatnak további patogének fertőzésének is (Romanazzi et al., 2012). A *Verticillium* nemzetségben belül a *Verticillium dahliae* rendelkezik a legnagyobb gazdakörrel, több, mint 200 növényt képes fertőzni. Világszerte elterjedt kórokozó, elsősorban a mérsékelt és szubtrópusi övben fordul elő nagy gyakorisággal. A fertőzés következtében a növény növekedése lelassul, a levelek elszíneződnek, a leveleken kezdetben sárgulás, majd hervadás figyelhető meg (Deketelaere et al., 2017). A *Phytophthora cactorum* nagy gazdakörrel rendelkező gomba patogén. A fertőzés határa a gyümölcsök rothadásnak indulnak, a levélen rozsdás elszíneződés, hervadás figyelhető meg (Eikemo et al., 2010). A *Stigmia carpophila* legnagyobb mértékben kajszit, őszibarackot, nektarint fertőz, de jelenlétét kimutatták cseresznye gazdanövényről is. A *Stigmia* fertőzés hatására a levélen kör alakú vöröses, lilás elszíneződött foltok jelennek meg, melyek idővel elszáradnak és kiesnek, ezáltal a levél lyukacsossá válik. A tünetek tavasszal, tartósan hűvös, csapadékos időjárási feltételek mellett a legintenzívebbek (Ivanová et al., 2012). A *Taphrina deformans* elsősorban a mérsékelt égövben az őszibarackot, nektarint, kisebb mértékben mandulát fertőző patogén gomba. A fertőzés jellemző tünete a levélgöndörödés, törékennyé válhat, felszínén sárgás, pirosas elszíneződött ráncok jelenhetnek meg (Cissé et al., 2013). A *Podosphaera pannosa* a leggyakoribb csonthéjas gyümölcsfákon előforduló lisztharmat betegség. A fertőzést követően fehéres bevonat jelenhet meg a leveleken és a gyümölcsön is (Marimon et al., 2020). Kajszi és őszibarack monília megbetegedését a *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* és a *Monilinia fructigena* okozza. A tünetek a virágokon, hajtáson és gyümölcsön jelentkeznek. A rovarkártétel, jégeső, vagy egyéb mechanikai sérülést követően juthatnak be a kórokozók a fejlődő gyümölcsbe, melyen barnás elszíneződés alakul ki, majd rothadásnak indul. A fertőzés hajtáselhalást is eredményezhet, ami a teljes növény pusztulásához is vezethet. Európában leggyakrabban a *Monilinia laxa* eredményez gazdasági károkat (Mari et al., 2012).

Magyarországon a szaporítóanyag előállításához használt kajszai és őszibarack anyafáknak mentesnek kell lennie a *Phytophthora cactorum*, *Verticillium dahliae* a patogén gombáktól 14/2017. (III. 23.) FM rendelet.

2.2.3. Csonthéjas növényeket fertőző vírusok

A HTS-alapú vírusdiagnosztikai eszközökkel egyre több csonthéjas növényt fertőző vírus kerül azonosításra, többségük a *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Comoviridae*, *Potyviridae*, *Secoviridae* és *Tombusviridae* családokba tartozik (Villamor et al., 2016). Kezdetben a csonthéjasokat fertőző vírusok közül a legtöbbet Európának azon részéről azonosították, melyek régóta jelentős területnek tekinthetők gyümölcsstermesztés szempontjából. Kína nagy jelentőséggel rendelkezik csonthéjas gyümölcsök termesztésében, legtöbb nemesített csonthéjas növény Kínából származik, ezért számos vírus azonosításra került (Jelkmann, 1995).

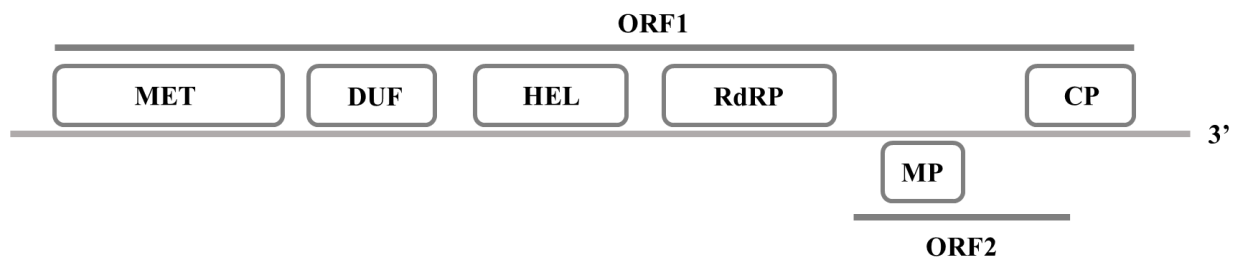
A vírus által okozott tünetek megjelenése és súlyossága függ magától a vírus patogenicitásától, illetve a gazdanövénytől. A gyümölcsfák termés mennyiségét, minőségét jelentős mennyiségben befolyásolja a patogének által okozott biotikus stressz. A leveleken, de elsősorban a termésen megjelenő vírus tünetek csökkentik a vírus piaci értékét. Annak ellenére, hogy a vírusok/viroidok jelentős termés veszteségeket képesek okozni, nehéz pontosan felbecsülni az általuk okozott gazdasági károkat. A csonthéjas gyümölcsfák esetében a szilvahimlő (*Plum pox virus* - PPV) kártételével kapcsolatban rendelkezünk a legrészletesebb adatokkal, becslések szerint 30 év alatt 10 milliárd dollár költséggel járt, amelyet a termés kiesés, a fertőzöttség ellenőrzése és mentesítési programok eredményeztek (Cambra et al., 2006). A csonthéjas növények vegetatív szaporítása kedvez a vírusok, viroidok terjedésének, ami megnehezíti az ellenük való védekezést. Egyes vírusok transzmissziójában rovar, atka és fonálféreg vektorokat is azonosítottak. A súlyos gazdasági károkat okozó szilva törpülés vírus (*Prune dwarf virus* - PDV) és a Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (*Prunus necrotic ringspot virus* - PNRSV) vírusok mag átvitelével vertikális és pollenen keresztül történő horizontális úton is képesek terjedni (Gao et al., 2017).

Magyarországon a hatósági szabályozás szerint a kajszai és az őszibarack szaporítóanyagban a PPV, alma klorotikus levélfoltosság vírus (*Apple chlorotic leafspot virus* - ACLSV), alma mozaik vírus (*Apple mosaic virus* - ApMV), kajszai látens vírus (*Apricot latent virus* - ALV), a PDV, a PNRSV és a szamóca látens gyűrűsfoltosság vírus (*Strawberry latent*

ringspot virus - SLRSV), valamint az őszibarack látens mozaik viroid (*Peach latent mosaic viroid* - PLMVd) jelenlétét kell vizsgálni és kizárni (14/2017. (III.23.) FM rendelet).

2.2.3.1. Cseresznye vírus A (*Cherry Virus A* - CVA)

A CVA-t elsőként Németországban írták le cseresznye gazdanövényből 1995-ben (Jelkmann, 1995). Rendszertanilag a *Betaflexiviridae* család *Capillovirus* nemzettségébe sorolható. 7383 nukleotid hosszúságú, pozitív, egy szálú RNS genommal rendelkeznek.



1. ábra A CVA genomszerveződése

Az ORF1 kódolja a metiltranszferázt (MET), egy azonosítatlan funkcióval rendelkező domént (domain of unknown function - DUF), helikázt (HEL), RNS-függő RNS polimerázt (RdRP) és a köpenyfehérjét (CP). Az ORF2 a mozgási fehérje (MP) kódolásáért felelős (Gao et al., 2016 alapján módosított saját ábra).

Genom szerveződését tekintve hasonlóságot mutat a *Capillovirus* nemzetség típus fajához, az alma törzsbarázdáltság vírusához (*Apple stem grooving virus* - ASGV). Két átfedő nyitott leolvasási kerettel (ORF) rendelkeznek (1. ábra). Az ORF1 kódolja kereteltőlódás nélkül a 266 kDa molekulatömegű RNS-függő RNS polimerázt (RNA-dependent RNA Polymerase - RdRP), metiltranszferázt, helikázt, és a köpenyfehérjét (coat protein - CP). Az ORF2 az 52 kDa molekulatömegű feltételezett mozgási fehérje (movement protein - MP) kódolásáért felelős (1. ábra) (James & Jelkmann, 1998). A CVA gyakran kimutatható cseresznyéből (Marais et al., 2011) és meggyből (Jelkmann, 1995), viszont más csonthéjas növényből is kimutatták a jelenlétét: kajszi és őszibarackból (Noorani et al., 2010), japáncseresznyéből (Šafářová et al., 2013), valamint szilvából (Katsiani et al., 2018). A vírus világszerte elterjedt, előfordulását jelentették Németországból (Jelkmann, 1995), Indiából (Kirby & Adams, 2001), Olaszországból (Šafářová et al., 2013), Franciaországból (James & Jelkmann, 1998), Egyesült-Királyságból (Mandic et al., 2007), Kanadából (Šafářová et al., 2013). Lengyelországból (Šafářová et al., 2013), Szerbiából (Isogai et al., 2004), Csehországból (Noorani et al., 2013), Japánból (Isogai et al., 2004) és Kínából (Rao et al., 2009). A CVA kiemelkedően magas fertőzési rátát eredményezhet, Indiában a vizsgált fák 54%-a fertőzött volt (Gao et al., 2017), Japánban 92%-os fertőzöttségről is beszámoltak (Gao et al., 2016). A magas fertőzöttség

ellenére jelenleg nem azonosítottak átvitelében érintett vektor organizmust, a vírus terjedése vegetatív úton, oltással, szemzéssel megy végbe (Marais et al., 2012). Eddig a gazdanövényein nem azonosítottak CVA fertőzéshez köthető tüneteket (Gao et al., 2016). Jelenleg nem ismert, milyen mértékben járul hozzá a CVA a tünetek megjelenéséhez, az esetlegesen megjelenő tünetek más vírussal való koinfekciónak tulajdoníthatóak (Kesanakurti et al., 2017). A CVA izolátumok között jelentős genetikai heterogenitás tapasztalható, a Kínából származó izolátumok teljes genomjának vizsgálata során 81% és 98,2% közötti nukleotid egyezést tapasztaltak (Martelli et al., 2012). Az kódoló régiók között legnagyobb nukleotid eltérést az RdRP gén szekvenciájában figyelték meg (79,1 - 90,7%). A pontmutációk kisebb mértékben érintették az aminosav sorrendet, konzerváltabb szekvenciát eredményeztek (92,2 - 99,2%) (Gao et al., 2017).

Filogenetikailag a CVA genotípusok 6 csoportra oszthatók. 75 teljes CVA genom vizsgálatának eredményeként megállapíthatóvá vált, hogy még akár az egy egyedből származó különböző CVA genotípusok sem feltétlenül egy filogenetikai csoportba klaszterizálódnak. A cseresznye gazdanövényről származó izolátumok az V. csoport (kizárólag nem cseresznye gazdanövényről származó genotípusokat tartalmaz) kivételével bármelyik csoportba tartozhatnak. A kajszai gazdanövényről izolált CVA genomok a IV és VI csoportba tartoznak, míg az őszibarack gazdanövényről gyűjtött szekvenciák az I csoporthoz klaszterizálódtak. A II és III csoportban kizárólag cseresznye gazdanövényről származó izolátumok találhatóak. A genotípusok közötti rekombinációs események során létrejövő rekombináns genotípusok nem illeszthetők egyik csoportba se. Rekombináns genotípusokat meggy, cseresznye és japáncseresznye gazdanövényből mutattak ki. A genotípusok egy nukleotidot érintő polimorfizmus (single nucleotide polymorphism - SNP) vizsgálatából látható, hogy a vírus köpenyfehérjét és mozgási fehérjét kódoló régióiban található nagy mennyiségben konzerválódott SNP-k, melyek megnehezítik a PCR-rel végzett detektálását (Gao et al., 2017). Kimutatására nem rendelkezünk rutin diagnosztikában használt ELISA teszttel, sem jelenlétére utaló indikátornövényvel (Keim-Konrad & Jelkmann, 1996).

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

Az LChV-1 rendszertanilag a *Closteroviridae* család *Velarivirus* nemzetségébe tartozik (Marais et al., 2016). Első előfordulását Németországból írták le cseresznye gazdanövényről (Matic et al., 2007; Vitushkina et al., 1997). Leggyakoribb gazdanövényeként a cseresznyét és a meggyet írták le, de több *Prunus* nemzetségbe tartozó gyümölcsfából is kimutatták jelenlétét.

Szilván, őszibarackon és mandulán figyeltek meg LChV-1 fertőzést Franciaországban (R Tahzima et al., 2017), Olaszországban (Lim et al., 2015), Belgiumban (Matic et al., 2007) és Koreában (Elena et al., 2008).

A LChV-1 előfordulását Európa több országából is leírták, jelenlétét kimutatták Svájcban, Hollandiában, Nagy-Britanniában (Keim-Konrad & Jelkmann, 1996), Lengyelországban (Šafářová et al., 2016), Franciaországban (Tahzima et al., 2017), Olaszországban (Ludvíková & Suchá, 2011), Görögországban (Serçe et al., 2011), Németországban (Ruiz-García et al., 2016), Csehországban (Tahzima et al., 2019), Törökországban (Isogai et al., 2004), Szlovákiában (Šafářová et al., 2016), Spanyolországban (Cho et al., 2018), Romániában (Isogai et al., 2004) és Belgiumban (Lu et al., 2015). Európán kívül is számos országban, köztük Japánban (Sabanadzovic et al., 2005), Indiában (Nagar et al. 2009), Koreában (Bajet et al., 2008), Kínában (Fiore et al., 2017), Kanadában (Wood, 1993), USA-ban (Keim-Konrad & Jelkmann, 1996; Šafářová et al., 2020), Chilében (Šafářová et al., 2016) és Új- Zélandon (Foster & Lott, 1947) kimutatták a LChV-1 fertőzést (Šafářová et al., 2020).

A LChV-1 és a LChV-2 (*Ampelovirus* nemzetség) kórokozók felelősek a cseresznyén megjelenő „Little cherry disease” (LChD) tünetegyüttes kialakulásáért, melyet már 1933-ban megfigyeltek Észak-Amerikában, Brit-Columbia tartományban (Jeger et al., 2017). Európában csak később, 1990-es évektől gyakorolt erős terméskiesést az LChD cseresznye ültetvényeken (Büttner et al., 1994). Az LChD fertőzés következtében a levélen vörös elszíneződés, bronzosodás figyelhető meg, a gyümölcs mérete csökken (2.ábra), felszínén elszíneződések jelenhetnek meg, valamint a gyümölcs ízletességét is negatívan befolyásolja (Candresse et al., 2013). A betegség tüneteinek súlyosságában, epidemiológiai vonatkozásában jelentős különbségek tapasztalhatók, melyekre magyarázatul szolgálhat a LChV-1 és LChV-2 előfordulásának térbeli elkülönülése. A LChV-1 Európában, a LChV-2 pedig inkább az amerikai kontinensen fordul elő (Candresse et al., 2013; Matic et al., 2009).

A LChV-1 fertőzött meggy és cseresznye vizsgálati minták vírusfertőzésre utaló tüneteket mutatnak Kwanzan és Shiروفugen (japáncseresznye) indikátornövényeken, ugyanakkor cseresznye és díszcseresznye gazdanövényen tünetmentesen is képes fertőzni (Mekuria et al., 2013). A LChV-1 hatására a levél mérete törpülést mutat az egészséges növényhez képest, felszínén deformációk jelenhetnek meg, a szemzés helyétől fokozatos nekrozis alakulhat ki, ami végül az indikátornövény pusztulásához is vezethet (Šafářová et al., 2020). Az indikátornövényeken kialakított szindrómákat a szakirodalom „Shiروفugen” és „Kwanzan stunting” néven említi. Kajszi gazdanövényen az esetek többségében tünetmentes

fertőzés figyelhető meg, esetenként a levél felszínén enyhe mozaikosság jelenik meg (Katsiani et al., 2018).



2.ábra A LChV-1 aprógyümölcsűség cseresznyén

Az ábra bal oldalon Lambert cseresznye fajta LChV-1 fertőzött, jobb oldalon pedig egészséges gyümölcssei láthatók (<https://gd.eppo.int/taxon/LCHV10/photos>).

Vegetatív szaporítás (szemzéssel, oltással) során átvihető a fertőzés, vektora jelenleg nem ismert, a LChV-2 esetében terjedésében szerepet játszik a *Phenacoccus aceris* és a *Pseudococcus maritimus* (Katsiani et al., 2018).

A LChV-1 hosszú (16934 bp), pozitív egyszálú RNS genommal rendelkezik, ami 8 kódoló régióból áll (3. ábra). Az ORF1a és az ORF1b kódolják a papain-szerű proteináz (papain-like proteinase - P-PRO) helikáz és metiltranszferáz doméneket és az RNS-függő RNS polimerázt (RdRP). Az ORF2 egy kis méretű (4 kDa) hidrofób fehérjét kódol, amely részleges átfedésben van a 70 kDa molekulatömeg HSP70h (hősokk fehérje 70 homológ) fehérjét kódoló ORF3-mal. Az ORF3-mal átfedésben álló ORF4 61 kDa molekulatömegű HSP90 fehérjét, az ORF5 és ORF6 pedig a köpenyfehérjét (CP) és a minor köpenyfehérjét (CPm) kódolja. Az ORF7 és ORF8 21 és 27 kDa molekulatömegű fehérjék (p21, p27) kódolásáért felelős (3. ábra). A részleges és teljes genom szekvenciák elemzések alapján a LChV-1 RdRP, HSP70h és a CP fehérjéit kódoló gének nagy genetikai diverzitással jellemezhetőek, míg a p21 és p27 kódoló régiók kisebb variabilitással rendelkeznek. A vélhetőleg RNS interferencia szuppresszor aktivitással rendelkező p21 szekvenciák azonban nem mutattak rokonságot a *Velarivirus* nemzetség más tagjával, ami vélhetőleg specifikus gazdanövényhez történő adaptálódás eredménye (Šafářová et al., 2020).



3. ábra A LChV-1 genomszerveződése

Az ORF1a kódolja a papain-szerű proteinázt (P-PRO), metiltranszferázt (MET) és helikázt (HEL), az ORF1b pedig az RNS-függő RNS polimerázt (RdRP). Az ORF2 a p4, az ORF3 a hő sokk fehérje 70 homológ (HSP70h), az ORF4 a HSP90 (p61), az ORF5 a köpenyfehérje (CP), az ORF6 a minor köpenyfehérje (CPm), az ORF7 a p21, az ORF8 a p27 fehérje kódolásáért felelős (Katsiani et al., 2018 alapján módosított saját ábra).

A szekvenciák filogenetikai elemzése alapján 5 klaszter különíthető el. Cseresznye gazdanövényen előfordulhat különböző filogenetikai csoportba tartozó LChV-1 genotípusok együttes jelenléte (Bag et al., 2015). A csoportok elkülönülésében nem figyelhető meg korreláció sem a földrajzi eredettel, sem az adott gazdanövényvel kapcsolatban (Lu et al., 2016). Magyarországon a 14/2017.(III.23) FM rendelet értelmében cseresznye és meggy gazdanövényen a vizsgálatköteles, nem zárlati károsító kórokozótól közé tartozik, azaz jelenlététől a prebázis anyanövénynek, prebázis, bázis és certifikált szaporítóanyagok mentesnek kell lennie.

2.2.3.3. Őszibarack-asszociált luteovírus (*Peach-associated luteovirus* – PaLV)

A PaLV rendszertanilag a *Luteoviridae* család *Luteovirus* nemzettségébe sorolható. A *Luteoviridae* családba tartozó vírusok mezőgazdasági szempontból nagy jelentőséggel rendelkeznek. 25-30 nm izometrikus kapsziddal rendelkeznek. A fertőzött növény floémjában lokalizálódnak, terjedésükben elsősorban a levéltetvek töltenek be jelentős szerepet (Ali et al., 2014).

A PaLV vírust 2017-ben azonosították őszibarack minták HTS vizsgálatával. Tekintve, hogy a vírust nemrég fedezték fel, gazdanövényeiről és elterjedéséről eddig kevés információ áll rendelkezésünkre. Gazdanövényeként a nektarint és az őszibarackot azonosították. Előfordulását kimutatták Grúziából, Spanyolországból (Sorrentino et al., 2018), Olaszországból (Xu et al., 2019) és Kínából (Wu et al., 2017).

Az elsőként szekvenált grúziai és spanyol minta 96% nukleotid szekvencia azonosságot mutatott egymással. Az 5819 nukleotid hosszúságú genomjuk 7 ORF-ből áll (4. ábra). Az ORF1 és az ORF2 az RNS-függő RNS polimerázt (RdRP), az ORF3 a köpenyfehérjét, az ORF4 a mozgási fehérjét kódolja (Lenz et al., 2017). Más luteovírusokhoz hasonlóan megtalálható az N-terminális részén konzervált motívumot tartalmazó ORF3a kódoló régió (L. P. Wu et al., 2017). Az ORF6, ORF7 régió két ismeretlen funkciójú fehérjét kódol (4. ábra).



4. ábra A PaLV genomszerveződése

Az ORF1 és ORF2 a replikációért felelős fehérjéket, az ORF3 a köpenyfehérjét (CP), az ORF4 a mozgási fehérjét (MP) az ORF5 a readthrough domént (RTD) kódolja, az ORF6 és ORF7 pedig két ismeretlen funkciójú fehérjét kódol (Wu et al., 2017 alapján módosított saját ábra).

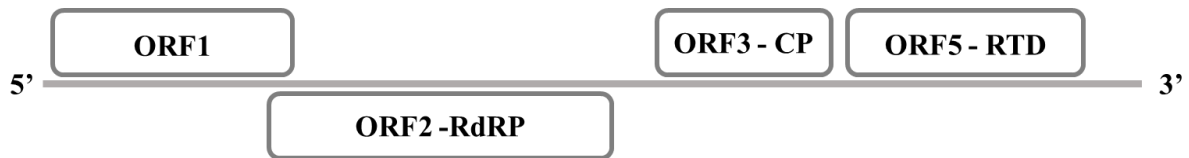
A nukleinsav és aminosav sorrend alapján a luteovírusok közül filogenetikailag a cseresznye-asszociált luteovírussal (ChALV - *Cherry-associated luteovirus*) áll a legközelebbi filogenetikai rokonságba. A PaLV 73%-os nukleinsav hasonlóságot mutat a ChALV-hez képest, a kódoló régiók tekintetében a legkonzerváltabbnak a P2, míg legvariábilisabb a P3a kódoló régió tekinthető a luteovírusok között (Wu et al., 2017).

A PaLV az eddigi ismeretek alapján csak látens fertőzéshez vezet, nem alakít ki specifikus tüneteket a fertőzött növényeken. Enyhe mozaikosságot ugyan tapasztaltak GF305 tesztnövényeken, viszont a levél tünetek vélhetőleg a PLMVd-vel való koinfekció eredményeként jelentkeztek (Bag et al., 2015).

2.2.3.4. Nektarin törzsgödrösödés asszociált vírus (*Nectarine stem-pitting-associated virus - NSPaV*)

Az NSPaV első előfordulását 2015-ben, az Amerikai Egyesült Államokban, Kalifornia államban dupla szálú RNS-ek HTS vizsgálatával azonosították Franciaországból importált nektarin gazdanövényből (Bag et al., 2015). Kimutatták jelenlétét Kínában (Lu et al., 2016), Japánban (Candresse et al., 2016), Dél-Koreában (Jo et al., 2017) és Magyarországon (Krizbai et al., 2017) is. Az NSPaV fertőzést többnyire őszibarack és nektarin gazdanövényekről diagnosztizálták, viszont japán kajsziból (*Prunus mume*) is kimutatták (Candresse et al., 2016).

Az NSPaV pozitív, egyszálú RNS genommal rendelkezik, 4991 nukleotid hosszúságú genomjának vizsgálata során 4 ORF-et azonosítottak. Az ORF1 és az ORF2 a P1 és P2 fehérjék kódolásáért felelős, amelyek az RdRP fehérje komplexet kódolják. Rövid IGR (intergenic region) szakaszt követően a köpenyfehérjét (CP) és a vélhetőleg rovar vektor általi transzmisszióba jelentős fúziós fehérjét az ORF3 kódolja. Az NSPaV genomjába nem található meg a luteovírusokra jellemző ORF4 kódoló régió (5. ábra).



5. ábra Az NSPaV genomszerveződése

Az ORF1 és ORF2 a virális replikáz P1 és P2 fehérjéjét, az ORF3 a köpenyfehérjéjét (CP), az ORF5 a CP readthrough fehérjéjét (readthrough domain - RTD) kódolja (Villamor et al., 2016 alapján módosított saját ábra).

Vegetatív szaporítással (szemzés, oltás) történő terjedését kísérletesen alátámasztották (Bag et al., 2015). Filogenetikai vizsgálatok alapján legközelebbi rokonságban a Rose spring-dwarf-associated virus-sal (RSDaV) áll (Bag et al., 2015).

Az NSPaV fertőzött fák esetében a kéreg eltávolítását követően szár gödrösödés tüneteket, míg a kérgen nekrotikus foltokat figyeltek meg (6.ábra). A szár gödrösödés tüneteket mutató fákból ugyan nem minden esetben detektáltak NSPaV fertőzést, viszont a tüneteket mutató fákból azonban nem detektálták más patogén jelenlétét, ezért a tünetek kialakításában betöltött szerepe jelenleg még nem tisztázott (Xu et al., 2019). Törzsgödrösödés tüneteket megfigyeltek NSPaV-vel és *Nectarine virus M* (NeVM) vírussal fertőzött egyedekben, a koinfekció következtében azonban nem vonható le egyértelmű következtetés, hogy melyik vírus fertőzése tehető felelőssé a tünetek kialakításában (Villamor et al., 2016). Az *Asian prunus virus 2* (APV2) vírussal együttesen fertőzött növényeken erősebb mértékben jelentkeztek a tünetek, ezért feltételezhetően az APV2 és az NSPaV koinfekció szinergista hatást vált ki (Wu et al., 2017).

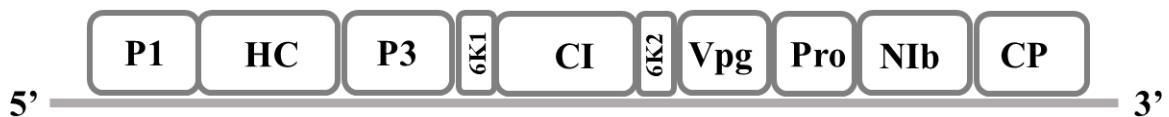


6.ábra Az NSPaV törzsgödrösödés tünete

A három kérgétől eltávolított nektarin esetében az S-el (symptomatic) jelölt NSPaV fertőzött fákon törzsgödrösödés tünetek figyelhetők meg, míg jobb oldalon az egészséges, AS-sel (asymptomatic) jelölt tünetmentes fa látható (Bag et al., 2015).

2.2.3.5. Szilva himlő vagy sarka vírus (*Plum pox virus* - PPV)

A PPV, más néven sharka vírus a *Potyviridae* család *Potyvirus* nemzetségébe tartozik. 750 nm hosszú 15 nm vastagságú fonal-szerű virionnal rendelkeznek (Nikbakht Dehkordi et al., 2017), melynek pozitív egy szálú 10 kb hosszúságú RNS genomja, 5' végén VPg, 3' végén pedig poli(A) farok található (7. ábra). Genomjáról képződő nagy méretű poliproteinje 3 vírus által kódolt proteáz segítségével proteolitikusan processzálódik az alábbi fehérjékre: P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIaprot, NIb, CP. A CI (cylindrical inclusion) fehérje a vírus replikációban játszik szerepet (Nikbakht Dehkordi et al., 2017). Genomját a 3' végén kódolt köpenyfehérje (CP) veszi körül, ami fontos szerepet tölt be a sejtről-sejtre történő transzportjába, illetve a növényen belül szisztemikus terjedésében (Fernández et al., 2002).



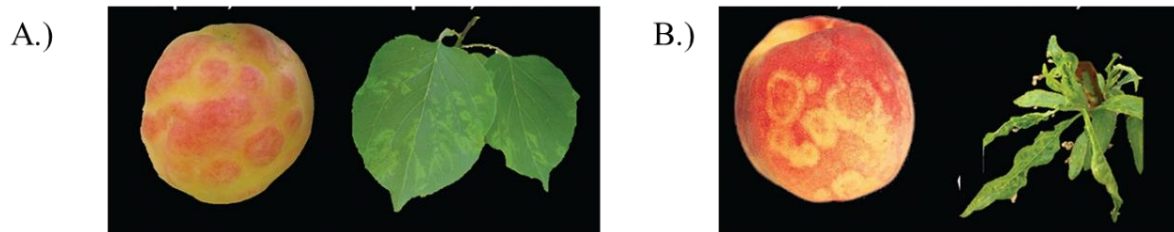
7. ábra A PPV genomszerveződése

A PPV RNS-ének 5' végén VPg, 3' végén poly(A) farok található. Az RNS-ről egy nagyméretű poliprotein transzlálódik, majd a vírus által kódolt proteázok által a következő fehérjékre hasítódik: P1 (proteáz), HC (proteáz), P3(replikációban jelentős fehérje) CI (helikáz), NIb (replikáz), CP (köpenyfehérje) (Fernández et al., 2002 alapján módosított saját ábra).

Filogenetikai analízise alapján az izolátumok 9 törzsbe csoportosíthatók, megkülönböztetünk PPV-D, PPV-M, PPV-Rec, PPV-EA, PPV-C, PPV-T, PPV-W, PPV-CR, PPV-An variánsokat. Legnagyobb elterjedéssel, és ezáltal legnagyobb gazdasági jelentőséggel a PPV-D és a PPV-M törzsek rendelkeznek (James et al., 2013).

A PPV előfordulása a XX. században Európára korlátozódott, azonban mára sokkal szélesebb elterjedéssel bír. Először Bulgáriában azonosították, 1917-ben (Atanasov, 1932). Detektálták jelenlétét Afrika, Ázsia, Észak-és Dél-Amerika országaiban is (Candresse & Cambra, 2006). Gazdanövényeit tekintve az összes termesztett csonthéjas gyümölcsfáról kimutatták PPV fertőzést (Clemente-Moreno et al., 2015).

A sharka tünetek általában jellegzetesek, a levélen klorotikus foltok, gyűrűk jelennek meg, érkivilágosodás és a termésen deformációk (8. ábra), nekrotikus foltok figyelhetők meg (Sochor et al., 2012).



8. ábra A PPV vírus tünetei

A.) PPV fertőzés tünetei kajszi gyümölcsön és levélen, B.) őszibarack gyümölcsön és levélen (Rubio et al., 2017).

A csonthéjas növényeket fertőző vírusok közül a legnagyobb gazdasági kártétellel a PPV rendelkezik, ezért a 10 legjelentősebb növényi patogén vírus közé sorolják (Scholthof et al., 2011). A PPV jelentős mértékű patogenicitásához az alábbi tulajdonságai járulnak hozzá. Számos levéltetű faj szerepel vektoraként, ezért gyors terjedésre képes, amit nehéz ellenőrzés alatt tartani. A fertőzött gyümölcsfákon súlyos tüneteket képes kialakítani, ami fogékony fák esetében akár 100%-os termésveszteséggel is járhat. Terjedésében a vegetatív szaporítás jelentős mind lokális, mind pedig globális tekintetben. Legtöbb gyümölcs termő vidéken karantén státuszából adódóan ellenőrzés alatt tartják az import növényeket, mégis nehéz megakadályozni az elterjedését a PPV által még érintetlen ültetvényeken (Scholthof et al., 2011). A gazdanövényei általánosságban fogékonyak tekinthetők, kevés rezisztencia forrás áll a termelők és a nemesítők rendelkezésére (Dicenta et al., 2000).

2.2.4. Csonthéjas növényeket fertőző viroidok

A viroidok növényeket fertőző szubvirális elemek. Kis méretű, fehérjét nem kódoló RNS molekulák. Rövid, cirkuláris RNS-ük autonóm módon replikálódnak, a szatellit RNS-ektől eltérően nem szorulnak helper vírus jelenlétére. 2020-ig 44 viroidot azonosítottak, melyek két családba oszthatók szerkezetük, gazdasejten belüli lokalizációjuk és replikációs mechanizmusuk tekintetében (Adkar-Purushothama & Perreault, 2020). A *Pospiviroidae* családba tartozó viroidok (például a *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)) tartalmaznak szerkezetükben konzervált motívumokat, mint a központi konzervált régió (CCR). A sejtmagban replikálódnak aszimmetrikus „rolling-circle” mechanizmussal. Replikációjuk során nem képesek replikatív intermedierjeik katalitikus hasítására, helyette a gazdasejt nukleáz és ligáz enzimeit használják monomer viroidok létrehozására. Az *Avsunviroidae* családba tartozó viroidok ezzel szemben nem rendelkeznek központi konzervált régióval, a kloroplasztisban replikálódnak és akkumulálódnak, szimmetrikus „rolling-circle” mechanizmussal replikálódnak

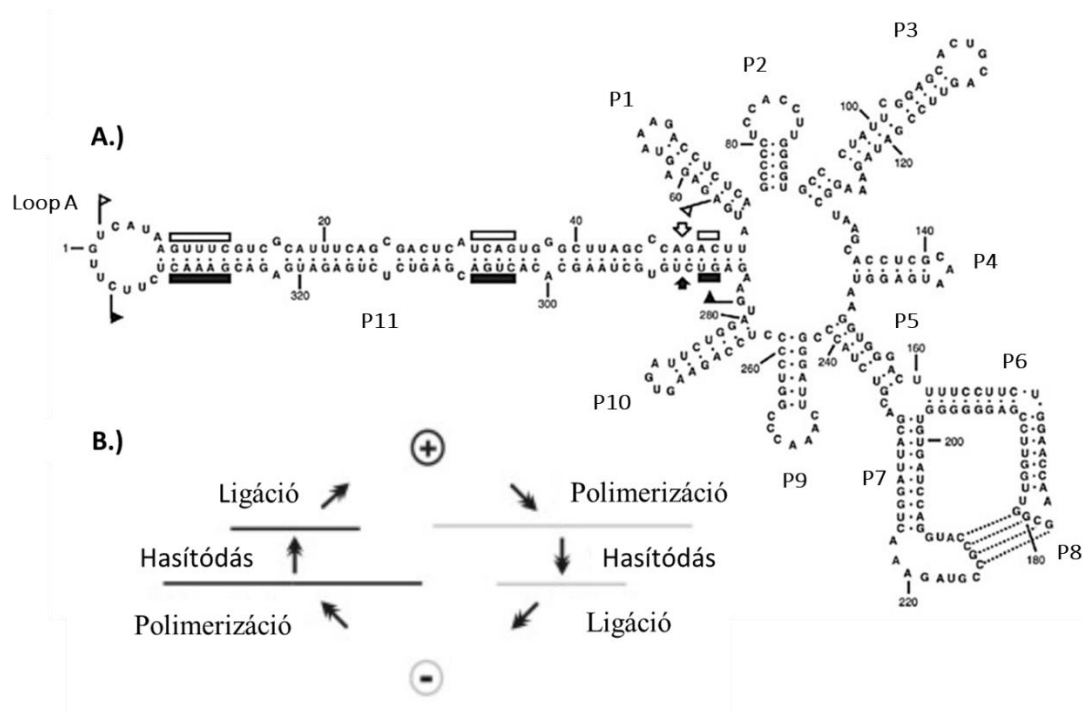
(9/B. ábra). Monomer RNS-eik replikatív intermedierjeikből saját hammerhead ribozim aktivitásuknak köszönhetően hasítódnak (Motard et al., 2008).

2.2.4.1. Őszibarack látens mozaik viroid (*Peach latent mosaic viroid* - PLMVd)

A PLMVd az *Avsunviroidae* család *Pelamoviroid* nemzetségébe tartozik. Replikációja és a gazdanövényben való felhalmozódása következtében feltűnő tüneteket alakíthatnak ki a gazdanövényben. A viroid nevéből adódóan gyakran eredményez látens fertőzést, amely során idővel eltűnnek, vagy egyáltalán nem jelentkeznek a viroid jelenlétére utaló levéltünetek. A tünetek sokszor a későn, a fertőzéstől számítva 2 év elteltével jelentkeznek. A PLMVd a következő tünetek kialakulását eredményezheti: levél felszínén mozaikosság, foltok, legszembetűnőbb esetben a teljes levél felszínét érintő albínó fenotípus (peach calico - PC) jelenik meg. A fertőzés hatására a virágokon rózsaszín csíkok alakulhatnak ki, kései lombfakadás, virágzás és termés érés következhet be, a termésen pedig deformációk és elszíneződés jelenhet meg, a mag alakja lekerekítetté válik (Desvignes, 1986). A levéltünetek detektálására a GF-305 őszibarack indikátor bizonyult a legalkalmasabbnak (Hernandez & Flores, 1992). A viroid által okozott őszibarack látens mozaik szindróma (peach latent mosaic -PLM) a fák élettartamának csökkenéséhez és a fokozott fogékonyságot eredményez a biotikus és az abiotikus stresszre. Először Franciaországból írták le a viroid által okozott PLM (peach latent mosaic) szindrómát, de Japánból és az Egyesült-Államokból is beszámoltak hasonló, PLMVd-hez köthető tünetegyüttesről (Hernandez & Flores, 1992). A fertőzött szövetből nem mutattak ki celluláris patogén kórokozót, ezért a kórokozót vírusnak tekintették (Ambro's et al., 1998). A vélt vírus partikulumok tisztítására tett kísérletek azonban sikertelennek bizonyultak, továbbá a fertőzés a hőkezeléssel szemben rezisztensnek bizonyult, ezért feltételezték, hogy viroid okozhatja a PLM szindrómát. Gélelektroforézissel igazolták a kis molekulatömegű, cirkuláris RNS-ek jelenlétét a tüneteket mutató növényekből, melyek az egészséges növényekből nem voltak detektálhatók (Hernandez & Flores, 1992). A PLMVd szekvenciájában azonosítottak konzervált régiókat a kivágódásért felelős hammerhead struktúrát kialakító régióban, mely hasonlóságot mutat az *Avsunviroidae* családba tartozó *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) hammerhead régiójának szekvenciájával. Az ASBVd-vel ellentétben a PLMVd kettő helyett egy hammerhead régióval rendelkezik (Delgado et al., 2005). A PLMVd elágazásokban gazdag térszerkezetét tekintve jelentősen eltér a pálcika alakú viroidoktól (Motard et al., 2008) (9/A. ábra). Az elágazásokban gazdag régió mellett rendelkezik egy majdnem teljesen kétszálú, hurokban (loop A) végződő hammerhead-karral,

amelyben a hammerhead struktúrákat és hasítási helyet alkotó nukleotidok egymással szemben helyezkednek el (Flores et al., 1992). Az elágazásokban gazdag régióban a P7 és P8 karok között létrejövő kapcsolat elősegíti a viroid térszerkezetének kialakítását, valamint annak fenntartásában, stabilitásának növelésében is fontos szerepet tölt be (Flores et al., 2006).

A PLMVd replikációja szimmetrikus rolling-circle mechanizmussal megy végbe (9/B. ábra). A fertőzött növényben túlnyomó többségben cirkuláris monomer formában van jelen. A gazdanövény RNS polimerázának segítségével ismétlődő átírást végez a pozitív (+) polaritású szárlól, ezáltal negatív polaritású (-) multimer RNS-ek képződnek. A multimer szál hasítódik a hammerhead ribozim aktivitásának köszönhetően. A hasított, azonos hosszúságú, negatív polaritású monomer viroidok ligálódnak, így ismét cirkuláris szerkezetet vesznek fel (Flores et al., 1992). A negatív polaritású cirkuláris monomer templátként szolgál a pozitív polaritású multimer szál előállításához. A multimer szál monomerekre hasítódik, melyek ligálódva pozitív polaritású cirkuláris viroidokat hoznak létre (Desvignes, 1986).



9. ábra A PLMVd térszerkezetete és replikációja

A.) A PLMVd egyszálú cirkuláris RNS genomja bonyolult másodlagos szerkezettel rendelkezik, a P1-P11 a bázispárosodásra képes karokat jelölik. A nyilak a viroid hammerhead ribozim hasítóhelyeit, a fekete és fehér téglalapok a hammerhead motívumok konzervált nukleotidjait, a fekete és fehér zászlók a pozitív és negatív polaritású hammerhead szerkezetet jelölik. B.) Az *Avsunviroidae* családra jellemző szimmetrikus rolling-circle replikációs mechanizmus. A pozitív polaritású monomer replikációjával a szürkével jelölt negatív polaritású multimer szál keletkezik, ami hasítódik, majd negatív polaritású cirkuláris monomerekké ligálódik. A negatív polaritású monomerről a feketével jelölt pozitív polaritású multimer szál keletkezik, ami hasítódik, majd pozitív polaritású multimer monomerekké ligálódik (Motard et al., 2008).

A fertőzött gazdanövényen belül a PLMVd kimutatható a hajtásból, levélből, kéregből, gyökérből és gyümölcsből (Flores et al., 1992). A *Pospiviroidae* család tagjaival (PSTVd) ellentétben képes bejutni a hajtáscsúcsba is. Horizontális terjedését a vegetatív szaporítás, a fertőzött rügyekkel végzett szemzés segíti elő. A PLMVd kozmopolita kórokozónak tekinthető, elterjedésének mértéke vélhetőleg összefüggésben állhat a szaporítóanyag globális kereskedelmének kialakulásával. Levéltetű vektoron keresztül is lehetséges a viroid transzmissziója, viszont csak kis hatékonysággal. Sem magátvitellel (vertikális terjedés), sem pollennel nem terjed a PLMVd, pollenből és magból molekuláris diagnosztikai módszerekkel a viroid nem mutatható ki (Flores et al., 2006).

2.4. Az RNS interferencia

Az evolúció során a növények számos védekezési mechanizmust fejlesztettek ki a patogén kórokozók ellen, mint például a hiperszenzitív reakció, a szisztémás szerzett rezisztencia, az ubiquitin/26S proteasóma rendszer, valamint az RNS interferencia (Csorba et al., 2015).

A növényi antivirális védekezés fő mechanizmusa az RNS interferencia, ami az eukarióta szervezetekre jellemző evolúciósan konzervált génszabályozó mechanizmus. Az RNS interferencia mechanizmusa számos fiziológiai funkció ellátását teszi lehetővé. Részt vesz fejlődésbiológiai, DNS hibajavítási, biotikus és abiotikus stressz válasz esetén végbemenő folyamatok szabályozásában, valamint védelmet biztosít az adott szervezet számára idegen nukleinsavak (vírusok, transzpozonok) támadása ellen (Csorba & Burgyán, 2016). A géncsendesítési folyamat megvalósulhat poszttranszkripció (PTGS - posttranscriptional gene silencing) és transzkripció szinten (TGS - transcriptional gene silencing). A PTGS végbe mehet célzott mRNS hasításával, majd lebontásával, vagy az mRNS translációjának szekvencia specifikus gátlásával. A TGS esetén a célgének átírása gátlódik a kromatin epigenetikai módosítása által (Basu et al., 2014). Az RNS interferencia kulcsszereplői a kis RNS-ek, melyek endogén, vagy exogén eredetűek lehetnek.

A kis RNS-ek biogenezisük, illetve hatásmechanizmusuk alapján osztályozhatók. Két fő RNS interferencia útvonalat különböztetünk meg, a génexpressziós szabályozásban a miRNS (mikro RNS), míg az antivirális védekezésben a siRNS (small interfering RNA) útvonal játszik szerepet (Kuo & Falk, 2020). A miRNS-ek a növények genomjában kódoltak, a siRNS-ek a növények antivirális védekezési mechanizmusa során képződnek, de endogén génről is átíródnak. A siRNS-ek az endogén prekursorból képződő mikro RNS-ekkel (miRNS)

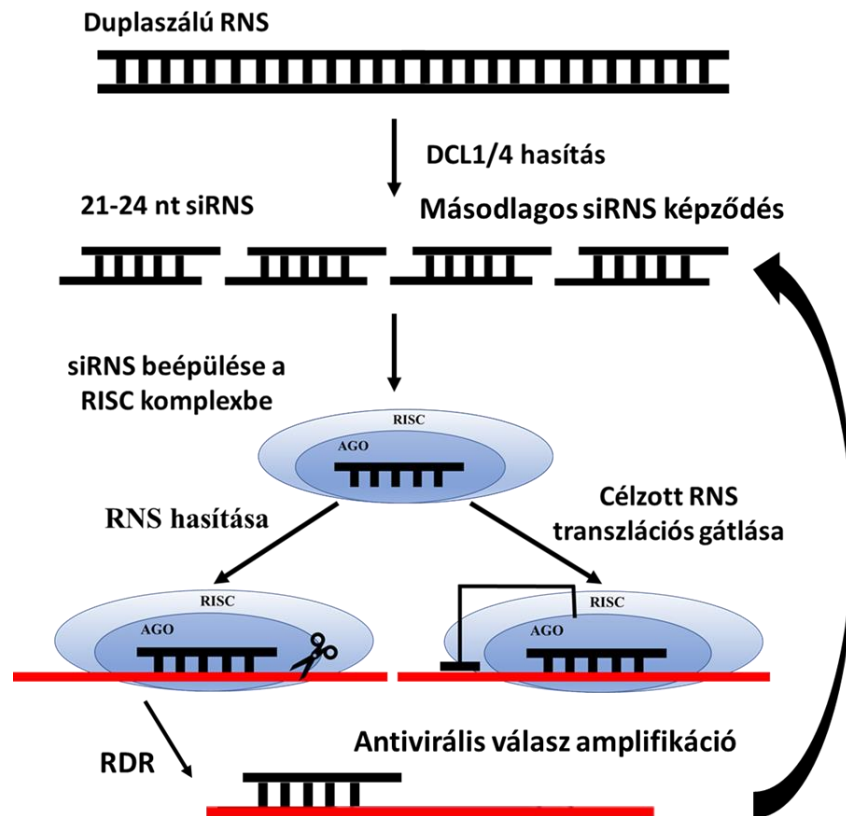
ellentétben a célzott RNS-sel teljes komplementaritással képesek bázispárosodásra (Basu et al., 2014).

Az antivirális RNS interferencia folyamata három részre, iniciációs, effektor és amplifikációs fázisra osztható. Az iniciációs szakaszban megy végbe a siRNS-ek képződése és effektor molekulákba való beépülése (Csorba & Burgyán, 2016). A siRNS útvonal kezdő lépése a virális RNS-ek felismerése. A szervezet számára idegen duplaszálú RNS-ek, vagy hajtű szerkezettel rendelkező RNS-ek, melyek az RNáz III családba tartozó Dicer-szerű (Dicer-like - DCL) ribonukleázok által 21-24 nukleotid hosszúságú siRNS-ekre hasítódnak a citoplazmában (Morgado, 2020). *Arabidopsis thaliana* modellnövényben 4 DCL fehérjét azonosítottak (DCL1-4), az antivirális védekezés során a DCL2 és DCL-4 játszik szerepet. A DCL fehérjék tartalmaznak helikázt, PAZ domént, két RNáz III doméneket és két duplaszálú RNS-kötőhelyet. A PAZ domén és a duplaszálú RNS kötőhelyek felelősek a duplaszálú RNS kötésében és pozicionálásában, hogy az RNS molekula hozzáférhető legyen az RNáz III enzimek számára, melyek katalitikus hasításuk eredményeképpen 3' végén 2nt túlnyúló véggel rendelkező 21-24 nt hosszúságú siRNS-eket hoznak létre (Bernstein et al., 2001). A DICER enzimek működéséhez szükséges az RNS-ek pozicionálásában szerepet játszó duplaszálú RNS-kötő fehérjék közreműködése (Double-stranded RNA binding - DRB) (Eamens et al., 2012). A siRNS-ek a 3' végén metilálódnak a HUA Enhancer 1 (HEN1) által, majd a HASTY (HST) fehérje segítségével kijutnak a sejtmagból a citoplazmába (Peragine et al., 2004).

A DCL enzimek hasítása által keletkezett duplaszálú siRNS-ek egyik szála beépül az RNS indukált géncsendesítési komplexbe (RNA-induced silencing complex - RISC), míg a másik szál lebomlik. A RISC effektorai az RNáz H endonukleázokhoz tartozó Argonauta (AGO) fehérjék, melyek képesek elhasítani a beépült siRNS-sel komplementer RNS-eket, ami a felismert RNS degradációjához vezet (10.ábra). *Arabidopsis thaliana* modellnövényben 10 AGO fehérjét azonosítottak (AGO1-10). A kis RNS-ek mérete és az 5' végén elhelyezkedő nukleotid típusa alapján épül be a különböző AGO fehérjékbe. Az AGO1,2,3,5,7 és 10 a PTGS alapú génszabályzásban vesz részt, míg az AGO4, 6, 9 a TGS-ben játszik szerepet, az AGO8 pszeudogénnek tekinthető (Mallory & Vaucheret, 2010).

Az amplifikációs fázis során az endogén és a virális RNS-függő RNS polimeráz aktivitásával felerősíti az antivirális RNS interferenciát (Kuo & Falk, 2020). *Arabidopsis thaliana* esetében 6 RDR fehérjét azonosítottak: RDR1,2,3a,3b,3c és 6 (Wassenegger & Krczal, 2006). Az AGO-k hasítási termékeit képesek az RDR fehérjék felismerni és polimeráz aktivitásuk által a hasított RNS-ből duplaszálú RNS keletkezik, ezáltal ismételt templátként szolgálnak a DCL enzimeknek (elsősorban a DCL-2-nek) és másodlagos siRNS-ek képződnek

(Branscheid et al., 2015). A nagy mennyiségben keletkezett virális siRNS-ek HTS alapú vizsgálata hatékony vírusdiagnosztikai vizsgálatok végrehajtását teszi lehetővé (Kreuze et al., 2009).



10. ábra Az antivirális RNS interferencia mechanizmusa

A vírus duplaszálú RNS-ét DCL enzimek 21 - 24 nukleotid hosszúságú siRNS-ekre hasítják, melyek egyik szála beépül a RISC komplex AGO fehérjéjébe. A beépült siRNS-sel komplementer virális RNS hasítódik, vagy transzlációja gátlódik (Burgján & Havelda, 2011 alapján módosított saját ábra).

A vírusok replikációjuk fenntartása érdekében különböző mechanizmusokat fejlesztettek a növények antivirális védekezési mechanizmusa ellen. Egyes vírusok kódolnak RNS interferencia gátló szuppresszor fehérjéket (viral suppressors of RNA silencing - VSR). A szuppresszor fehérjék nagy diverzitással rendelkeznek, ezáltal az RNS interferencia minden fázisában képesek kifejteni gátló hatásukat. Képesek megakadályozni az RNS hasítást, a végrehajtó fehérjekomplexek összeépülését, az antivirális válasz amplifikációját, valamint transzkripció szinten képesek szabályozni az RNS interferencia komponenseinek expresszióját (Csorba et al., 2015). Az RNS interferencia iniciációs fázisának gátlásának egyik hatékony mechanizmusa a duplaszálú kis RNS-ek megkötése. Számos vírus, köztük a *Grapevine leafroll-associated virus 3* rendelkezik P19 szuppresszor fehérjével, melynek hatására nem képesek a kis RNS-ek beépülni az effektor komplexbe (Gouveia & Nolasco, 2012). A *Polerovirus*

nemzetségre jellemző P0 szuppresszor fehérje F-box motívumán keresztül képes előidézni az effektor fázisban központi szerepet játszó AGO fehérjék destabilizációját, majd ezt követően az autofágia mechanizmusán keresztül történő lebomlását (Baumberger et al., 2007). A P1 szuppresszor fehérje képes kötődni az AGO fehérjéhez, ezzel meggátolva annak működését (Giner et al., 2010). A virális szuppresszor fehérjék egyes esetekben több ponton is képesek gátolni antivirális géncsendesítés mechanizmusát. A *Turnip crinkle virus* p38 szuppresszor fehérje képes megkötni a kis RNS-eket, kötődni az AGO1 és AGO2 fehérjékhez, gátolni az elsődleges siRNS képződést, valamint képes előidézni a miR168 túltermelését, melynek hatására az AGO1 fehérje kifejeződésének mértéke lecsökken (Várallyay & Havelda, 2013). A *Potyvirus* nemzetség tagjaira jellemző Hc-Pro szuppresszor aktivitással rendelkező fehérje szintén számos ponton képes gátolni az RNS interferenciát. Képes megkötni a duplaszálú RNS-eket, gátolja a HEN-1 metiltranszferázt, megakadályozza az elsődleges siRNS képződést, a miR168 fokozott transzkripcióját követően pedig az AGO1 expresszióját csökkenti (Endres et al., 2010).

2.3. Vírusok elleni védekezés, vírusdiagnosztikai módszerek

A gombák és baktériumok fertőzésével szemben rendelkezésre állnak fungicid, illetve baktericid hatású vegyszerek, ezek azonban a vírusfertőzéssel szemben hatástalanok. Ebből adódóan vírusfertőzés megelőzésére helyeződik a hangsúly. Vegyszeres védekezéssel a vírusok terjedésében fontos szerepet játszó rovar vektorok ellen lehet fellépni, valamint a nemesítéssel rezisztens fajták kialakításával lehet megelőzni a fertőzés által okozott tünetek súlyosságát. Az ültetvények létrehozásához elengedhetetlen a vírusmentes szaporítóanyag előállítása, amely vírusmentesítési módszerek fejlesztésével, különböző protokollok kombinációival tehető hatékonyabbá (Naidu & Hughes, 2014).

2.3.1. Vírusmentesítési technológiák

A csonthéjas növények vegetatív szaporításából adódóan a prebázis ültetvények izolátorházban lévő anyanövényeinek patogén mentessége rendkívül nagy jelentőséggel bír, hiszen a vírusok/viroidok a fertőzött anyafáról származó szaporítóanyagon keresztül képesek tovább terjedni. A szaporítóanyag patogénmentesítéséhez alkalmazott technikák közé tartozik a termoterápia, kemoterápia és a merisztéma tenyésztés, illetve az említett módszerek különböző kombinációi (Panattoni et al., 2013).

A termoterápia során a növényt még a fiziológiai tolerancia küszöbén belül, növénytől függően 35°C - 54°C között tartják meghatározott ideig. A termoterápiához használt hőmérsékletet, illetve a hőkezelés időtartamát úgy határozzák meg, hogy a kezelés során a növény még életbe maradjon, a kórokozó viszont elpusztuljon. A vírusok érzékenyebbek a hőmérséklet növelésére a növényi sejteknél, azonban a termoterápia során alkalmazott hőstressz szövethárosodáshoz vezethet (Spiegel et al., 1993). A hőterápiában a leggyakrabban használt hőmérsékletet 35°C - 38 °C között állítják be. A 35 °C feletti hőmérsékleten a vírus köpenyfehérjében található hidrogén és diszulfid hidak felszakadnak, majd felbomlanak a nukleinsavak foszfodiészter kötése is. A termoterápia eredményeként a virális replikáz gátlása következtében a vírus infektivitása is lecsökken. A növények belső környezetét érintő változások (pH, ionerő) hatására a lítikus enzimek aktivitása nő, kompetíció alakul ki a riboszómához kötődéshez a virális RNS és a messenger RNS között (Panattoni et al., 2013). A hőkezelés a vírusok mozgási fehérjéjének működésre is negatív hatással van. A termoterápia legjelentősebb vírusmentesítő hatását a parenchimában lokalizálódott vírusok ellen fejt ki (Grout, 1990).

A termoterápián belül a másik vírus mentesítési módszer a krioterápia, amely során folyékony nitrogén kezelésnek teszik ki a hajtáscsúcsot, majd kiolvasztást követően a hajtáscsúcsból teljes növényt regenerálnak (Panattoni et al., 2013).

A növények esetében alkalmazott antivirális kemoterápiás eljárásokat a humán gyógyászatból vették át. A kemoterápiás szerek hatékonyságával kapcsolatban lágyszárúakon több vizsgálatot végeztek fás szárú növényekhez képest (Panattoni et al., 2013). Hatékony antivirális hatást válthatnak ki az inozin monofoszfát dehidrogenáz (IMPDH) inhibitorok, S-adenozilhomocisztein hidroláz (SAH) inhibitorok és a neuraminidáz (NA) inhibitorok. Elsőként az IMPDH inhibitorok közé tartozó Ribavirin nukleozid analógot alkalmazták vírusmentesítésre, ami a *Respiratory syncytial virus* kezelésére kifejlesztett szintetikus guanozin nukleozid analóg. A Ribavirin a vírus replikációjának gátlásával fejt ki antivirális hatását. A Ribavirint 9 különböző víruscsaládba tartozó vírus esetén sikeresen használták vírusmentesítésre *in vitro* szövettenyészeteken (Panattoni et al., 2013).

A vírusmentes növény előállításához használt szövettenyésztési technikák során izolálják a növény hajtásának egy kisméretű részét, ami lehet hajtáscsúcs, merisztéma, vagy szomatikus embrió, majd kontrollált körülmények között, megfelelő médiumban teljes növényt regenerálnak az adott szövetből (Hollings, 1965). A hajtáscsúcsban, valamint a merisztémában fertőzött növény esetében alacsonyabb a vírus koncentráció, a vírusok egy része kizáródik a merisztémából, ezért a szövettenyésztéshez kisebb méretű kiindulási szövetdarab esetén

hatékonyabb a vírusok eliminációja. A vírusmentesítési hatékonyságot nagyban növeli, ha termoterápiát követően történik a hajtáscsúcs, vagy merisztéma izolálás. Hajtáscsúcs esetén 5-10 mm, merisztéma izolálás során 0,2-0,7 mm méretű szövetdarabot izolálnak a vírusmentesítésre kijelölt növényből. A szövettenyésztési technikák időigényesek, kis méretű merisztémák, és hajtáscsúcsok esetében is több hónap, mire a teljes növény regenerációja végbemegy. A szomatikus embriogenezis a mikroszaporítási technikák közé tartozik, amely során portokból, levélből izolált explantátumokat kallusz képződést indukáló médiumba helyezik, majd differenciálódási folyamatokon keresztül az embrióból teljes növény regenerálódik (Popescu, 2010). Magyarországon a patogén mentesítést a termoterápia és szövettenyésztési technikák kombinációjával végzik, de kísérletek folynak Ribavirinnel kemoterápiás módszerek optimalizálására is. A vírusmentesítésen átesett növények a 14/2017. (III.23.) FM rendelet értelmében izolátorházban lévő prebázis ültetvényekre, majd bázis ültetvényekre kerülnek. A prebázis anyanövény prebázis szaporítóanyag előállítására szánt anyanövény, melyről prebázis szaporítóanyag állítható elő. A prebázis szaporítóanyag által bázis anyanövény állítható elő. A bázis anyanövény alkalmas bázis szaporítóanyag előállítására. A bázis szaporítóanyagot prebázis kiindulási állapotú szaporító alapanyagból állítják elő a fajta azonosságának, pomológiai jellemzőinek, növény-egészségügyi állapotának megőrzését biztosító módon.

2.3.2. Vírusdiagnosztikai módszerek

Az ültetvények virológiai állapotának felméréséhez, illetve a vírusmentesítés hatékonyságának ellenőrzésére nagy érzékenységgű vírusdiagnosztikai módszerek alkalmazása szükséges (Naidu & Hughes, 2014). A vírusdiagnosztikában alkalmazott módszereket csoportosíthatjuk specifikus (szerológiai, molekuláris biológiai tesztek) és nem specifikus (biotesztek, elektron mikroszkópia) technikákra. Az adott vírus/ viroid kimutatására fejlesztett specifikus technikákhoz szükséges az adott kórokozó előzetes ismerete, ezzel szemben a nem specifikus technikákhoz ez nem szükséges, viszont a patogén azonosítása biológiai/fizikai paraméterek alapján az esetek többségében csak nemzetség szinten valósulhat meg (Pecman et al., 2017).

2.3.2.1. Nem specifikus vírusdiagnosztikai módszerek

A gazdasági károkat okozó vírusokkal való fertőződés legtöbbször az adott kórokozó jelenlétére specifikus, vizuálisan detektálható tünetek megjelenését eredményezi a gazdanövényen, amely diagnosztikai értékkel rendelkezik. A tünetek kialakulását azonban számos tényező befolyásolhatja, függhetnek az adott vírus törzstől, a gazdanövény fajtól és fajtától, a fertőzéstől eltelt időtartamtól és a környezeti tényezőktől. Kedvezőtlen időjárási tényezők, a talaj egyenlőtlen ásványi anyag és tápanyag ellátottsága, egyéb patogének, rovarok, atkák kártétele, légszennyezés, illetve herbicid kezelés is eredményezhet vírusfertőzéshez hasonló tüneteket. A vizuális tünetek alapján végzett vírusdiagnosztikát tovább nehezíti, hogy különböző vírusok fertőzése során hasonló tünetek jelentkezhetnek, más esetekben pedig ugyanazon a gazdanövényen egy adott vírus különböző törzsei eltérő tüneteket alakíthatnak ki. A fásszárú növények biológiai indexelése során a vizsgálati mintákat a vizsgálatköteles vírusokra specifikus tüneteket mutató indikátornövényekre szemzik, majd az inkubációs idő (ami 3 évet is igénybe vehet) leteltével értékelik a tüneteket (Bock, 1982).

A növényi minták elektronmikroszkópos vizsgálatával a mintában jelen lévő vírusok morfológiája alapján van lehetőség vírusok azonosítására. A módszer hátránya, hogy költséges, nagy mennyiségű minta, valamint alacsony koncentrációban jelen lévő vírusok vizsgálatára nem alkalmas, időigényes, továbbá csak nemzetség, illetve család szintjén azonosíthatóak a mintában jelenlévő vírusok (Milne, 1991).

2.3.2.2. Specifikus vírusdiagnosztikai módszerek

A specifikus vírusdiagnosztikai módszerek közé tartoznak a szerológiai és a nukleinsav amplifikáció alapú technikák. Az antigén-ellenanyag kölcsönhatáson alapuló jelzések eljárások közül a leggyakrabban az ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) tesztek használják. Több változata ismert, rutin diagnosztikában leggyakrabban alkalmazott módszer a DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay). A DAS-ELISA technológia alapja a szilárd fázishoz kötött antitesthez kötődő antigén detektálására egy másik, antigénhez szintén kötődő, enzimmel jelzett antitest használata. Az enzimreakció olyan kromogén vagy fluorogén szubsztrát hozzáadásával megy végbe, amely a reakció során mérhető színváltozást eredményez. Az ELISA tesztek elterjedése forradalmasította a növényi vírusdiagnosztikai vizsgálatokat, a módszer bevezetése nagy mennyiségű minta költséghatékony vizsgálatát tette lehetővé (Torrance & Jones, 1981). A monoklonális antitestek

alkalmazása növelte a vizsgálatok specificitását és a szenzitivitást is. A módszer előnyös tulajdonságainak köszönhetően a használatát bevezették a szaporítóanyag előállításához szükséges anyafák és a nemesítéssel előállított új gyümölcsfa fajták zárlati és vizsgálatköteles vírusainak szűrésére. A Kanadában végzett PPV eradikációját célzó program során egy év alatt 1 millió csonthéjas mintát teszteltek ELISA-val (Boonham et al., 2014). A hatékony vírusdiagnosztikai vizsgálatok végzéséhez megfelelő minőségű specifikus antitest előállítása szükséges, amihez először virion izolálással, vagy a vírus köpenyfehérjéjének expresszáásával tisztított antigénhez kell hozzájutni (Steel et al., 2010). Az ELISA specificitása az esetek többségében nem alkalmas a különböző vírus törzsek elkülönítésére, a konzervált szerkezetű köpenyfehérjék esetén a faj szintű elkülönítés is problémába ütközik (pl.: *Geminiviridae* család *Begomovirus* nemzetség) (Boonham et al., 2014).

A nukleinsav kimutatás alapú módszerek használata egyre nagyobb teret nyer a szerológiai eljárásokkal szemben. Ezek a módszerek is alkalmazhatók a szaporítóanyag előállítás során az anyanövények certifikációjához szükséges vírusdiagnosztikai vizsgálatokhoz és az ültetvények virológiai felméréséhez.

A nukleinsav hibridizációs technikák nagy érzékenységgű, megbízható vírusdiagnosztikai módszerek. Növényi vírusok, viroidok kimutatására az RNS detektálásra alkalmas Northern-blot technológia vált ismertté. Az RNS-ek gélelektroforézissel való elválasztását követő hibridizálás növeli a specificitást, viszont a dot-blot hibridizálási technikák nagy mennyiségű minta együttes vizsgálatát teszik lehetővé. A virális RNS-ek detektálása az adott vírusra/viroidra specifikus radioaktív (^{32}P izotóp) vagy fluorescensen jelölt próbával végezhető. A nem radioaktív jelöléshez biotin és digoxigenin molekulák használhatók. A biotinnal jelölt nukleinsavakat nagy affinitással képes kötni az avidin, illetve a sztreptavidin, a digoxigenin pedig az uridin nukleotidokhoz képes kapcsolódni (Pallás et al., 1998).

A nukleinsav hibridizációs technikák helyett azonban a polimeráz láncreakció alapú módszerek terjedtek el legszélesebb körben. Egy adott vírus kimutatásához szükséges primerek tervezéséhez szükséges a kórokozó részleges, vagy teljes genomjának ismerete. A primerek szintézise lényegesen gyorsabban végrehajtható az ELISA reakciókhoz szükséges monoklonális antitest előállításához képest. A PCR (Polymerase Chain Reaction) reakció nagy szenzitivitásának köszönhetően alacsony koncentrációban jelen lévő vírusok detektálását is lehetővé teszi, viszont a nagy érzékenysége miatt kis mértékű kontamináció is vezethet téves pozitív eredményhez (Boonham et al., 2014). A reakció során amplifikált termék detektálása megvalósítható gélelektroforézissel végzett elválasztási technikákkal, illetve fluoreszcencia méréssel valós idejű PCR technikák esetében (Mumford et al., 2000).

A nagy mintaszám gyors vizsgálatát lehetővé tevő valós idejű PCR eljárások között vírus diagnosztikában a TaqMan módszert alkalmazzák a legszélesebb körben. A reakció során a Taq polimeráz 5'-3' exonukleáz aktivitása által képes elbontani a templáthoz kötődő próbát. A próbán egy riporter és egy kioltó fluorofór csoport található, melynek elbomlását követően, a fluorescens rezonancia-energiatranszfer (FRET) jelenséget kihasználva detektálható a termék mennyiségi növekedése (Boonham et al., 2009). A gyors, megbízható, megfelelő érzékenységgű, nagy mennyiségű minta tesztelésére alkalmas diagnosztikai módszerek fejlesztése mellett egyre nagyobb igény merült fel az alacsonyabb eszközígényű, akár terepi körülmények között elvégezhető izotermális amplifikáció alapú vizsgálatok fejlesztésére. A LAMP (loop-mediated isothermal amplification) reakcióhoz egy belső és egy külső primerpár szükséges, valamint a szál áthelyeződést indukáló *BstI* polimeráz, ami lehetővé teszi a denaturáció nélküli DNS amplifikációt. Az 65°C-on végbemenő amplifikáció során folyamatosan megy végbe az új szálak szintézise, így bonyolult, elágazó, kihurkolódásokban gazdag konkatamer DNS keletkezik. A keletkezett termék detektálható agaróz gélen végzett elválasztással, fluoreszcencia intenzitás mérésével, illetve terepi körülmények között is kiértékelhető kolorimetriás reakcióval is (Notomi et al., 2000).

2.3.2.3. Nagy áteresztőképességű szekvenálási (high throughput sequencing - HTS) technikák vírusdiagnosztikai alkalmazása

A HTS technológiák alkalmazása új lehetőséget nyitott a növényi vírusdiagnosztika területén, ugyanis több minta együttes vizsgálatát teszi lehetővé, segítségével a mintákban lévő összes patogén kimutatható. A HTS alapú szekvenálási reakciók végrehajtásához több platform áll rendelkezésre. A leggyakoribban az Illumina platformon végzett szekvenálás tekinthető. Az Illumina rövid szekvenciák leolvasását teszi lehetővé, a szekvenálási reakció pedig szilárd fázishoz kötve, híd amplifikációs módszerrel, szintézissel megy végbe. A reakcióhoz használt nukleotidok 4 különböző fluorescens jelöléssel vannak ellátva, így a beépült nukleotid fluorescens jel detektálásával határozható meg a vizsgált minta nukleotid sorrendje. A SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) szekvenálási technológia során a szekvencia meghatározás 4 fluorofórral jelölt, oktamer oligonukleotidok ligálásával történik (Maliogka et al., 2018; Schuster, 2008).

Először 2009-ben végeztek HTS-sel növényi mintákon diagnosztikai vizsgálatokat. A HTS technológiák előnye a szerológiai és nukleinsav amplifikáció alapú módszerekkel szemben, hogy a mintában jelen lévő összes vírus/viroid kimutatható (Adams et al., 2009;

Kreuze et al., 2009). A növényi vírusdiagnosztikában többnyire az Illumina és Ion Torrent platformokon végeznek vizsgálatokat (Boonham et al., 2014; Maliogka et al., 2018). A HTS vizsgálatokhoz különböző módszerrel előkészített minták használhatók: totál RNS, riboszómális RNS-ektől mentesített RNS, duplaszálú RNS, kis RNS, izolált vírus partikulumból tisztított RNS, poliadenilált RNS (Pecman et al., 2017). Különböző típusú RNS izolátumok szekvenálása adott vírusok kimutatására eltérő hatékonysággal alkalmazható. Izolált duplaszálú RNS szekvenálásával a pozitív, szimpla- és duplaszálú RNS genommal rendelkező vírusok hatékonyabban diagnosztizálhatók, mint a negatív, egyszálú RNS genommal rendelkező vírusok (Roossinck et al., 2015). Az izolált virionokból tisztított RNS kivonatból a vírus teljes szekvenciája rekonstruálható, de a nem enkapszidálódott vírusok, viroidok ezzel az eljárással nem azonosíthatók (Kutnjak et al., 2015). A poliadenilált RNS-ekből nagy hatékonysággal kimutathatók a poli(A) farokkal rendelkező RNS vírusok, míg a poli(A) farok nélküli vírusok ezzel az eljárással nem detektálhatók (Wu et al., 2015). A legelterjedtebb, legáltalánosabban használt diagnosztikai módszerek közé tartozik a kis RNS-ek és az rRNS depletált RNS-ek HTS vizsgálata. A nagy mennyiségben jelen levő rRNS-ek eltávolításával 10-szer nagyobb virális RNS koncentráció érhető el, ezáltal hatékonyabb konszenzus szekvencia építhető létre a szekvenált kis RNS-ekből, a readekből (Adams & Fox, 2016). A kis RNS-ek izolálására kidolgozott protokoll több növényfaj esetében is sikeresen alkalmazható, ezáltal széles körű vírus diagnosztikai vizsgálatot tesz lehetővé. A növények védekezési mechanizmusa, az RNS interferencia során keletkező kis RNS-ek szekvenálása nagy hatékonysággal alkalmazható vírusok, viroidok kimutatására. (Kutnjak et al., 2017).

3. Anyag és módszer

3.1. Mintagyűjtés

A vizsgálatainkhoz szükséges levélmintákat kajszi és őszibarack fákról gyűjtöttük, a NAIK Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet Elvira majorban található izolátorházaiból és törzsültetvényeiről. A leveleket a fák négy égtájának megfelelő ágáról szedtük, annak érdekében, hogy reprezentatív képet kaphassunk a fák fertőzöttségének mértékéről. Vizsgálatainkhoz Ligeti óriás, Pannónia és Magyar kajszi fajtákból gyűjtöttünk leveleket. Az őszibarack esetében Springcrest és Cresthaven őszibarack fajták izolátorházából, illetve törzsültetvényből származó egyedeiről gyűjtöttünk levélmintákat. A kajszi fajtákából és a Springcrest őszibarack fajta esetében hajtáscsúcsból regenerált *in vitro* növényekről is gyűjtöttünk mintákat. Az izolátorház átfogóbb vírusdiagnosztikai vizsgálatához további 10 fajtáról (Flavortop, Nektár H, Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Redhaven, Champion, Suncrest, Aranycsillag, Apolka) gyűjtöttünk levélmintákat, melyek a vizsgálat idejében a NÉBIH Velencei Virologiai Állomásán bioteszt vizsgálat alatt állnak. A mintákat a begyűjtést követően hűtve szállítottuk, majd feldolgozásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

3.2. RNS izolálás

Fásszárú növények esetében az RNS izolálás több nehézséggel jár a légyszárúakhoz képest, mivel magasabb a poliszacharid és polifenol tartalmuk, melyek nagy molekulatömegű komplexek létrehozásával képesek megkötni a nukleinsavakat, ezzel csökkentve az izolálás hatékonyságát. Az RNS izolálást Gambino módosított CTAB-alapú protokollja alapján végeztük (Gambino et al., 2008).

1. Az extrakciós puffert (2 % CTAB, 2,5 % PVP-40, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA (pH 8), 2 M NaCl) vízfürdőben $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra melegítettük.
2. 150-200 mg levélminta homogenizálás során a fák mind a négyágáról gyűjtött levelét felhasználtuk, majd dörzsmozsárban folyékony nitrogénben porrá őrölt levelekhez 850 μl $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os extrakciós puffert és 17 μl 2% β -merkaptotetanolt adtunk.
3. A homogenizált mintákat 2 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük, vortex segítségével rázattuk, 10 percig $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben inkubáltuk, majd 5 perc elteltével ismételten vortex-el homogenizáltuk.

4. 850 µl 4 °C-os kloroform-izoamil alkoholt adtunk a csövekhez, majd óvatosan elkevertük a csövek forgatásával.
5. A mintákat 10 000 rpm-en 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk.
6. Új 2 ml-es Eppendorf csövekbe 800 µl kloroform-izoamil alkoholt adtunk.
7. Centrifugálást követően a felülúszót 800 µl kloroform-izoamil alkoholhoz mértük.
8. A mintákat 10 000 rpm-en 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk.
9. Új 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe 250 µl 9 M LiCl-ot mértünk. A centrifugálást követően a felülúszót a 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe mértük, majd óvatosan forgatva elkevertük.
10. A mintákat 30 percig jégen inkubáltuk, majd 13 000 rpm-en 20 percig 4°C-on centrifugáltuk.
11. A felülúszót eltávolítottuk, majd 450 µl 65 °C-os SSTE (0,5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 M NaCl) puffert mértünk a csövekbe, majd intenzív keveréssel visszaoldottuk a csapadékot.
12. A csövekbe 450 µl kloroform-izoamil alkoholt (24:1) mértünk, majd óvatosan összekevertük.
13. A mintákat 10 000 rpm-en 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk.
14. Új 1,5 mL-es Eppendorf csövekbe 280 µl izopropanolt és 30 µl 4M nátrium acetátot adtunk. Centrifugálás után a felülúszót rámértük az előkészített csövekbe, óvatosan forgatva kevertük, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk 10 percig.
15. A mintákat 13 000 rpm-en 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk.
16. Eltávolítottuk a felülúszót, majd 4°C-os 70%-os etanollal mostuk a csapadékot.
17. A mintákat 13 000 rpm-en 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk.
18. Leöntöttük a mintákról az etanolt, a maradék etanolt pedig vákuum centrifugával (5 perc) távolítottuk el a csapadékról.
19. A csapadékot 25 µl steril MilliQ vízben visszaoldottuk és -20 °C-on tároltuk.

3.3. RNS keverékek (poolok) előállítása

Annak érdekében, hogy minél több egyed virológiai státuszáról információt gyűjthessünk, a kis RNS szekvenáláshoz mintakeverékeket (poolokat) készítettünk az egyedek RNS izolátumaiból. A poolok készítéséhez az egyedi RNS-eket egyenlő arányban (koncentrációban) mértük össze. A kajszibarack esetében hat keverékeket készítettünk fajták (Ligeti óriás, Pannónia és a Magyar kajszibarack) izolátorházából, illetve törzsültetvényből származó egyedeiből. A Cresthaven és Springcrest őszibarack izolátorházából és törzsültetvényéből

származó mintákból négy keveréket, az izolátorház tíz, bioteszt vizsgálat alatt álló fajtáiból (Flavortop, Nektár H, Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Redhaven, Champion, Suncrest, Aranycsillag, Apolka) egy keveréket készítettünk.

3.4 Kis RNS könyvtár készítés

A kis RNS könyvtárakat az RNS keverékek felhasználásával, a Truseq Small RNA Library Preparation Kit (Illumina) optimalizált protokollja alapján készítettük (Czotter et al., 2018). Először a kisRNS frakciót izoláltuk az RNS kivontokból, majd 3' és 5' adaptereket ligáltunk a kis RNS-ekhez. Reverz transzkripcióval cDNS-t írtunk, melyet PCR-rel amplifikáltunk. Végül gélből izoláltuk és tisztítottuk a kis RNS könyvtár megfelelő mérettartományba eső frakcióját (11. ábra).

1. A kis RNS könyvtárak készítéshez 10-30 µg RNS keveréket használtunk fel. Az RNS-eket denaturáltuk 65 °C-on 20 percig, majd 8%-os ureát tartalmazó poliakrilamid gélen választottuk el őket.
2. A kis RNS frakciót tartalmazó géldarabot steril szikével izoláltuk a gélből.
3. 2 ml-es Eppendorf csőbe helyeztünk 0,5 ml-es csöveket, melyek alját 4 helyen steril tűvel átlukasztottuk. A 0,5 ml-es csövekbe helyeztük a kis RNS frakciót tartalmazó géldarabokat.
4. Centrifugáltuk a csöveket 2 percen keresztül 13 000 rpm-en, melynek hatására az összetört géldarabok a 2 ml-es Eppendorf csövekbe kerültek.
5. A 0,5 ml-es Eppendorf cső eltávolítását követően 350 µl steril 0,3 M NaCl-t mértünk a csövekbe, majd egy éjszakán keresztül 4°C-on rázattuk a csöveket alacsony fokozaton.
6. Az oldatban lévő kis RNS-eket Spin X acetátos filtercsövön keresztül szűrtük át, 13 000 rpm-en centrifugáltuk 2 percen keresztül.
7. Az acetátos filtercsövön átszűrődő oldatot ismételten ráértük a filtercsőre, majd 2 percen keresztül centrifugáltuk 13 000 rpm-en keresztül, ezzel eltávolítottuk a géldarabokat az oldatból.
8. Az eluált oldathoz 350 µl 100% izopropanolt és 1 µl GlycoBlue (Invitrogen) reagenst adtunk.
9. Inkubáltuk a csöveket -70°C-on 3 órán keresztül.
10. A precipitálódott RNS-t maximális fordulatszámon centrifugáltuk 4°C-on 20 percen keresztül.
11. Eltávolítottuk a felülúszót, majd 1 ml 4°C-os 70%-os etanollal mostuk a csapadékot.
12. Leöntöttük az etanolt a csapadékról, majd szobahőmérsékleten vákuum centrifugával elpárologtattuk a maradék etanolt.

13. Vissza oldottuk a csapadékot 12 μl MQ tisztaságú vízbe.
14. A 3' adaptereket ligálásához steril PCR-csőbe 2,5 μl tisztított kis RNS-t és 0,5 μl 3' RNS adaptert mértünk, majd denaturáltuk 70°C-on 2 percig.
15. Hozzáadtunk 1 μl ligálási puffert (HML), 0,5 μl RNáz inhibitor és 0,5 μl T4 RNS ligáz 2-t (trunkált).
16. A ligálást 28°C-on végeztük 1 órán keresztül.
17. Az inkubációs idő leteltével 0,5 μl STOP (STP) reagens hozzáadásával leállítottuk a ligálási reakciót.
18. Inkubáltuk 28°C-on 15 percen keresztül a csöveket.
19. Új PCR-csőbe mértünk 0,5 μl RNS 5' adaptert (RA5), majd 2 percen keresztül denaturáltuk 70°C-on.
20. Egy új PCR csőbe 0,5 μl 10 mM ATP-t és 0,5 μl T4 RNS ligázt mértünk, majd hozzáadtuk a denaturált 5' adaptert, majd alapos keverést követően hozzáadtuk a 3' adapterrel ligált kis RNS frakcióhoz.
21. Az 5' adapter ligálást 28°C-on végeztük 1 órán keresztül.
22. Az adapterekkel ligált reakcióelegyhez 1 μl RT Primert (RTP) adtunk, majd 2 percen keresztül 70 °C-on denaturáltuk.
23. Denaturálást követően 1 μl RNáz mentes vizet, 2 μl 5x töménységű reakció puffert, 0,5 μl 12,5 mM dNTP mixet, 1 μl RNáz inhibitor és 1 μl Revert Aid H- reverz transzkriptázt mértünk PCR csövekbe.
24. Az RT-reakcióelegyből 5,5 μl -t adtunk a primert és 3'-5' adapterekkel ligált mintáinkhoz, majd 50 °C-on inkubáltuk 1 órán keresztül.
25. Új steril PCR csövekbe a PCR reakcióhoz 4,25 μl MilliQ vizet, 12,5 μl PCR mixet (PML), 1 μl RP1 (RNA PCR Primer 1) primert és 1 μl RPIX (RNA PCR Primer Index x) indexelt primert és 6,25 μl cDNS templátot adtunk.
26. A PCR reakciót a következő ciklusokat használtuk:

30 s	-	98 °C	
10 s	-	98 °C	}
30 s	-	60 °C	
15 s	-	72 °C	
10 s	-	72°C	
			16 x
27. A PCR terméket 8% -os poliakrilamid gélen választottuk el. 25 μl PCR termékhez 5 μl Orange DNS festéket adtunk. A várt molekulatömegű termék azonosításához 20 és 50 bp

alacsony molekulatömegű markert használtunk. Az elválasztást követően etídium bromiddal festettük a géleket, majd UV fény alatt izoláltuk a 145-160 nukleotid tartományba eső kis RNS frakcióról készített PCR terméket.

28. 2 ml-es Eppendorf csőbe helyeztünk 0.5 ml-es csöveket, melyek alját 4 helyen steril tűvel átlyukasztottuk. A 0.5 ml-es csövekbe helyeztük a kis RNS frakciót tartalmazó géldarabokat.

29. szobahőmérsékleten centrifugáltuk a csöveket 4 percen keresztül 13 000 rpm-en, melynek hatására az összetört géldarabok a 2 ml-es Eppendorf csövekbe kerültek.

30. A 0,5 ml-es Eppendorf cső eltávolítását követően 350 µl steril 0,3 M NaCl-t mértünk a csövekbe, majd egy éjszakán keresztül 4°C-on rázattuk a csöveket alacsony fokozaton.

31. Az inkubálást követően az oldatot Spin X acetátos filtercsövön keresztül szűrtük át, 13 000 rpm-en centrifugáltuk 2 percen keresztül.

32. Az acetátos filtercsövön átszűrődő oldatot ismételtén rámértük a filtercsőre, majd 2 percen keresztül centrifugáltuk 13 000 rpm-en keresztül, ezzel eltávolítottuk a géldarabokat az oldatból.

33. Az eluált oldathoz 350 µl 100% etanolt és 1 µl GlycoBlue (Invitrogen) reagenst adtunk, majd -70 °C-on inkubáltuk 2,5 órán keresztül.

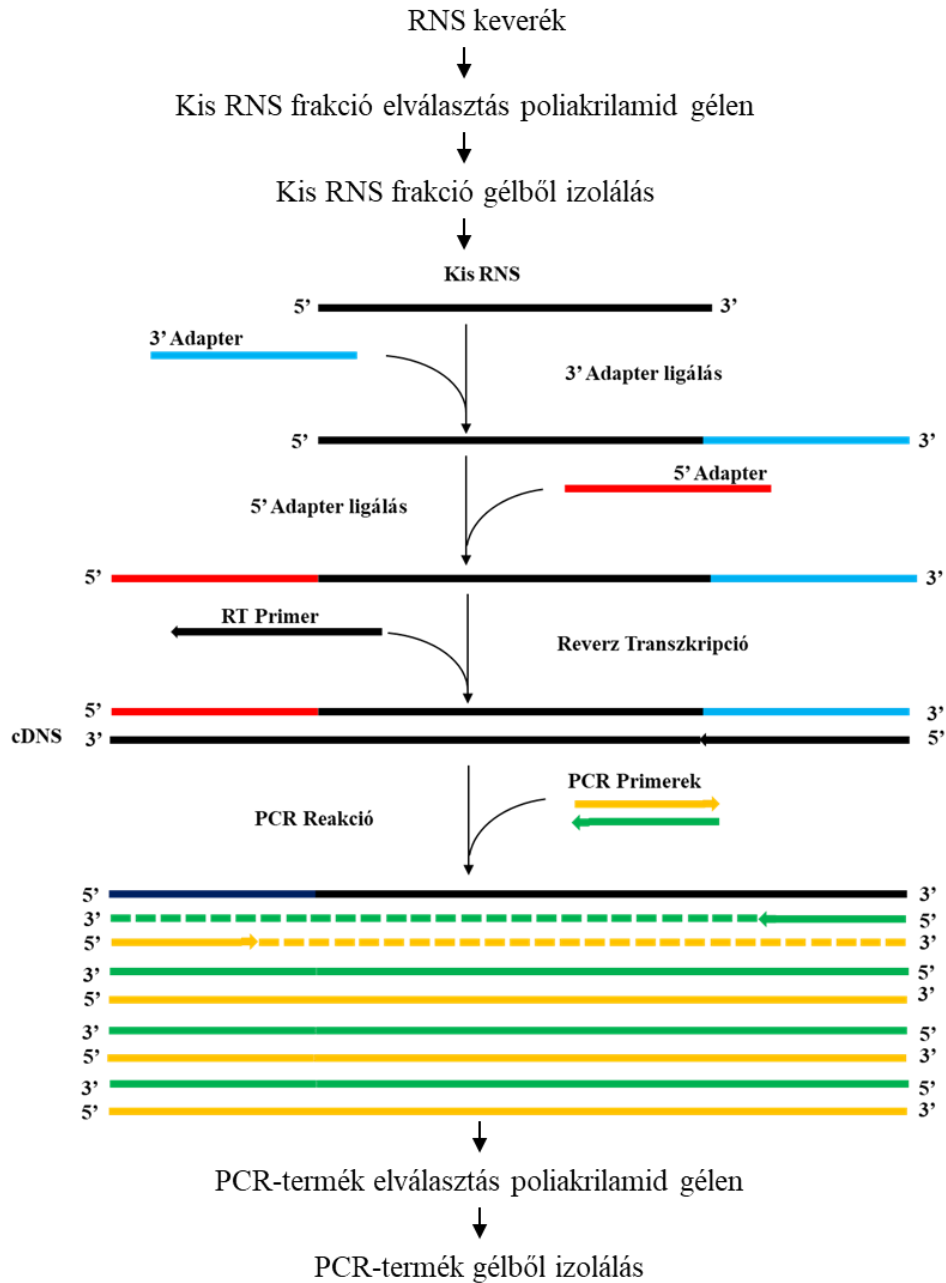
34. A precipitálódott RNS-t maximális fordulatszámon centrifugáltuk 4°C-on 20 percen keresztül.

35. Óvatosan eltávolítottuk a felülúszót, majd egymás után kétszer mostuk 1 ml 70%-os alkhollal a cspadékat.

36. Leöntöttük az etanolt a csapadékról, majd szobahőmérsékleten vákuum centrifugával elpárologtattuk a maradék etanolt.

37. Visszaoldottuk a csapadékot 12 µl steril 1x töménységű TE puffében, majd a szekvenálásra kész kis RNS könyvtárakat -20 °C-on tároltuk.

38. Az új generációs szekvenálást az UD Genomed (Debrecen) cég végezte Illumina HiScan2000 platformon.

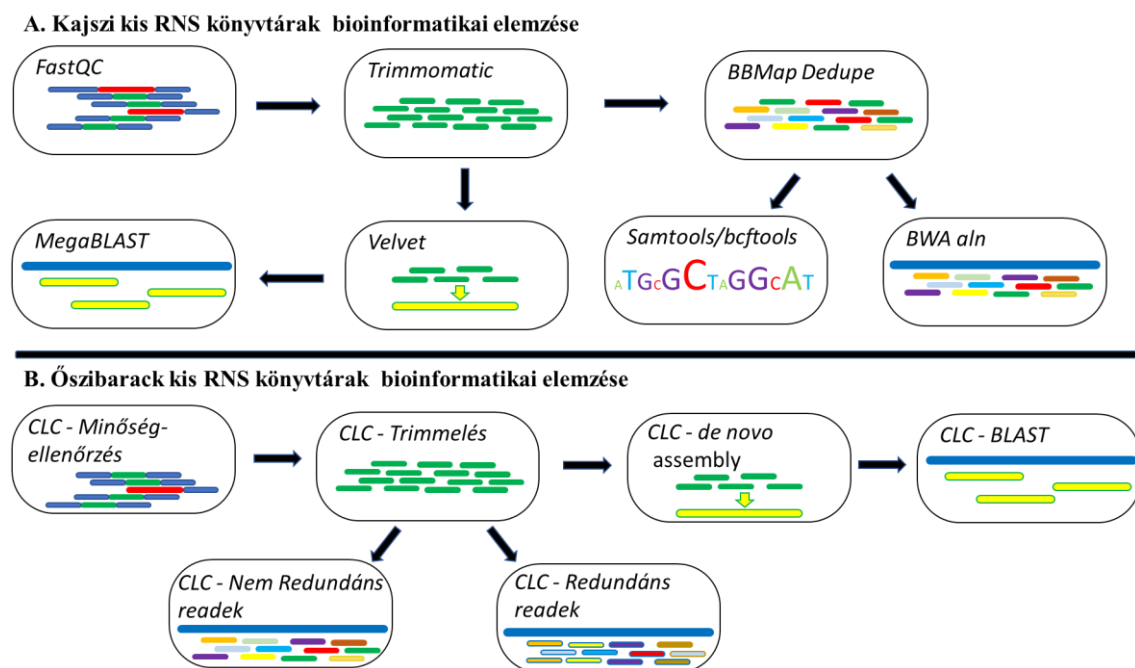


11. ábra A kis RNS könyvtár készítése

Az izolált RNS keverékből poliakrilamid gélelektroforézissel izoláltuk és tisztítottuk a kis RNS frakciót. A kis RNS-ekhez adaptereket ligáltunk, a 3' adaptert kék, az 5' adaptert piros színnel jelöltem. Ezt követően cDNS-t szintetizáltunk, majd narancssárga és zöld színnel jelölt primerekkel PCR-reakciót végeztünk. A PCR-terméket poliakrilamid gélen elválasztottuk, majd gélből izolálást végeztünk (saját ábra).

3.5. Kis RNS HTS eredményének bioinformatikai elemzése

A kajszi barack minták kis RNS HTS szekvenálási eredményének elemzését a szekvenálás minőség ellenőrzésével kezdtük, melyet a *FastQC* programmal végeztünk. Az adapter szekvenciák eltávolításához *Trimmomatic* programot használtunk (Bolger et al., 2014). Az egyedi, nem redundáns adatokat tartalmazó kis RNS listát a *BBmap Dedupe* programmal hoztuk létre, eltávolítva az ismétlődő readeket. A vírus/viroid azonosításhoz a kis RNS-eket *BWA aln* programmal illesztettük az NCBI RefSeq vírusokat és viroidokat tartalmazó referencia szekvenciáihoz (Li & Durbin, 2009). Az illeszkedő kis RNS olvasatok (readek) darabszámát *Samtools idxStats* programmal határoztuk meg.



12. ábra Kajszi és öszibarack kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése

A.) A kajszi kis RNS könyvtárak minőségellenőrzését *FastQC* programmal végeztük, a zöld színnel jelölt minőségellenőrzési követelményeknek megfelelt readek kék színnel jelölt adaptereit eltávolítottuk a *Trimmomatic* programmal. A *BBmap Dedupe* programmal a redundáns readeket eltávolítottuk, a különböző színek az eltérő szekvenciájú readeknek felelnek meg. A *BWA aln* programmal illesztettük a kék színnel jelölt referencia genomokra a különböző színekkel jelölt nem redundáns readeket. A *Samtools/bcftools* program segítségével konszenzus szekvenciát hoztunk létre. A *Velvet* programmal sárgával jelölt kontigokat építettünk, melyeket *MegaBlast* programmal illesztettük a kék színnel jelölt referencia genomokra. B.) Az öszibarack kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzését CLC Genomics Workbench szoftverrel elemeztük. A minőségellenőrzést és trimmelést követően *de novo assembly* módszerrel sárgával jelölt kontigokat építettünk, melyeket *BLAST* programmal illesztettük a kékekkel jelölt referencia genomokra. A referencia genomokra illesztettük a redundáns és nem redundáns readeket is (saját ábra).

A referencia genomra illeszkedő kis RNS readekből a *Samtools/bcftools* program segítségével konszenzus szekvenciát tudunk készíteni, ami a legnagyobb mértékben reprezentálja a mintánkban előforduló vírus/viroid szekvenciáját. A referenciagenom azon pontjain, ahol nem található illeszkedő kis RNS readek N-nel helyettesíti a program, így az N-ek és a referencia genom hosszából kiszámolható az adott vírursa illeszkedő readek lefedettségi értéke. Másik megközelítés szerint a kis RNS-ekből az átfedő szakaszaik alapján hosszabb „kontig” szekvenciákat hoztunk létre *Velvet* programmal és a kontigokat illesztettük az NCBI adatbázisban található növényi vírusok referencia genomjaira. A kontigokat *k*-hosszúságú monomer szekvencia részekből, kmerekből hoztuk létre. A kontig építéshez 13, 15 és 17 kmer értékeket használtunk. A kapott kontig szekvenciákat *MegaBLAST* programmal illesztettük az NCBI RefSeq adatbázisára (Morgulis et al., 2008) (12/A. ábra).

Az őszibarack kis RNS könyvtárakat CLC Genomics Workbench (Qiagen) programcsomaggal elemeztük. CLC beépített funkcióival elvégezhető a szekvenálási adatok minőségellenőrzése, az adapter szekvenciák trimmelése. A readok átfedő régióiból *de novo* assembly módszerrel kontigokat készítettünk, melyeket *BLAST* program segítségével illesztettünk a referencia genomokra. Azokra a vírus genomokra, amelyekre találatot kaptunk, illesztettük a kis RNS szekvenciákat is (lefedettségi ábrákat készítettünk), hogy meggyőződjünk a találat hitelességéről (12/B. ábra).

A bioinformatikai elemzése során pozitív vírustalálatként értékeltük, ha az adott vírusra illeszkedő nem redundáns readok és a normalizált redundáns readok (redundáns read szám / 1000000) száma elérte a küszöbértéket (200 read), kaptunk kontig találatot és a readok referencia genomra vetített lefedettsége 40% feletti értéket adott.

3.6. Kis RNS HTS eredményének visszaigazolása RT-PCR-rel

3.6.1. cDNS szintézis

A kis RNS szekvenálás bioinformatikai vizsgálatával kapott vírus/viroid találatok megerősítése érdekében RT-PCR alapú visszaigazolást végeztünk. A szekvenálás alapjául szolgáló RNS keverékekből, valamint az egyedi RNS kivonatokból RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) segítségével cDNS-tkészítettünk.

1. A reakcióhoz maximálisan 2,75 µl RNS templátot és 0,25 µl Random Primert mértünk 0,5 ml-es Eppendorf csőbe, majd denaturáltuk 65 °C-on 5 percen keresztül, majd jégbe helyeztük további 5 percre.

2. Ezt követően 1 µl 5x Reakció puffert, 0,5 µl 10mM dNTP-t, 0,25 µl RiboLock RNáz inhibitor és 0,25 µl RevertAid reverz transzkriptáz enzimet adtunk az RNS-ekhez.

3. A cDNS szintézist a következő hőmérséklet beállításokkal végeztük:

25 °C - 10 perc

42 °C - 60 perc

45°C - 10 perc

70°C - 10 perc

4. A cDNS-eket felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.6.2. PCR vizsgálat

A kis RNS HTS-sel azonosított vírusok/viroid találatok verifikációját PCR-rel végeztük. A PCR-alapú diagnosztikához a szakirodalomban közölt, illetve saját tervezésű primereket használtunk (1-2 táblázat). A primerek tervezéshez az adott vírus szekvenciáit gyűjtöttük össze az NCBI GenBank adatbázisából, majd Clustal Omega program segítségével illesztettük az adatbázisból nyert szekvenciákat a kis RNS HTS elemzés során a szekvenált readekből készített konszenzus szekvenciára. Az illesztés alapján olyan 20-25 nukleotid hosszúságú konzervatív régiókat kerestünk, ami 3' végen guaninra vagy citozinra végződik, és lehetőleg minél kevesebb ismétlődő nukleotidot tartalmaz. A primerek minőségét az NCBI Primer-BLAST programjával ellenőriztük, hogy kizárjuk a forward és reverse primer saját magával, illetve az egymással való anellálódását. A primer tervezésnél törekedtünk a forward és reverse primer anellációs hőmérséklete közti különbséget minimalizálni. A PCR reakciókhoz használt primerek paramétereit a következő táblázatokban láthatók (1-2. táblázat).

1. táblázat A PCR vizsgálatokhoz felhasznált primerek neve, szekvenciája, referenciagenomon való pozíciója és az amplifikált termék mérete

Vírus név	Primer neve	Primer szekvenciája	Pozíció a genomon	Termék mérete
PPV	PPV_P1(9534)r	ACCGAGACCACTACACTCCC	9534-9515	427 bp
	PPV_F3 (9108)	GGAATGTGGGTGATGATGG	9108-9126	
	PPV_P2(9292)f	CAGACTACAGCCTCGCCAGA	9292-9311	242 bp
	PPV_P1(9534)r	ACCGAGACCACTACACTCCC	9534-9515	
NSPaV	NSPaV_F_2588	TATCTCGACAACCTGTGATCG	2588-2609	1752 bp
	NSPaV_R_4339	CTTGTTACACCGGTAGGACTTC	4319-4339	
PaLV	PaLV_F_2430	CACTGGTCAATGTGGCATGATCC	2430-2452	1132 bp
	PaLV_R_3561	CTGAGGAGCTGCGTCTACC	3543-3561	
PLMVd	PLMVd_F(117_141)	CCCAGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG	117-141	337 bp
	PLMVdR(92_116)	AACTGCAGTGCTCCGAATAGGGCAC	92-116	
CVAMP	CVAMP-Fm(5400)	ATGTTCGATCATAACAGTYAAG	5400-5420	1391 bp
	CVAMP-Rm(6791)	TTACCTTCTGCACCAACYAC	6791-6772	
LChVI	LChVI_12165F	GCAAAAAGTCAGATGTTGGTG	12165-12184	1096 bp
	LChVI_13261R	GACGTGGTCTAATACTTGCG	13261-13241	
	LChVI_9493F	GTGTTAGATTCGCTATTAR	9493-9512	795 bp
	LChVI_10288R	CAGTCGAACCTACCAAGCGTTC	10288-10268	

2. táblázat A PCR vizsgálatokhoz felhasznált primerek olvadási hőmérséklete (T_m), az amplifikált kódoló régió funkciója, a primer forrása, illetve az adott vírus/viroid referenciagenomja

Vírus név	Primer neve	T _m (°C)	Amplifikált régió funkciója	Primer referencia	Referencia genom
PPV	PPV_P1(9534)r	65°C	kapszid fehérje	Wetzel et al., 1991	NC_001445.1
	PPV_F3 (9108)				
	PPV_P2(9292)f	62°C	kapszid fehérje	Wetzel et al., 1991	
	PPV_P1(9534)r				
NSPaV	NSPaV_F_2588	68°C	kapszid fehérje, read-through fehérje	saját tervezés	NC_027211.1
	NSPaV_R_4339				
PaLV	PaLV_F_2430	65°C	ORF3a, kapszid fehérje, mozgási fehérje	saját tervezés	NC_034970.1
	PaLV_R_3561				
PLMVd	PLMVd_F(117_141)	53°C	teljes genom	Jo et al., 2015	NC_003636.1
	PLMVdR(92_116)				
CVAMP	CVAMP-Fm(5400)	62°C	feltételezett mozgási fehérje	saját tervezés	NC_003689.1
	CVAMP-Rm(6791)				
LChVI	LChVI_12165F	51°C	kapszid fehérje	saját tervezés	NC_001836.1
	LChVI_13261R				
	LChVI_9493F	51°C	HSP70		
	LChVI_10288R				

1. A PCR vizsgálatokhoz a reakcióelegyet a kontamináció elkerülése érdekében lamináris boxban mértük össze. Munkánk során steril PCR csöveket, steril szűrős pipettahegyeket használtunk.

2. A templátként használt cDNS-ekből tízszeres hígítást készítettünk.

3. A DNS amplifikációt a diagnosztikai vizsgálatokhoz Thermo Scientific Phire Green Hot StartII DNS polimeráz enzimmel végeztük. A reakcióhoz 9,4 µl MQ vizet, 3 µl 5X Phire puffert, 0,75 µl - 0,75 µl forward és reverse primert (10 pmol/ µl), 0,3 µl dNTP-t (10mM), 0,3 µl Phire polimerázt adtunk.

A PCR reakciót a következő beállításokkal végeztük:

98°C	-	30 másodperc	
98°C	-	10 másodperc	} 40X
* °C	-	10 másodperc	
72°C	-	20 másodperc	
72°C	-	1 perc	

*Vírus primer specifikus anellációs hőmérséklet alkalmazása

4. A kapott PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el.

3.7. PCR-termék tisztítása és szekvenálása

Az adott vírusra pozitív PCR tesztet mutató minták szekvencia meghatározásához a PCR reakciót egy hibajavítási funkcióval rendelkező DNS polimerázzal, Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) enzimmel megismételtük. A Q5 DNS polimeráz nagy másolási pontossággal, valamint 3'→5' exonukleáz aktivitással bír. A PCR-termékeket 1.2%-os agaróz gélen választottuk el, majd steril szikével kivágtuk a gélből. A PCR-termék izolálását Thermo Scientific GenJET Extraction Kit protokollja alapján végeztük. A PCR-terméket 30 µl MQ vízbe oldottuk vissza. A PCR-termékek Sanger szekvenálását forward és reverse irányból a BIOMI Kft. végezte.

3.8. Klónozás

Annak érdekében, hogy a szekvencia vizsgálatokhoz a PCR reakció során sokszorozott vírus/viroid szekvenciáját a termék teljes hosszúságában meghatározhassuk, a Q5 polimerázzal felsokszorozott, Thermo Scientific GenJET Extraction Kittel izolált PCR terméket CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) pJET1.2/blunt vektorba klónoztuk.

1. A ligálást 10 µl végtérfigatba végeztük, 5 µl 2Xpuffert, 4 µl tisztított PCR terméket, 0,5 µl pJET1.2/blunt plazmidot és 0,5 µl ligáz enzimet adtunk a reakcióelegyhez.

2. A reakcióelegyet 20 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten.

3. Az inkubációs idő leteltével 200 µl jégen felolvasztott DH5α kompetens sejtekhez 5 µl ligátumot adtunk, majd óvatosan összekevertük a ligátumot a baktériumszuszpenzióval.
4. 20 percig jégen inkubáltuk a szuszpenziót, majd 30 másodpercig hősokkoltuk 42°C-os vízfürdőben, majd azonnal jégre tettük.
5. 500 µl folyékony antibiotikum mentes SOC táptalajt hozzáadását követően 40 percig 37°C-on rázó termosztátban inkubáltuk a csöveket.
6. A szuszpenzióból 200 µl-t szélesztettünk ampicillin antibiotikumot tartalmazó LB táptalajra.
7. A lemezeket 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül.
8. Az inkubálást követően ellenőriztük, hogy nőttek-e telepek. A pJET1.2/blunt vektor ligált inzert hiányában egy *Escherichia coli* számára letális restriktív enzimet expresszál, ami a transzformálást követően elpusztítja a baktérium sejtet, így csak az inzerttel ligálódott vektort tartalmazó baktériumok képeztek telepeket.
9. Minden lemezről 4 egymástól jól elkülöníthető telepet oltottunk le folyékony ampicillin tartalmú LB táptalajra, majd 37°C-on ráztattuk.

3.9. Plazmid izolálás baktériumtenyészetből

A rekombináns plazmidokat a plasmid DNA purification kit (MACHEREY-NAGEL) segítségével izoláltuk a baktériumokból. A protokoll végén az izolált plazmidot 50 µl MQ tisztaságú vízbe oldottuk vissza. XbaI (5' T|CTAGA 3') és XhoI (5' C|TCGAG 3') (Thermo Fisher Scientific) restriktív enzimekkel emésztettük a plazmidokat, ezzel ellenőriztük, hogy a megfelelő mérettartományba eső inzert ligálódott-e a plazmidokba. Az emésztéshez 1 órán keresztül inkubáltuk 37°C-os vízfürdőben a reakcióelegyet, majd 1.2%-os TBE agaróz gélen gélelektroforézissel történő elválasztást végeztünk.

3.10. Szekvencia elemzések

A szekvenált PCR-termékek és klónok nukleinsav, illetve aminosav szekvenciák illesztéséhez az interneten elérhető *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) programot, filogenetikai elemzésekhez pedig *MEGA 6.0* (Tamura et al., 2013) szoftvert használtuk. A filogenetikai fákat Neighbor-Joining módszerrel készítettük 1000 bootstrap ismétléssel. A GenBank adatbázisba 44 izolátum nukleinsav szekvenciáját töltöttük fel (M3, M4. melléklet).

3.11. Northern-blot analízis

A Northern blot vizsgálatokhoz 1-3 μ g izolált RNS-t használtunk. 4.5 μ l RNS mintához 15,5 μ l 10XMAE puffer, formaldehid, formamid, 10mg/ml EtBr tartalmú mintakezelő oldatot, majd 20 percen keresztül 65°C-on denaturáltuk a mintákat. Az RNS-ek elválasztását hűtött helységben (4°C) történő gélelektroforézissel végeztük 1,5%-os agaróz gélen, MAE pufferben (0,1M MOPS (pH 7,0), 40 mM Nátrium-acetát, 5 mM EDTA). Az elválasztást követően a gélt Amersham HyBond-NX membránra (GE Healthcare) blottoltuk kapilláris módszerrel. A blottolást egy éjszakán keresztül végeztük, amelyhez 20X SSC puffert használtunk (3 M NaCl, 0,3 M nátrium-citrát (pH 7,2)). Az inkubációs idő leteltével az RNS-eket UV fényvel megvilágítva keresztkötöttük a nitrocellulóz membránhoz. A membránt 65°C-on 15 percig mostuk 2X SSC (0.3M NaCl, 30mM nátrium-citrát (pH 7,2)) pufferben, majd Church pufferben (0,5 M Na₂HPO₄ (pH 7,2), 1% BSA, 1 mM EDTA, 7% SDS) 1 órán keresztül prehibridizáltuk szintén 65°C-on. A vírus/viroid specifikus radioaktív P³² jelzett DNS próba készítését a DecaLabel Kit (Thermo Scientific) segítségével készítettünk, amihez a következő reakcióelegyet készítettünk: 5 μ l 5X Decalabel puffer, 1 μ l tisztított vírus/viroid specifikus PCR-termék és 19 μ l MQ tisztaságú víz. A keveréket 10 percig forraltuk, majd azonnal jégre tettük. Miután visszahűlt a reakcióelegy 1.5 μ l MixC-t, 0.5 μ l Klenow DNS polimerázt és 3 μ l [α -P32]-dCTP-t mértünk hozzá, majd 37°C-os vízfürdőben inkubáltuk 1 órán keresztül. 2 μ l dNTP (10mM) hozzáadását követően 5 percig inkubáltuk 37°C-on, majd 5 percig 96°C-on denaturáltuk, végül jégbe helyeztük. Az elkészült DNS próbát 15 ml hibridizáló (Church-puffer) pufferbe kevertük. A membránt egy éjszakán keresztül hibridizáltuk a Church pufferhez adott radioaktívan jelölt próbával 65°C-on. Ezt követően a csökkenő sókoncentrációjú sóoldattal mostuk a membránt (2xSSC – 0.1xSSC 0.1%SDS), majd röntgen filmet helyeztünk a membránra. A jel erősségétől függően pár órán, vagy akár több napon keresztül is exponáltuk, majd sötét szobában előhívtuk a filmet.

4. Eredmények

4.1. Kajszi és őszibarack fák vírusfertőzöttségének felmérése kis RNS HTS-sel

Munkánk során izolátorházból és szabadföldi törzsültetvényeiből származó kajszi és őszibarack mintákat vizsgáltunk kis RNS HTS-sel. Kajsziarack fajták közül a Ligeti óriás, Pannónia és Magyar kajszi fajták egyedeit reprezentáló kis RNS könyvtárakat készítettünk (Magyar kajszi fajta esetében csak a törzsültetvényről származó egyedekről). Őszibarack mintákból 5 kis RNS könyvtárat készítettük: Springcrest, valamint Cresthaven fajták izolátorházból és törzsültetvényből származó egyediből és az őszibarack izolátorház 10 fajtáját reprezentáló keverékből készítettünk (3.táblázat).

3. Táblázat A kis RNS könyvtárak készítéséhez felhasznált kajszi és őszibarack fajták

Kis RNS Könyvtár neve	Ültetvény poolok kis RNS könyvtárakhoz		
	Fajta	izolátorház / törzsültetvény	Tesztelt fák (db)
1_LO_ih	Ligeti óriás	izolátorház	3
2_LO_tü		törzsültetvény	2
3_P_ih	Pannónia kajszi	izolátorház	3
4_P_tü		törzsültetvény	2
	Magyar kajszi	izolátorház	4
5_M_tü		törzsültetvény	2
1_Sc_ih	Springcrest	izolátorház	4
2_Sc_tü		törzsültetvény	2
3_Ch_ih	Cresthaven	izolátorház	4
4_Ch_tü		törzsültetvény	2
5_ősz_ih	10 fajtából álló keverék:		
	1_Flavortop	izolátorház	10
	2_Nektár H		
	3_Venus		
	4_Incrocio Pieri		
	5_Cresthaven		
	6_Redhaven		
	7_Champion		
	8_Suncrest		
	9_Aranycsillag		
10_Apolka			

A fák vírusfertőzöttségének meghatározásához a csoportunk által fásszerű növényekre optimalizált kis RNS könyvtár készítési protokollt követtük. A szekvenálás eredményét bioinformatikai módszerekkel elemeztük a kajszi minták esetében csoportunk által publikált módszerekkel (Czotter, et al., 2018), míg az őszibarack minták esetében a Qiagen CLC Genomics Workbench programcsomagot használtuk.

4.2. Kis RNS HTS eredményének bioinformatikai elemzése

A HTS eredményeképpen kapott szekvenciák minőségellenőrzését követően kajszibarack könyvtárak esetében 11918150-13294950 közötti read számot (átlagosan 12620899 read), őszibarack könyvtárak esetében 9776381-18111452 közötti (átlagosan 13292328) olvasatot, readet kaptunk (M2. melléklet). Ezt követően, úgynevezett trimmelés során eltávolítottuk az adapter szekvenciákat, ezáltal megkaptuk a kis RNS-ek szekvenciáját. A trimmelt readok elemzése során mennyiségében nem tapasztaltunk jelentős változást a szekvenált readok számához képest, kajszibarack esetén 10394694-12463256 (átlagosan 11493787), őszibarack esetén 9655292-17779344 (átlagosan 13031372) kis RNS readet kaptunk. A szekvenált kis RNS-ek közül az ismétlődő szekvenciák szűrésével megkaptuk a nem redundáns kis RNS-ek darabszámát. A kajszibarack könyvtárak nem redundáns kis RNS-einek száma 537920 és 1691987 (átlagosan 1050748 read) között változott, míg az őszibarack könyvtáraknál 9746998-2592339 közötti read számot (átlagosan 1574118 readet) kaptunk. A kajszibarack könyvtárak elemzése során a Velvet programmal 3 különböző beállítás mellett (kmer13, kmer15, kmer17) 3444-16284 (átlagosan 9319) kontig szekvenciát építettünk a kis RNS-ek átfedő szakaszaiból, míg az őszibarack könyvtárak kis RNS-eiből 401-8363 közötti (átlagosan 3686) kontigot építettünk a CLC Genomic Workbench szoftverrel. A szekvenált kis RNS könyvtárak szekvenciáit feltöltöttük a GEO adatbázisba (kajszibarack könyvtárak azonosítója: GSE114251, őszibarack könyvtárak azonosítója: GSE130859).

4.3. Kajszibarack fák kis RNS HTS-sel megállapított vírusfertőzöttsége

A kajszisi és őszibarack kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése során pozitív vírustalálatként értékeltük, ha az adott vírusra illeszkedő nem redundáns readok és a normalizált redundáns readok (redundáns read szám / 1000000) száma elérte a küszöbértéket (200 read), kaptunk kontig találatot és a readok referencia genomra vetített lefedettsége 40% feletti értéket adott.

A kajszibarack minták elemzése során találatot kaptunk a CVA, LChV-1 és PPV vírusokra (4. táblázat). A Pannónia fajta izolátotházból (P_{ih}) és törzsültetvényből származó egyedek (P_{tü}) is CVA-t fertőzöttséget mutattak (13/A. ábra). A P_{ih} könyvtár esetében mind a három kmer érték mellett kaptunk kontig találatokat a CVA-ra, kmer13 esetében 2, kmer15-nél 3 és kmer17 beállítás mellett 1 db kontigot kaptunk. A vírusra illeszkedő kis RNS-ek vizsgálatakor 3082 nem redundáns és 1143 normalizált redundáns readet kaptunk, melyek 76,1

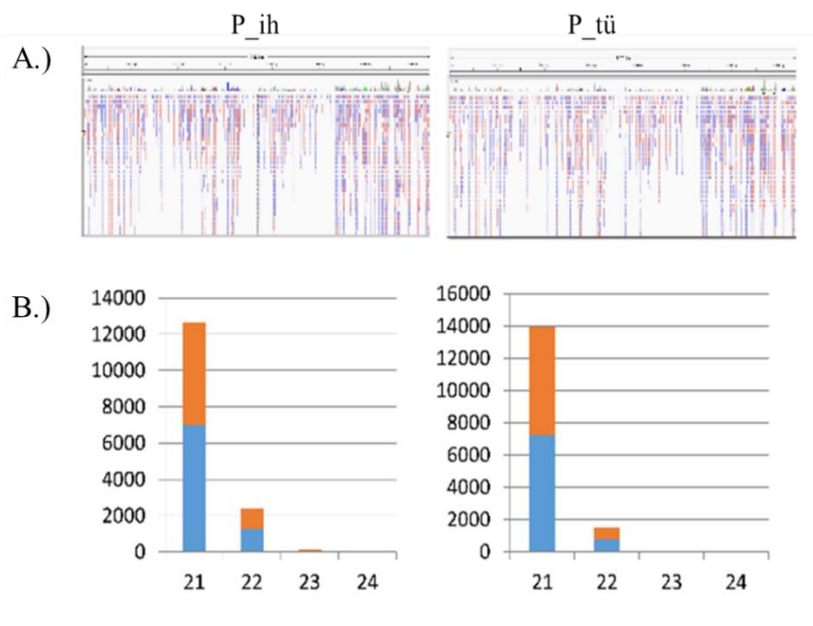
%-ban fedték le a CVA referencia genomot (NC_003689.1). A P_tű könyvtár esetében kmer13 és kmer15 beállítások mellett 5, illetve 3 CVA-ra illeszkedő kontigot kaptunk. Ebben az esetben a 3298 referencia genomra illeszthető nem redundáns és 1366 normalizált redundáns read 78,8% lefedettségi értéket mutatott.

4. táblázat Kajsziparack kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése

Kis RNS könyvtár neve	Bioinformatikai elemzés		Vírusok		
			CVA	LChV-1	PPV
1_LO_ih	kontig blast	kmer13	0	0	0
		kmer15	0	0	0
		kmer17	0	0	0
	read bwa	Nem redundáns	92	198	111
		Redundáns*	11	52	21
lefedettség	%	17,7	15,7	15,5	
2_LO_tű	kontig blast	kmer13	0	0	9
		kmer15	0	0	5
		kmer17	0	0	0
	read bwa	Nem redundáns	106	227	1542
		Redundáns*	13	261	216
lefedettség	%	20,4	17,6	78,0	
3_P_ih	kontig blast	kmer13	2	0	0
		kmer15	3	0	0
		kmer17	1	0	0
	read bwa	Nem redundáns	3082	200	145
		Redundáns*	1143	68	30
lefedettség	%	76,1	15,9	19,0	
4_P_tű	kontig blast	kmer13	5	0	0
		kmer15	3	0	0
		kmer17	0	0	0
	read bwa	Nem redundáns	3296	227	161
		Redundáns*	1366	175	57
lefedettség	%	78,8	17,6	21,2	
5_M_tű	kontig blast	kmer13	0	2	11
		kmer15	0	22	67
		kmer17	0	2	50
	read bwa	Nem redundáns	85	6028	9325
		Redundáns*	11	771	1925
lefedettség	%	19,2	91,2	94,0	

Szürke kijelöléssel a kontig találatokat, kékkel a küszöb érték feletti illeszkedő readok számát, valamint a lefedettséget jelöltük. Redundáns*: normalizált redundáns readok száma (redundáns read szám /1000000), bwa: kis RNS-ek referencia genomra illesztését végző program, kmer13/15/17: kontig építéshez használt *k* hosszúságú szekvencia részletek.

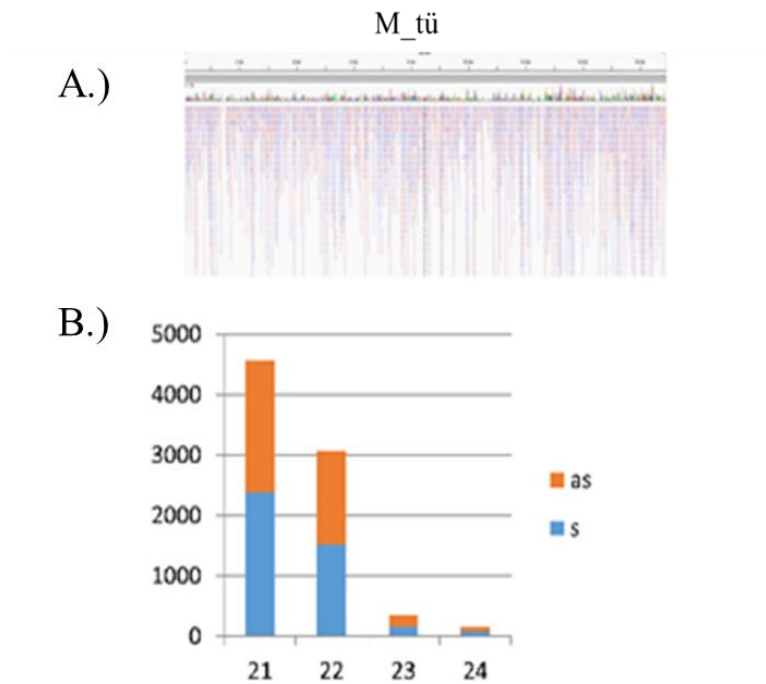
A kis RNS-ek méreteloszlását tekintve a 21 nukleotid hosszúságú kis RNS-ek voltak jelen a legnagyobb mennyiségben (13/B.ábra).



13. ábra Pannónia fajta kis RNS könyvtárak virológiai elemzése

A.) A Pannónia fajta izolátorházából és törzsültetvényből készített kis RNS könyvtárak CVA referencia genomra illeszkedő kis RNS-einek lefedettsége. B.) Pannónia kis RNS könyvtárak CVA referencia genomra illeszkedő kis RNS-einek méreteloszlása. s: sense, pozitív szálra illeszkedő kis RNS-ek, as: antisense, negatív szálra illeszkedő kis RNS-ek

A Magyar kajszi törzsültetvényből (M_tü) készített könyvtárból kimutattuk a LChV-1 és a PPV jelenlétét is (4. táblázat). A kmer13 (2 kontig), kmer15 (22 kontig) és kmer17 (2 kontig) beállítások mellett kaptunk kontig találatokat a LChV-1-re (4. táblázat). Az illeszkedő readok vizsgálatával 6028 nem redundáns, 771 normalizált redundáns readet kaptunk, melyek 91,2 %-ban fedték le a referencia genomot (NC_001836.1)(14/A.ábra). A kis RNS-ek méreteloszlását vizsgálva a 21 nukleotid hosszúságúak voltak jelen a legnagyobb mennyiségben (14/B. ábra).



14. ábra Magyar kajszai fajta kis RNS könyvtárak virológiai elemzése

A.) A Magyar kajszai fajta törzsültetvényéből azonosított LChV-1 referencia genomra illeszkedő kis RNS-ek lefedettsége. B.) A Magyar kajszai fajta törzsültetvényéből azonosított LChV-1 referencia genomra illeszkedő kis RNS-ek és méreteloszlása. s: sense, pozitív szárra illeszkedő kis RNS-ek, as: antisense, negatív szárra illeszkedő kis RNS-ek.

A P_tü és a Ligeti óriás törzsültetvényéből (LO_tü) is kaptunk küszöb értéket meghaladó nem redundáns read számot, a LO_tü esetében is 200 feletti normalizált redundáns read számot a LChV-1-re, azonban a readok lefedettsége nem érte el a 40%-ot, továbbá egyik kmer értékkel sem kaptunk kontig találatot (4. táblázat).

A PPV-re mindhárom kmer beállítással (kmer13:11, kmer15:67, kmer17: 50) kaptunk kontig találatokat a Magyar kajszai fajta esetében (4.táblázat). A M_tü könyvtárból 9325 nem redundáns és 1925 normalizált PPV referencia genomra (NC_001445.1) illeszkedő readet azonosítottunk. A LO_tü könyvtár vizsgálata során is kimutattuk a PPV jelenlétét, kmer13 és kmer15 beállítások mellett 9 és 5 PPV referencia genomra illeszkedő kontigot kaptunk. 1542 nem redundáns és 216 normalizált PPV-re illeszkedő readet kaptunk a könyvtár elemzése során, melyek 78%-ban illeszkedtek a referencia genomra.

4.4. Őszibarack fajták kis RNS HTS-sel megállapított vírusfertőzöttsége

Az őszibarack könyvtárak bioinformatikai elemzése során kimutattuk a PaLV, NSPaV, PPV vírusokat és a PLMVd viroidot (5. táblázat).

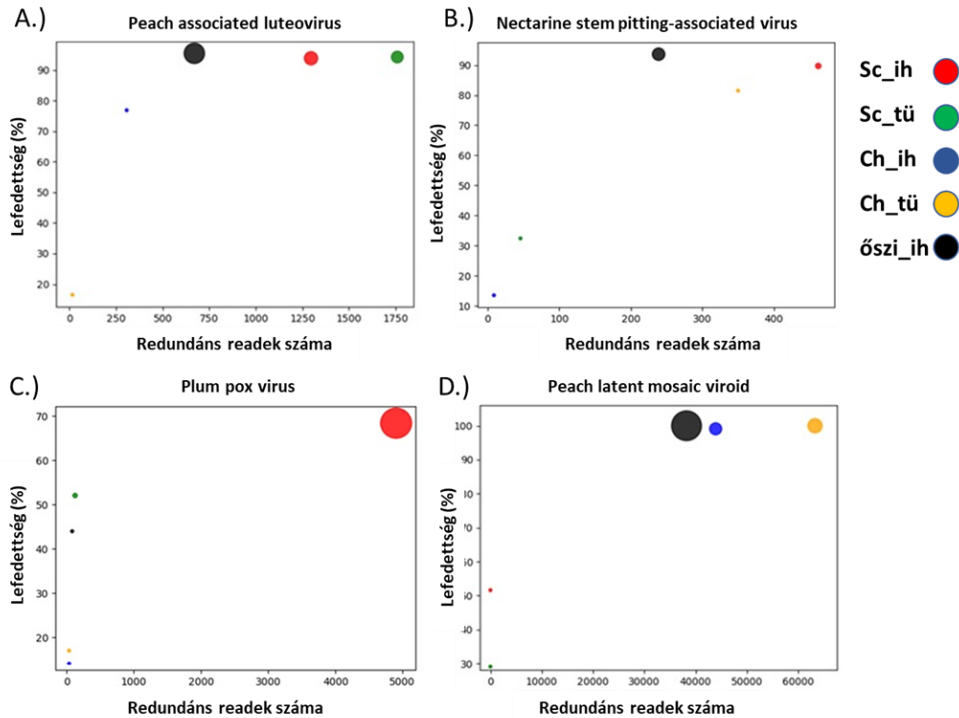
A PaLV-t azonosítottuk a Springcrest izolátorházból és törzsületevényből (Sc_ih, Sc_tü), a Cresthaven törzsületevényből (Ch_tü) készített könyvtárakból, valamint az őszibarack izolátorház 10 fajtájából készített könyvtárból (őszi_ih). Három könyvtár esetében tapasztaltuk PaLV-re illeszthető kontigok jelenlétét (Sc_ih: 17 kontig, Sc_tü: 13, őszi_ih: 41), a Cr_ih könyvtárból viszont nem kaptunk kontig találatot, annak ellenére, hogy 1012 nem redundáns és 307 normalizált redundáns readet kaptunk (15/A. ábra), melyek 76,9%-os lefedettséget mutattak (16/C. ábra). Az Sc_Ih esetében 2368 nem redundáns és 1296 normalizált redundáns PaLV referencia genomra (NC_034970.1) illeszkedő readet találtunk (5.táblázat), melyek 93,9%-ban fedték le a referencia genomot (16/A. ábra). A Sc_tü esetében 2547 nem redundáns és 1759 normalizált redundáns PaLV specifikus readet kaptunk (5. táblázat), melyek 94,3%-os lefedettséget mutattak (16/B. ábra).

5. táblázat Őszibarack kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése

Kis RNS könyvtár neve	Bioinformatikai elemzés	Vírusok				Viroidok
		PPV	NSPaV	PaLV	ChaLV	PLMVd
1_Sc_ih	vírus/viroid specifikus kontig (db)	94	2	17	0	0
	nem redundáns read (db)	3867	1353	2368	677	17
	redundáns*	4908	462	1296	197	3
	lefedettség %	68,3	89,7	93,9	48,3	51,6
2_Sc_tü	vírus/viroid specifikus kontig (db)	1	0	13	1	0
	nem redundáns read (db)	637	166	2547	714	6
	redundáns*	122	46	1759	312	1
	lefedettség %	52,0	32,4	94,3	51,2	29,1
3_Ch_ih	vírus/viroid specifikus kontig (db)	0	0	0	0	14
	nem redundáns read (db)	102	56	1012	244	2817
	redundáns*	34	9	307	47	43915
	lefedettség %	14,2	13,5	76,9	29,4	99,1
4_Ch_tü	vírus/viroid specifikus kontig (db)	0	0	0	0	20
	nem redundáns read (db)	143	1291	95	66	3586
	redundáns*	33	350	16	14	63289
	lefedettség %	17,1	81,5	16,5	12,1	100
5_őszi_ih	vírus/viroid specifikus kontig (db)	0	16	41	1	89
	nem redundáns read (db)	509	1627	3076	848	5462
	redundáns*	79	239	670	125	38197
	lefedettség %	43,9	93,6	98,5	61,1	100

Szürke jelöléssel a kontig találatokat, kékkel a küszöbérték feletti illeszkedő readek számát, valamint a lefedettséget jelöltük. Redundáns*: normalizált redundáns readek száma (redundáns read szám /1000000)

Az őszi_ih könyvtárból is kimutattuk a PaLV-t, 3076 nem redundáns és 670 normalizált redundáns illeszkedő readet találtunk (5. táblázat), melyek 98,5%-ban lefedték a referencia genomot (16/D. ábra).



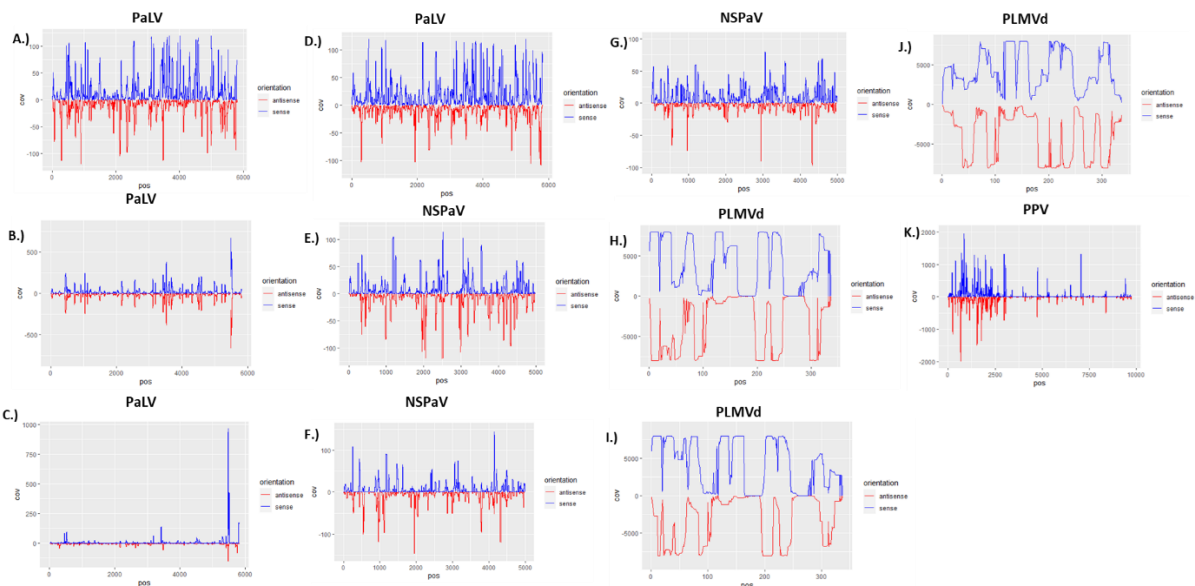
15. ábra Őszibarack kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzése.

Az adott vírusra, viroidra illeszkedő normalizált redundáns readszámokat ábrázoltuk a lefedettség függvényében. A kontig találatok darabszámát a pontok átmérőjének arányában ábrázoltuk. Kis RNS könyvtárak: Sc_ih: Springcrest izolátorház, Sc_tü: Springcrest törzsültetvény, Ch_ih: Cresthaven izolátorház, Ch_tü: Cresthaven törzsültetvény, őszi_ih: ősziarack izolátorház

Azokban a könyvtárakban (Sc_ih, Sc_tü, Ch_tü, őszi_ih), melyekből kimutattuk a PaLV-t, találatot kaptunk a ChaLV vírusra is, a Sc_tü és az őszi_ih könyvtárakból pedig még 1-1 ChaLV-re illeszkedő kontigot is találtunk (5. táblázat). A kontig egyezés, a küszöbérték feletti nem redundáns, normalizált redundáns read számok és lefedettségi értékek ellenére feltételezzük, hogy a ChaLV-re illeszkedő readek és kontigok a PaLV-vel való közeli filogenetikai rokonság eredményeképpen adtak találatot a ChaLV vírusra.

Az NSPaV vírus jelenlétét kimutattuk az Sp_ih, Ch_tü és az őszi_ih könyvtárakból, kontig találatot azonban csak a SC_ih (2 kontig) és az őszi_ih (16 kontig) könyvtárakban figyeltünk meg (5. táblázat, 15/B.ábra). A Sc_ih könyvtárból 1353 nem redundáns és 462 normalizált redundáns readet (89,7% lefedettséggel) (16/E. ábra), az őszi_ih könyvtárból pedig 1627 nem redundáns és 239 normalizált redundáns NSPaV jelenlétére utaló readet (93,6% lefedettséggel) mutattunk ki (16/G. ábra). Annak ellenére, hogy a Ch_tü könyvtár elemzése

során nem találtunk NSPaV specifikus kontigot, 1291 nem redundáns és 350 normalizált redundáns read illeszkedett a referencia genomra (NC_027211.1) 81,5%-os lefedettséggel (16/F. ábra).



16. ábra Sense és antisense kis RNS readek eloszlása

PaLV, NSPaV, PPV és PLMVd referencia genomra illesztett kis RNS readek eloszlása. Kékkel a pozitív, pirossal a negatív számról keletkezett kis RNS-ek darabszáma látható a függőleges tengely mentén, a vízszintes tengelyen a referencia genom hosszát tüntettem fel. A: Sc_ih, B: Sc_tü, C: Ch_ih, D: őszi_ih, E: Sc_ih, F: Ch_tü, G: őszi_ih, H: Ch_ih, I: Ch_tü, J: őszi_ih, K: Sc_ih

A Sc_ih és Sc_tü könyvtárakban találtunk PPV fertőzésre utaló kontigokat (Sc_ih: 94 kontig, Sc_tü: 1 kontig). A Sc_ih esetében sokkal magasabb nem redundáns (3867 db) és normalizált redundáns read (4908 db) számokat figyeltünk meg, mint a Sc_tü esetében (nem redundáns read szám: 637, normalizált redundáns read szám: küszöbérték alatti) (15/C. ábra), valamint a readok lefedettsége is 16%-kal magasabb volt a Sc_ih könyvtárban (16/K. ábra).

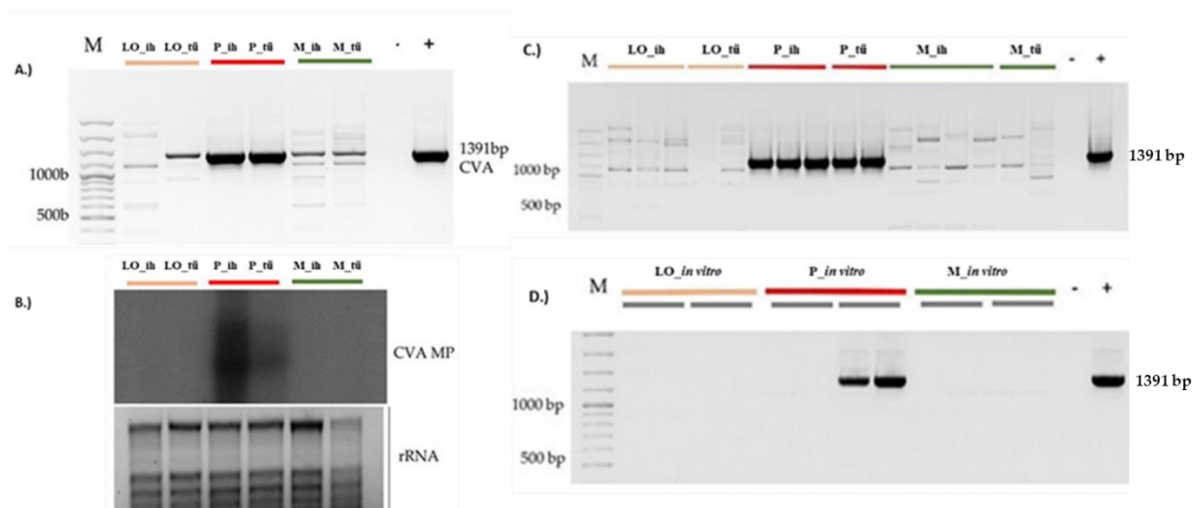
A Ch_ih, Ch_tü és őszi_ih könyvtárak elemzése során kimutattuk a PLMVd-t (15/D. ábra). Mindhárom könyvtárnál találtunk a viroid genomra (NC_003636.1) illeszkedő kontigokat (Ch_ih: 14, Ch_tü: 20, őszi_ih: 89), valamint magas nem-redundáns (Ch_ih: 2817, Ch_tü: 3586, őszi_ih: 5462) és normalizált redundáns read számokat (Ch_ih: 43915, Ch_tü: 63289, őszi_ih: 38197), melyek Ch_ih esetében 99,1%-ban (16/H. ábra), Ch_tü és őszi_ih esetében pedig teljesen lefedték a referencia genomot (16/I/J. ábra) (5. táblázat).

4.5. A kajszi barack fajta kis RNS HTS-sel kapott eredményeinek visszaigazolása molekuláris biológiai módszerekkel

A kis RNS könyvtárakhoz használt egyedek RNS-kivonataiból, illetve az egyedi RNS-ek keverékeiből reverz transzkripcióval szintetizált cDNS-t felhasználva vírus specifikus PCR-rel validáltuk a kis RNS könyvtárak vírusdiagnosztikai elemzése során kapott vírusok előfordulását.

4.5.1. A CVA előfordulásának visszaigazolása

A CVA vírust a Pannónia fajta izolátorházból és törzsültetvényből készített kis RNS könyvtárból (P_{ih} és P_{tü}) mutattuk ki bioinformatikai vizsgálatokkal, melyek verifikáláshoz a vírus feltételezett mozgási fehérjét kódoló régiójára tervezett primerpár segítségével RT-PCR-t végeztünk. A könyvtárkészítéshez használt RNS keverékek közül a P_{ih} és a P_{tü} mintákból kimutatható volt a CVA RT-PCR-rel (17/A. ábra). Northern-blot vizsgálattal is alátámasztottuk a fertőzést a Pannónia izolátorházból és a törzsültetvényből származó mintakeverékek esetében (17/B. ábra). A Pannónia fajta pooljait alkotó egyedek RT-PCR vizsgálata során mind az izolátorház (3/3), mind pedig a törzsültetvény (2/2) minden egyedénél CVA fertőzést tapasztaltunk (17/C. ábra). A fertőzés forrásának felderítése érdekében a vírusmentesítés során létrehozott *in vitro* kajszi vonalak RNS kivonatait RT-PCR-rel tesztelve 4 *in vitro* Pannónia *in vitro* növényből 2 esetben kimutatható volt a CVA (17/D. ábra).

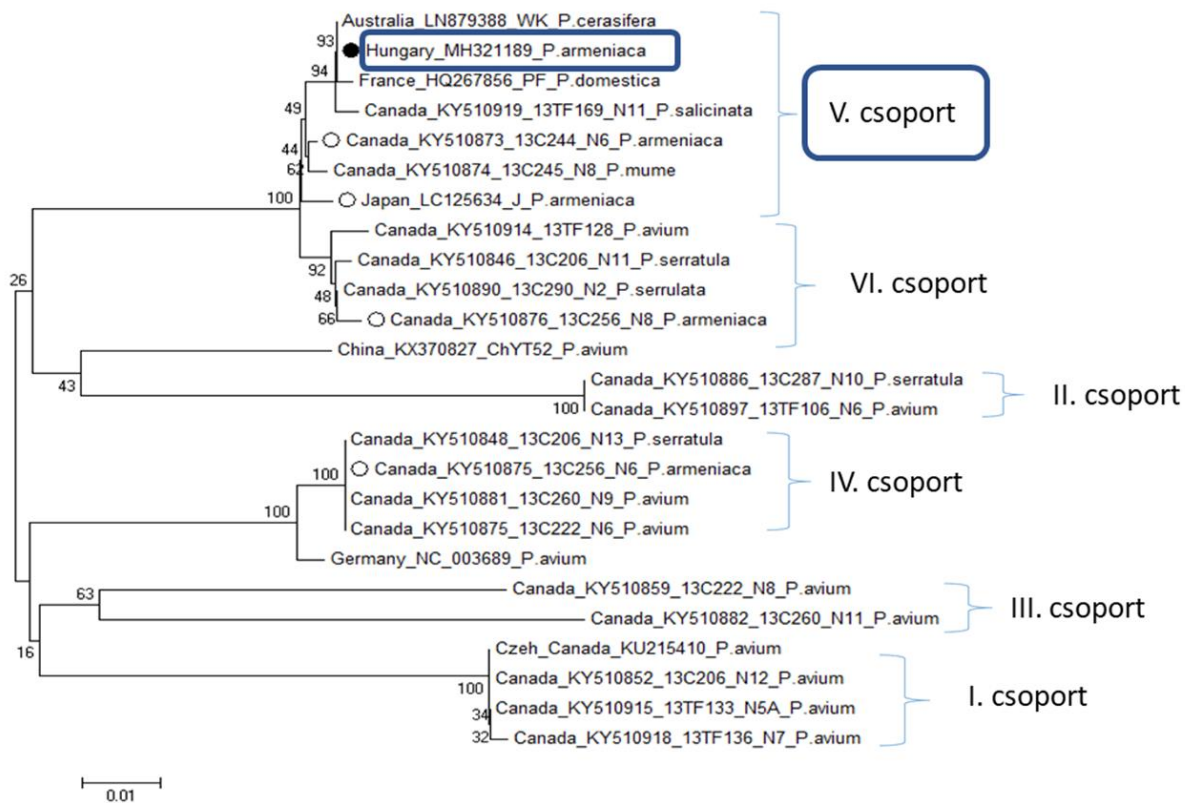


17. ábra A CVA jelenlétének visszaigazolása

A Ligeti óriás, Pannónia és Magyar kajszi fajták izolátorházából, törzsültetvényből származó minták keverékeinek CVA fertőzöttségét RT-PCR-rel igazoltuk vissza a CVA mozgási fehérjéjére (MP) tervezett primerek segítségével (A). A CVA jelenlétét Northern-blottal is vizsgáltuk, loading kontrollként riboszómális RNS-ek (rRNS) láthatók (B). A keverékekhez felhasznált egyedek kivonatainak CVA fertőzöttségét (C) és a kajszi fajták *in vitro* szövettényesztett vonalainak mintáit is teszteltük CVA-ra RT-PCR-rel (D).

4.5.2. Kajsziarackból azonosított CVA variáns filogenetikai vizsgálata

A Pannónia fajta izolátorházából származó egyedéből izolált CVA mozgási fehérjét kódoló régióját klónoztuk, és nukleotid sorrendjét Sanger-szekvenálással határoztuk meg. A klónozott vírus szekvenciákat feltöltöttük a GenBank adatbázisba (M3. melléklet). A filogenetikai elemzés során a kajsziról származó CVA klón szekvencia (MH321189) a nem cseresznye gazdanövényről származó izolátumokkal együtt klaszterizálódott (5.csoport), valamint közeli rokonságot mutatott kanadai, illetve japán kajsziarack gazdanövényből izolált CVA szekvenciákkal (18. ábra). A kajszi gazdanövény eredetű CVA szekvenciák páronkénti illesztése a kanadai 13C256_N6 izolátum kivételével (92%) jelentős homológiát mutattak (98-99%).

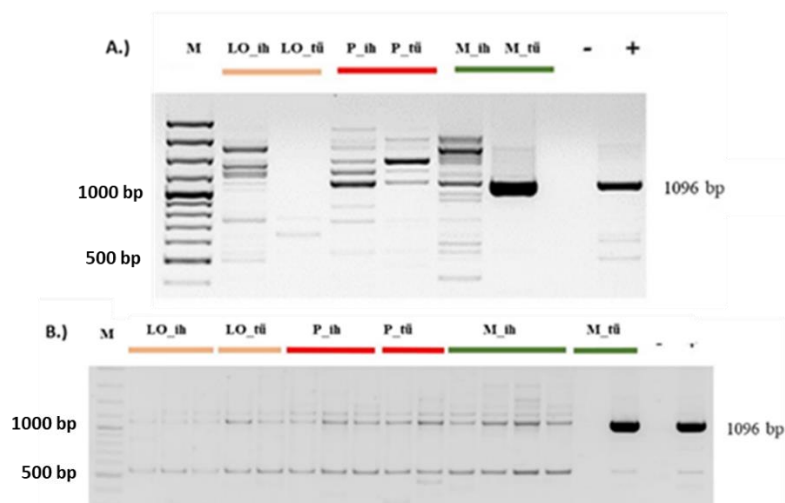


18. ábra CVA filogenetikai vizsgálata

A fekete körrel jelölt magyar CVA izolátum a filogenetikai fán az V. csoportba tartozó szekvenciákkal mutatott közeli rokonságot. Üres körrel jelöltük a kajszi gazdanövényről származó CVA szekvenciákat.

4.5.3. A LChV-1 jelenlétének visszaigazolása

A kis RNS könyvtárak vizsgálata során a Magyar kajszi törzsültetvényből kimutattuk a LChV-1 vírus jelenlétét. A vírus köpenyfehérjét kódoló szakaszának amplifikálására tervezett primerekkel végzett PCR pozitív reakciót adott a törzsültetvényről származó Magyar kajszi egyedek keverékének esetében, míg az izolátorházból származó minta nem mutatott LChV-1 fertőzést (19/A. ábra). A mintakeverék egyedeinek PCR-vizsgálata során a két szabadföldi minta közül csak az egyik esetében tapasztaltunk LChV-1 fertőzést (19/B. ábra). A Ligeti óriás, Pannónia, Magyar kajszi fajták szaporítóanyagának előállítását alapjául szolgáló *in vitro* vonalak vizsgálata során sem detektáltunk LChV-1 vírus fertőzést.



19. ábra LChV-1 fertőzés igazolása RT-PCR-rel

Ligeti óriás, Pannónia és Magyar kajszi fajták izolátorházából, törzsültetvényből származó minták keverékeinek (A) és a keverékeket alkotó egyedek (B) LChV-1 fertőzöttségének vizsgálata RT-PCR-rel.

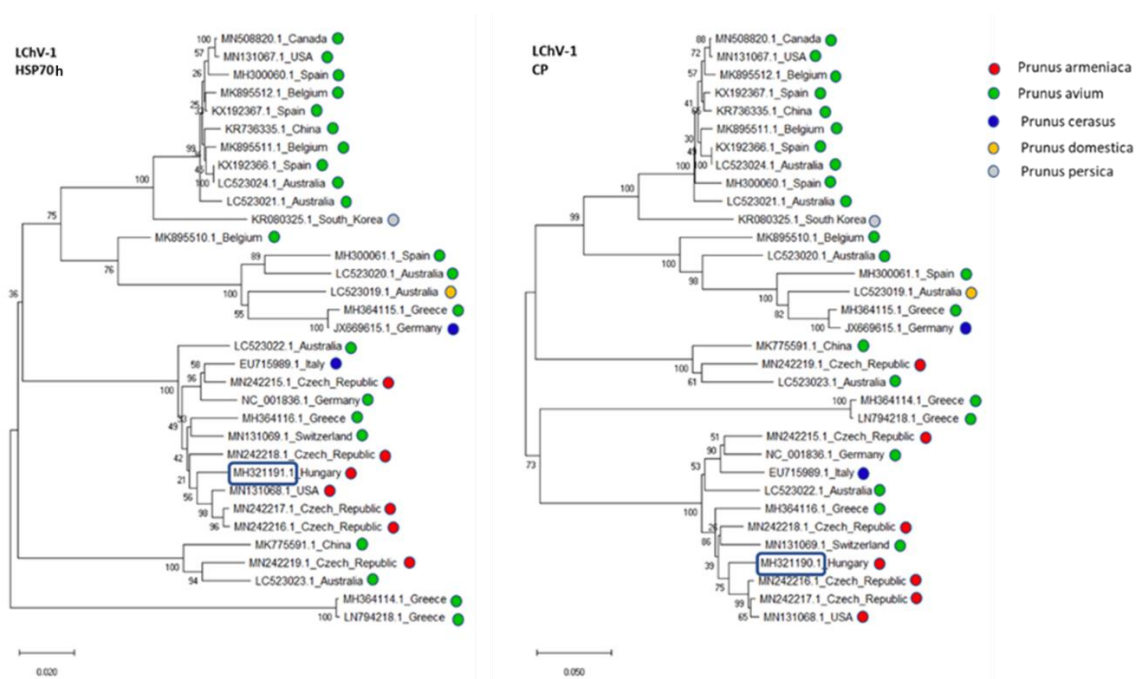
4.5.4 A Magyar kajszi fajtában azonosított LChV-1 filogenetikai vizsgálata

A LChV-1 köpenyfehérjét (CP) és a HSP70h fehérjét kódoló régiójának filogenetikai vizsgálata során a Magyar kajszi törzsültetvényből származó LChV-1 variáns szekvenciát cseresznye (*Prunus avium*), meggy (*Prunus cerasus*), szilva (*Prunus domestica*), kajszi (*Prunus armeniaca*) és őszibarack (*Prunus persica*) gazdanövényről származó LChV-1 izolátumokkal hasonlítottuk össze (20. ábra). A Magyar kajszi LChV-1 klón közeli rokonságot mutatott a Kwanzan satnyulás szindrómáért (Kwanzan stunt disease) felelős Olaszországból, meggy gazdanövényről izolált LChV-1 szekvenciával (EU715989).

A variáns azonosításakor az adatbázisban nem szerepelt kajsziarackot fertőző LChV-1 szekvencia. Azóta több szekvencia információval rendelkezünk kajsziarackot fertőző LChV-1 variánsokról, melyek vizsgálatával megállapítható, hogy a kajszi gazdanövényről származó amerikai és cseh izolátumok közeli rokonságot mutatnak a magyar LChV-1 szekvenciával, viszont a csoporthoz nem kizárólag kajszi, hanem meggy és cseresznye gazdanövényről származó LChV-1 szekvenciák is tartoznak. A Magyar kajszi törzsültetvényről származó izolátum CP és HSP70h szekvenciák nagymértékű homológiát mutattak a magyar nemesítésű, Csehországból származó Madarska (MN242217.1) és Magyar kajszi (MN242216.1) fajtákból izolált LChV-1-el, valamint együtt klaszterizálódott a Marlen (MN242218.1) és VP-LE-12/6 (MN242215.1) fajtákkal (20. ábra). A HSP70h gén tekintetében

a cseh Magyar kajszi (96,61%), a CP esetében a Madarska fajtával (96,69%) tapasztaltuk a legnagyobb szekvencia egyezést.

A cseh Velkopavlovicka kajszi fajtáról izolált LChV-1 szekvencia (MN24219.1) külön klaszterizálódott a többi kajsziarackból izolált LChV-1-től. A Magyarországról származó LChV-1-gyel összehasonlítva a CP génre nézve csak 74,49%, HSP70h kódoló régióval összevetve pedig 78,89% egyezést kaptunk.

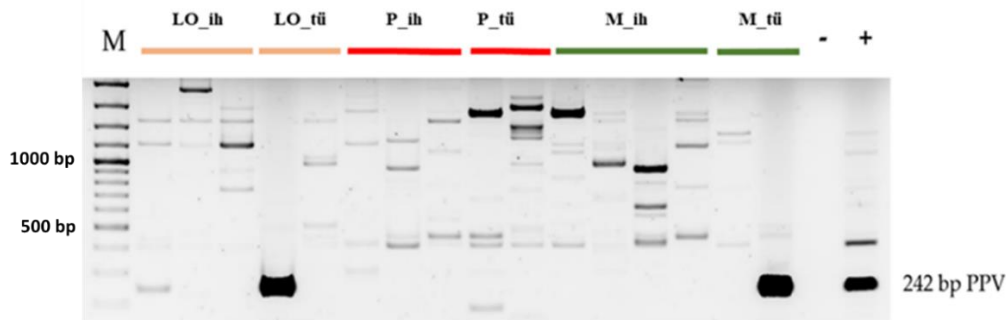


20. ábra LChV-1 filogenetikai vizsgálata

Összevetettük a Magyar kajsziáról származó LChV-1 CP és HSP70h kódoló régiók szekvenciáját az adatbankban található csonthéjas növényekről származó LChV-1 szekvenciákkal.

4.5.5. A PPV jelenlétének visszaigazolása

RT-PCR-rel megerősítettük a Ligeti óriás és a Magyar kajszi törzsültetvényből a PPV jelenlétét, azonban az izolátorházból nem volt kimutatható sem a Ligeti óriás, sem a Magyar kajszi fajták egyedeiből (21. ábra). A Ligeti óriás és a Magyar kajszi esetében a 2-2 vizsgált egyedből csak 1-1 esetben detektáltuk a vírust, a Magyar kajszi esetében a PPV mellett LChV-1 fertőzést is kimutattunk.



21. ábra A kajszi fajtákban talált PPV fertőzés RT-PCR visszaigazolása

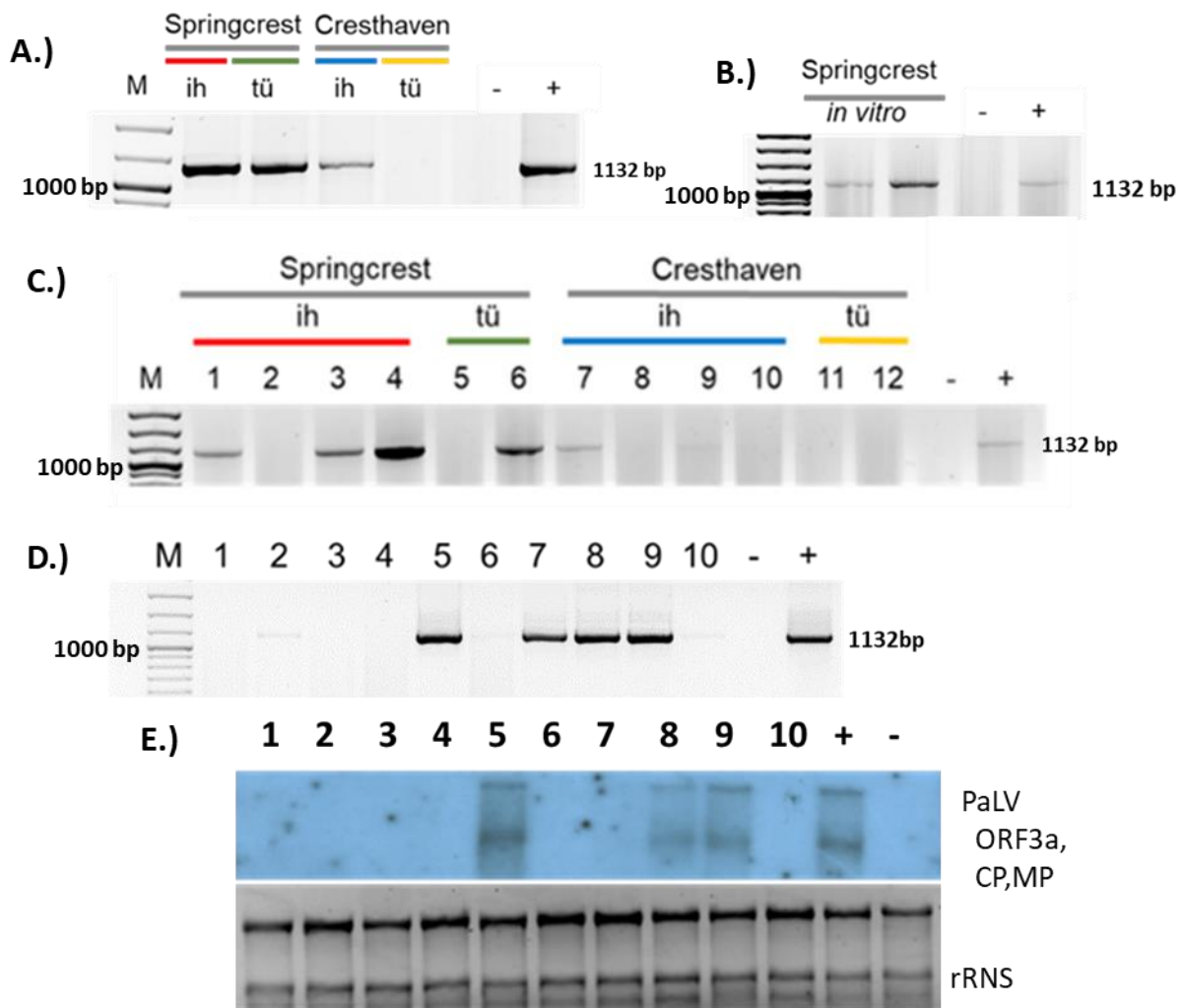
A kajsziarack egyedek vizsgálata során a Ligeti óriás, és a Magyar kajszi fajták törzsültetvényeiből, 1-1 egyed esetében detektáltunk PPV fertőzést.

4.6. Az őszibarack fajták HTS-sel kapott eredményeinek visszaigazolása molekuláris biológiai módszerekkel

Az őszibarack könyvtárak bioinformatikai vizsgálata során azonosítottuk a PaLV, NSPaV, PPV vírusok és a PLMVd viroid előfordulását. A kis RNS HTS diagnosztikai vizsgálattal kapott eredmények visszaigazolását RT-PCR-rel, illetve Northern blot vizsgálattal erősítettük meg. A vírusok/viroid Sanger-szekvenálásához a vírusok/viroid amplifikált régióját klónoztuk. A kapott szekvenciákat feltöltöttük a GenBank adatbázisba (M4. melléklet).

4.6.1. A PaLV jelenlétének visszaigazolása

A PaLV molekuláris biológiai validálásához RT-PCR reakció során a vírus 1132 bp hosszú régióját amplifikáltuk, mely a vírus ORF3a, köpenyfehérjéjét és mozgási fehérjéjét kódoló géneket fedi le. A Springcrest fajta izolátorházából és törzsültetvényéből, Cresthaven fajta esetében pedig az izolátorházából készített mintakeverékéből igazoltuk vissza a PaLV fertőzést (22/A. ábra).



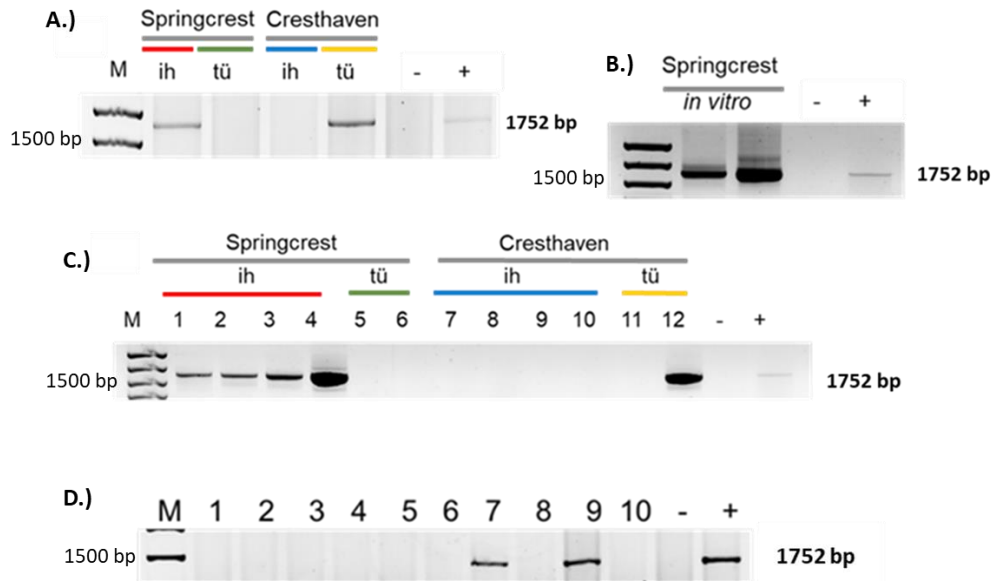
22. ábra PaLV jelenlétének visszaigazolása

RT-PCR-rel visszaigazoltuk a Springcrest izolátorházból, törzsültetvényből, és a Cresthaven izolátorház mintakeverékekből a PaLV jelenlétét (A). A vizsgált Springcrest *in vitro* egyedek mindkét esetben fertőzöttek voltak (B). A PaLV fertőzött poolok egyedei közül nem minden esetben volt kimutatható a vírus (C). Az izolátorház 10 fajtájából 4 esetben mutattuk ki a PaLV-t RT-PCR-rel (D) és Northern-blottal (E). A számok a következő őszibarack fajtákat jelölik: 1: Flavortop, 2: Nektár, 3: Venus, 4: Incrocio Pieri, 5: Cresthaven, 6: Redhaven, 7: Champion, 8: Suncrest, 9: Aranycsillag, 10: Apolka. A Northern-blothoz a próbát a PaLV ORF3a, köpenyfehérjét (CP) és mozgási fehérjét (MP) kódoló régióra terveztük.

A Springcrest izolátorházból készített keverék egyedeinél 4-ből 3 esetben, a törzsültetvény esetében a két egyed közül csak egy esetben, mutattuk ki a fertőzést (22/C. ábra). A Springcrest *in vitro* növények tesztelése során mindkét vizsgált egyednél kimutattuk a PaLV-t (22/B. ábra). A Cresthaven izolátorházban található egyedei között 2 esetben kaptunk pozitív találatot. Az izolátorház 10 fajtáját reprezentáló keverék 10 egyede közül a Cresthaven, Champion, Suncrest és Aranycsillag fajtákból kaptunk uPCR terméket (22/D. ábra), amit Northern blottal is megerősítettünk (22/E. ábra). A Northern-blot vizsgálatokhoz készített próbát is az ORF3a, CP és MP kódoló régiókra terveztük.

4.6.2 Az NSPaV jelenlétének visszaigazolása

A HTS-sel diagnosztizált NSPaV vírust RT-PCR-rel igazoltuk vissza. A reakció során a vírus 1752 bp hosszúságú, köpenyfehérjét és a read-through fehérjét kódoló régióját amplifikáltuk.



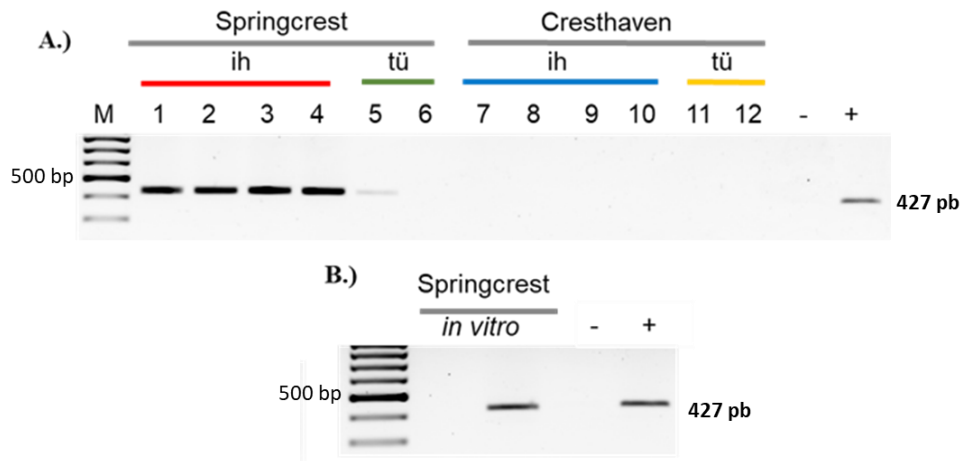
23. ábra NSPaV fertőzés visszaigazolása

RT-PCR-rel visszaigazoltuk a Springcrest izolátorházból és Cresthaven törzsültetvényből az NSPaV jelenlétét (A). A Springcrest fajta *in vitro* növényeiből is kimutatható volt a vírus (B). A Sc_ih pool minden egyede fertőzöttek voltak (C). Az izolátorház 10 fajtája közül 2 fajta esetében kaptunk PCR-terméket NSPaV vírusra (D). A számok a következő őszibarack fajtákat jelölik: 1: Flavortop, 2: Nektár, 3: Venus, 4: Incrocio Piere, 5: Cresthaven, 6: Redhaven, 7: Champion, 8: Suncrest, 9: Aranycsillag, 10: Apolka (D).

A kis RNS könyvtárakhoz készített keverékek közül a Springcrest izolátorházból és a Cresthaven törzsültetvényből származó mintákból mutattunk ki NSPaV-t (23/A. ábra). A Springcrest izolátorház mintakeverék mind a 4 egyede fertőzött volt, míg a Cresthaven törzsültetvény pool egyedei közül csak egy esetben detektáltuk a vírust (23/C. ábra). A Springcrest fajta *in vitro* egyedeinek tesztelése során mindkét esetben kimutatható az NSPaV (23/B. ábra). Az izolátorház 10 fajtája közül Champion és Aranycsillag esetében kaptunk PCR-terméket NSPaV vírusra (23/D. ábra).

4.6.3 A PPV jelenlétének visszaigazolása

A Springcrest fajta izolátorházából és törzsültetvényéből készített könyvtárakból kaptunk kontig találatot a bioinformatikai elemzés során PPV-re, melyet RT-PCR-rel visszaigazoltunk a vírus köpenyfehérjét kódoló szakaszát amplifikáló primerek segítségével.



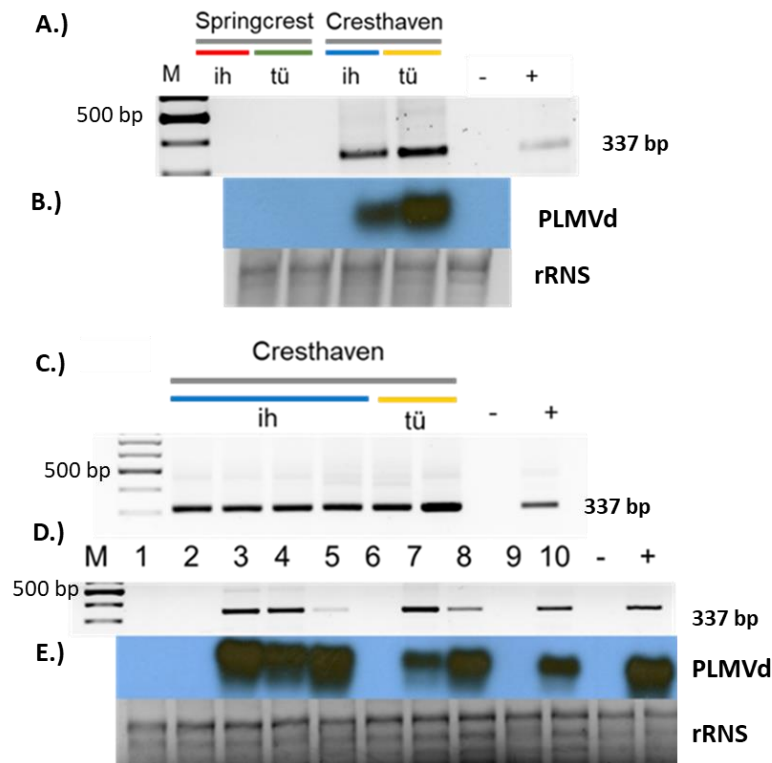
24. ábra PPV jelenlétének visszaigazolása

RT-PCR-rel visszaigazoltuk a PPV jelenlétét Springcrest izolátorházból, törzsültetvényből származó mintákból (A), valamint *in vitro* Springcrest mintákból is egy esetben (B).

A Springcrest izolátorház összes vizsgált egyede, míg a törzsültetvény esetében csak 1 egyed mutatott pozitív PCR reakciót (24/A. ábra). A két Springcrest *in vitro* növény vizsgálata során 1 esetben kimutattuk a PPV vírust (24/B. ábra). A GenBank szekvenciáival összehasonlítva 99%-os homológiát mutatott az M törzsbe tartozó izolátummal (M92280.1). A referencia genommal (NC_001445.1) 96%-os nukleinsav és 99%-os aminosav egyezést kaptunk.

4.6.4 A PLMVd jelenlétének visszaigazolása

A PLMVd jelenlétét visszaigazoltuk RT-PCR-rel (25/A. ábra) és Northern blot analízissel a Cresthaven izolátorházból, törzsültetvényből származó egyedek keverékeiből (25/B. ábra). A Cresthaven mintakeverékek minden egyede PLMVd fertőzöttséget mutatott (25/C. ábra). Az őszibarack izolátorház 10 fajtáját reprezentáló keverék RT-PCR (25/D. ábra) és Northern-blot vizsgálata alapján 6 (Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Champion, Suncrest és Apolka) fajta mutatott PLMVd fertőzést (25/E. ábra).

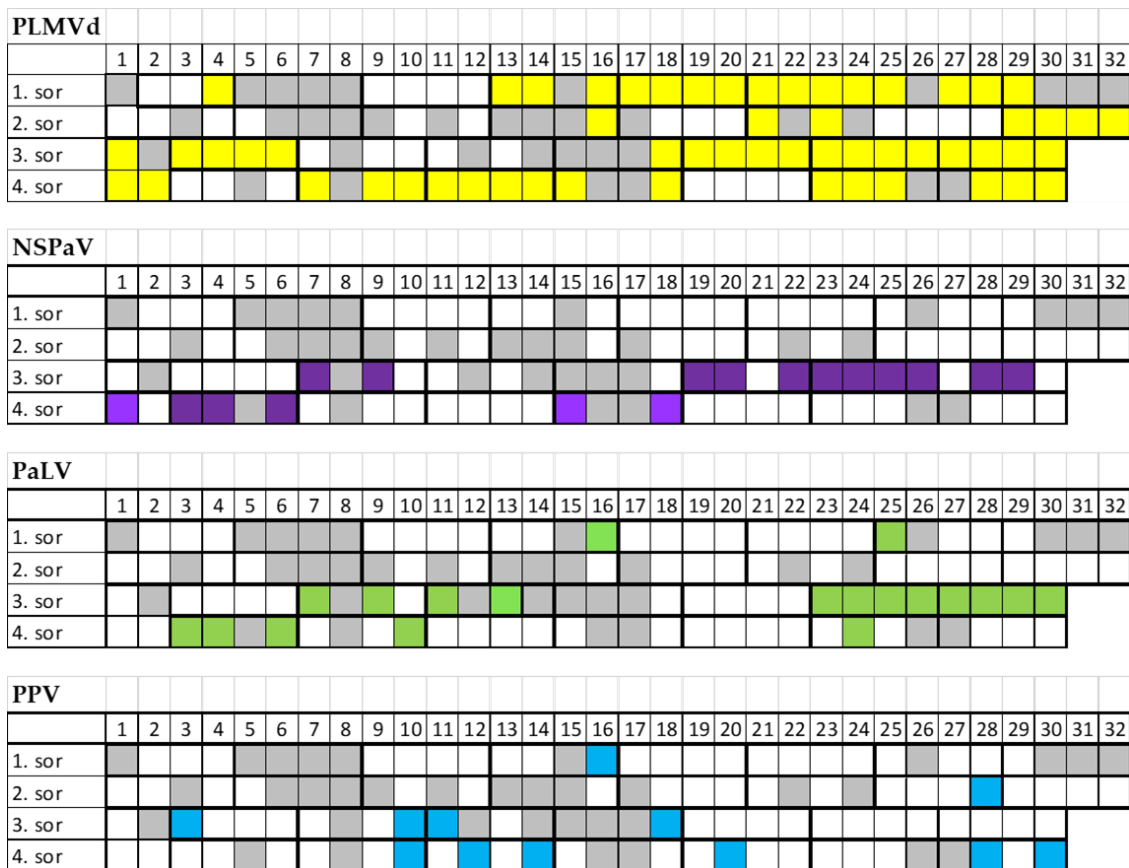


25. ábra A PLMVd fertőzés visszaigazolása

Visszaigazoltuk a Cresthaven izolátorházból és törzsültetvényből a PLMVd jelenlétét RT-PCR-rel (A) és Northern-blottal (B). A Cresthaven keverékek minden egyede viroid fertőzöttséget mutatott (C). Az őszibarack izolátorház 10 fajtáját reprezentáló keverékből 6 esetben mutattuk ki a PLMVd-t RT-PCR-rel (D) és Northern-blottal (E). A Northern-blotthoz tervezett próbát a PLMVd genomra terveztük. rRNS: riboszómális RNS. A számok a következő őszibarack fajtákat jelölik: 1: Flavortop, 2: Nektár, 3: Venus, 4: Incrocio Pieri, 5: Cresthaven, 6: Redhaven, 7: Champion, 8: Suncrest, 9: Aranycsillag, 10: Apolka.

4.6.5 A Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet őszibarack izolátorházának virológiai felmérése

Az őszibarack izolátorházban vizsgálataink során jelentős mértékű fapusztulást (28%) tapasztaltunk. Az izolátorház virológiai státuszának meghatározása érdekében az őszibarack mintákban kis RNS könyvtárak HTS vizsgálatokkal detektált vírusok jelenlétét RT-PCR-rel vizsgáltuk az izolátorház egyedeiben (26. ábra). Az izolátorház 89 egyedéből 65 (73%) fa esetében detektáltunk vírus/viroid fertőzést, 15 fában PPV-t, 19 fánál PaLV-t, 17 egyedben NSPaV-t, 15 esetben PPV-t és 59 fában PLMVd-t mutattunk ki. A PLMVd előfordulása az izolátorház soraiban egyenletesen oszlott el, mind a 4 sorban jelentős a PLMVd fertőzöttség volt megfigyelhető, ezzel szemben az NSPaV és PaLV fertőzöttség az izolátorház 3. és 4. sorában volt a legjelentősebb mértékű.



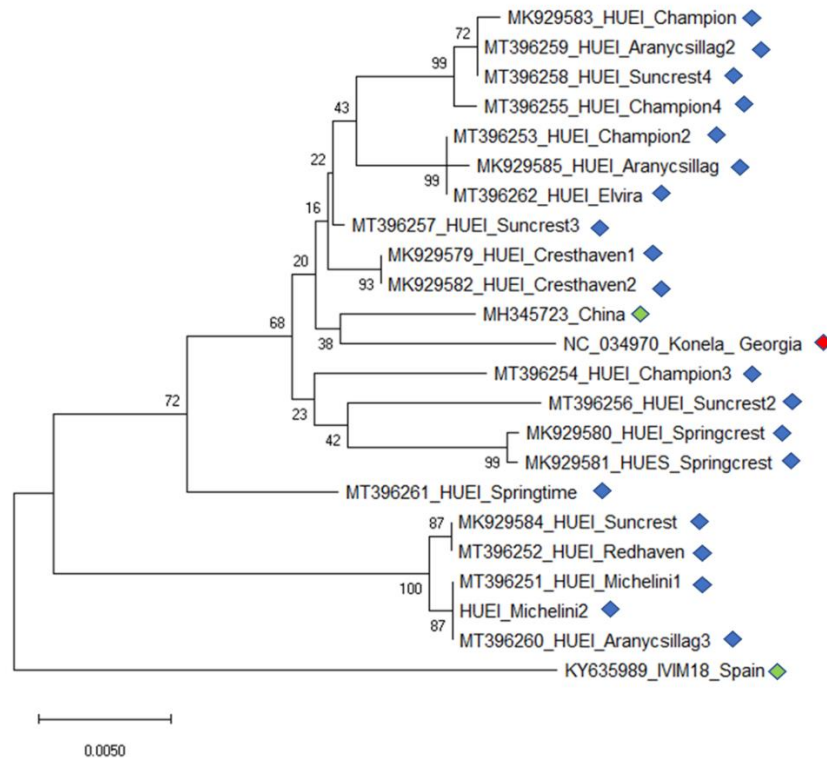
26. ábra Az ősziabarack izolátorház virológiai felmérése

PLMVd esetében Northern-blottal (sárga), NSPaV (lila), PaLV (zöld) és PPV (kék) RT-PCR-rel mértük fel az izolátorház egyedeinek vírus/viroid fertőzöttségének mértékét. Az elpusztult egyedeket szürke négyzetekkel jelöltük.

4.6.6 Az ősziabarack fajtákban azonosított PaLV variánsok filogenetikai vizsgálata

Az izolátorház vírusdiagnosztikai vizsgálatát követően több ősziabarack fajta egyedeiből is kimutattuk a PaLV-t. A Champion, Aranycsillag, Suncrest, Elvira, Springtime, Springcrest, Redhaven, Michelin fajtákból mutattuk ki a PaLV vírust, majd a PCR-termékeket klónoztuk és szekvenáltattuk. A filogenetikai vizsgálat során a PaLV-vel közeli rokonságot mutató ChaLV vírustól elkülönültek a PaLV szekvenciák, csak 81% homológiát mutattak a vizsgált génszakaszra nézve (ORF3a, CP, MP). A GenBank adatbázisban található szekvenciákat összevetve a klón szekvenciákat 96 - 100 % közötti hasonlósági értékeket kaptunk. A spanyol IVIM18 PaLV izolátum (KY635989) különült el leginkább a filogenetikai a fán, 96% egyezést mutatott az adatbanki és az izolátorházból azonosított PaLV variánsok szekvenciáival. A Grúziából és Kínából származó PaLV szekvenciák együtt klaszterizálódtak (27. ábra). A legközelebbi rokonságot a Cresthaven1,2 (MK929579, MK929582) és a Suncrest3 (MT396257) szekvenciáknál figyeltük meg. Egyes fajták esetében megfigyeltük, hogy az adott

fajta egyedeiből izolált PaLV szekvenciák együtt klaszterizálódnak (Michelini, Springcrest, Cresthaven), míg más esetekben az egyedeknél nem tapasztaltunk fajta szerinti szeparációt a filogenetikai fán.

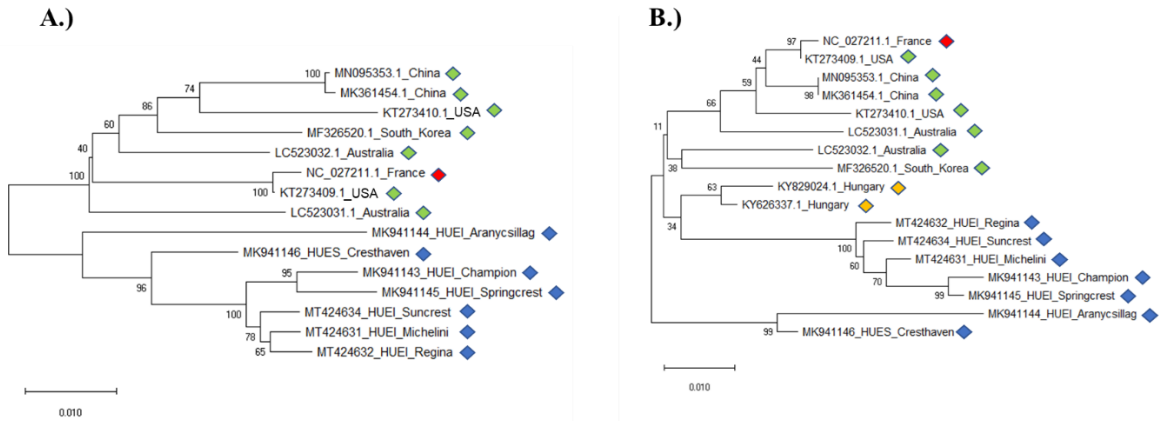


27. ábra PaLV filogenetikai elemzése

Kékkel jelöltük az izolátorházból származó PaLV szekvenciákat, pirossal a referencia genomot, zölddel az adatbankból származó PaLV szekvenciákat.

4.6.7. Az őszibarack fajtákban azonosított NSPaV variánsok filogenetikai vizsgálata

Az NSPaV köpenyfehérjéjét kódoló 1752 nukleotid hosszúságú klónozott szekvenciáit összevetve a GenBank adatbázis szekvenciáival az érdi NSPaV szekvenciák elkülönülten klaszterizálódtak a filogenetikai fán. Az adatbankból származó szekvenciák alapján nem következtethetünk az NSPaV vírus fertőzés forrására (28/A. ábra). A 411 bp hosszúságú részlegesen köpenyfehérjéjét kódoló szekvenciák elemzése során a Szobról származó szekvenciákat (KY829024.1, KY626337.1) (Krizbai et al., 2017) összehasonlítottuk az érdi mintákból izolált NSPaV szekvenciákkal (28/B. ábra). Az magyar (érdi és a szobi) NSPaV szekvenciák monofiletikus csoportot alkottak, kivéve az Aranycsillag (MK941144) és a Cresthaven (MK941146) fajtákból izolált NSPaV szekvenciák.

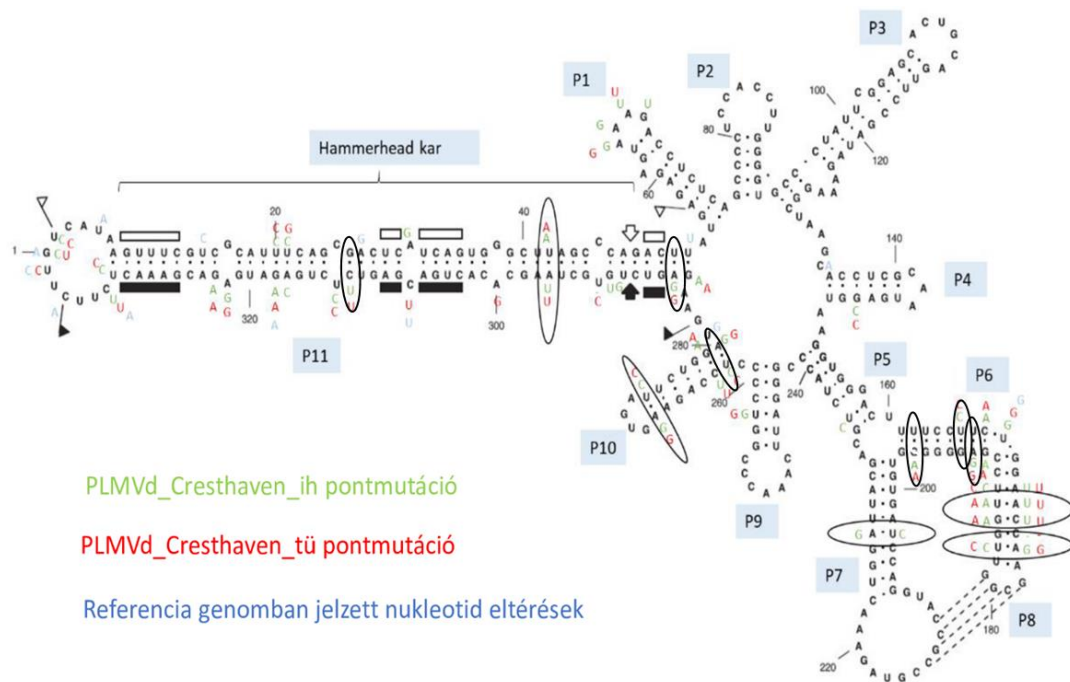


28. ábra NSPaV filogenetikai elemzése

Filogenetikai vizsgálatokkal hasonlítottuk össze az érdről származó 1752 nt hosszúságú NSPaV szekvenciákat a GenBank-ben található NSPaV szekvenciákkal (A), továbbá rövidebb, 411 bp hosszúságúra vágott szekvenciák alapján is készítettünk filogenetikai fát, hogy a GenBank Magyarországról származó szekvenciáival is összevethessük az érdi NSPaV mintákat (B). Kékkel jelöltük az izolátorházból származó NSPaV szekvenciákat, pirossal a referencia genomot, zölddel az adatbankból származó, narancssárgával pedig a korábban Magyarországról publikált szekvenciákat.

4.6.8. Az őszibarack fajtáiban azonosított PLMVd térszerkezeti vizsgálata

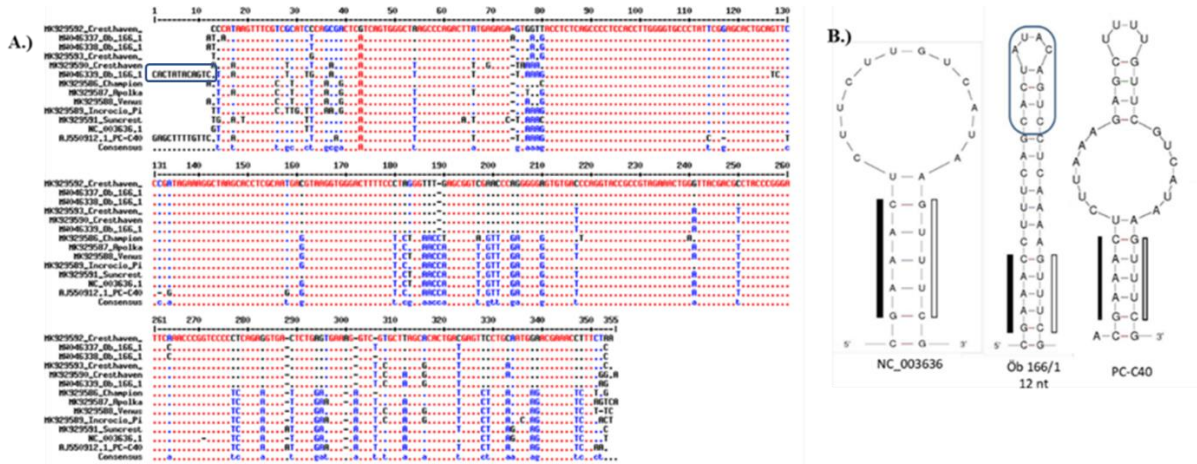
A PLMVd egyszálú, cirkuláris RNS molekulája erős másodlagos szerkezettel rendelkezik. Az egymással szemben elhelyezkedő nukleotidok bázispárosodással elágazó duplaszálú karokat formálnak, melyek hurkokban végződnek (29. ábra). A Cresthaven izolátorházból és törzsültetvényéből származó PLMVd klónok (MK929592, MK929593) szekvenciájában előforduló pontmutációkat a referencia genom szerkezeti ábrájára illesztve azt tapasztaltuk, hogy a pontmutációk jelentős része a kihurkolódott szerkezeti elemekben található, melyek a molekula stabilitásának fenntartásában nem rendelkeznek jelentős szereppel. Ezzel szemben a kivágódásért felelős hammerhead doménekben nem figyeltünk meg SNP-eket. A viroid duplaszálú karjain azonosítottunk olyan pontmutáció párokat, melyek továbbra is képesek egymással bázispárosodásra, nem eredményeznek változást a viroidra jellemző másodlagos szerkezetben. 11 pontmutáció párt figyeltünk meg a PLMVd klónokban, melyek közül 3 Wobble bázispárosodással (G-U) kapcsolódott egymással (29. ábra).



29. ábra PLMVd pontmutációk elhelyezkedése

Zöld színnel jelöltük a Cresthaven izolátorházból, pirossal a törzsültetvényből származó pontmutációkat a PLMVd térszerkezetére illesztve. A bekarikázott pontmutáció párok esetében továbbra is megmarad a bázispárosodás az egymással szemben elhelyezkedő nukleotidok között (Motard et al., 2008 alapján módosított ábra).

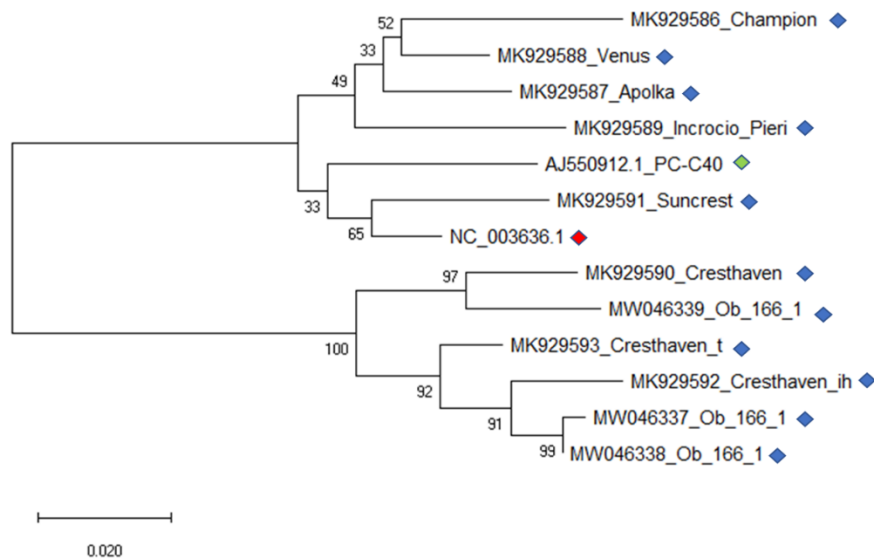
A kis RNS HTS során a referencia genomra illeszkedő readok vizsgálatával számos pontmutációt azonosítottunk. Az izolátorházban előforduló PLMVd genetikai variabilitásának felmérése érdekében PCR-termék szekvenálást végeztünk azokból az őszibarack fajtákból (Venus, Andosa, Maria Bianca, Fantasia, Baladin, Early Redhaven, Springtime, Öb 166/1, Elvira, Starking Delicios), melyek között volt elpusztult egyed, az élő egyedeiből pedig kimutattuk PLMVd fertőzést. A PLMVd szekvenciákban jelentős genetikai heterogenitást tapasztaltunk, egyes egyedeken belül is számos viroid variáns volt megfigyelhető. A legszembetűnőbb mutációt, egy 12 nukleotid hosszúságú inzerciót az Öb166/1 fajtából izolált PLMVd szekvenciában azonosítottuk (30/A. ábra). Az inzerció egy kihurkolódó régiót képez a hammerhead kar terminális végén. Az inzerció pozícióját tekintve megegyezett a peach calico fenotípus kialakításában fontos szerepet játszó mutációval (AJ550912.1 - PC-C40), az inzerciók szekvenciájában azonban nem tapasztaltunk homológiát (30/B. ábra). Az inzerció szerkezetét tekintve jelentős változást okoz a terminális hurokban, ugyanis 7-tel több nukleotid képes kapcsolódni a vele szemben elhelyezkedő komplementer nukleotiddal, valamint a PC-C40 PLMVd variánshoz képest is egy zártabb térszerkezetet hoz létre.



30. ábra PLMVd mutációk

A.) A PLMVd klónokban számos mutáció megfigyelhető, ugyanakkor konzervatív szakaszokon (melyek a viroid replikációjához és stabilitásának fenntartásához szükségesek) nem láthatók SNP-k. B.) Az Öb 166/1 fajtaban detektált 12 nt hosszúságú PLMVd inzerció pozícióját tekintve megegyezik a PC-C40 variánsal, de szekvenciájában attól eltér, ezért eltérő tészerkezetet is eredményez. Az A.) és a B.) ábrán is kék keretben jelöltem az inzerciót a PLMVd szekvenciájában.

A kis RNS könyvtárak készítéséhez felhasznált őszibarack fajták egyedeiből a PLMVd PCR-termékeket klónoztuk és Sanger szekvenálást végeztünk, hogy filogenetikai elemzést végezhessünk a fajták 1-1 viroid variánsát reprezentáló szekvenciákból. A filogenetikai fán látható, hogy a Cresthaven és az Öb fajtákból származó viroid szekvenciák elkülönülten csoportosulnak a Champion, Venus, Apolka, Incrocio Pieri és Suncrest fajtáktól. A két vizsgált inzerció mutáns, a peach calico fenotípust okozó PC-C40 és az Öb166/1 fajtaból származó PLMVd is külön klaszterizálódott (31. ábra).

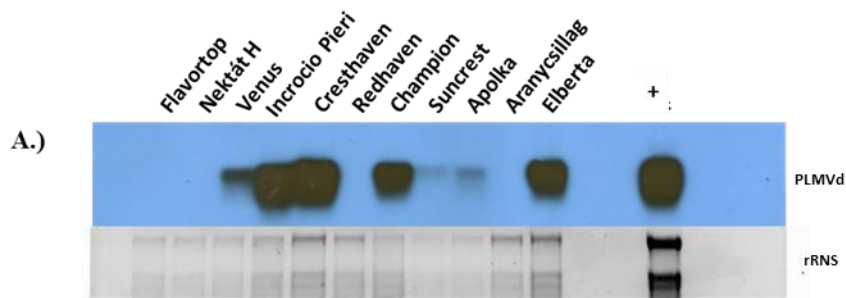


31. ábra PLMVd filogenetikai elemzése

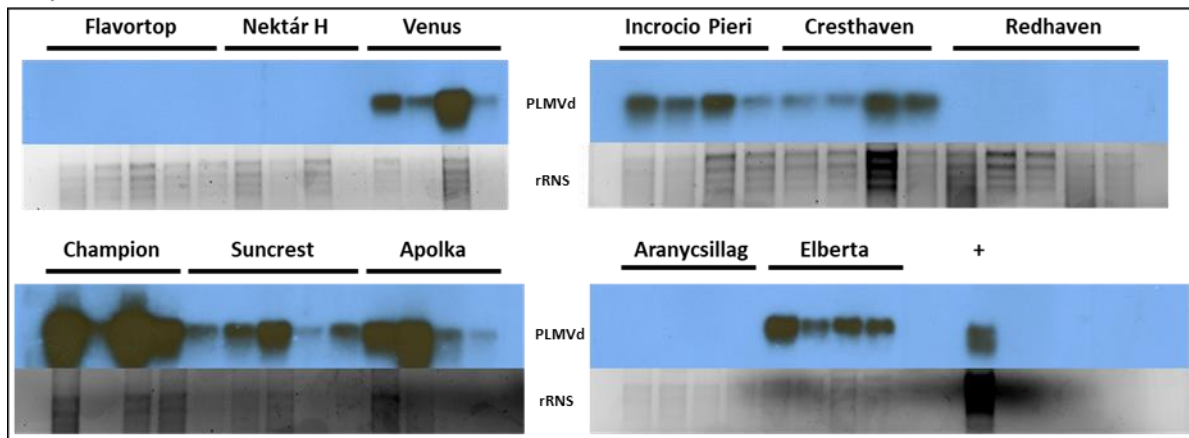
A PLMVd szekvenciák rokonsági viszonyainak vizsgálata során az érdi őszibarackokból izolált PLMVd szekvenciákat hasonlítottuk össze egymással, illetve a piros színnel jelölt referencia genommal (NC_003636.1) és a zölddel jelölt peach calico fenotípust okozó PC-C40 (AJ550912.1) izolátummal.

4.6.9. A PLMVd jelenlétének bioteszt vizsgálata GF305 indikátornövényen

Az őszibarack izolátorház 11 fajtájának (Flavortop, Nektár H, Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Redhaven, Champion, Suncrest, Apolka, Aranycsillag, Elberta) egy-egy egyedét a NÉBIH Veleencei Virologiai Laboratóriumban bioteszttel vizsgálták a 2016-2019 közötti időszakban. Az őszibarack szabadföldi virológiai vizsgálatához a Kwanzan, GF31 mirabolán hibrid és GF305 indikátorokat használnak, melyek 4-5 egyedére végeznek szemzést a vizsgálati fajtából. A PLMVd hatóságilag vizsgálatköteles kórokozónak minősül, bioteszt vizsgálatokon a GF305 indikátornövény alkalmas a viroid tünet alapú diagnosztikájára. Az indikátorok bonitálását (tünet alapú vizsgálatát) a szemzéstől számított 3 év leteltével végzik. A vizsgált fák esetében nem voltak láthatóak a viroid jelenlétére utaló tünetek, annak ellenére, hogy a teszten lévő anyafák keverékéből kimutattuk HTS-sel a PLMVd-t, továbbá a mintakeverék 6 fajtájából RT-PCR-rel és Northern-blottal is megerősítettük a jelenlétét (25/D. ábra). A bioteszttel vizsgált GF305 indikátornövényekből gyűjtött minták RNS-eiből a szemzett fajták szerint készítettünk keverékeket, majd Northern-blot vizsgálatot végeztünk PLMVd-re specifikus radioaktív DNS-próbával, hogy igazoljuk a viroid transzmisszióját. A Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Champion, Suncrest és Apolka fajtákkal szemzett indikátorokból, valamint a HTS vizsgálatokban nem szereplő, viszont szintén az érdi őszibarack izolátorházból származó Elberta fajtával szemzett GF305 indikátorból is kimutattuk a PLMVd transzmisszióját (32/A. ábra). Továbbiakban vizsgáltuk, hogy a különböző őszibarack fajtákkal szemzett indikátorokból készített keverék egyedei milyen mértékű viroid fertőzöttséget mutatnak (32/B. ábra). A Northern-blot vizsgálatokból látható, hogy a viroid fertőzött fajták szemzésével a GF305 indikátorok mindegyikébe átjutott a PLMVd.



B.)



32. ábra PLMVd transzmisszió vizsgálat

Az érdi izolátorház 11 anyanövényével szemzett GF305 indikátorából készített mintakeverékek Northern-blot vizsgálatával igazoltuk a PLMVd transzmisszióját (A). A mintakeverékek egyedeit is vizsgáltuk, hogy meghatározzuk, milyen arányban jut át a viroid fertőzés a vizsgálati fajtáról az indikátor növénybe (B). A Northern-blotthoz tervezett próbát a PLMVd genomra terveztük. rRNS: riboszómális RNS.

4.7. Új tudományos eredmények

1. A kis RNS HTS alapú szekvenálás bioinformatikai elemzését, valamint az eredmények visszaigazolását követően megállapítottam, hogy a kis RNS HTS hatékony vírusdiagnosztikai módszer a kajszi- és őszibarack minták esetében is.
2. Kajszi- és őszibarack minták vizsgálata során kimutattam a CVA és LChV-1 vírusokat, melyek magyarországi előfordulásáról eddig nem rendelkezünk ismeretekkel. A LChV-1 fertőzést kajszi- és őszibarack gazdanövényről az elsők között írtuk le.
3. Őszibarack minták elemzése során először mutattam ki a PLMVd és a PaLV jelenlétét hazánkban.
4. A kajszi és őszibarack izolátorházban nevelt egyedek vizsgálata során kimutattam a CVA, LChV-1, PaLV, NSPaV és PLMVd kórokozókat, amely alapján fertőzött szaporítóanyaggal történő fertőzésre következtethetünk.
5. Az őszibarack izolátorházban megfigyelt jelentős fapusztulás okának vizsgálatakor megállapítottam, hogy nagymértékű PLMVd fertőzés önmagában nem tehető felelőssé az izolátorházban tapasztalt fapusztulásért.

5. Következtetések és javaslatok

A gyümölcsfa ültetvények viromjának HTS alapú vizsgálataival lehetőség adódik új kórokozók leírására (Bag et al., 2015), vagy adott gazdanövényen (Šafářová et al., 2016), illetve adott földrajzi területen ismeretlen vírusok kimutatására (Sorrentino et al., 2018). A vírusoktól/viroidoktól mentes ültetvények létrehozásához a szaporítóanyag patogénmentesítése, és annak diagnosztikai nyomonkövetése elengedhetetlen a hosszú élettartamú ültetvények létrehozásához. A szaporítóanyag előállításához az izolátorházak anyafáit ezért a 14/2017. (III.23.) FM rendeletben előírt vírusokra/viroidokra kötelező tesztelni. Azonban a szaporítóanyag globális kereskedelme, valamint a klímaváltozás hatására megjelenő új rovar vektorok kedveznek a vírusok/viroidok terjedésének. Az adott területen, vagy gazdanövényen újonnan megjelenő vírusok/viroidok érintettek lehetnek bizonyos tünetek kialakulásában, vagy fertőzésük következtében fogékonyabbá tehetik a gazdanövényt más vírusok fertőzésére, ezáltal súlyosabb tünetek megjelenését idézhetik elő.

A különböző szekvenálási technikák fejlődésének, valamint a vizsgálatok költségeinek csökkenésének köszönhetően egyre nagyobb teret hódítanak a metagenom szintű diagnosztikai eljárások. A HTS technológiák egyre növekvő népszerűsége ellenére Magyarországon fásszárú, mezőgazdaságilag jelentős növényeken kevés metagenomikai eredmény áll rendelkezésünkre, hazánkban szőlő (Czotter et al., 2018) és őszibarack (Krizbai et al., 2017) mintákból végeztek HTS vizsgálatokat. Mivel nem rendelkezünk növényvédelmi technológiával a vírusok/viroidok fertőzésével szemben, ezért az izolátorházak virológiai felmérése kulcsfontosságú szereppel bír a szaporítóanyag előállítás tekintetében. A NAIK Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet Elvira majorban található kajszi és őszibarack izolátorházaiból, törzsültetvényeiből végeztünk kis RNS HTS vizsgálatokat, hogy meghatározzuk a vizsgált fajták viromját. A csoportunk által optimalizált fásszárú növények kis RNS HTS-alapú vírusdiagnosztikai protokollját sikeresen alkalmaztuk kajszi és őszibarack minták virológiai vizsgálatához.

5.1. Kajsziarack vírusdiagnosztikai következtetések

Az 5 kajsziarack könyvtár kis RNS HTS vizsgálata során kimutattuk a CVA, a LChV-1 és a PPV vírusok jelenlétét. A CVA specifikus kis RNS readok méreteloszlását tekintve túlnyomó többségben 21 nukleotid hosszúságúakat azonosítottunk, míg a LChV-1 esetében a

21 nukleotid hosszúsági kis RNS-ek mellett a 22 nukleotid hosszúságú kis RNS-ek is jelentős mértékben képződtek a DCL2/4 enzimek hasításának eredményeképp (Parent et al., 2012).

A kis RNS HTS vizsgálatok során találatot kaptunk a CVA vírusra a Pannónia fajta izolátorházból (P_{ih}) és törzsültetvényből (P_{tü}), LChV-1 vírusra pedig a Magyar kajszi törzsültetvényből (M_{tü}) készített könyvtárakból. A P_{ih} és P_{tü} könyvtárakból visszaigazoltuk a CVA-t RT-PCR-rel és Northern-blottal, M_k könyvtárból pedig a LChV-1-et RT-PCR-rel. A könyvtárak elemzése során kaptunk küszöbértéket meghaladó LChV-1 genomra illeszkedő nem redundáns és redundáns readeket a Ligeti óriás törzsültetvényből (LO_{tü}) és a P_{tü} könyvtárakból is, azonban RT-PCR-rel nem tudtuk visszaigazolni a LChV-1 a könyvtárak készítéséhez felhasznált RNS keverékből. A kajszi barack HTS vizsgálatoknál alkalmazott protokoll esetében akkor kaptunk megbízható, RT-PCR-rel visszaigazolható vírus találatot, amennyiben a meghatározott küszöb értékeknek nem csak a vírusra illeszkedő readek darabszáma felelt meg, hanem kaptunk kontig találatot és 40% feletti lefedettségi értéket is. Ezen eredményeink alapján a CVA és a LChV-1 magyarországi előfordulását elsőként írtuk le, a LChV-1 fertőzést kajszi barack gazdanövényen az elsők között detektáltuk (Šafářová et al., 2017, Baráth et al., 2018). A HTS technológiák előnyei ellenére hazánkban a vírusdiagnosztikai vizsgálatok többségét ELISA-val, RT-PCR-rel és biotesztekkel végzik, melyek ismeretlen vírusok detektálását nem teszik lehetővé. A vírusok azonosításához specifikus tünetek kialakulása nyújthat segítséget, azonban a CVA eddigi ismeretek alapján látens fertőzést okoz, de a LChV-1 is sokszor tünetmentes fertőzéshez vezet, ezáltal a gyümölcsfák fertőzöttségének mértéke jóval magasabb lehet. Egy japán felmérés során a vizsgált fák 92%-a CVA fertőzöttséget mutatott (Isogai et al., 2004).

A CVA fertőzés vélhetőleg szaporítóanyagon keresztül történő fertőzéssel mehetett végbe, mivel nem csak a szabadföldi P_{tü}, hanem az izolátorházból származó P_{ih} poolból is kimutattuk, továbbá 2 minta esetében az *in vitro* növényekből is. A P_{tü} és P_{ih} mintakeverékek egyedeinek vizsgálata során minden egyed CVA fertőzöttnek bizonyult, ami a vírus nagy mértékű virulenciájának tulajdonítható (Gao et al., 2017). A Magyar kajszi fajta esetében nem szaporítóanyagon keresztül történő fertőzésre következtethetünk, ugyanis az izolátorházból nem, csak a törzsültetvényből készített poolból mutattuk ki a LChV-1 vírust, valamint az *in vitro* növényekből sem detektáltuk a jelenlétét. A mintakeverék egyedeinek vizsgálatával pedig csak egy esetben tapasztaltunk LChV-1 fertőzést. Az ültetvényen található LChV-1 fertőzésre fogékony cseresznye és meggy gyümölcsfák, melyekről feltételezhetően metszéssel, vagy eddig azonosítatlan vektor szervezetten keresztül juthatott át a vírus a Magyar kajszi fajtára.

Magyarországon a 14/2017. (III.23.) FM rendelet értelmében a CVA nem tartozik a hatóságilag vizsgálatköteles vírusok közé. A CVA eddigi ismereteink alapján látens fertőzést eredményez, ugyanakkor nem tisztázott a szerepe más vírusokkal történő koinfekció esetében, a gazdanövény élettartamára gyakorolt hatása, továbbá az sem, hogy a CVA fertőzés milyen hatást fejt ki a gazdanövényre biotikus és abiotikus stressz esetén. A CVA fertőzés hatására bekövetkező növényélettani változások megismerése szükséges, hiszen világszerte elterjedt, széles gazdakörrel és magas fertőzési rátával rendelkezik (Gao et al., 2017). A 14/2017.(III.23) FM rendelet szerint a LChV-1 vizsgálatköteles kórokozónak minősül cseresznye és meggy gazdanövényen, a kajszibarack azonban nem áll hatósági kontroll alatt. A LChV-1 fertőzést kajszibarackból csak 2017-ben írták le, ezért kártételéről kajszibarackon még nem rendelkezünk ismeretekkel (Šafářová et al., 2020).

A CVA és a LChV-1 szekvenciák filogenetikai elemzésével a vírusok gazdanövényhez való adaptációjára következtethetünk. A vizsgált szekvenciák homológiáját nagyobb mértékben befolyásolta a vírus gazdanövénye, mint az izolátum származási helye. A CVA mozgási fehérjét kódoló gén klónozott szekvenciájának filogenetikai vizsgálata során a Pannónia fajtáról származó CVA izolátum az V. csoportba klaszterizálódott, ahova a nem cseresznye gazdanövényről származó izolátumok sorolhatók. Az V. csoportba több kajszibarack gazdanövényből izolált CVA szekvenciával is közeli filogenetikai rokonságot figyeltünk meg.

Az Amerikai Egyesült Államokból és Csehországból származó kajszibarack gazdanövényről izolált LChV-1 szekvenciák többsége nagy mértékű homológiát mutattak a Magyar kajsziról származó izolátummal CP és HSP70h kódoló régiók esetében. A magyar LChV-1 izolátum erős patogenicitással rendelkezhet, ugyanis együtt klasztereződött az olasz ITMAR szekvenciával (EU715989.1), amely a „Kwanzan stunt disease” kórkép kialakításáért felelős, azonban a megbetegítő képességének becslése érdekében más kódoló régiók vizsgálata, köztük az RNS interferencia szuppresszor funkcióval rendelkező p21 is szükséges. A LChV-1 Európa szerte elterjedt kórokozónak tekinthető. Sporadikus előfordulásából adódóan nehéz meghatározni a vírus fertőzésének kiindulási pontjait (Šafářová et al., 2020). A fertőzés forrásának egyértelmű megállapításához a rendelkezésünkre álló adatbanki szekvenciák nem nyújtanak elegendő bizonyítékot. A LChV-1 nagy genetikai variabilitásából adódóan megnehezíti az RT-PCR-rel végzett vírusdiagnosztikai vizsgálatát, a HTS-sel végzett elemzések által azonosíthatók a vírus genomában előforduló mutációk is, ezáltal lehetőség nyílik hatékonyabb diagnosztikai primerek tervezésére is (Katsiani et al., 2018).

A LO_{tü} és a M_k könyvtárakból kimutattuk a PPV jelenlétét. A fertőzött fajták izolátorházból származó egyedeiből nem azonosítottuk a PPV jelenlétét, ezért feltételezéseink szerint nem a szaporítóanyaggal, hanem a szabadföldön történt a fertőződés. A 14/2017. (III.23.) FM rendelet alapján a PPV vizsgálatköteles kórokozó, fertőzése az ültetvényeken jelentős gazdasági károkat okozhat. A M_k RNS keverék egyedei közül abból mutattuk ki a PPV-t, ami LChV-1 fertőzöttséget is mutatott. Későbbi mintavétel alkalmával tapasztaltuk, hogy feltételezhetően a kombinált vírusfertőzésnek köszönhetően a Magyar kajszi fa elpusztult.

5.2. Őszibarack vírusdiagnosztikai következtetések

Munkánk során az 5 őszibarack kis RNS könyvtár HTS vizsgálatával kimutattuk a PaLV, NSPaV, PPV vírusok és a PLMVd viroid jelenlétét. Magyarországon az NSPaV és a PPV előfordulásáról rendelkezünk korábbi ismeretekkel, a PaLV és a PLMVd fertőzését viszont csoportunk írta le először. Az őszibarack kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzését a kajszi könyvtárakkal ellentétben CLC Genomics Workbench szoftverrel végeztük. A bioinformatikai eredmények értékelése során a redundáns és nem-redundáns read szám, lefedettségi érték és kontig találat közül legalább 3 küszöbértéket meghaladó paraméter esetében kaptunk RT-PCR-rel visszaigazolható vírus/viroid találatot. A PaLV-re kaptunk kontig találatokat a Springcrest izolátorházból és törzsültetvényből, valamint a 10 fajtából készített kis RNS könyvtárból. A Cresthaven izolátorházból nem kaptunk kontig találatot, viszont magas PaLV-re illeszkedő reads számokat és lefedettséget tapasztaltunk. A Springcrest fajtából mind az izolátorházból, mind pedig a törzsültetvényből visszaigazoltuk a PaLV-t, kimutattuk az *in vitro* növényekből is ezért szaporítóanyagon keresztül történő fertőzésre következtítettünk. A Cresthaven izolátorház egyedeiből szintén visszaigazoltuk a PaLV-t, azonban a törzsültetvényben található egyedekbe nem jutott át a vírus. A közeli filogenetikai rokonságban álló vírusok vizsgálata során a homológ szekvenciákról keletkező kis RNS-ek, kontigok eredményezhetnek téves vírus találatot, amelyet az illeszkedő readok, kontigok részletesebb elemzésével kiküszöbölhetünk. A PaLV-vel nagymértékű homológiát mutató ChaLV-re kaptunk vírus találatot azokból a könyvtárakból, amelyekből kimutattuk a PaLV-t is, azonban a PaLV-nél kevesebb ChaLV genomra illeszkedő read számot és lefedettséget kaptunk. A ChaLV-re kapott kontig illeszkedett a PaLV referencia genomra is, ezért a ChaLV-t téves vírus találatnak értékeltük.

Az NSPaV fertőzés forrását nem tudtuk egyértelműen meghatározni a Springcrest és Cresthaven fajták kis RNS könyvtárainak elemzése alapján, mert a Springcrest esetében csak

az izolátorházból, Cresthaven fajtából pedig csak a törzsültetvényből mutattuk ki a vírust. A szaporítóanyagokon keresztül történő fertőzést alátámasztja, hogy a Springcrest izolátorházból készített mintakeverék minden egyede fertőzöttnek bizonyult és az *in vitro* növényekből is detektáltuk a vírust, a felvetést viszont nem támasztja alá, hogy a Springcrest törzsültetvény és a Cresthaven izolátorház egyedeiből nem detektáltuk a vírust.

A PaLV és az NSPaV vírusokat csak pár éve azonosították ezért tünetek kialakításában való részvételükről, gazdasági jelentőségükről nem áll rendelkezésre kellő információ. Magyarországon egyik vírus sem tartozik a vizsgálatköteles vírusok közé. Az Amerikai Egyesült Államokban import nektarin fákon törzsgödrösödés tüneteket (Bag et al., 2015), Magyarországon szobi őszibarack ültetvényen intenzív levél sárgulás tüneteket figyeltek meg NSPaV fertőzött fákon (Krizbai et al., 2017). Mindkét esetben HTS-alapú vizsgálatokkal detektálták az NSPaV fertőzést.

A Springcrest izolátorházból és törzsültetvényből, és *in vitro* növényekből detektáltunk a PPV, Cresthaven izolátorházból és törzsültetvényből pedig a PLMVd fertőzést, melyek a 14/2017. (III.23.) FM rendelet értelmében vizsgálatköteles kórokozónak minősülnek. Azáltal, hogy izolátorházból és törzsültetvényből is kimutattuk a kórokozók jelenlétét, szaporítóanyagokon keresztüli fertőződésre következtethetünk. A Cresthaven izolátorházból és törzsültetvényről származó PLMVd-t klónozott szekvenciáinak elemzésével nagy genetikai heterogenitást tapasztaltunk. A PLMVd replikációjában a kloroplasztiszban kódolt DNS-függő RNS polimerázt használja, ami nem rendelkezik hibajavítási mechanizmussal, valamint a DNS helyett a viroid RNS-ét is elfogadja templátként, ezért a PLMVd kiemelkedően magas mutációs rátával rendelkezik (Gago et al., 2009). A nagy mértékű genetikai variabilitás ellenére a replikációban részt vevő hammerhead régiók, valamint a molekula stabilitásában részt vevő P7-P8 karon található szekvenciák konzervatívnak tekinthetők (Flores et al., 2006). A Cresthaven izolátorházból és törzsültetvényből származó szekvenciákat a PLMVd térszerkezetére vetítve 11 pontmutáció párt azonosítottunk, melyek továbbra is képesek voltak bázispárosodásra, ezzel hozzájárulva a viroid stabilitásában jelentős elágazódásokban gazdag konformációjának fenntartásában.

Az őszibarack izolátorházban jelentős fapusztulást tapasztaltunk, ezért a virológiai állapotának átfogóbb vizsgálata érdekében az izolátorház egyedeit RT-PCR-rel teszteltük PaLV, NSPaV és PPV vírusokra, Northern-blottal pedig PLMVd-re. Az izolátorház 89 egyedének 73%-ából kimutattunk vírus/viroid fertőzést. A legnagyobb mértékű fertőzöttséget PLMVd esetében tapasztaltunk (66%), 21%-ban PaLV, 19%-ban NSPaV és 16%-ban PPV jelenlétét határoztuk meg. Az izolátorházban tapasztalt fapusztulás kiváltó okát nem tudtuk

egyértelműen meghatározni, hiszen az elpusztult egyedeket nem tudtuk bevonni a mintavételünkbe, valamint a pusztulást mutató fajták élő egyedeiből számos esetben nem mutattuk ki vírusok/viroid jelenlétét. Az izolátorház fájnak pusztulásában a magas vírus/viroid fertőzöttség ellenére vélhetőleg más patogén kórokozó is szerepet játszhat.

A különböző őszibarack fajtákról származó klónozott vírus és viroid szekvenciákat összehasonlítottuk a GenBank adatbázis szekvenciáival. A filogenetikai elemzés során a PaLV szekvenciák 96-100% egyezést mutattak. Az NSPaV szekvenciák filogenetikai vizsgálatával az Aranycsillag (MK941144) és a Cresthaven (MK941146) szekvenciák kivételével a magyar NSPaV szekvenciák monofiletikus csoportot alkottak. A szobi szabadföldi ültetvényről izolált NSPaV szekvenciákkal is nagymértékű homológiát mutattak az érdi izolátorházból származó NSPaV szekvenciák, ezáltal feltételezhetően közös forrásból történt az NSPaV fertőzés.

A GenBank adatbázisban kevés PaLV és NSPaV szekvencia áll rendelkezésre filogenetikai vizsgálatokhoz. A vírusok variabilitásának, izolátumok homológia viszonyaik későbbi elemzése érdekében a kapott szekvenciákat feltöltöttük a GenBank adatbázisba.

A PLMVd szekvenciák vizsgálata során az Öb166/1 fajtából azonosítottunk egy 12 nukleotid hosszúságú inzerciót, ami lokalizációját tekintve megegyezik a peach calico (PC) fenotípust eredményező inzercióval. A viroid terminális kihurkolódó régiójában található inzerció GF-305 indikátornövényen albinó tünetek megjelenéséhez vezet levélen és a gyümölcsön is. Az inzerciót tartalmazó RNS-ről képződő viroid eredetű kis RNS-ek az RNS interferencia mechanizmusán keresztül képesek a kloroplasztisz biogenezisében fontos szerepet játszó HSP90 mRNS-ének degradációjára (Navarro et al., 2012). Az Öb166/1 klónból azonosított inzerció szekvenciája a PC inzerció szekvenciájával nem mutatott homológiát, ezért a régióról keletkező siRNS-ek nem vezetnek a HSP90 degradációjához, így albinó levéltünetek sem jelentek meg.

Az őszibarack izolátorház 11 fajtája bioteszt vizsgálat alatt áll a NÉBIH Velencei Virológiai Laboratóriumában. A vizsgált fajtákból készített kis RNS könyvtárból kimutattuk a PaLV-t, NSPaV-t és PLMVd-t, viszont az indikátornövényeken nem tapasztaltunk vírus/viroid fertőzésre utaló tüneteket. A PLMVd fertőzés kimutatására a GF305 indikátor alkalmas, a PaLV-re, NSPaV bioteszt detektálására jelenleg nem ismert specifikus indikátornövény. A Northern-blot vizsgálata alapján Venus, Incrocio Pieri, Cresthaven, Champion, Suncrest és Apolka vizsgálati fajtával szemzett GF305 indikátorokból mutattuk ki a PLMVd-t. Vizsgálatunkkal igazoltuk, hogy a viroid képes átjutni a vizsgálati mintáról az indikátornövénybe, mivel mind az izolátorház anyafáiról, mind az indikátornövényből kimutattuk a PLMVd jelenlétét. A PLMVd számos esetben látens fertőzést eredményez, ezért

tünetek hiányában az indikátornövények diagnosztikai alkalmazása téves negatív eredményhez vezethet.

6. Összefoglalás

Magyarországon a kajszi és őszibarack jelentős gazdasági növénynek tekinthető. Az ültetvényeken a vírusok/viroidok fertőzése jelentős termésveszteséget, az elpusztult fák pótlása pedig további járulékos költségeket eredményez. A hosszú élettartamú ültetvények létrehozása érdekében a szaporítóanyag vírusmentesítése, illetve vírusdiagnosztikai vizsgálata kulcsfontosságú szereppel bír.

A metagenomikai vizsgálatok a szerológiai, RT-PCR, illetve hibridizációs technológiákkal szemben képesek a vizsgálati mintában jelen lévő összes kórokozó kimutatására. A metagenomikai eljárások egy speciális változata, a kis RNS-ek szekvenálása hatékonyan alkalmazható vírusok/viroidok diagnosztikai vizsgálatára. A kis interferáló RNS-ek a növények antivirális védekezése során képződnek, melyek a vírusok komplementer RNS-éhez kötődve kiválthatják annak degradációját, vagy translációját gátolják. A kis RNS-ek szekvenálásával lehetőségünk adódik a vizsgált minták viromjának meghatározására.

PhD munkám céljának tűztük ki, hogy kis RNS HTS módszert optimalizáljuk kajszi és őszibarack minták vizsgálatára, melynek segítségével felmérést végezhetünk az Érdi Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet izolátorházainak és törzsültetvényeinek virológiai állapotáról.

A kajszi és őszibarack fákat vegetatív módon szaporítják, ami kedvez a kórokozók terjedésének. A szaporítóanyag előállításához használt anyafák vírusmentességének ellenőrzése kiemelkedően fontos jelentőséggel bír az egészséges ültetvények létrehozásához. A HTS vizsgálatokat izolátorházból és törzsültetvényből származó kajszi és őszibarack mintákból végeztük. A kajsziarack virológiai felméréshez Ligeti óriás, Pannónia és Magyar kajszi fajtákból, az őszibarack vizsgálatokhoz pedig Springercrest és Cresthaven fajtákból, valamint az őszibarack izolátorház további 10 NÉBIH Velencei Virológiai Állomásán bioteszt vizsgálaton lévő fajtájából gyűjtöttünk levélmintákat. A mintákból módosított CTAB-alapú protokollal RNS mintákat izoláltunk, majd az egyedi RNS-ekből keverékeket készítettünk. Az RNS poolokból 5 kajszi és 5 őszibarack kis RNS könyvtárát készítettem, melyeket Illumina platformon szekvenáltattunk. A kajsziarack kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzésével kimutattam a CVA, LChV-1 és a PPV, őszibarack könyvtárakból pedig a PaLV, NSPaV, PPV és PLMVd jelenlétét. Igazoltam a CVA, LChV-1, PaLV és PLMVd előfordulását Magyarországon, melyek jelenlétéről nem rendelkezünk korábbi ismeretekkel. A bioinformatikai elemzéssel kapott vírus/viroid találatokat RT-PCR-rel, CVA-ra, PaLV-re és PLMVd-re Northern-blottal is visszaigazoltam. Az izolátorházból is kimutattam a CVA, PaLV,

NSPaV, PPV és PLMVd jelenlétét, ezért szaporítóanyagon keresztül történő fertőződésre következtettem. A PCR-termékeket klónoztuk, majd Sanger szekvenálást követően filogenetikai elemzéseket végeztem, a szekvenciákat feltöltöttem a GenBank adatbázisba.

Az őszibarack izolátorházban magas fapusztulást tapasztaltam, ezért teszteltem az izolátorház egyedeit PaLV, NSPaV és PPV vírusokra, valamint PLMVd viroidra. A legnagyobb fertőzöttséget a PLMVd esetében figyeltem meg, de vizsgálataink alapján nem bizonyítható, hogy az izolátorházban tapasztalt fapusztulás a vírus/viroid fertőzés következménye. A viroid szekvenciák elemzése során nagymértékű genetikai variabilitást tapasztaltam. Azonosítottam pontmutáció párokat, melyek a PLMVd térszerkezetére vetítve egymással szemben helyezkedtek el, a mutációk bekövetkeztével továbbra is képesek voltak bázispárosodásra, ezáltal a viroid konformációját, stabilitását nem befolyásolták. Az izolátorház PLMVd szekvenciáinak vizsgálata során azonosítottam egy 12 nukleotid hosszúságú inzerciót, ami azonos pozícióban található, mint a „peach calico” fenotípust eredményező inzerció, szekvenciáját tekintve azonban attól eltérést mutat.

A NÉBIH Velencei Virologiai Állomásán az érdei izolátorházban lévő őszibarack fajtákat bioteszt alapú vírusdiagnosztikai vizsgálatokkal is elemzik. Vizsgálataimmal kimutattam, hogy a fertőzött vizsgálati mintáról átjutott a PLMVd a GF305 indikátor növénybe, az indikátorok bonitálása során azonban nem tapasztaltam PLMVd specifikus tüneteket, mert a GF305 csak bizonyos PLMVd variánsok diagnosztikájára alkalmas.

A kis RNS HTS módszert sikerrel alkalmaztam kajszai és őszibarack minták vírusdiagnosztikai felmérésére, a kapott bioinformatikai eredmények visszaigazolhatók voltak molekuláris biológiai technikákkal. A HTS vizsgálatok segítségével azonosítottam Magyarországon ismeretlen vírusok, viroid előfordulását, ezáltal pontosabb képet kaptunk az izolátorházak és törzsültetvények virológiai állapotáról.

7. Summary

Apricot and peach are economically important fruit trees in Hungary. Virus or viroid infections can lead to serious crop losses and the replacement of died trees causes additional charges. The virus elimination and diagnostics possess high importance in order to create long life plantations.

In contrast to serologic, RT-PCR or hybridization assays, metagenomic methods are able to detect every pathogen in the investigated sample. Small RNA sequencing is a special version of metagenomics, which can be applied to virus/viroid diagnostics. During the plants' antiviral defense mechanism small interfering RNAs are produced, which can trigger degradation of target RNAs, or mediate translation repression. Small RNA sequencing is a powerful method to determine the whole virome of the sample.

During my PhD work we set as a goal to optimize small RNA HTS method for apricot and peach samples, which can help to assess the sanitary status of the certified plantations at the Fruitculture Research Institute. Apricot and peach trees are propagated vegetatively, which is favorable for the pathogens' spreading. The surveillance of the mother trees is essential for healthy plantations, because mother trees are the source of propagation material. HTS experiments were performed from apricot and peach samples deriving from isolator house or stock nursery. In the case of apricot virological survey Ligeti óriás, Pannónia, Magyar kajszai cultivars were sampled. Springcrest, Cresthaven and further 10 cultivars were investigated, which are under biotest examination in the Virological Research Station of NÉBIH. RNA isolation from leaf samples was performed by modified CTAB protocol, then pools were prepared from individual RNAs. 5 apricot and 5 peach small RNA library were constructed from RNA pools, then the libraries were sequenced using Illumina platform. During the analysis of apricot-derived small RNA libraries CVA, LChV-1 and PPV viruses were detected. In the case of peach-derived libraries PaLV, NSPaV, PPV and PLMVd were identified. The occurrence of CVA, LChV-1, PaLV and PLMVd was not described before in Hungary. Virus or viroid hits detected by small RNA HTS were verified by RT-PCR, in the case of CVA, PaLV and PLMVd Northern-blot validation was performed also. I assumed propagation material-derived infections, because CVA, PaLV, NSPaV, PPV and PLMVd were detected from isolator house. PCR-products were cloned, then Sanger sequencing was done to be able to perform additional phylogenetic analysis and the received sequences were deposited to GenBank database.

Because of the large-scale decay of peach trees in the isolator house PaLV, NSPaV, PPV viruses and PLMVd viroid were tested individually. The highest infection rate was observed by PLMVd but according to our results the viroid mediated decay is not proved. The PLMVd possesses high genetic variability. Certain point mutation pairs were identified, which did not cause conformational changes within the structure of the viroid because they kept the base pairing property. During the examination of PLMVd 12 nt long insertion was detected at the same position as in the case of peach calico insertion, but sequence homology was not noticed. Peach cultivars are under biotest examinations in the Virological Research Station of NÉBIH. PLMVd transmission to GF305 indicator was justified, however PLMVd specific symptoms were not developed. GF305 indicator gives reliable diagnostic results only for certain PLMVd strains.

Small RNA HTS was successfully applied to survey infection rate of apricot and peach cultivars, because the bioinformatical results could be confirmed by molecular diagnostics assays. With the help of HTS, unknown viruses and a viroid were described in Hungary, therefore we obtained a reliable picture of the virological status of isolator houses and stock nurseries.

8. Mellékletek

M1. 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 plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 537–545. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x>
- Adkar-Purushothama, C. R., & Perreault, J. P. (2020). Current overview on viroid–host interactions. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 11, Issue 2). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1570>
- Ali, M., Hameed, S., & Tahir, M. (2014). Luteovirus: insights into pathogenicity. In *Archives of Virology* (Vol. 159, Issue 11, pp. 2853–2860). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2172-6>
- Ambro's, S., Ambro's, A., Herná'ndez, C., Herná'ndez, H., Desvignes, J. C., & Flores, A. R. (1998). Genomic Structure of Three Phenotypically Different Isolates of Peach Latent Mosaic Viroid: Implications of the Existence of Constraints Limiting the Heterogeneity of Viroid Quasispecies. In *JOURNAL OF VIROLOGY*. <http://www.abc.wustl.edu/zucker/rna/energy/index.shtml>
- Atanassov, D. (1932). Plum pox. A new virus disease. *Annals of the University of Sofia Faculty of Agriculture and Silviculture*, 11: 49–69., 11, 49–69.
- Bag, S., al Rwahnih, M., Li, A., Gonzalez, A., Rowhani, A., Uyemoto, J. K., & Sudarshana, M. R. (2015). Detection of a new luteovirus in imported nectarine trees: A case study to propose adoption of metagenomics in post-entry quarantine. *Phytopathology*, 105(6), 840–846. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0262-R>
- Bajet, N. B., Unruh, T. R., Druffel, K. L., & Eastwell, K. C. (2008). Occurrence of Two Little Cherry Viruses in Sweet Cherry in Washington State. *Plant Disease*, 92(2), 234–238. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-2-0234>
- Baráth, D., Jaksá-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(6). <https://doi.org/10.3390/v10060318>
- Basu, S., Sharma, V. K., Bhattacharyya, D., & Chakraborty, S. (2014). An overview of antiviral RNA silencing in plant: Biogenesis, host-virus interaction and potential applications. In *Approaches to Plant Stress and their Management* (pp. 317–337). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1620-9_18
- Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E., & Baulcombe, D. C. C. (2007). The Ploverovirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Current Biology*, 17(18), 1609–1614. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.039>
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, & Hannon GJ. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366.

- Bock, K. R. (1982). The identification and partial characterisation of plant viruses in the tropics. *Tropical Pest Management*, 28(4), 399–411. <https://doi.org/10.1080/09670878209370747>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- 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 generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>
- Branscheid, A., Marchais, A., Schott, G., Lange, H., Gagliardi, D., Andersen, S. U., Voinnet, O., & Brodersen, P. (2015). SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 43(22), 10975–10988. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1014>
- Bubán, T., Gonda, I., Glits, M., Tóth, G., Harmat, M., Hrotkó, L., Kállay, K., Nyéki, T., Papp, J., Péntzes, J., Porpáczy, B., Simon, A., Sipos, G., Béla, Z., Soltész, M., Szabó, L., Szabó, Z., Szalay, L., Timon, B., Vályi, I. (2004). *A gyümölcsök termesztése*.
- Burgyán, J., & Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. In *Trends in Plant Science* (Vol. 16, Issue 5, pp. 265–272). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.010>
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., & Llácer, G. (2006). *Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease*. <http://faostat.fao.org>
- Candresse, T., & Cambra, M. (2006). Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of Plum pox virus strains. *EPPO Bulletin*, 36(2), 239–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2006.00980.x>
- Candresse, T., Faure, C., Theil, S., & Marais, A. (2016). First Report of Nectarine stem pitting-associated virus Infecting Prunus mume in Japan. *Plant Disease*, 101(2), 393. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1323-PDN>
- Candresse, Thierry, Marais, A., Faure, C., & Gentit, P. (2013). Association of Little cherry virus 1 (LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology*, 103(3), 293–298. <https://doi.org/10.1094/PHTO-10-12-0275-R>
- Cho, S.-Y., Kim, H., & Yi, S.-I. (2018). First Report of Little cherry virus 1 and 2 in Sweet Cherry in Korea. *Plant Disease*, 102(5), 1045. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0783-PDN>
- Cissé, O. H., Almeida, J. M. G. C. F., Fonseca, Á., Kumar, A. A., Salojärvi, J., Overmyer, K., Hauser, P. M., & Pagni, M. (2013). Genome sequencing of the plant pathogen Taphrina deformans, the causal agent of peach leaf curl. *MBio*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00055-13>
- Clemente-Moreno, M. J., Hernández, J. A., & Diaz-Vivancos, P. (2015). Sharka: How do plants respond to Plum pox virus infection? In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 66, Issue 1, pp. 25–35). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru428>

- Csorba, T., & Burgyán, J. (2016). Antiviral silencing and suppression of gene silencing in plants. In *Current Research Topics in Plant Virology* (pp. 1–33). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2_1
- Csorba, T., Kontra, L., & Burgyán, J. (2015). Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. In *Virology* (Vols. 479–480, pp. 85–103). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.028>
- Czotter, N., Molnár, J., Pesti, R., Demián, E., Baráth, D., Varga, T., & Várallyay, É. (2018). Use of siRNAs for diagnosis of viruses associated to woody plants in nurseries and stock collections. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1746, pp. 115–130). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_9
- Czotter, N., Molnar, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., Szittyá, G., Kocsis, L., Deak, T., Bisztray, G., Tusnady, G. E., Burgyan, J., & Varallyay, E. (2018). NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian Vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00122>
- Deketelaere, S., Tyvaert, L., França, S. C., & Hofte, M. (2017). Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01186>
- Delgado, S., Martínez de Alba, Á. E., Hernández, C., & Flores, R. (2005). A Short Double-Stranded RNA Motif of Peach Latent Mosaic Viroid Contains the Initiation and the Self-Cleavage Sites of Both Polarity Strands. *Journal of Virology*, 79(20), 12934–12943. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.20.12934-12943.2005>
- Desvignes, J. C. (1986). Peach latent mosaic and its relation to peach mosaic and peach yellow mosaic virus diseases. *Acta Hort.*, 193, 51–57.
- Dicenta, F., Martínez-Gómez, P., Burgos, L., & Egea, J. (2000). Inheritance of resistance to plum pox potyvirus (PPV) in apricot, *Prunus armeniaca*. *Plant Breeding*, 119(2), 161–164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00458.x>
- Eamens, A. L., Kim, K. W., & Waterhouse, P. M. (2012). DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior*, 7(10). <https://doi.org/10.4161/psb.21518>
- Eikemo, H., Brurberg, M. B., & Davik, J. (2010). Resistance to *Phytophthora cactorum* in Diploid *Fragaria* Species. In *HORTSCIENCE* (Vol. 45, Issue 2). <http://www.fao.org>
- Elena, K., Alivizatos, A. S., & Varveri, C. (2008). New plant pathogens reported in Greece, 1990-2007. *Hellenic Plant Protection Journal*, 1, 1–25. www.bpi.gr
- Endres, M. W., Gregory, B. D., Gao, Z., Foreman, A. W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G. J., Ecker, J. R., Bowman, L. H., & Vance, V. (2010). Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathogens*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000729>
- Fernández-Fernández, M. R., Martínez-Torrecedrada, J. L., Roncal, F., Domínguez, E., & García, J. A. (2002). Identification of Immunogenic Hot Spots within Plum Pox

- Potyvirus Capsid Protein for Efficient Antigen Presentation. *Journal of Virology*, 76(24), 12646–12653. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12646-12653.2002>
- Fiore, N., Fernández, C., Quiroga, N., Pino, A. M., Rivera, L., Sagredo, K., & Zamorano, A. (2017). First Report of Little cherry virus 1 in Chile. *Plant Disease*, 102(3), 689. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1407-PDN>
- Flores, R., Delgado, S., Rodio, M. E., Ambrós, S., Hernández, C., & di Serio, F. (2006). Peach latent mosaic viroid: Not so latent. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 7, Issue 4, pp. 209–221). <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00332.x>
- Flores, R. , Hernández, C. , Avinent, L. , Hermoso, A. , Llácer, G. , Juárez, J. , Arregui, J. M. , Navarro, L. , & Desvignes, J. C. (1992). Studies on the detection, transmission and distribution of peach latent mosaic viroid in peach trees. *Acta Hortic.*, 309, 325–330.
- Foster, W. R., & Lott, T. B. (1947). “LITTLE CHERRY,” A VIRUS DISEASE’ (Vol. 27, Issue 1). www.nrcresearchpress.com
- Gago, S., Elena, S. F., Flores, R., & Sanjuán, R. (2009). Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science*, 323(5919), 1308. <https://doi.org/10.1126/science.1169202>
- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- Gao, R., LI, S. fang, & LU, M. guang. (2016). Complete nucleotide sequences of two isolates of Cherry virus A from sweet cherry in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(7), 1667–1671. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61343-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61343-6)
- Gao, R., Xu, Y., Candresse, T., He, Z., Li, S., Ma, Y., & Lu, M. (2017). Further insight into genetic variation and haplotype diversity of Cherry virus A from China. *PLoS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186273>
- Giner, A., Lakatos, L., García-Chapa, M., López-Moya, J. J., & Burguán, J. (2010). Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathogens*, 6(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000996>
- Gouveia, P., & Nolasco, G. (2012). The p19.7 RNA silencing suppressor from grapevine leafroll-Associated virus 3 shows different levels of activity across phylogenetic groups. *Virus Genes*, 45(2), 333–339. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0772-3>
- Helena Ivanová, Monika Kaločaiová, & Milan Bolvanský. (2012). Shot-hole disease on *Prunus persica*-the morphology and biology of *Stigmina carpophila*. *FOLIA OECOLOGICA*, 39(1), 1336–5266. <https://www.researchgate.net/publication/293084882>
- Hernandez, C., & Flores, R. (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures (viroids/viroid-like satellite RNAs/self-cleavage). In *Biochemistry* (Vol. 89).
- Hollings, M. (1965). Disease Control Through Virus-Free Stock. *Annual Review of Phytopathology*, 3(1), 367–396. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.03.090165.002055>

- Isogai, M., Aoyagi, J., Nakagawa, M., Kubodera, Y., Satoh, K., Katoh, T., Inamori, M., Yamashita, K., & Yoshikawa, N. (2004). Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 70(5), 288–291. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0129-4>
- James D, & Jelkmann W. (1998). Detection of cherry virus A in Canada and Germany. *17th International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops: Fruit Tree Diseases.*, 472, 299–303.
- James, D., Varga, A., & Sanderson, D. (2013). Genetic diversity of Plum pox virus: strains, disease and related challenges for control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(4), 431–441. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.828100>
- Janse. (2009). *Phytobacteriology: Principles and Practice.: Vol. Phytobacteriology* (Phytobacteriology). CABI.
- Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Jaques Miret, J. A., MacLeod, A., Navajas Navarro, M., Niere, B., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Rossi, V., Urek, G., van Bruggen, A., van der Werf, W., West, J., ... Grégoire, J.-C. (2017). Pest categorisation of *Ips duplicatus*. *EFSA Journal*, 15(10), e05040. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5040>
- Jelkmann, W. (1995). Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. In *Journal of General Virology* (Vol. 76).
- Jo, Y., Cho, J. K., Choi, H., Lian, S., & Cho, W. K. (2017). First Report of Nectarine stem pitting-associated virus and Plum bark necrosis and stem pitting-associated virus Infecting a Peach Cultivar in Korea. *Plant Disease*, 101(6), 1067. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1634-PDN>
- 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*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/v10070385>
- Keim-Konrad, R., & Jelkmann, W. (1996). Genome analysis of the 3'-terminal part of the little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite clostero-like virus*. In *Arch Virol* (Vol. 141).
- Kesanakurti, P., Belton, M., Saeed, H., Rast, H., Boyes, I., & Rott, M. (2017). Comparative analysis of cherry virus A genome sequences assembled from deep sequencing data. *Archives of Virology*, 162(9), 2821–2828. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3394-1>
- Kirby, M. J., & Adams, A. N. (2001). Occurrence of Cherry Virus A in the UK. In *Plant Pathology* (Vol. 50). <http://www.bspp.org.uk/ndr>
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., & Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.024>

- Krizbai, L., Kriston, E., Kreuze, J., & Melika, G. (2017). Identification of Nectarine stem pitting-associated virus infecting *Prunus persica* in Hungary. *New Disease Reports*, *35*, 18. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2017.035.018>
- Kuo, Y.-W., & Falk, B. W. (2020). RNA interference approaches for plant disease control. *BioTechniques*. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0098>
- Kutnjak, D., Elena, S. F., & Ravnikar, M. (2017). *Time-Sampled Population Sequencing Reveals the Interplay of Selection and Genetic Drift in Experimental Evolution of Potato Virus Y*. <https://doi.org/10.1128/JVI>
- Kutnjak, D., Rupar, M., Gutierrez-Aguirre, I., Curk, T., Kreuze, J. F., & Ravnikar, M. (2015). Deep Sequencing of Virus-Derived Small Interfering RNAs and RNA from Viral Particles Shows Highly Similar Mutational Landscapes of a Plant Virus Population. *Journal of Virology*, *89*(9), 4760–4769. <https://doi.org/10.1128/jvi.03685-14>
- Lenz, O., Přibylová, J., Fránová, J., Koloniuk, I., & Špak, J. (2017). Identification and characterization of a new member of the genus Luteovirus from cherry. *Archives of Virology*, *162*(2), 587–590. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3125-z>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, *25*(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Lim, S., Igori, D., Yoo, R. H., Zhao, F., Cho, I. S., Choi, G. S., Lim, H. S., Lee, S. H., & Moon, J. S. (2015). Genomic detection and characterization of a Korean isolate of Little cherry virus 1 sampled from a peach tree. *Virus Genes*, *51*(2), 260–266. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1225-6>
- López, María M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M. T., Llop, P., Penyalver, R., & Cambra, M. (2003). Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. In *International Microbiology* (Vol. 6, Issue 4, pp. 233–243). Springer-Verlag GmbH Co. KG. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0143-y>
- López, M M, Roselló, M., & Palacio-Bielsa, A. (2006). Supplement 1: RECENT ADVANCES IN THE STUDY OF BACTERIAL DISEASES OF STONE FRUIT AND NUT TREES: Minireviews based on the activity of ESF. In *Source: Journal of Plant Pathology* (Vol. 92). http://www.jstor.orgURL:http://www.jstor.org/stable/41998756http://www.jstor.org/stable/41998756?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents
- Ludvíková, H., & Suchá, J. (2011). First Report of Little Cherry Disease from Sweet Cherry (*Prunus avium*) and Sour Cherry (*P. cerasus*) in the Czech Republic. *Plant Disease*, *95*(9), 1197. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0868>
- Lu, M. G., Gao, R., Chen, R. R., Wu, B., Zhang, Z. X., & Li, S. F. (2015). First Report of Little cherry virus 1 in Sweet Cherry Trees in China. *Plant Disease*, *99*(8), 1191. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1200-PDN>
- Lu, M. G., Zhang, C., Zhang, Z. X., Wang, C. A., & Li, S. F. (2016). Nectarine stem-pitting-associated virus Detected in Peach Trees in China. *Plant Disease*, *101*(3), 513. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1256-PDN>

- 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. In *Viruses* (Vol. 10, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v10080436>
- Mallory, A., & Vaucheret, H. (2010). Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *The Plant Cell*, 22(12), 3879–3889. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080671>
- Mandic B., Matic S., al Rwahnih M., Jelkmann W., & Myrta A. (2007). Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. *Plant Pathol.*, 89, 103–108.
- Marais, A., Faure, C., Theil, S., Svanella-Dumas, L., Brans, Y., Maurice, I., Blin, V., & Candresse, T. (2016). First Report of Little cherry virus 1 on Plum in France. *Plant Disease*, 100(12), 2544. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0915-PDN>
- Marais, A., Svanella-Dumas, L., Barone, M., Gentit, P., Faure, C., Charlot, G., Ragozzino, A., & Candresse, T. (2012). Development of a polyvalent RT-PCR detection assay covering the genetic diversity of Cherry capillovirus A. *Plant Pathology*, 61(1), 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02488.x>
- Marcone, & Jarausch. (2010). CANDIDATUS PHYTOPLASMA PRUNORUM, THE CAUSAL AGENT. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 19–34.
- Mari, M., Martini, C., Guidarelli, M., & Neri, F. (2012). Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biological Control*, 60(2), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.013>
- Marimon, N., Eduardo, I., León, M., Berbegal, M., Armengol, J., & Luque, J. (2020). A qPCR-based method for the detection and quantification of the peach powdery mildew (*Podosphaera pannosa*) in epidemiological studies. *European Journal of Plant Pathology*, 158(4), 1005–1016. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02136-0>
- Martelli, G. P., AbouGhanem-Sabanadzovic, Agranovsky, A. A., al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Dovas, C. I., Fuchs, M. ;, Gugerli, P., Hu, J. S., & Jelkmann, W. (2012). Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *J. Plant Pathol.*, 94, 7–19.
- Matic, Slavica, Minafra, A., Sánchez-Navarro, J. A., Pallás, V., Myrta, A., & Martelli, G. P. (2009). “Kwanzan Stunting” syndrome: Detection and molecular characterization of an Italian isolate of Little cherry virus 1. *Virus Research*, 143(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.03.005>
- Matic, S, Myrta, A., & Minafra, A. (2007). First report of little cherry virus 1 in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89(Suppl.3), S75.
- Mekuria, T. A., Smith, T. J., Beers, E., Watson, G. W., & Eastwell, K. C. (2013). First Report of Transmission of Little cherry virus 2 to Sweet Cherry by *Pseudococcus maritimus* (Ehrhorn) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Plant Disease*, 97(6), 851. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1115-PDN>

- Morgado, L. (2020). Diversity and types of small RNA. In *Plant Small RNA* (pp. 37–47). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817112-7.00002-x>
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, *24*(16), 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>
- Motard, J., Bolduc, F., Thompson, D., & Perreault, J. P. (2008). The peach latent mosaic viroid replication initiation site is located at a universal position that appears to be defined by a conserved sequence. *Virology*, *373*(2), 362–375. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.12.010>
- Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I., & Boonham, N. (2000). Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus Using a Multiplex Real-Time Fluorescent Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopathology*®, *90*(5), 448–453. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.5.448>
- Naidu, R. A., & Hughes, A. (2014). *Methods for the detection of plant virus diseases*.
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M. E., Delgado, S., Flores, R., & di Serio, F. (2012). Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant Journal*, *70*(6), 991–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04940.x>
- Németh, M. v. (1979). Gyümölcsfák vírusos, mikoplazmás és rickettsiás betegségei. *Mezőgazdasági Kiadó*.
- Nikbakht Dehkordi, A., Babaeian, N., Karimpour, S., Martinez-Gomez, P., Rubio, M., & Bagheri, N. (2017). Sharka (Plum pox virus): A forgotten disease in Iran. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, *4*(2), 183–191. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2017.241714.205>
- Noorani, Md Salik, Awasthi, P., Sukapaka, M., Singh, L., Ram, R., Sharma, M. P., Zaidi, A. A., & Hallan, V. (2013). Immunodiagnosics for Cherry virus A and Cherry necrotic rusty mottle virus. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *24*(1), 93–104. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0240-8>
- Noorani, M. S., Awasthi, P., Singh, R. M., Ram, R., Sharma, M. P., Singh, S. R., Ahmed, N., Hallan, V., & Zaidi, A. A. (2010). Complete nucleotide sequence of cherry virus A (CVA) infecting sweet cherry in India. *Archives of Virology*, *155*(12), 2079–2082. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0826-6>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 12).
- Pallás, V., Más, P., & Sánchez-Navarro, J. A. (1998). Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *81*, 461–468. <https://doi.org/10.1385/0-89603-385-6:461>

- Panattoni, A., Luvisi, A., & Triolo, E. (2013). Review. Elimination of viruses in plants: Twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *11*(1), 173–188. <https://doi.org/10.5424/sjar/20131111-3201>
- Parent, J. S., de Alba, A. E. M., & Vaucheret, H. (2012). The origin and effect of small RNA signaling in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3, Issue AUG). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00179>
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., & Ravnikar, M. (2017). Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: Comparison of two approaches. *Frontiers in Microbiology*, *8*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998>
- Pénzes, B., & Szalay, L. (2003). *Kajszai* (pp. 92–96). Mezőgazda Kiadó.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L., & Poethig, R. S. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes and Development*, *18*(19), 2368–2379. <https://doi.org/10.1101/gad.1231804>
- Popescu, C. F. (2010). *From plant tissue Carmen*. <https://www.researchgate.net/publication/284502768>
- Romanazzi, G., Mancini, V., & Murolo, S. (2012). First report of *Leucostoma cinctum* on sweet cherry and European plum in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, *51*, 365–368. www.fupress.com/pm
- Roossinck, M. J., Martin, D. P., & Roumagnac, P. (2015). Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery. In *Phytopathology* (Vol. 105, Issue 6, pp. 716–727). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW>
- Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Marais, A., Sánchez-Navarro, J. A., Pallás, V., & Candresse, T. (2017). Recent advances and prospects in Prunus virology. In *Annals of Applied Biology* (Vol. 171, Issue 2, pp. 125–138). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/aab.12371>
- Ruiz-García, A. B., Martínez, C., Santiago, R., García, M. T., de Prado, N., & Olmos, A. (2016). First Report of Little cherry virus 1 (LChV-1) in Sweet Cherry in Spain. *Plant Disease*, *100*(11), 2340. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0620-PDN>
- Sabanadzovic, S., Ghanem-Sabanadzovic, N. A., Rowhani, A., Grant, J. A., & Uyemoto, J. K. (2005). DETECTION OF CHERRY VIRUS A, CHERRY NECROTIC RUSTY MOTTLE VIRUS AND LITTLE CHERRY VIRUS 1 IN CALIFORNIA ORCHARDS. *Journal of Plant Pathology*, *87*(3), 173–177. <http://www.jstor.org/stable/41998236>
- Šafářová, Dana, Ševčíková, V., Neumanová, K., Suchá, J., Nečas, T., & Navrátil, M. (2020). Molecular characterisation of little cherry virus 1 infecting apricots in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, *158*(1), 83–97. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02056-z>

- Šafářová, D., Faure, C., Candresse, T., Navrátil, M., Nečas, T., & Marais, A. (2016). First Report of Little cherry virus 1 Infecting Apricot in the Czech Republic. *Plant Disease*, 101(5), 845. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1289-PDN>
- Šafářová, D., Navrátil, M., Paprštejn, R., Candresse, T., & Marais, A. (2013). Cherry virus a infecting cherries and plums in the Czech Republic - Short communication. *Horticultural Science*, 40(1), 37–39. <https://doi.org/10.17221/141/2012-hortsci>
- Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., & Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 12, Issue 9, pp. 938–954). <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- Schuster, S. C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. In *Nature Methods* (Vol. 5, Issue 1, pp. 16–18). <https://doi.org/10.1038/nmeth1156>
- Serçe, C. U., Gazel, M., & Çaglayan, K. (2011). First report of little cherry virus 1 in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 93(4, Supplement), S4.66.
- Shulaev, V., Korban, S. S., Sosinski, B., Abbott, A. G., Aldwinckle, H. S., Folta, K. M., Iezzoni, A., Main, D., Arús, P., Dandekar, A. M., Lewers, K., Brown, S. K., Davis, T. M., Gardiner, S. E., Potter, D., & Veilleux, R. E. (2008). Multiple Models for Rosaceae Genomics. *Plant Physiology*, 147(3), 985. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115618>
- Sochor, J., Babula, P., Adam, V., Krska, B., & Kizek, R. (2012). Sharka: The past, the present and the future. In *Viruses* (Vol. 4, Issue 11, pp. 2853–2901). <https://doi.org/10.3390/v4112853>
- Sorrentino, R., Marais, A., Faure, C., Theil, S., Alioto, D., & Candresse, T. (2018). First report of peach-associated luteovirus in nectarine (*Prunus persica*) in Italy. In *Plant Disease* (Vol. 102, Issue 7, p. 1465). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0012-PDN>
- Spiegel, S., Frison, E. A., & Converse, R. H. (1993). Recent developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germ plasm. *Plant Disease*, 77(12), 1176–1180. <https://doi.org/10.1094/PD-77-1176>
- Steel, E., Barker, I., Danks, C., Coates, D., & Boonham, N. (2010). A. tumefaciens-mediated transient expression as a tool for antigen production for cucurbit yellow stunting disorder virus. *Journal of Virological Methods*, 163(2), 222–228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.09.024>
- Tahzima, Rachid, Foucart, Y., Peusens, G., 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(7). <https://doi.org/10.3390/v11070592>
- Tahzima, R, Foucart, Y., Peusens, G., Beliën, T., Massart, S., & de Jonghe, K. (2017). First Report of Little cherry virus 1 affecting European Plum (*Prunus domestica*) in Belgium. *Plant Disease*, 101(8), 1557. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0074-PDN>

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Torrance, L., & Jones, R. A. C. (1981). Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. *Plant Pathology*, *30*(1), 1–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1981.tb01218.x>
- Várallyay, É., & Havelda, Z. (2013). Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Molecular Plant Pathology*, *14*(6), 567–575. <https://doi.org/10.1111/mpp.12029>
- Villamor, D. E. V., Mekuria, T. A., Pillai, S. S., & Eastwell, K. C. (2016). High-throughput sequencing identifies novel viruses in nectarine: Insights to the etiology of stem-pitting disease. *Phytopathology*, *106*(5), 519–527. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-15-0168-R>
- Vitushkina, M., Fechtner, B., Agranovsky, A., & Jelkmann, W. (1997). Development of an RT-PCR for the detection of little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe. In *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 103). Kluwer Academic Publishers.
- Wassenegger, M., & Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Science*, *11*(3), 142–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.003>
- Wood, G. A. (1993). Further investigations of the little cherry disease in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *21*(1), 39–44. <https://doi.org/10.1080/01140671.1993.9513744>
- Wu, L. P., Liu, H. W., Bateman, M., Liu, Z., & Li, R. (2017). Molecular characterization of a novel luteovirus from peach identified by high-throughput sequencing. *Archives of Virology*, *162*(9), 2903–2905. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3388-z>
- Wu, Q., Ding, S. W., Zhang, Y., & Zhu, S. (2015). Identification of Viruses and Viroids by Next-Generation Sequencing and Homology-Dependent and Homology-Independent Algorithms. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 53, pp. 425–444). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120030>
- Xu, Y., Li, S., Na, C., Yang, L., & Lu, M. (2019). Analyses of virus/viroid communities in nectarine trees by next-generation sequencing and insight into viral synergisms implication in host disease symptoms. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48714-z>

M2. Kis RNS könyvtárak statisztikája

Kis RNS Könyvtár neve	szekvenált readek száma	read szám		kontig szám
		redundáns	nem redundáns	
1_LO_ih	12005469	11130126	1285768	10302
2_LO_sn	12622682	11047585	607256	5351
3_P_ih	13294950	12463256	1130809	11215
4_P_sn	11918150	10394694	537920	3444
5_M_sn	13263245	12433276	1691987	16284
1_Sc_ih	12 694 033	12 532 238	1 688 213	4 578
2_Sc_tü	9 776 381	9 655 292	1 550 262	4 499
3_Ch_ih	13 276 321	12 879 660	974 698	401
4_Ch_tü	12 603 454	12 310 332	1 065 078	589
5_őszi_ih	18 111 452	17 779 344	2 592 339	8 363

M3. CVA és LChV-1 klón szekvenciák

vírus/viroid neve	fajta	GeneBank azonosító	Referencia Genom	Pozíció a referencia genomon	Kódoló régió	Nukleotid egyezés (%)	Aminosav egyezés(%)
CVA	Pannónia	MH321189	NC_003689.1	5400-6791	mozgási fehérje	1275/1392(92%)	421/463(91%)
LChV-1	Magyar kajszi	MH321190	NC_001836.1	12165-13261	coat protein	1011/1097(92%)	338/365(93%)
LChV-1	Magyar kajszi	MH321191	NC_001836.1	9493-10288	HSP70	753/796(95%)	251/265(95%)

M4. PaLV, NSPaV, PLMVd, PPV klónozott szekvenciák

vírus/viroid neve	fajta	izolátum	GeneBank azonosító	Pozíció a referencia genomon	Kódoló régió	Nukleotid egyezés (%)	Aminosav egyezés(%)
PaLV	Springcrest	HUEI_Springcrest	MK929580	2430-3561	ORF3a, CP, MP	98,1% (1110/1132)	97,6%(538/551)
	Springcrest	HUES_Springcrest	MK929581			98,1% (1110/1132)	97,6%(538/551)
	Cresthaven	HUEI_Cresthaven1	MK929579			98,8% (1118/1132)	98,4%(542/551)
	Cresthaven_ih	HUEI_Cresthaven2	MK929582			98,8% (1118/1132)	98,4%(542/551)
	Michelini	HUEI_Michelini1	MT396251			96,8% (1096/1132)	95,1%(524/551)
	Redhaven	HUEI_Redhaven	MT396252			96,8% (1096/1132)	94,9%(523/551)
	Champion	HUEI_Champion2	MT396253			98,5% (1115/1132)	98%(540/551)
	Champion	HUEI_Champion3	MT396254			98,2% (1112/1132)	97,6%(538/551)
	Champion	HUEI_Champion	MK929583			98,4% (1114/1132)	98,2%(541/551)
	Champion	HUEI_Champion4	MT396255			98,5% (1115/1132)	98%(540/551)
	Suncrest	HUEI_Suncrest	MK929584			96,8% (1096/1132)	95,1%(524/551)
	Suncrest	HUEI_Suncrest2	MT396256			98,4% (1114/1132)	98,2%(541/551)
	Suncrest	HUEI_Suncrest3	MT396257			99% (1121/1132)	98,6%(543/551)
	Suncrest	HUEI_Suncrest4	MT396258			98,5% (1115/1132)	98%(540/551)
	Aranycsillag	HUEI_Aranycsillag	MK929585			98,4% (1114/1132)	97,8%(539/551)
	Aranycsillag	HUEI_Aranycsillag2	MT396259			98,5% (1115/1132)	97,6%(538/551)
	Aranycsillag	HUEI_Aranycsillag3	MT396260			96,8% (1096/1132)	95,1%(524/551)
	Springtime	HUEI_Springtime	MT396261			97,9% (1108/1132)	96,9%(534/551)
Elvira	HUEI_Elvira	MT396262	98,5% (1115/1132)	98%(540/551)			
NSPaV	Springcrest	HUEI_Springcrest	MK941145	2588-4339	CP, Read-through protein	93,4% (1637/1752)	93,4% (491/526)
	Cresthaven	HUES_Cresthaven	MK941146			94,4% (1654/1752)	93,2% (490/526)
	Michelini	HUEI_Michelini	MT424631			93,8% (1644/1752)	94,1%(495/526)
	Regina	HUEI_Regina	MT424632			93,7% (1642/1752)	94,1%(495/526)
	Champion	HUEI_Champion2	MT424633			93,6% (1639/1752)	93,2% (490/526)
	Champion	HUEI_Champion	MK941143			94,8% (1636/1752)	93,2% (490/526)
	Suncrest	HUEI_Suncrest	MT424634			94% (1646/1752)	94,1% (495/526)
	Aranycsillag	HUEI_Aranycsillag	MK941144			94% (1646/1752)	92,4% (486/526)
	Aranycsillag	HUEI_Aranycsillag2	MT424635			93,6% (1639/1752)	93% (489/526)
PLMVd	Cresthaven	HUEI_Cresthaven	MK929592	1-337	-	85,8% (289/337)	-
	Cresthaven	HUES_Cresthaven	MK929593			87,2% (294/337)	
	Venus	HUEI_Venus	MK929588			95,6% (322/337)	
	Incrocio_Pieri	HUEI_Incrocio_Pieri	MK929589			94,4% (318/337)	
	Cresthaven	HUEI_Cresthaven	MK929590			85,2% (287/337)	
	Champion	HUEI_Champion	MK929586			92,9% (313/337)	
	Suncrest	HUEI_Suncrest	MK929591			95,6% (322/337)	
	Apolka	HUEI_Apolka	MK929587			94,7% (319/337)	
PPV	Springcrest_Ih	HUEI_Springcrest	MK934763	9154-9534	CP	95,8% (365/381)	99,1%(121/122)
	Springcrest_Sn	HUES_Springcrest	MK934764			96,1% (366/381)	99,1%(121/122)

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Várallyay Évának a PhD munkámhoz nyújtott segítségért, köszönöm a Molekuláris Növénykórtan Csoport és a Növényi Fejlődésbiológia Csoport munkatársainak támogatását. Köszönöm a NAIK-MBK munkatársainak a tanácsait, építő kritikáit, melyekkel ismereteimet bővítettem.

Köszönöm a NAIK - Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet és a NÉBIH Velencei Virologiai Állomás munkatársainak a lehetőséget, hogy vizsgálataimhoz szükséges mintákat rendelkezésünkre bocsátották, és segítséget nyújtottak a mintavétel során.

Köszönöm feleségemnek, családomnak és barátaimnak a PhD tanulmányaim során nyújtott támogatást.