10.14751/SZIE.2020.011

10.14751/SZIE.2020.011

Doktori (PhD) értekezés

Ádám János

Gödöllő

2019

10.14751/SZIE.2020.011

10.14751/SZIE.2020.011

SZENT ISTVÁN EGYETEM

Csonthéjasok PPV fertőzöttségének vizsgálata

Ádám János

Gödöllő

2019

10.14751/SZIE.2020.011

10.14751/SZIE.2020.011

A doktori iskola

megnevezése: **Kertészettudományi Doktori Iskola**

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Zámboriné dr. Németh Éva egyetemi tanár, MTA doktora
SZENT ISTVÁN EGYETEM, Kertészettudományi Kar,
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető: Dr. Palkovics László egyetemi tanár, MTA doktora
SZENT ISTVÁN EGYETEM, Kertészettudományi Kar,
Növénykórtani Tanszék

……. ……
Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

10.14751/SZIE.2020.011

10.14751/SZIE.2020.011

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ... 4
2. CÉLKITŰZÉS ... 5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ... 6
3.1. A vírus gazdasági jelentősége és elterjedése ... 6
3.2. A vírus rendszertani besorolása, jellemzése ... 9
3.3. A PPV törzsek jellemzése ... 11
3.3.1. Dideron (D) törzs ... 11
3.3.2. Marcus (M) törzs ... 12
3.3.3. Rekombináns (Rec) törzs ... 13
3.3.4. El Amar (EA) törzs ... 13
3.3.5. Cherry (C) törzs ... 13
3.3.6. Winona (W) törzs ... 14
3.3.7. Turkey (T) törzs ... 14
3.3.8. Cherry Russian (CR) törzs ... 14
3.3.9. Ancestor Marcus (AM) törzs ... 15
3.4. A vírus gazdanövényköre ... 15
3.5. A vírus tünetei a fontosabb gazdanövényeken ... 16
3.5.1. Tünetek szilván ... 16
3.5.2. Tünetek őszibarackon ... 17
3.5.3. Tünetek kajszin ... 17
3.6. A vírus természetes terjedése ... 18
3.7. Védekezés helyzete és lehetőségei ... 20
3.7.1. Rezisztencia alkalmazása ... 22
4. VIZSGÁLAT HELYE, ANYAGA ÉS MÓDSZERE ... 25
4.1. A vizsgálatok helye ... 25
4.1.1. A hazai felmérés helyszíne ... 25
4.1.2. Az alany-nemes kombinációk vizsgálatának helyszíne ... 25
4.1.3. A gazdanövény preferencia vizsgálatának helyszíne ... 26
4.1.4. Az FTA technológia vizsgálatainak helyszíne ... 27
4.2. Vizsgálatok anyaga ... 28
4.2.1. Az északi megyékben végzett felmérés mintái ... 28
4.2.2. Az alany-nemes kombinációk vizsgálatában szereplő minták ... 30
4.2.3. Vizsgált alanyfajták jellemzése ... 30
4.2.4. A vizsgálatban szereplő nemesfajták jellemzése ... 32
4.2.5. A gazdanövény preferencia vizsgálatában használt minták ... 34
4.2.6. Az FTA technológia ... 34
4.2.7. A vizsgálat során alkalmazott kit-ek és vegyszerek ... 36
4.2.8. Felhasznált primerek ... 36
4.2.9. A PCR készülék ... 37
4.3. Vizsgálati módszerek ... 37

4.3.1. Összribonukleinsav-kivonás (TRNS) levélszövetből ... 37
4.3.2. Reverz transzkripció ... 38
4.3.3. Polimeráz láncreakció (RT-PCR, nested PCR) ... 38
4.3.4. A PCR-termék visszaizolálása és tisztítása ... 39
4.3.5. Törzsmeghatározás Restrikciós analízissel (RFLP) ... 39
4.3.6. Törzsmeghatározás M, D és Rec törzs specifikus primerekkel ... 39
4.3.7. Nukleotid szekvencia meghatározása és analízise ... 41
4.3.8. Statisztikai módszerek ... 42
4.3.9. Az FTA technológia – mintagyűjtéstől PCR-ig ... 43
5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ... 44
5.1. A hazai felmérés eredményei ... 44
5.1.1. A PCR vizsgálat eredménye ... 44
5.1.2. A restrikciós analízis eredménye ... 47
5.1.3. Szekvencia analízis és rokonsági kapcsolat feltárása ... 50
5.2. A hazai felmérés eredményeiből levont következtetések ... 51
5.3. Az alany-nemes kombinációk vizsgálatának eredményei ... 53
5.3.1. A PCR vizsgálatok eredményei ... 53
5.3.2. A törzsmeghatározás eredményei ... 58
5.3.3. Szekvencia analízis és rokonsági kapcsolatok feltárása ... 60
5.3.4. Statisztikai eredmények ... 62
5.4. Az alany-nemes kombinációk eredményeiből levont következtetések ... 65
5.5. Gazdanövény preferencia vizsgálatának eredményei ... 67
5.6. A gazdanövény preferencia vizsgálat eredményeiből levont következtetések ... 69
5.7. Az FTA technológia vizsgálatának eredményei és következtetések ... 71
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ... 73
7. ÖSSZEFOGLALÁS ... 74
8. SUMMARY ... 77
9. IRODALOMJEGYZÉK ... 79
10. MELLÉKLETEK ... 96
M1. – Ábrajegyzék ... 96
M2. – Táblázatjegyzék ... 97
M3. – A TÉT38-as azonosítóval ellátott izolátum szekvenciája ... 98
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 99

10.14751/SZIE.2020.011

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3'NIb–CP	az NIb gén 3' végének és a CP génnek megfelelő cDNS szakasz
3'P3–6K$_1$–5'CI	a P3 gén 3' végének, a teljes 6K$_1$ génnek és CI gén 5' végének megfelelő cDNS-szakasz
6K$_1$	első 6 kD-os fehérje
6K$_2$	második 6 kD-os fehérje
A	Adenin
Bg	*Prunus persicae* 'Babygold 6'
bp	bázispár
CABI	Centre for Agriculture and Biosciences International
Cad	*Prunus davidiana x Prunus persica* 'Cadaman' alany
cDNS	komplementer DNS
CI	henger alakú zárványfehérje, cylindrical inclusion protein
CP	köpenyfehérje, capsid protein, coat protein
Cr	*Prunus persicae* 'Cresthaven'
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid trifoszfát
EPPO	European Plant Protection Organization
FTA	Flinders Technology Associates
HC-Pro	segítő fehérje és proteáz, helper component protease
kD	kilodalton, relatív molekulatömeg
Man	mandula magonc alany
Mic	*Prunus persicae* 'Michelini'
mRNS	hírvivő RNS, messenger RNS
NIa	kis sejtmagi zárványfehérje, nuclear inclusion „a" protein
NIb	nagy sejtmagi zárványfehérje, nuclear inclusion „b" protein
OEPP	Office of Executive Policy and Programs
ORF	nyitott leolvasási keret, open reading frame
P1	első fehérje, first protein/protease
P3	harmadik fehérje, third protein
PCR	polimeráz láncreakció, polymerase chain reaction
PIPO	Pretty Interesting *Potyviridae* ORF
PPV	*Plum pox virus*, szilvahimlő vírus, sharka vírus
RFLP	restriction fragment length polymorphism, nukleinsav hasításos eljárás
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció, fordított átírás
RT-PCR	reverz transzkripciós-PCR, fordított átírást követő PCR, reverse transcription-PCR
ssRNS	egyszálú RNS, single stranded RNS
TRNS	összribonukleinsav, totál ribonukleinsav
UTR	nem-kódoló régió
VPg	genomhoz kötött protein, viral protein genome-linked

10.14751/SZIE.2020.011

1. BEVEZETÉS

Magyarországon az almatermésűek után a csonthéjas gyümölcsöket termesztik a legnagyobb mennyiségben és területen. A hazai környezeti feltételek valamennyi mérsékelt égövi gyümölcsfaj termesztéséhez adottak, azonban számos tényező befolyásolja termeszthetőségüket. Az éghajlat változása és az egyre gyakoribb szélsőséges időjárási jelenségek mellett a már ismert, és újabb növényvédelmi problémák, köztük a jelentős károkat okozó vírusfertőzések jelentenek nagy gondot.

A szilva (*Prunus domestica* L.) sokoldalú feldolgozhatóságának és nagyfokú ökológiai toleranciájának köszönhetően ma is az egyik legnagyobb mennyiségben termesztett csonthéjas gyümölcsfajunk. A szilva hazánkban nagyfokú termésbiztonsággal rendelkezik, alacsony költséggel bőven és rendszeresen terem, gépi betakarításra kiválóan alkalmas. Hazánk az őszibarack (*Prunus persica* L.) és a kajszi (*Prunus armeniaca* L.) gazdaságos termeszthetőségének északi határán fekszik. Mindkét faj nagyon kedvelt és keresett gyümölcs, így hazánkban is viszonylag nagy felületen termesztik őket, az őszibarack a meggy és a szilva után a harmadik legnagyobb területen termesztett csonthéjas gyümölcsünk. Bő fajtaválasztékkal rendelkeznek, de Magyarországon érdemes a helyi (hűvösebb) környezeti feltételeknek megfelelő fajtákat termesztésbe vonni, mert a mediterrán régióból érkező import barackokkal csak ezekkel a fajtákkal lehet felvenni a versenyt.

A szilva himlő vírus (*Plum pox virus*, PPV, sharka vírus) a csonthéjasok termesztését meghatározó kórokozó. Súlyos károkat főleg szilva-, őszibarack- és kajsziültetvényekben okoz. A fertőzés következtében kialakult terméskiesés több milliárd euróra becsülhető gazdasági kárt okoz világszerte napjainkban is. Veszélyességét fokozza, hogy a nemzetközi szaporítóanyag-kereskedelemnek köszönhetően mára világszerte elterjedtté vált, és minden fontosabb csonthéjas gyümölcsfajokat termesztő országban kimutathatóan jelen van. Magyarországon a PPV előfordulása 1948 óta ismert, a csonthéjas gyümölcsösökben a legveszélyesebb, legnagyobb károkat előidéző kórokozók között tartják számon. A betegség következtében csökken a termés mennyisége és minősége, alacsonyabb az áru esztétikai és beltartalmi értéke, szállításkor a gyümölcs könnyebben sérül, romlik a tárolhatósága. A PPV-vel szembeni védekezési stratégiák a levéltetű vektorok elleni védekezés, egészséges szaporítóanyag használata, valamint rezisztens fajták nemesítése. A szilva himlő elleni védekezés kiemelkedő fontosságú módja a rezisztencianemesítés.

2. CÉLKITŰZÉS

A PPV megjelenése óta nagy gazdasági jelentőséggel bír, máig kilenc törzsét írták le, és a jövőben elképzelhető, hogy számolnunk kell meggyen és cseresznyén is járványos megjelenésével. Dolgozatomban a vírus hazai elterjedésnek felmérését, valamint a hazánkban jelen lévő törzsek felmérését és gazdanövény preferenciájuknak vizsgálatát tűztem ki fő feladatul. A diagnosztikai módszerek folyamatos fejlődése hozzájárul a vírus elleni küzdelemhez, így a molekuláris vizsgálatokon túl a már meglévő technikák pontosítása, valamint új technikák tesztelése is részét képezi a vizsgálataimnak. Munkám során hazai termesztési gyakorlatban használt őszibarack alany-nemes kombinációknak is vizsgáltam a vírussal szembeni ellenállóságát, eredményeimmel a termesztés sikerességéhez szeretnék hozzájárulni. Munkám és dolgozatom főbb céljai ezek után a következők:

1. Felmérés készítése Magyarország északi megyéiben a csonthéjas ültetvények és házikertek PPV fertőzöttségéről, a pozitív mintákból származó vírusizolátumok törzsekbe sorolása, és molekuláris jellemzése, valamint a különböző törzsek hazai elterjedtségének feltérképezése.
2. Őszibarack oltványok vizsgálata, mely során vizsgáltuk, hogy igazolható-e, az alanyfajtának hatása a vírusfertőzöttségre, igazolható-e a nemesfajták hatása a vírusfertőzöttségre, és igazolható-e az alany-nemes kombinációk hatása a vírusfertőzöttségre.
3. Egy ültetvényben egymás mellett elhelyezkedő szilva, kajszi és őszibarack fák virológiai vizsgálatának elvégzése, a PPV kimutatása molekuláris módszerekkel, a vírustörzsek meghatározása, a vizsgált csonthéjasokon előforduló PPV törzsek gazdanövény preferenciáinak vizsgálata.
4. A korábban már ismert P3–CI genomi régióban végzett RFLP vizsgálat tökéletesítése a leggyakrabban előforduló PPV törzsek (M, D Rec) azonosítására.
5. A Whatman FTA (Flinders Technology Associates) membrán alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata a mintagyűjtés, tárolás és a vírusdiagnosztika területén.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A vírus gazdasági jelentősége és elterjedése

A szilva himlő napjaink egyik legfontosabb csonthéjas gyümölcsöket érintő vírusos betegsége. Különösen a dél- és közép-európai országokban komoly gazdasági kárt okoz a szilva-, őszibarack- és kajszi ültetvényekben (Németh, 1994). Ez a gazdasági kár nem csak a vírusfertőzöttség miatt eladhatatlanná vált kajszi-, és szilvatermés okozta bevételkiesésben jelenik meg, hanem az egészségügyi ellenőrzések és a vírus felszámolására irányuló intézkedések költségében is. Egy 2006-os kutatás szerint a PPV miatti kiadások összege világszinten eléri a 10 milliárd eurót (Cambra *et al.*, 2006). Az okozott gazdasági kárt könnyen tovább növelheti a PPV más vírusok jelenlétében (pl. *Apple chlorotic ringspot virus*) mutatott szinergista hatása (Németh, 1994).

A vírusfertőzés gazdasági szempontból gyümölcskártételével okozza a legnagyobb problémát (Németh, 1979). A vírus termésmennyiség-csökkenést idéz elő egyrészt a gyümölcshullásból adódóan, másrészt a fán maradó gyümölcsök 0,2–3,7%-os tömegcsökkenésével. Megváltoznak a fertőzött gyümölcsök beltartalmi értékei, a cukorszázalék akár 0,14–2,11%-kal is csökkenhet érzékeny fajtáknál. Ezzel párhuzamosan a savtartalom 0,14–0,27%-kal nő (Jordovic és Janda, 1963). A relatív savanyúság érzet a cukor-sav arány jelentős mértékű megváltozásával a gyümölcs élvezeti értékét rontja. A megbetegedett gyümölcsök antocián tartalma csökken (György, 1976). Ízetlen és rostos állományúak lesznek a gyümölcsök. A betegségre fogékony fajtáknál a fertőzés tartósan kihat a termés minőségére és mennyiségére, sőt akár teljesen tönkre is teheti a fát. Kajszinál a fertőzés következményeképpen az érés 10-14 nappal korábban bekövetkezik, a gyümölcsök romlandók, a szállítást nem bírják. A gyümölcs foltosodása, deformálódása minőségrontó tényező, amely az értékesíthetőséget rontja (Hamdorf, 1985). Később leírták a vírusfertőzést kísérő további jelenségként a fák törzsének deformációja mellett a fertőzött fák kéreghasadását is (Zawadzka, 1979). A PPV fontosságát felismerve az EPPO nemzetközi szervezet a kórokozót az A2 karantén kategóriába sorolta (http://www.eppo.int).

A kórokozóról szóló első tudományos közlés 1917-18-ban Bulgáriában jelent meg egy nagy gazdasági kárt okozó szilva himlő járványról (Atanassov, 1932). Bulgáriában a korábban termesztett "Kjüstendil" szilvafajta és más érzékeny fajták olykor 95-100%-os érés előtti gyümölcshullást mutattak a PPV fertőzés következtében, amely

éves szinten megközelítőleg a 60 ezer tonnát is elérte (Trifonov, 1974). Az 1987−92-ben végzett felmérések alapján a szilvák 24,34%-a, őszibarackok 15,7%-a, kajszik 10%-a, meggyek 31%-a, cseresznyék 11,74%-a, mandulák 1,5% fertőzöttnek bizonyult. Macedónia és Bosznia-Hercegovina területén hasonló mértékű károkat figyeltek meg. Jugoszlávia egyes vidékein a szilvafák 90–100%-a már 1936-ban vírusfertőzött volt, 1955-ben 16 millió fertőzött fát találtak (Novaković, 1955). Romániai adatok ezen tájt 12–77%-os termésmennyiség veszteséget említenek a fertőzött szilvaültetvényeken. Moldáviai források szerint a szilva termésvesztesége 16–48%-ra tehető (Minoiu, 1975). Az egykori Csehszlovákia területén történt felmérések alapján az erősen fertőzött területeken a fánkénti átlagos termésmennyiség 83,4%-kal csökkent (Blattny és Heger, 1965). 1961-ben 90 000 faiskolai növényt semmisítettek meg PPV fertőzöttség miatt (Králiková, 1963). Spanyolországban 1988−1993 között 560 000 gyümölcsfát, Franciaországban 1992-ben 27 000 fát, valamint 1993-ban 100 hektár gyümölcsöst semmisítettek meg a PPV fertőzés továbbterjedése és a gazdasági károk mérséklése érdekében (Roy és Smith, 1994). Magyarországi vizsgálatok alapján a szilva gyümölcshullása elérte a 28,6–37,4%-ot (Németh, 1979).

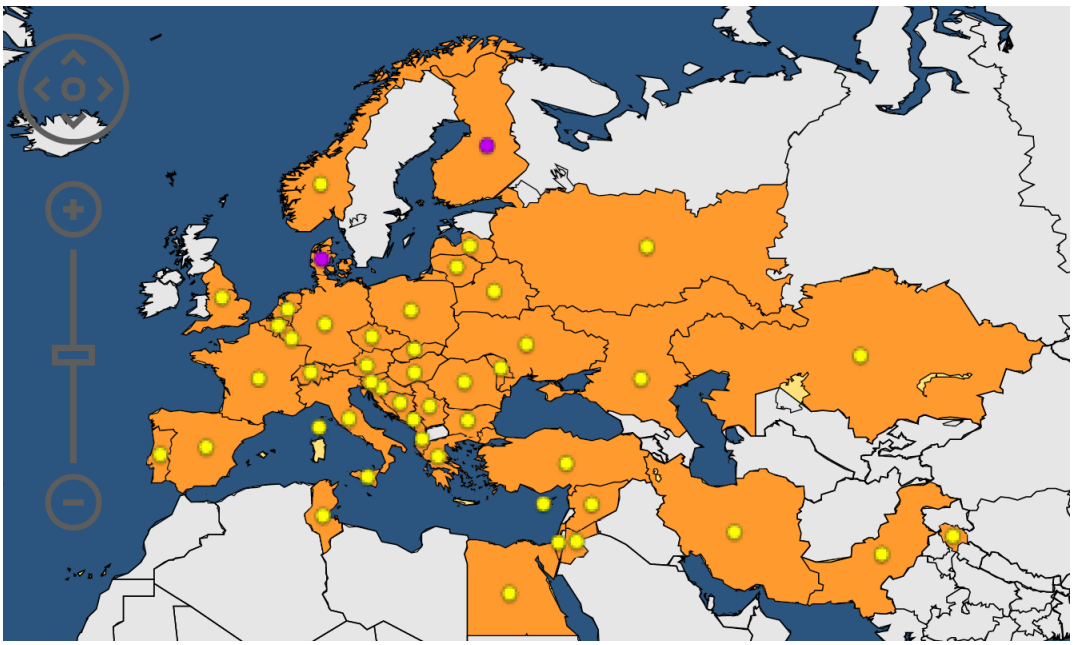
A vírus felismerését követően agresszívan terjedt először a mediterrán régióban és a Közel-Keleten, majd egész Európában (1. táblázat, 1-2. ábra). A kórokozó első hazai leírása a kajszi faiskolák „csillagfoltosság betegsége" néven történt (Szirmai, 1948). Majd 1951-ben szilván (Husz és Klement, 1951), 1963-ban őszibarackon (Németh, 1963), valamint mandulán is azonosították (Pribék és Gáborjányi, 1997). A vadon előforduló, valamint dísznövényként alkalmazott *Prunus* fajok közül a PPV szórványos előfordulását jelezték *P. spinosa* fajon (Salamon és Palkovics, 2002).

Leírták Egyiptomban (Wetzel *et al.*, 1991a) Dél-Amerikában, később Észak-Amerikában is, és az Indiai szubkontinensen (Thakur *et al.*, 1994). Japánban 2009-ben jelent meg a PPV (Maejima *et al.*, 2011). A szaporítóanyagok nemzetközi kereskedelme révén a vírus rohamosan terjedt, mára csak Ausztrália és Óceánia területén nincs jelen (Matthews, 2013).

1. táblázat: PPV megjelenése a világon kontinensenként időrendi sorrendben (http://www.cabi.org)

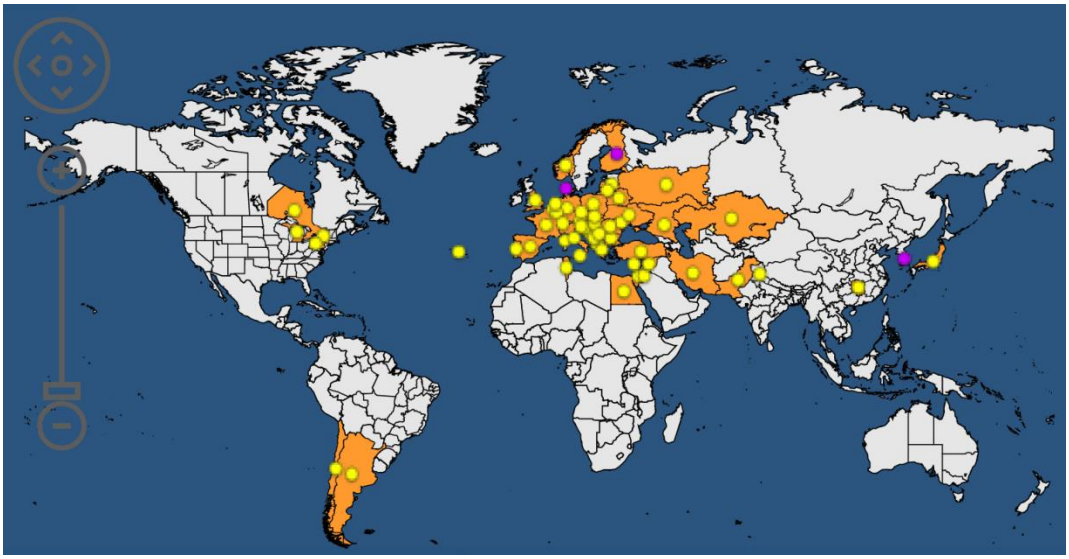
Régió	Első megjelenés	Hivatkozás
ÁZSIA		
Szíria	1984-85	(Dunez, 1986)
India	1994	(Thakur *et al.*, 1994)
Jordánia	2000	(Al-Rwahnih *et al.*, 2000)
Kazahsztán	2004	(Spiegel *et al.*, 2004)
Kína	2001	(Navratil *et al.*, 2005)
Pakisztán	2006	(Kollerová *et al.*, 2006)
Japán	2009	(Maejima *et al.*, 2010)
Dél-Korea	2016	(Oh *et al.*, 2017)
AFRIKA		
Egyiptom	1986	(Németh, 1994)
Tunézia	2000s	(Boulila *et al.*, 2004)
ÉSZAK-AMERIKA		
USA	1999	(Milius, 1999)
Kanada	2000	(Thompson *et al.*, 2001)
DÉL-AMERIKA		
Chile	1992	(Roy és Smith, 1994)
Argentína	2004	(Dal Zotto *et al.*, 2006)
EURÓPA		
Bulgária	1915	(Atanassov, 1932)
Szerbia	1935	(Dulic-Markovic és Jevremovic, 2006)
Csehország	1940s	(Roy és Smith, 1994)
Románia	1941	(Roy és Smith, 1994)
Magyarország	1948	(Szirmai, 1948)
Horvátország	1949	(Kajic *et al.*, 2008)
Szlovákia	1950	(Glasa, 2006)
Németország	1955	(Roy és Smith, 1994)
Bosznia-Hercegovina	1960s	(Roy és Smith, 1994)
Ausztria	1961	(Németh, 1994)
Luxemburg	1961	(Roy és Smith, 1994)
Lengyelország	1962	(Roy és Smith, 1994)
Moldova	1962	(Kölber *et al.*, 2001)
Egyesült Királyság	1965	(Mumford, 2006)
Hollandia	1965	(Verhoeven *et al.*, 2006)
Görögország	1967	(Roy és Smith, 1994)
Svájc	1967	(Roy és Smith, 1994)
Ukrajna	1967	(Kondratenko és Udovychenko, 2006)
Törökország	1968	(Roy és Smith, 1994)
Franciaország	1970	(Quiot *et al.*, 1995)
Albánia	1971	(Kölber *et al.*, 2001)
Olaszország	1973	(Roy és Smith, 1994)
Belgium	1974	(Roy és Smith, 1994)
Spanyolország	1981	(Llácer *et al.*, 1985)

Ciprus	1982	(Roy és Smith, 1994)
Portugália	1984	(Roy és Smith, 1994)
Szlovénia	1987	(Roy és Smith, 1994)
Litvánia	1995	(Staniulis *et al.*, 1998)
Norvégia	1998	(Blystad és Munthe, 2006)



1. ábra: A PPV elterjedése Európában (forrás: CABI, 2018)

Jelmagyarázat: Sárga pont: elterjedt, Lila pont: szórványos megjelenés



2. ábra: A PPV elterjedése a világon (forrás: CABI, 2018)

Jelmagyarázat: Sárga pont: elterjedt, Lila pont: szórványos megjelenés

3.2. A vírus rendszertani besorolása, jellemzése

A PPV a *Potyviridae* családba, azon belül is a *Potyvirus* nemzetségébe tartozó növénypatogén vírus.

A *Potyviridae* családba közel 200 bizonyított és lehetséges faj tartozik, amely az összes ismert növényi vírus 30%-át teszi ki (Shukla *et al.,* 1994). Hét nemzetség alkotja: *Potyvirus, Ipomovirus, Macluravirus, Rymovirus, Tritimovirus, Brambyvirus* és *Bymovirus*. Utóbbi nemzetségbe tartozó vírusok két RNS molekulát tartalmaznak, melyek hossza 250-300 nm és 500-600 nm, míg a többi hat nemzetség tagjai mind egyszálúak, hosszuk 650-900 nm (King *et al.,* 2011). A családba tartozó vírusok mindegyikére jellemző, hogy a fertőzést követően intracelluláris szélkerék formájú zárványtesteket hoznak létre a fertőzött növényben (Edwardson *et al.,* 1984). A *Potyvirus* és *Macluravirus* nemzetség tagjai nem-perzisztens módon levéltetvekkel, a *Bymovirus* nemzetség tagjai a *Plasmodiophorales* rendhez tartozó gombákkal, a *Rymovirus* és a *Tritimovirus* tagjai gubacsatkákkal, és az *Ipomovirus* nemzetség tagjai dohány molytetűvel terjednek (King *et al.,* 2011).

A *Potyvirus* nemzetség tagjai egyszálú, lineáris, pozitív RNS-t tartalmaznak. Virionjaikat 5%-ban nukleinsav és 95%-ban fehérje alkotja, jellemzően rugalmas fonál alakúak, 680-900 nm hosszúak, 11-13 nm átmérőjűek, és a megközelítőleg 2000 CP alegységgel együtt helikális formába rendeződnek (King *et al.,* 2011; Urcuqui-Inchima *et al.,* 2001). A nemzetség típustagja a *Potato virus Y,* azaz a burgonya Y vírus. A nemzetség tagjai általában szűk gazdanövénykörrel rendelkeznek, de egyes vírusok akár 30 gazdanövény családot is fertőzhetnek. A legtöbb potyvírus a mechanikai átvitel mellett nem perzisztens módon levéltetűvel is terjed, de vannak egyedek, amelyek ez alól kivételt képeznek – valószínűleg a helper komponens, vagy a CP cisztronok mutációja miatt. Néhány potyvírus maggal is képes terjedni (King *et al.,* 2011).

A PPV genomja izolátumtól függően 9420-9975 (NCBI azonosító: LC333268 - JQ794501) nukleotid hosszúságú, pozitív szálú RNS (+ssRNS). A genom egy 5’ nem-kódoló-régióból (5’UTR), egy nyitott leolvasási keretből (open reading frame, ORF), és egy 3’ nem-kódoló-régióból (3’UTR) tevődik össze. Az 5’ végnél található egy *Potyviridae* családra jellemző genomhoz kötött protein (VPg), míg a 3’ véghez egy poliadenilált szekvencia kapcsolódik (Hari, 1981; Riechmann *et al.,* 1989). A két vég közötti szakasz egy több, mint 3000 aminosav hosszú poliproteint kódol, amelyet a transzláció során a vírus által kódolt proteázok fognak hasítani (Urcuqui-Inchima *et al.,* 2001). A 3. ábrán látható géntermékek az 5’-vég felől a következők: első fehérje (P1), segítő fehérje és proteáz (Hc-Pro), harmadik fehérje (P3), első 6 kD-os fehérje ($6K_1$), henger alakú zárványfehérje (Cl), második 6 kD-os fehérje ($6K_2$), kis sejtmagi zárványfehérje (NIa), nagy sejtmagi zárványfehérje (NIb), köpenyfehérje (CP)

(Riechmann *et al.*, 1992). A genom ezen kívül tartalmaz egy PIPO (Pretty Interesting *Potyviridae* ORF) elnevezésű, a P3 fehérjével átfedésben lévő nyitott leolvasási keretet is (Chung *et al.*, 2008).

A PPV a különböző evolúciós nyomásokra – felépítésének köszönhetően – igen könnyen reagál genetikai diverzifikációval. Ezt a hajlamot erősíti még a leggyakoribb gazdanövényeinek vegetatív szaporítása (oltás, szemzés stb.), az íly módon fertőzött növények országokon átívelő kereskedelme és az afidofil tulajdonsága (James *et al.*, 2013).

Az 1970-es években a szilva hímlő vírusnak 3 csoportját különítették el *Chenopodium foetidum* gazdanövényen okozott tünetek alapján: sárga (yellow), köztes (intermediate) és nekrotikus (necrotic) törzset (Šutić *et al.*, 1971). Mára a molekuláris analitikai módszerek megjelenésével a PPV 9 törzsét sikerült elkülöníteni.

3. ábra: A PPV genomjának sematikus ábrája

Jelmagyarázat: Genomhoz kötött protein (VPg); az első fehérje (P1); segítő fehérje és proteáz (HC–Pro); harmadik fehérje (P3); első 6 kD-os fehérje ($6K_1$); henger alakú zárványfehérje (CI); második 6 kD-os fehérje ($6K_2$); kis sejtmagi zárványfehérje (NIa); nagy sejtmagi zárványfehérje (NIb); köpenyfehérje (CP); poliadnenilált szakasz (A_n) (Riechmann *et al.*, 1992), *valamint a PIPO fehérje (Pretty Interesting Potyviridae ORF)* (Chung *et al.*, 2008).

3.3. A PPV törzsek jellemzése

3.3.1. Dideron (D) törzs

A két első PPV törzs, amelyet molekuláris analitikai módszerekkel sikerült elkülöníteni egymástól, a D és az M. A D törzset elsőként az 1970-es évek végén egy dél-kelet franciaországi kajszi mintáról sikerült leírni (Kerlan és Dunez, 1979). A két törzs elkülönítéséhez használt legelterjedtebb nukleinsav alapú módszer a vírus köpenyfehérjét kódoló régiójának (CP régió) 3’ végét célzó RT-PCR, majd RFLP. A PCR reakció során keletkező 243 bp hosszúságú cDNS szakaszon a D törzs izolátumai esetében megtalálható egy *Rsa*I restrikciós enzim hasítóhely, az M törzsnél viszont nem (Wetzel *et al.*, 1991b). A molekuláris módszerek mellett lehetőség van már D

törzs-specifikus, monoklonális ellenanyaggal végzett szerológiai elkülönítésre is (Cambra *et al.*, 1994).

A D az egyik legáltalánosabban elterjedt törzse a sarka vírusnak. A világon szinte mindegyik országban jelen van, ahol a PPV-t megtalálták és végeztek vírustörzs meghatározási vizsgálatokat (García és Cambra, 2007). A D törzsre a kevésbé hatékony levéltetű átvitel és gyengébb tünetek megjelenése a jellemző (Levy *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006). Legtöbbször szilván és kajszin mutatták ki, de izolátumoktól és földrajzi helyzettől függően levéltetű átvitelben és gazdanövény preferenciában is észleltek eltéréseket (Dallot *et al.*, 1997; Candresse és Cambra, 2006; Schneider *et al.*, 2011; Subr *et al.*, 2013). A D törzsön belüli genetikai diverzitás viszonylag alacsony, az izolátumok köpenyfehérjét kódoló nukleotidjai és a poliadenilált végek hasonlósága 99–96% között alakul (Matic *et al.*, 2011).

3.3.2. Marcus (M) törzs

A másik 1979-ben elkülönített PPV vírustörzs az M, amelyet egy görögországi őszibarack mintáról írtak le először (Kerlan és Dunez, 1979). Az M törzs szerológiailag és genetikailag is különbözik a D törzstől (Boscia *et al.*, 1997; Kerlan és Dunez, 1979). A fentebb említett nukleinsav alapú RT-PCR-t követő RFLP módszer alkalmazásakor az M – a D törzstől eltérően – nem tartalmazza az *Rsa*I hasítóhelyet kódoló szakaszt (Wetzel *et al.*, 1991b). Vannak azonban olyan esetek, amikor a D törzsű izolátum *Rsa*I hasadási helyén az aminosav sorrend megváltozik (GTAC-ról GTGC-re), így a meggátolt enzimműködés következtében téves M eredményt kapunk (James és Glasa, 2006). Vírustörzsek vizsgálatakor érdemes tehát több genomi régiót is célzó eljárásokat alkalmazni.

Ennél a törzsnél is megfigyelhetők a különböző izolátumok közötti eltérések. Két szerológiailag különböző altörzset különböztetnek meg: a mediterrán régióból származó M1-et, illetve a kelet- és közép-európai M2-t. Az altörzsek közötti területi megoszlás a vírustörzs földrajzi elterjedésének és evolúciós kapcsolatainak időbeli alakulására enged következtetni (Myrta *et al.*, 2001). Az M törzsön belüli genetikai diverzitás, hasonlóan a D törzshöz viszonylag alacsony, az izolátumok köpenyfehérjét kódoló nukleotidjai és a poliadenilált végek hasonlósága 99–100% között mozog (Matic *et al.*, 2011). Az M törzs tagjai általában erőteljesebb tüneteket váltanak ki, gyorsabban terjednek levéltetvekkel és könnyebben fertőzik az őszibarackot (Dallot *et al.*, 1997; Bianco *et al.*, 2004; Llácer és Cambra, 2006). A vírustörzsre jellemző agresszivitást jól példázza egy kísérlet, melyben egy D, M és Rec vírustörzzsel

fertőzött szilvafán 7 év elteltével csak az M törzset tudták kimutatni (Predajňa *et al.*, 2012b).

3.3.3. Rekombináns (Rec) törzs

A *Potyvirus* nemzetségen belüli rekombinációra elsőként a 90-es évek elején találtak példát Szerbiában (mai Montenegro – ǒ6 izolátum) egy *Prunus* fajon (Cervera *et al.*, 1993). Később, 2001-ben írták le Nyugat-Szlovákiában a BOR-3 izolátumot egy magról ültetett kajszibarackról (Glasa *et al.*, 2001). További, az előzőhöz hasonló rekombináns minták vizsgálata során megállapították, hogy ezek az izolátumok egy külön csoportot alkotva képezik a Rec törzset. A Rec izolátumok rekombinációs pontja az NIb fehérjét kódoló szakaszban található a 8449 és a 8450 nukleotid között. Az 1–8449 nukleotidig tartó szakasz a D törzsből, míg az 8450. nukleotidtól a 3' végig terjedő szakasz az M törzsből származik (Glasa *et al.*, 2004). A CP régióra irányult vizsgálati módszerekkel a Rec törzs a rekombinációs pont elhelyezkedése miatt nem mutatható ki egyértelműen (M eredményt ad). Az általunk is használt Rec specifikus RT-PCR során a primerek (mD5 és mM3) a rekombinációs pont mentén elhelyezkedő DNS szakaszokra kapcsolódnak, ezzel létrehozva egy 605 bp hosszúságú, csak a Rec törzsre jellemző szakaszt (Subr *et al.*, 2004). Az M törzshöz hasonlóan a Rekombináns törzs tagjai is könnyen fertőzik a szilvát (Subr *et al.*, 2013).

3.3.4. El Amar (EA) törzs

Az EA törzset először 1991-ben sikerült leírni egy egyiptomi (El Amar régióból származó) kajszi mintáról (Wetzel *et al.*, 1991a). További vizsgálatok során kiderült, hogy az EA törzs 3' régiója genetikailag igen eltér a többi törzs azonos szakaszától (81%), valamint hogy a teljes nukleinsav szekvenciája 79–80%-ban egyezik meg a D, 80%-ban az M, 77%-ban a Rec, és 77%-ban a C törzsekkel (Myrta *et al.*, 2006). Az EA törzs elkülönítésére egyaránt léteznek szerológiai, és PCR-alapú módszerek (Hammond *et al.*, 1997; Szemes *et al.*, 2001; Matic *et al.*, 2011).

Annak okát, hogy az EA törzset eddig csak Egyiptomban sikerült azonosítani, még ma is kutatják, de az elterjedtség valós méretének megállapítását a vírustörzs-vizsgálatok hiánya is nehezítheti (James *et al.*, 2013). Egy Egyiptomban végzett felmérés szerint az EA csak az ország idősebb kajszi ültetvényeiben található meg (37%), a későbbi telepítésűekben nem (Maghraby *et al.*, 2007).

3.3.5. Cherry (C) törzs

Korábbi megállapításokkal ellentétben, a PPV képes meggy- és cseresznyefákat is fertőzni; meggyen 1989-ben Moldovában, míg cseresznyén 1997-ben sikerült először

beazonosítani (Kalashyan *et al.*, 1994; Crescenzi *et al.*, 1997). Később, 2003-ban Fanigliulo és társai megállapították, hogy a meggy- és cseresznyefákról származó vírusminták a többi PPV vírustörzstől jelentősen különböznek, miközben egymáshoz viszont nagyon hasonlóak, így együtt alkotják a C törzset (Fanigliulo *et al.*, 2003).

A C törzs elkülönítésére rendelkezésre állnak szerológiai és különböző molekuláris módszerek (Nemchinov és Hadidi, 1998; Myrta *et al.*, 2000; Szemes *et al.*, 2001).

3.3.6. Winona (W) törzs

A W törzset először 2003-ban Kanadában azonosították (James *et al.*, 2003; James és Varga, 2005), amikor se az univerzális PPV 5B antitestek (Cambra *et al.*, 1994), se széles spektrumú RT-PCR (Wetzel *et al.*, 1991b) segítségével nem sikerült azonosítani a 3174-01 jelölésű izolátum törzsbéli besorolását. Később a kanadai mintát követően megtalálták még Ukrajnában szilván (Mavrodieva *et al.*, 2008, 2013), Litvániában szilván és kökényen (Glasa *et al.*, 2011) és Oroszországban szilván, kökényen, kanadai szilván (*Prunus nigra*) és pelyhes meggyen (*Prunus tomentosa*) (Sheveleva *et al.*, 2012). Filogenetikai vizsgálatok során kiderült, hogy a W a C törzzsel áll a legközelebbi rokonságban. A W törzs kimutatására ma már törzsspecifikus primerek (James és Varga, 2005; Glasa *et al.*, 2011), és monoklonális ellenanyagok is rendelkezésre állnak (Croft *et al.*, 2008).

3.3.7. Turkey (T) törzs

A Rec törzs mellett a T a másik példája a fajon belüli rekombinációs események következtében kialakuló törzsnek. Bár a T mintákban több rekombinációs pontot is sikerült azonosítani, csak egy olyat találtak, amely minden vizsgált izolátumban fellelhető. Ez a közös rekombinációs pont a HC-Pro fehérjét kódoló régión belül a genom 1566. nukleotidjánál helyezkedik el. A PPV-T törzs izolátumait eddig csak törökországi kajszi és szilvamintákban sikerült azonosítani és (Glasa és Candresse, 2005; Serçe *et al.*, 2009).

3.3.8. Cherry Russian (CR) törzs

Idősebb oroszországi meggyfákon találtak rá 2012-ben a PPV egy újabb törzsére, a CR-re, miután szerológiai és molekuláris vizsgálatok alapján megállapították, hogy a talált izolátumok kevés hasonlóságot mutatnak a már ismert PPV törzsekkel (Glasa *et al.*, 2012). Későbbi filogenetikai vizsgálatok a CR és C törzsek közös eredetére engednek következtetni, amelynek következtében mindkét törzs képessé vált meggyfák és cseresznyék fertőzésére (Glasa *et al.*, 2012; Chirkov *et al.*, 2013).

3.3.9. Ancestor Marcus (AM) törzs

Az AM törzset eddig csak egy izolátum esetében sikerült azonosítani egy albániai szilvamintában 2012-ben. Genetikai felépítése alapján egy evolúciós elmélet szerint ez lehet az M törzs potenciális őse (Palmisano *et al.*, 2012).

3.4. A vírus gazdanövényköre

A sharka vírus számos különböző növényfajt fertőz, amelyek között termesztett, dísz-, vad- és gyomnövények is vannak. A vírus természetes gazdanövényei a *Prunus* fajok közül a következők:

Persica x davidiopersica 'Atropurpurea', *Prunus amygdalus, P. armeniaca, P. avium, P. bessey, P. x blireana, P. cerasifera, P. cerasifera x munsoniana 'Marianna', P. cerasus, P. domestica, P. glandulosa, P. institia, P. japonica, P. persica, P. spinosa, P. salicina, P. tomentosa, P. triloba* (Németh, 1979; Llacer és Cambra, 1986; Kalashyan *et al.*, 1994; Crescenzi *et al.*, 1994; Sebestyen *et al.*, 2008; OEPP/EPPO, 2004). A nem *Prunus* nemzetségbe tartozó fás szárú gazdanövényei az *Euonymus europaeus* és a *Ligustrum vulgare* (Polak, 2000). A gyümölcsösökben megtalálható gyomnövények közül a következő fajokat képes fertőzni: *Ajuga genevensis, Campanula rapunculoides, Capsella bursa-pastoris, Cichorium sp., Cirsium arvense, Clematis sp., Convolvulus arvensis, Datura stramonium, Lactuca serriola, Lamium album, L. amplexicaule, L. purpureum, Lithospermum arvense, Lupinus albus, Medicago lupulina, Melilotus afficinalis, Ranunculus acer, R. arvensis, Rorippa sylvestris, Rumex crispus, Silene vulgaris, Solanum dulcamara, Solanum nigrum, Sonchus sp., Taraxacum officinale, Trifolium incarnatum, Veronica hederifolia* (Kröll, 1973; Milusheva és Rankova, 2001; Virščeк *et al.*, 2003; Pribék *et al.*, 1998).

A PPV-t szilváról először Bulgáriában írták le (Atanassov, 1932), majd később ugyanitt megtalálták kajszin is (Christoff, 1958). Őszibarackról a világon először Németh Mária írta le hazánkban (Németh, 1963). Magyarországon a három főbb termesztett *Prunus* faj mellett (kajszi, őszi szilva) a vírus természetes hazai előfordulásáról számoltak be meggyen és cseresznyén (Kölber *et al.*, 1997), mandulán (Pribék *et al.*, 2000) és kökényen (Salamon és Palkovics, 2002). PPV eseti előfordulását jelezték még ördögcérnán és csattanó maszlagon (Pribék és Gáborjányi, 1997), valamint számos dísznövény *Prunus* fajon és fajtán is (Sebestyen *et al.*, 2008).

3.5. A vírus tünetei a fontosabb gazdanövényeken

3.5.1. Tünetek szilván

A fertőzés kezdetén a leveleken szabálytalanul eloszló kivilágosodások vagy ereket szegélyező világos, klorotikus mintázat látható, majd később a vírusra jellemző foltok, gyűrűk és szalagos mintázatok alakulhatnak ki, melyek nagysága a gazdanövénytől függően változhat (4.a ábra). Magasabb hőmérsékleten (jellemzően nyáron) ezek a mintázatok elhalványodhatnak, maszkírozódhatnak (Németh, 1979).

A gyümölcsökön a vírus gyűrű vagy szabálytalan alakú, kékes színű, besüppedő foltokat hoz létre. A minta megjelenhet az epidermisz felületén, súlyos esetben az alatta elhelyezkedő sejteken, amelyek ilyenkor nekrotizálódnak (4.b ábra). A gyümölcs rostossá, ízetlenné válik, és gazdanövénytől függően a termések nagy százaléka érés előtt lehullhat (Németh, 1979).

A szilvafajták érzékenysége (és ezzel a tünetek súlyossága) igen változó. Az európai szilvák közül érzékenynek talált fajták: ’Althann ringló’, ’Ageni’, ’Besztercei szilva’, ’Bluefre’, ’Čačanska rodna’, ’Cambridge Gage’, ’Damson’, ’Early Laxton’, ’Early Transparent Gage’, ’Kirke’, ’Monarch’, ’Morettini 355’, ’Obilnaja’, ’Olasz kék’ (Italian Prune), ’Pozegača’, ’President’, ’Ruth Gerstetter’, ’Victoria’, ’Wangenheimi’, ’Zimmer’s Früzwetsche’, ’Zöld ringló’. Ezeken az egyedeken a terméstünetek súlyosabbak, a gyümölcshús nagyobb mértékben károsodik (Németh, 1986).

Toleráns fajta a ’Besztercei szilva’ Nm. 122 és Nm. 150 klónjai, a ’Čačanska lepotica’, ’Č. najbolja’, ’Č. rana’, ’Czar’, ’Ontario’, ’Prune Ageni’, ’Washington’, ’Prune d’Ente 707’, ’Scoldus’, ’Stanley’, ’Weresne’. A tolerancia miatt a termésen csak felületi kártétel jelentkezik, a gyümölcshús nem károsodik (Németh, 1986).

4. ábra: PPV tünetei szilva levelén (a) és termésén (b) (Fotó: Ádám J., Palkovics L.)

3.5.2. Tünetek őszibarackon

A PPV az őszibarack egyik legfontosabb kórokozója, bár jóval kevésbé károsítja, mint a szilvát. A héjon előidézett mintázat rontja az exportlehetőségeket, csökken a tárolhatóság és a szállíthatóság (Németh, 1979).

Kihajtáskor a fertőzés hatására szabálytalan klorotikus mintázatok mutatkoznak a leveleken (5.a ábra). A kivilágosodott részek fejlődése az egészséges levélrészektől elmarad, így levéldeformációk alakulnak ki. Később ezek a klorotikus részek gyűrűs, az erek mentén szalagos mintázatot vesznek fel. A tünetek a nyári melegben elhalványulhatnak. A levéltünetek mértéke nagyban függ a gazdanövény érzékenységétől (Németh, 1979).

5. ábra: PPV tünetei őszibarack levelén (a) és termésén (b) (Fotó: Ádám J.)

A gyümölcsökön a terméshéjtól világosabb színű gyűrűk jelennek meg (5.b ábra). A világos héjú fajtákon ezek a tünetek teljesen elhalványulhatnak. A vírusfertőzött gyümölcsök kevésbé szállíthatók és tárolhatók, mint az egészségesek (Németh, 1979). Súlyosabb tünetek figyelhetők meg komplex vírusfertőzések esetén, ha az őszibarackot a PPV mellett alma klorotikus levélfoltosság vírus is fertőzi (*Apple chlorotic ringspot virus*), a foltok a teljes gyümölcsfelületet beboríthatják, és ha az előbbi két vírus mellett még egy Ilarvírus is megjelenik (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV), a termés deformálódik, különböző horpadások és repedések jelenhetnek meg rajta (Marenaud *et al.*, 1976).

3.5.3. Tünetek kajszin

A kajszin okozott tünetek bár nem olyan súlyosak, mint szilván, de a gyümölcshéjon és a csonthéj külsején megjelenő jellegzetes foltok nehézséget jelentenek az exportra termelésnél.

A leveleken nem feltűnő klorotikus foltok, gyűrűk, szalagos mintázatok jelennek meg (6.a ábra), amelyek nyári melegben elhalványulhatnak, elmaszkírozódnak (Németh, 1979).

A kajszi esetében a vírusfertőzés egyértelmű jele a kőmagon (csonthéjon) megtalálható világos mintázottság, ami akkor is megjelenik, ha a gyümölcshéj tünetmentes (6.b ábra). Már egész korán, a csonthéj fásodásának kezdetén kialakul, és azután sem tűnik el, miután a gyümölcs rothadásnak indul és a mag kiszárad. A csonthéj körüli részen a hús sokszor száraz és szivacsos. A gyümölcs külsején a tünetek a héj színénél világosabb (egyes fajtáknál sötétebb piros) gyűrűs, szalagos mintázatként jelennek meg. Néhány esetben a gyűrűk besüppednek és bebarnulnak, alatta a gyümölcs rostos állományúvá, íztelenné válik. Súlyos esetben a fertőzés gyümölcstorzulást is eredményezhet. Az érés időpontját akár 10-14 nappal előre hozhatja, és a gyümölcsök tárolhatósága és szállíthatósága romlik. A fertőzött fák növekedése lassabb lesz, a hajtások rövidebbek, a törzskörméret pedig csökken (Németh, 1979).

6. ábra: PPV tünetei kajszi levelén (a) és csonthéján (b) (Fotó: Ádám J., Nagy G.)

3.6. A vírus természetes terjedése

A vírus legfontosabb terjedési módjai a növényi szövetnedvvel, művelőeszközökkel és a levéltetvekkel való átvitel.

A PPV széleskörű elterjedéséért a nemzetközi szaporítóanyag kereskedelemben alkalmazott vegetatív szaporítási módok (oltás, szemzés) során történő vírusátvitel a felelős. Ahhoz, hogy az előállított oltvány vírusmentes legyen, mind az alanynak, mind a nemesnek egészségesnek kell lennie, mert ha csak az egyik is fertőzött, a betegség az egész növényre átterjed. Az emberi tevékenység által a vírus nagyon sok országba

eljutott, többek között hazánkba is feltehetően vegetatív úton szaporított szilvaalanyokkal hozták be Bulgária felől (Németh, 1979).

A szilva himlő vírus kisebb távolságokon belüli gyors, járványszerű elterjedésében kulcsfontosságú a levéltetvekkel való átvitel. Az állati vektorokkal való terjedés sikerességét és a fertőzés térbeli terjedésének alakulását nagyban befolyásolja a gazdanövény és a PPV-izolátum típusa (Šutic *et al.*, 1976; Dallot *et al.*, 2004). Megállapították, hogy ugyanazon levéltetűfaj különböző populációi eltérő vírusátviteli hatékonysággal rendelkezhetnek (Labonne *et al.*, 1994b). Dél-Európában és Észak-Amerikában megfigyelték, hogy a vírust hordozó levéltetvek nem a közvetlenül szomszédos, hanem a kissé távolabbi fákat látogatták szívesebben (Gottwald *et al.*, 1995; Gottwald, 2006). Spanyolországban összetettebb, nagyobb távú (akár 150 méteres) és rövid távú levéltetűmozgást is tartalmazó fertőzési mintákat azonosítottak (Capote *et al.*, 2010). Egy francia kísérletben az újonnan fertőződött fák 90%-a az előzőleg fertőzött fa 200 méteres környezetében helyezkedett el, de távolabbi, akár 600 méteres terjedési távolságot is mértek (Labonne és Dallot, 2006). A PPV a *Prunus* tápnövényű levéltetű fajokon kívül a nemzetség tagjain csak próbaszívásokat végző fajokkal is terjed. A szakirodalom szerint a leghatékonyabb PPV terjesztő levéltetű fajok az *Aphis spiraecola*, a *Myzus persicae* és a *Hyalopterus pruni*. További PPV-átvitelre képes levéltetűfajok a következők: *Aphis arbuti, A. craccivora, A. fabae, A. gossypii, A. hederae, A. idaei, A. nasturtii, A. sambuci, A. spiraephaga, Brachycaudus cardui, B. helichrysi, B. persicae, Dysaphis plantaginea, D. pyri, Hyalopterus amygdali, H. pruni, Macrosiphum rosae, Megoura viciae, Metopolophium dirhodum, Myzus cerasi, M. varians, Phorodon humuli, Rhopalosiphum padi, Sitobion avenae, S. fragariae, Toxoptera citricida, Uroleucon achilleae, U. sonchi* (Krczal és Kunze, 1972; Leclant, 1973; Minoiu, 1973; Fos és Massonié, 1993; Avinent *et al.*, 1994; Labonne *et al.*, 1994a, 1994b; Pribék és Gáborjányi, 1997; Gildow *et al.*, 2004; Labonne és Dallot, 2006).

A PPV a nem-perzisztens, úgynevezett stylet-borne vírusok közé tartozik. Az állati vektorok a vírust a szipókájukkal viszik át egyik növényről a másikra. Nincs inkubációs idő, azaz a vektor a felvétel után azonnal fertőzőképessé válik, de ezt a képességét viszonylag hamar, már 1-2 szívás után elveszítheti (Horváth, 1972). A levéltetveken kívül PPV átvitelre képesek az *Empoasca flavescens* (zöld szőlőkabóca), valamint az *Aculus fockeaui* (csonthéjasok levélatkája) fajok (Jordović, 1963; Isac *et al.*, 1998).

A szilva himlő járványok kialakulásában az afidofil tulajdonság mellett a vírus természetben előforduló rezervoárnövényeinek elterjedtsége is szerepet játszik. A *Prunus spinosa* és a *Prunus institia* fajok mellett a nagy számban előforduló vírusgazda gyomnövények, illetve a dísz- és vad *Prunus* fajok is állandó fertőzési forrásokat jelenthetnek a levéltetvek számára (Salamon és Palkovics, 2002).

A vírus fertőzött maggal történő terjedésének lehetőségét mind a mai napig vizsgálják. Bár az 1960-as években felmerült ennek lehetősége (Szirmai, 1961), és később szerológiai vizsgálatokkal alá is támasztották (Németh és Kölber, 1982), több újabb vizsgálat negatív eredményt adott ezzel kapcsolatban (Pasquini és Barba, 2006; Milusheva *et al.*, 2008). Szerológiai és molekuláris módszerekkel ugyan sikerült kimutatni a vírus jelenlétét a maghéjban és sziklevelekben, viszont a rügyecskében és a gyököcskében nem. A vizsgált magokból kikelt magoncokon nem jelentek meg a PPV-re jellemző tünetek, és RT-PCR vizsgálatokkal sem tudták kimutatni a fertőzést (Pasquini *et al.*, 1998; Pasquini *et al.*, 2000).

3.7. Védekezés helyzete és lehetőségei

A szilva himlő vírus okozta fertőzés elleni védekezés szabályozása az Európai Unióban a *2000/29 EK irányelv* szerint történik, amely előírja azokat az eljárásokat, amelyek betartásával korlátozható a vírus terjedése.

A szilva himlő vírussal szembeni védekezési stratégiák két eljáráson alapulnak. Az egyik eljárás az inokulumok környezetbe való kijutásának megelőzésén, illetve csökkentésén alapul. Ilyen a karantén intézkedések betartása, a fakivágások a gyümölcsösökben, növényútlevéllel rendelkező szaporítóanyag használata. A másik eljárás a rezisztens fajták nemesítése (Németh, 1986).

Legfontosabb az egészséges szaporítóanyag előállítása vírusmentes anyatelepeken. A vírusmentes szaporítóanyag előállítás egyik feltétele a rendszeres növény-egészségügyi ellenőrzés. A törzsültetvényekben mintavételezés, vírus kimutatási technikákkal történő ellenőrzés alapján növelhető a megelőzési intézkedések hatékonysága (Jordovic, 1975). Magyarországon az 1970-es évek közepén került kidolgozásra a vírusmentes szaporítóanyag-előállítás rendszere és annak hatósági szabályozása (Németh, 1994).

A termő ültetvényeken a kivágási eljárás munka- és költségigényes. A módszert akkor alkalmazzák, ha mind a vizuális szemle, mind a laboratóriumi eredmények igazolják a fertőzés nagymértékű jelenlétét. Mivel ez jelentős árbevétel kieséssel is jár,

általában költségvetési forrásokból kiegészítő támogatást kapnak a gazdák (Hadidi, 1998). Ezzel a módszerrel néhány országban (Svájc, Dánia, Észtország, Hollandia) ideiglenesen megfékezték és kiszorították a kórokozót (Németh, 1994), azonban napjainkban szórványosan továbbra is előfordul Svájcban és Hollandiában. A fakivágás nem minden esetben hozza meg a várt eredményt. Több európai országban a fakivágást csak azzal a céllal végzik, hogy gazdasági és növénytermesztési szinten is elfogadható mértékűre korlátozzák a gyümölcsösökben jelenlevő inokulum mennyiségét (Jenser, 1989).

A stylet-born vírusoknál, így a PPV-nél is nagy hangsúlyt kell fektetni a vektorok elleni védelemre. A vírusvektor levéltetvek, különösen az ősszel előforduló levéltetvek ellen ésszerűen, a hasznos élő szervezeteket kímélő technológiával kell védekezni. A tél végi lemosó permetezésekkel, és a vegetációs időben történő inszekticides kezelésekkel, illetve a korona ritkításával a fertőzés veszélyét csökkenthetjük. Fontos a gyomok elleni védekezés, hiszen ezek nemcsak a vírus gazdanövényei, hanem a vírusvektorok által is kedveltek lehetnek (Németh, 1979). A vírusvektorok tevékenységét hazai viszonyok között csak nagy költséggel és kis növényállomány esetében lehet megszüntetni (Jenser, 1989).

Fontos, hogy a termőhelyeket a fertőzési gócokon kívül eső területeken alakítsák ki és az új telepítéseket szigeteljék el a szilvahimlővel fertőzött helyektől, a vektorok betelepedésének elkerülése érdekében. A repülési távolsághoz képest viszonylag hosszú vírusmegőrzési idő (legalább 60 perc) miatt azonban az izolációs távolság növelése sem jelenthet teljes biztonságot. Hatékony izolációnak tekinthető az 1000-1200 m-es távolság a fertőzött helytől (Németh, 1986). A PPV (mint nem-perzisztens vírus) esetében a fertőzés nagyobb valószínűséggel akadályozható meg PPV inkompatibilis növényekkel takart környezetben, mint az izolációs távolság biztosításával. Ennek az elvnek betartását a hazánkban 1989 után kialakult ültetvénytulajdonosi szerkezet, valamint a termőföldek elaprózódása és privatizációja nagymértékben nehezíti (Jenser, 1989).

A védekezésben nagy szerepe lenne a PPV-vel szemben ellenálló fajták nemesítésének, illetve azok termesztésbe vonásának (Németh, 1986). A jövőben nagy jelentősége lehet a védekezésben a vírusellenálló transzgénikus, vagy génszerkesztett növények előállításának. A genetikailag módosított növények előállítása olcsóbb, hatékonyabb, és talán kevesebb időt vesz igénybe, mint a hagyományos nemesítés. A növénygenetikai kutatások egyik célja, hogy rezisztenciagéneket juttassanak be termésüket tekintve értékes, de betegségekre fogékony fajtákba. A vírusok ellen

növényi eredetű, vírus eredetű, vagy egyéb vírus ellenálló gének építhetők be. PPV esetében a köpenyfehérje génnel való transzformációval értek el eredményeket (Horváth, 1972). Génszerkesztéssel a gazdanövény azon génjeit módosíthatjuk, melyekről átíródó fehérjék részt vesznek a vírus fertőzésében, a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban.

További lehetőségnek tekinthető a hőterápia, merisztéma tenyésztés, kemoterápia vagy a premunitás elvének alkalmazása. Vírusmentes szaporítóanyag előállításában alkalmazott módszerek, a vírusmentes anyatelep növény anyaga gyakran hőterápiát követő merisztéma tenyésztésből származik. Ezen eljárások értékes fajták megőrzésére is használatosak (Horváth, 1972).

3.7.1. Rezisztencia alkalmazása

A nemesítés általános célja a termőképesség, a piacképesség, valamint az ellenállóképesség fokozása. A legeredményesebb módszer a PPV leküzdésére a rezisztens fajták nemesítése lehet. A rezisztencianemesítésben egyaránt alkalmazzák a hagyományos nemesítési eljárásokat, valamint a biotechnológiai eljárásokat. Az ellenállóképesség alapján beszélhetünk a kórokozó megtelepedése ellen, valamint a betegség ellen ható csoportokról. A horizontális rezisztencia a kórokozó minden törzse ellen védettséget nyújt, a vertikális rezisztencia csak bizonyos törzsekkel szemben érvényesül. A mennyiségi nem lokalizálódó rezisztencia poligének által szabályozott, míg a minőségi lokalizált rezisztenciát monogének vagy poligének szabályozzák. Általában vad fajokban található gének szolgálnak forrásul a fertőzés-ellenállóság kialakításánál. Az őszibarack esetében többek között a *Prunus davidiana* fajt használják hibrid partnerként. A keresztezéses nemesítés során olyan tulajdonságok alakulnak ki, amelyek vagy a vírusok bejutását, vagy a vektorok tevékenységét akadályozzák meg. Ilyen például a növények túlérzékenységre irányuló nemesítése, amely során a növény helyi szövetelhalással lokalizálja a fertőzést. A hiperszenzitív reakciókra épülő nemesítési irányzat általában egy gén által kódolt (Gáborjányi *et al.*, 1999). A PPV elleni védekezés egyik lehetősége a vírust terjesztő levéltetvek elleni rezisztencia. *Myzus persicae* és *Myzus varians* fajokkal szemben az S2678 és az S2605 őszibarackfajták rezisztensek. A rovarok által megszúrt, fertőzött szövetek elhalnak megakadályozva a vírus továbbterjedését a növényben. Ezen rezisztencia az S 2678 fajtánál a *Myzus persicae* esetében annak morfológiai alakjától függ (Massonie és Maison, 1979).

Magyarországon szabadföldi vizsgálatokban természetes fertőződés feltételei között megfelelő toleranciájúnak találták a ’Michelini’, ’97/68’, ’Incrocio Pieri’, ’Mayfire’ és a ’Kínai 8’ fajtákat (Tóbiás *et al.*, 1992).

A PPV ellen főleg a nemzetközi szaporítóanyag kereskedelem szigorításával, a szaporítóanyag ellenőrzésével és rezisztencianemesítéssel tudunk valamelyest védekezni.

A hazánkra vonatkozó szilva himlő vírus elleni védekezési eljárásokat az Európa Tanács a növényeket vagy növényi termékeket károsító szervezeteknek a Közösségbe történő behurcolása és a Közösségen belüli elterjedése elleni védekezési intézkedésekről szóló 2000/29. EK irányelve tartalmazza. Az irányelv II. mellékletének A része II. szakaszának értelmében a PPV valamennyi tagállamába történő behurcolása és ott történő elterjesztése tilos, ha az *Prunus* sp. ültetésre szánt növényein fordul elő (vetőmag kivételével). Az irányelv a (IV. melléklet A része II. szakaszában meghatározott) *Prunus* fajok országok közötti szállításánál alkalmazandó különleges eljárásokat is tartalmazza. Az ide vonatkozó mellékletben megadott fajoknál (a magról termesztettek kivételével) igazolni kell a növény vírustól mentes területről való származását. Ha ez a hivatalos nyilatkozat nem áll rendelkezésre, abban az esetben a növényekről igazolni kell, hogy meghatározott körülmények között, megfelelő indikátorok, illetve módszerek alkalmazásával PPV mentesnek találtattak. Harmadik lehetőségként igazolni kell, hogy a növények közvetlen vonalon olyan anyagból származnak, amelyet a legutóbbi három teljes vegetációs időszak alatt legalább egy alkalommal hatóságilag PPV mentesnek találtak, vagy ez idő alatt nem észleltek a termőhelyen és annak közvetlen közelében PPV tünetes növényeket, vagy a termőhelyen a vírusos tüneteket mutató növényeket kiirtották.

A PPV elleni rezisztencia egyik forrása a vad *Prunus* fajokban természetes úton kialakult, ellenállóságért felelős génjének beépítése a termesztett *Prunus* fajok genomjába. Terepen megfigyelt, természetes fertőzési nyomásnál kialakult rezisztens *Prunus* fajokat már az 1940-es évek óta írtak le kutatók (Christoff, 1947; Jordovic, 1968; Syrgiannidis, 1979). Az azóta folyamatosan zajló vizsgálatok ellenére, nagyon kevés természetes rezisztenciával rendelkező *Prunus* fajt sikerült azonosítani (Kegler *et al.*, 1998; Martínez-Gómez *et al.*, 2000a). Őszibarack esetében általában a *Prunus davidiana* fajt használják hibridizációs partnerként (Kegler *et al.*, 1998; Pascal *et al.*, 2001).

Kajszi rezisztencianemesítési programokban általában észak-amerikai eredetű genotípusokat használnak (Badenes és Llácer, 2006). Egy kajszi fajták

rezisztenciájának összegző vizsgálatát végző kutatás szerint a fajtákat három csoportba lehet osztani a rezisztencia „stabilitása” alapján. Vannak fajták, melyek egyértelműen fogékonyak a PPV-re (pl.: ’Bergeron’, ’Canino’), valamint vannak, amelyek minden provokatív fertőzéses kísérletben ellenállónak bizonyultak (pl.: ’Harleyne’, ’Orange Red’, ’Stella’). A harmadik csoportba pedig azok a fajták sorolhatók, amelyek rezisztenciája megkérdőjelezhető (’Goldrich’, ’Harcot’, ’Stark Early Orange’, ’Veecot’) (Martínez-Gómez *et al.*, 2000a).

Szilva esetében rezisztens fajtákról nem beszélhetünk, léteznek azonban Közép- és Dél-Európában használt gyümölcstünetet nem mutató toleráns fajták (Kegler *et al.*, 1998; Ogašanovic *et al.*, 1993). Meleg, száraz évjáratokban azonban a negatív környezeti tényezők leronthatják a fák kondícióját, amelynek következtében a vírussal szembeni tolerancia megszűnik, és hasonlóan súlyos gyümölcstünetek jelennek meg, mint a fogékony fajtákon. Szilvanemesítési programokban jól alkalmazható a PPV-re hiperszenzitív reakciót adó ’Jojo’ fajta, mely a vírusátvitel sikeres megakadályozásával vírusmentes tud maradni (Hartmann, 1998; Hartmann és Neumüller, 2006).

Mivel a PPV egy gazdasági szempontból fontos vírus, a hagyományos rezisztencianemesítés mellett a vírus-rezisztens transzgénikus növények előállítása is nagy hangsúlyt kapott. A PPV esetében sikerült a CP fehérje növénybeni előállításával rezisztens szilvafajtát (’HoneySweet’) létrehozni (Ravelonandro *et al.*, 1997).

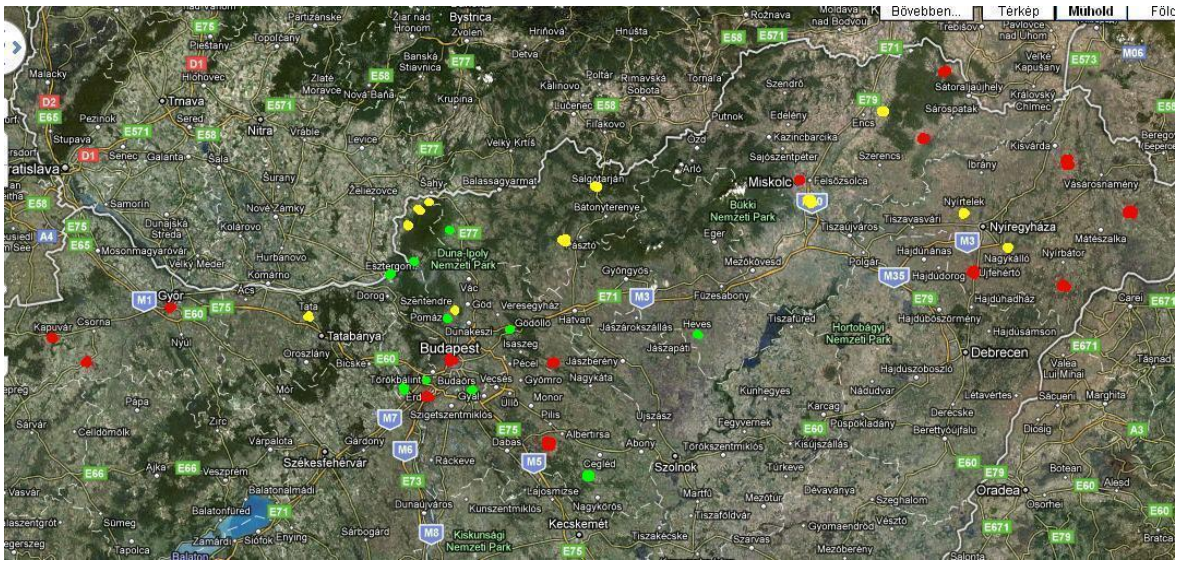
Azokban az országokban, ahol a szilva himlő vírus karantén kórokozónak számít gyakori védekezési módszer a fertőzött fák kivágása. Amerikában egy 10 éves program keretein belül, komoly felderítői munka alapján a fertőzött fák 200 méteres körzetében minden *Prunus* nemzetségű potenciális gazdanövényt kiírtottak, sikeresen megakadályozva a vírus komolyabb elterjedését (Gottwald *et al.*, 2013).

4. VIZSGÁLAT HELYE, ANYAGA ÉS MÓDSZERE

4.1. A vizsgálatok helye

4.1.1. A hazai felmérés helyszíne

A hazai felmérés során Magyarország északi megyéiből ültetvényekből és házi kertekből gyűjtöttünk mintákat. A felmérésben résztvevő megyék Pest, Borsod-Abaúj-Zemplén, Nógrád, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Komárom-Esztergom és Győr-Moson-Sopron megye voltak (7. ábra). A gyűjtött mintákat a Növénykórtani Tanszék laboratóriumában vizsgáltuk.

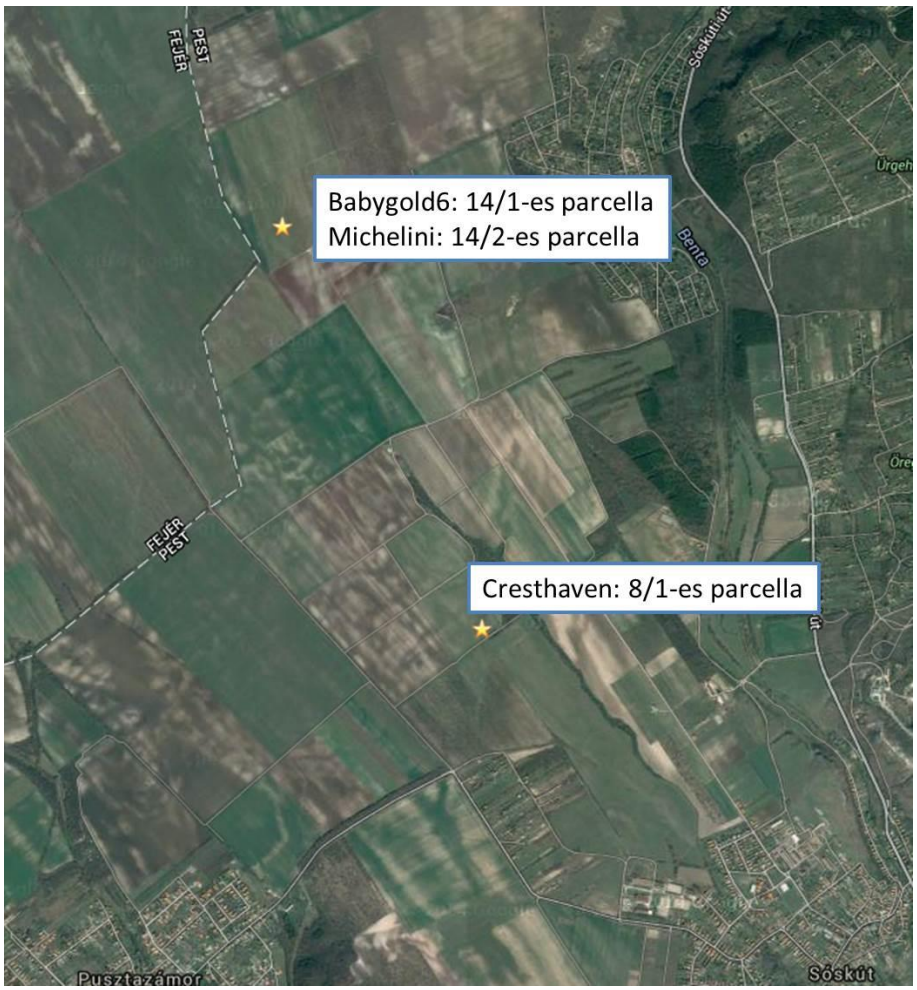


7. ábra: A hazai felmérés helyszínei (Google Maps)

Jelmagyarázat: *a pontok a mintavételi helyeket jelölik (Atkár, Bernecebaráti, Boldogkőváralja, Budapest, Cegléd, Csömör, Érd, Gönc, Győr-Ménfőcsanak, Kemence, Kistokaj, Kozárd, Ludastó, Nagykálló, Nyírtelek, Piliscsév, Salgótarján, Sóskút, Szentendre, Szigethalom, Tata, Tiszadob, Vámosmikola).*

4.1.2. Az alany-nemes kombinációk vizsgálatának helyszíne

A TÉT_10-1-2011-0673 pályázatban használt minták Pest megyéből, Sóskút területéhez tartozó ültetvényből származtak (8. ábra). A vizsgált parcellák a következő GPS koordinátákon találhatók: 47.419537, 18.804894 – ’Cresthaven’ (8/1-es parcella), valamint 47.436812, 18.792126 – ’Babygold6’ és ’Michelini’ (14/1 és 14/2-es parcella) (8. ábra). A mintákat a Növénykórtani Tanszékre szállítottuk, ahol a laboratóriumi vizsgálatokat végeztük. A kívánt szekvenciák meghatározásához a Hollandiában működő BaseClear cég Barcode Sequencing szolgáltatását vettük igénybe.



8. ábra: Az alany-nemes kombinációk vizsgálatában részt vevő minták helye (Google Maps)

4.1.3. A gazdanövény preferencia vizsgálatának helyszíne

A vizsgált szilva, kajszi és őszibarack fák Pest megyéből, Sóskút területéhez tartozó ültetvényekből származtak (9. ábra). A mintákat a következő GPS koordinátákon található útkereszteződést körülvevő táblákról gyűjtöttük: 47.428339, 18.801402. A mintákat a Szent István Egyetem Kertészettudományi Karának Növénykórtani Tanszékére szállítottuk, ahol a további laboratóriumi vizsgálatokat végeztük.

9. ábra: A gazdanövény preferencia vizsgálat mintáinak származási helye (GPS: 47.428339, 18.801402) (Google Maps)

Választásunk azért esett a 10. ábrán is bemutatott szilva, őszi és kajszi táblákra, mert ezen a területen az általunk vizsgált PPV vírus törzsek (M, D és Rec) gazdanövényei nagyon közel, egymással szomszédos táblákon helyezkednek el. A speciális közelség miatt minden általunk vizsgált fa azonos környezeti és időjárási körülményeknek volt kitéve, továbbá a területen elvégzett növényvédelmi kezelések is (növényfajtól függően) egységesen zajlottak. A kiválasztott helyszínnek köszönhetően a levéltetvek általi vírusátvitel minden feltétele adott volt, így a vírus akár próbaszívogatások útján, nem-perzisztens (stylet-borne) módon is akadály nélkül továbbterjedhetett, ezzel minden lehetőséget és esélyt megadva a törzsek szabad terjedésének és keveredésének.

4.1.4. Az FTA technológia vizsgálatainak helyszíne

Az FTA technológia vizsgálatát korábban hazai és szlovák mintákon végeztük el a Szlovák Tudományos Akadémia munkatársaival (Predajňa *et al.*, 2012a), dolgozatomban csak a saját vizsgálatok szerepelnek, melyeket Magyarországon végeztem Bulgáriából származó mintákon.

4.2. Vizsgálatok anyaga

4.2.1. Az északi megyékben végzett felmérés mintái

A vizsgálatokhoz gyűjtött minták adatait a 2. táblázat tartalmazza. A minták tünetmentes és tüneteket mutató fák levelei voltak. A minták ültetvényekből, mintaültetvényekből (többszöri mintavétel ugyan abból az ültetvényből) és házi kertekből származtak.

2. táblázat: Magyarország északi megyéiben végzett felmérésben szereplő minták adatai

Minta száma	Mintagyűjtés helye	Megye	gazdanövény
9	Kemence	Pest megye/Észak	*Prunus domestica*
10	Kemence		*Prunus domestica*
11	Kemence		*Prunus domestica*
12	Kemence		*Prunus domestica*
13	Kemence		*Prunus domestica*
14	Kemence		*Prunus domestica*
15	Bernecebaráti	Pest megye/Észak	*Prunus domestica*
16	Bernecebaráti		*Prunus domestica*
17	Bernecebaráti		*Prunus domestica*
18	Bernecebaráti		*Prunus domestica*
19	Vámosmikola	Pest megye/Észak	*Persica vulgaris*
20	Vámosmikola		*Persica vulgaris*
21	Kemence	Pest megye/Észak	*Prunus domestica*
22	Kemence		*Prunus avium*
23	Kemence		*Prunus domestica*
24	Budapest	Pest megye	*Prunus domestica*
25	Boldogkőváralja	Borsod-Abaúj-Zemplén	*Prunus cerasifera*
26	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'
27	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'
28	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'
29	Boldogkőváralja		*Prunus cerasifera*
30	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'
31	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'
32	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'
33	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'
34	Kozárd	Nógrád	*Prunus domestica*
35	Kozárd		*Prunus domestica*
36	Kozárd		*Prunus domestica*
37	Kozárd		*Prunus domestica*
38	Kozárd		*Prunus domestica*
39	Kozárd		*Prunus domestica*
40	Kistokaj	Borsod-Abaúj-Zemplén	*Prunus cerasifera*
41	Kistokaj		*Prunus domestica* 'Stanley'
42	Kistokaj		*Prunus domestica* 'Stanley'
43	Kistokaj		*Prunus domestica* 'Stanley'
44	Kistokaj		*Prunus armeniaca*
45	Nyírtelek	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus domestica* 'Besztercei'
46	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Besztercei'
47	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Elena'

Minta száma	Mintagyűjtés helye	Megye	gazdanövény
48	Nyírtelek	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus domestica* 'Besztercei'
49	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Besztercei'
50	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Besztercei'
51	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'
52	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'
53	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'
54	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'
55	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'
56	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'
57	Sóskút	Pest megye/Nyugat	*Prunus domestica* 'Bluefre'
58	Salgótarján	Nógrád	*Prunus domestica*
59	Ludastó	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Persica vulgaris*
60	Szentendre	Pest megye	*Prunus domestica*
61	Szentendre		*Prunus domestica*
62	Szentendre		*Prunus domestica*
63	Szentendre		*Prunus cerasifera*
64	Szentendre		*Prunus domestica*
65	Szentendre		*Prunus cerasifera*
66	Tata	Komárom-Esztergom	*Prunus domestica*
67	Tata		*Prunus domestica*
68	Tata		*Prunus domestica*
69	Tata		*Prunus domestica*
70	Tata		*Prunus domestica*
71	Tata		*Prunus domestica*
72	Ismeretlen		*Prunus salicina*
73	Szigethalom	Pest megye/Dél	*Prunus domestica*
74	Győr-Ménfőcsanak	Győr-Moson-Sopron	*Prunus domestica*
75	Sóskút	Pest megye/Nyugat	*Prunus domestica* 'Bluefree'
76	Piliscsév	Komárom-Esztergom	*Prunus domestica* 'Stanley'
77	Piliscsév		*Prunus domestica* 'Besztercei'
78	Csömör	Pest megye-Kelet	*Prunus domestica*
79	Csömör		*Prunus domestica*
80	Csömör		*Prunus domestica*
81	Gönc	Borsod- Abaúj-Zemplén	*Prunus domestica*
82	Gönc		*Prunus armeniaca* ceglédi kísérleti fajta
83	Gönc		*Prunus domestica* ismeretlen román fajta
84	Gönc		*Prunus domestica* 'Besztercei'
85	Boldogkőváralja	Borsod- Abaúj-Zemplén	*Prunus armeniaca* 'Yellowcot'
86	Atkár	Heves	*Prunus armeniaca* ceglédi
87	Atkár		*Prunus domestica* 'Besztercei'
88	Atkár		*Prunus domestica* 'Cacanska lepotica'
89	Bernecebaráti	Pest megye/Észak	*Prunus domestica*
90	Bernecebaráti		*Prunus domestica*
91	Bernecebaráti		*Prunus domestica*
92	Sóskút	Pest megye/Nyugat	*Prunus domestica* 'Cacanska lepotica'
93	Sóskút		*Prunus domestica*
94	Sóskút		*Prunus domestica* 'Stanley'
95	Sóskút		*Prunus armeniaca*

Minta száma	Mintagyűjtés helye	Megye	gazdanövény
96	Cegléd	Pest megye/Dél	*Prunus armeniaca*
97	Cegléd		*Prunus domestica* 'Stanley'
98	Cegléd		*Prunus domestica* 'Tuleu Gras'
99	Cegléd		*Prunus domestica* 'Cacanska lepotica'
100	Cegléd		*Prunus domestica* 'Tuleu Gras'
101	Cegléd		*Prunus domestica* 'Stanley'
102	Érd	Pest megye/Nyugat	*Prunus domestica*
103	Érd		*Prunus domestica*
104	Érd		*Prunus domestica*
105	Tiszadob	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus persica* 'Suncrest', 'Cresthaven'
106	Tiszadob		*Prunus domestica* 'Cacanska lepotica'
107	Tiszadob		*Prunus persica* 'Suncrest', 'Cresthaven'
108	Tiszadob		*Prunus persica* (var. *nectarina*) 'Andosa'
109	Nagykálló	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus domestica* 'Besztercei'
110	Nagykálló		*Prunus domestica*
111	Nagykálló		*Prunus domestica*
112	Nyírtelek	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus domestica*
113	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Besztercei'

4.2.2. Az alany-nemes kombinációk vizsgálatában szereplő minták

Az őszibarack alany nemes kombinációk vizsgálatában a mandula magonc, a ’Cadaman’, a ’GF677’és a ’Pe-Ma’ alanyok, valamint a ’Babygold 6’, a ’Cresthaven’ és a ’Michelini’ nemes kombinációi vettek részt.

4.2.3. Vizsgált alanyfajták jellemzése

Az alanyok oltványokban megjelenő tulajdonságai meghatározó jelentőségűek. Az oltvány gyökerét az alany alkotja, ezért figyelembe kell venni annak talajigényét, vízigényét, szárazságtűrését, hidegtűrését és télállóságát, növekedési erélyét, a talajban való rögzítés erősségét, sarjadzási hajlamát, betegségekkel és kártevőkkel szembeni ellenállóságát. Amennyiben a törzset is az alany alkotja, akkor a törzs szilárdságát, fagytűrő képességét szintén számításba kell venni. Az alany nagy hatással van a nemes rész vegetatív és generatív részeinek alakulására (Mišić, 2000).

Mandula magonc alany (*Prunus amygdalus*)

Más országokkal ellentétben Magyarországon a második legelterjedtebb őszibarack alany. Elsősorban a dombvidéki őszibarack termőtájakon használják. Szaporítása generatív úton, magról történik. Meleg, köves, száraz, kötött, meszes talajokra ajánlott (Timon, 1974). Kedveltsége olcsó és egyszerű szaporítási

lehetőségében rejlik. Jó az affinitása, harmadik-negyedik évben termőre fordulnak oltványai. Középerős növekedésű oltványt ad, ugyanakkor a ráoltott állomány nagyon heterogén, kiegyenlítetlen növekedésű. Nem tűri a talaj savanyúságát és a tartós vízellátást (Soltész, 1997). A ráoltott őszibarack fokozottan fagyérzékeny, télállósága romlik (Gyuró és Dávid, 1990). Érzékenyebb a fonálférgekre, gyökérgolyvára, fitoftórás gyökérnyakrothadásra és a verticilliumos hervadásra (Soltész, 1997).

'Cadaman' alany (*Prunus davidiana x Prunus persica*)

Ez az alany egy a NAIK Gyümölcstermesztési Kutatóintézet jogelődjében előállított Dávid-mandula és őszibarack hibridjei közül (*Prunus davidiana x Prunus persica*) (Mohácsy és Maliga, 1963). Hajtásdugványozással jól szaporítható. Oltványiskolában későn kell szemezni. A fajták ezen az alanyon nagyon erős növekedésűek, az ötödik-hatodik években adják az első nagy terméseket és rendkívül bőtermők. Nagyon jó mésztűrő, szárazságtűrő, a *Meloidogyne* fajokkal szemben rezisztens (Nagy *et al.*, 1992). Faiskolai használata széles körben elterjedt (Brózik *et al.*, 2003).

'GF677' alany (*Amygdalopersica x hybrida*)

Franciaországban, Lot-e-Garonne völgyében fellelt természetes mandulabarack-hibrid (*Amygdalopersica x hybrida*) (Mohácsy és Maliga, 1963). Faiskolai használata széles körben elterjedt. Dél-magyarországi és közép-dunántúli termőtájakon közkedvelt alanyfajta (Brózik *et al.*, 2003). Hajtásdugványozással jól szaporítható, szemzéseredése azonban kedvezőtlen. A talaj mésztartalmát 12% aktív mésztartalomig jól elviseli, sőt Spanyolországban még 14-25% aktív mésztartalom mellett sem mutatott klorózist 3 éves korig. Szárazságtűrő, növekedése 30%-kal erősebb a vadőszibarackénál. Kompatibilitása jó az őszibarack fajtákkal (Timon, 1974). Erős növekedésű, amely tulajdonsága hátráltatja az érést, kisebb méretű és gyengébben színeződött gyümölcsöket eredményez (Szabó, 2001). Gombás betegségekkel (*Fusicoccum spp., Corineum spp., Stereum purpureum*) szemben kielégítően viselkedik. Gyökérparazitákat jól toleráló, erős növekedésű, bőtermő, nagy fákat nevelő alany (Hrotkó, 1995). Talajnedvességgel szemben kevésbé érzékeny, mint a vadőszibarack magonc, de sokkal érzékenyebb, mint a szilvák. Jól bírja a vályogtalajt és meghálálja az öntözést (Timon, 1974).

'Pe-Ma' alany (*Prunus persica x Prunus amygdalus*)

Prunus persica 'Mezőkomáromi Duránci' x *Prunus amygdalus* keresztezéséből származó magoncok közül szelektálták a NAIK Gyümölcstermesztési Kutatóintézet jogelődjének munkatársai (Mohácsy és Maliga, 1963). Hajtásdugványozással

szaporítható, a dugvány gyökeresedése 80% körüli. Az oltványiskolában a szemzéseredés és az oltványkihozatal jó, célszerű későn szemezni. Erős-, nagyon erős növekedésű fákat nevel. A száraz, meszes talajokat jól tűri, klorózisra nem hajlamos (Nagy *et al.*, 1992).

4.2.4. A vizsgálatban szereplő nemesfajták jellemzése

Az őszibarack több évszázados termesztése, hosszú távú nemesítése során napjainkban rengeteg fajtával büszkélkedik. Ezen fajták számos alakkal, fedőszínnel, növekedési eréllyel, beltartalmi jellemzőkkel, ökológiai tulajdonságokkal és ellenálló képességgel rendelkeznek. A fajták értékét fajtatulajdonságaik határozzák meg (Mišić, 2000).

'Babygold 6'

L. F. Hough és C. H. Bailey, New Brunswickban (New Jersey, USA) állította elő 1961-ben. Államilag elismert ipari árufajta, melynek Gyúró Ferenc, Nyéki József, Szalai Géza és Németh Mária honosítói (Brózik és Kállay, 2000).

Fája közepesen erős növekedésű, hidegigénye közepes. Levélmirigyei vese alakúak. Harang alakú virágai, középidőben nyílnak (Tóth, 2001). Rendszeresen és bőven teremő fajta, érési ideje augusztus közepe-vége (Szabó, 2001).

Gyümölcse nagy, átlagosan 140-150 g tömegű, gömb alakú, csúcsa elgömbölyödött, közepesen molyhos héjú. Narancssárga alapon bordópiros fedőszín 30-50%-ban fedi, főként a napos oldalon (Brózik és Kállay, 2000). Húsa narancssárga, szilárd, édes, jó ízű, illatos, duránci. Magja közepes méretű. Jól tűri az áruvá készítést. Elsősorban ipari célfajta, de gyümölcsei befőtt és ivólé készítésén kívül friss fogyasztásra is alkalmasak, úgynevezett kettős hasznosítású fajta (Hrotkó, 1995). Lisztharmatra kevésbé fogékony. A téli lehülésekkel szemben ellenálló (Tóth, 2009).

'Cresthaven'

S. Johnston és J. E. Moulton állította elő South Havenben (Michigan, USA) a 'Kalhaven' és 'South Haven 309' keresztezésével 1963-ban (Tóth, 2001). Honosítója Gergely István (Brózik és Kállay, 2000).

Fája középerős növekedésű, korosodva szétterülő koronájú. Termővesszői kissé vaskosak, rügyei sűrűn, kettesével, gyakran csoportosan állnak. Levélmirigyei vese alakúak. Harang alakú sötét rózsaszín virágai későn nyílnak, kiegyenlítetlenül termékenyülnek. Augusztus végén, szeptember elején érő, közepes terméshozamú fajta (Szabó, 2001).

Gyümölcse nagy, átlagosan 150 g tömegű, gömb vagy lapított gömb alakú, csúcsa kissé bemélyedt. Héja alig, vagy közepes mértékben molyhos. Fedőszíne sárga alapon

50-70%-ban vörös. Húsa szilárd állományú, magvaváló, sárga, a mag körül vörös, jó ízű. Magja közepes, gömbölyű (Brózik és Kállay, 2000). Az áruvá készítést, szállítást és tárolást jól tűri, ezáltal sokoldalúan felhasználható fajta (Hrotkó, 1995). Lisztharmatra közepesen fogékony. A téli és tavaszi lehűlésekre kissé érzékeny (Brózik és Kállay, 2000).

'Michelini'

Ismeretlen eredetű magonc, 1930-ban A. Michelini emelte ki Borghetto Santo Stefano-ban (Olaszország) (Tóth, 2001). Államilag elismert árufajta, melynek Gyúró Ferenc, Nyéki József, Tóth Ferencné, Szalai Géza és Németh Mária honosítói (Brózik és Kállay, 2000).

Fája középerős-erős növekedésű, szétterülő koronát nevel. Alacsony-közepes hidegigényű. Vese alakú levélmirigyei vannak, rózsa alakú virágai közép-korán nyílnak. Közepes, illetve jó termőképességű, szeptember közepén érő fajta (Szabó, 2001).

Gyümölcse tetszetős, nagy, 120-140 g tömegű, gömbölyű, csúcsa kissé bemélyedt. Gyengén-közepesen molyhos héjú, fehér alapszínen 70-80%-ban csíkozott, piros fedőszínnel borított. Közép-kemény állományú, ízletes, magvaváló, húsa fehér, a mag körül piros színű. Gyümölcse friss fogyasztásra alkalmas, emellett hosszan tárolható (Brózik és Kállay, 2000). Az áruvá készítést és szállítást közepesen tűri. Kései érése és tetszetős gyümölcsei miatt kedvelt, szüreti szezon meghosszabbítására alkalmas fajta (Timon, 1974). Tafrinás levélfodrosodásra és baktériumos rákosodásra kevésbé érzékeny, a téli lehűlésekre kissé érzékeny (Tóth, 2009).

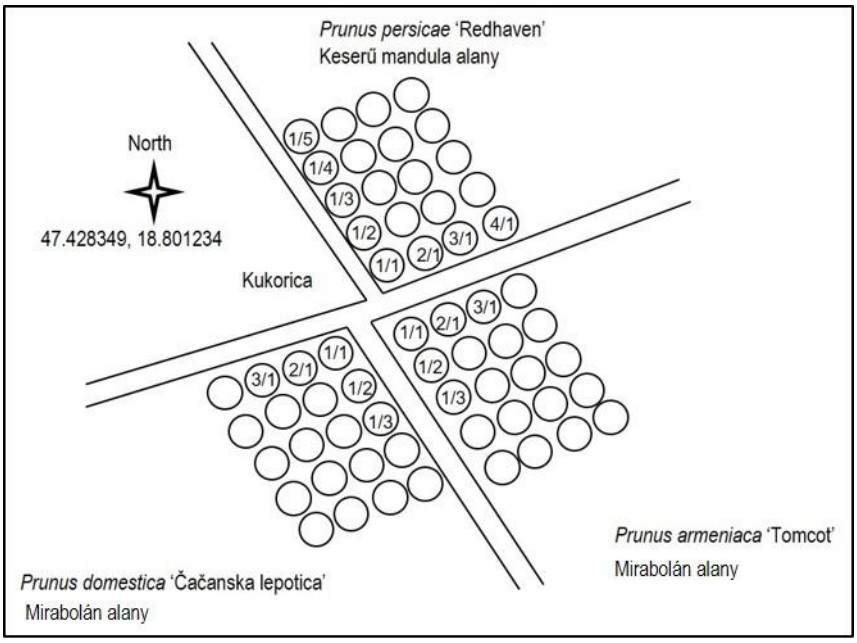
A laboratóriumban PPV okozta jellegzetes tüneteket mutató vagy tünetmentes őszibarack nemes és alany fajták leveleit vizsgáltuk. Az állomány egységesen, 2000-ben került telepítésre, így az ültetvény a vizsgálatok idején 14 éves volt. A leveleket szállítás után frissen használtuk fel, a mintákból levélkorongokat esetleges további vizsgálatok céljából -70 °C-on fagyasztva tároltuk. A vizsgálati minták darabszáma és fajtánkénti megoszlása a 3. táblázatban látható.

3. táblázat: Vizsgálati minták darabszáma és megoszlása

		Nemesfajta		
		'Cresthaven'	'Babygold 6'	'Michelini'
Alanyfajta	'GF677'	8	8	8
	'Cadaman'	16	12	11
	'Pe-Ma'	0	9	0
	mandula magonc	10	0	9

4.2.5. A gazdanövény preferencia vizsgálatában használt minták

A kísérlethez kiválasztott ültetvények: ’Čačanska lepotica’ szilva mirabolán alanyon, ’Redhaven’ őszibarack keserű mandula alanyon, ’Tomcot’ kajszi mirabolán alanyon. A laboratóriumi vizsgálatok elvégzéshez 20-20 fáról őszibarack, kajszi és szilvaleveleket gyűjtöttünk. Az ültetvények mindegyikét 2000-ben telepítették, pár utólagosan ültetett csemetét kivéve. A leveleket szállítás után -70 °C-on fagyasztva tároltuk. A vizsgálati minták darabszáma és fajtánkénti megoszlása a 10. ábrán látható.



10. ábra: A gazdanövény preferencia vizsgálataihoz kiválasztott terület és a minták

4.2.6. Az FTA technológia

A Whatman FTA Card egy kémiai úton kezelt szűrőpapír (membrán), mely alkalmas biológiai minták gyűjtésére és szobahőmérsékleten való tárolására nukleinsav alapú vizsgálatok céljából. Az FTA Card alkalmas DNS gyűjtésére és tárolásrára. A felhasználhatósága széles körű, használják törvényszéki vizsgálatok elvégzésére szexuális bűncselekmények felderítésénél (Fujita és Kubo, 2006), humán virológiában (Gustavsson *et al.*, 2009) és a növényvédelem területén egyaránt (Owor *et al.*, 2007; Grund *et al.*, 2010).

A DNS minták tárolhatósága sokkal jobb szobahőmérsékleten, mint az RNS mintáké. Az RNS degradációja függ a tárolási hőmérséklettől, illetve a sejttől, amiben a nukleinsav elhelyezkedik. Az RNS emlősök sejtjeiben sokkal stabilabb, akár 2-3 hónapig is tárolható szobahőmérsékleten, ellenben a növényi sejtekben lévő RNS-sel, ami 5-10 napig tárolható ezen a módon (Natarajan *et al.*, 2000). Más kutatások szerint RNS vírusok detektálása növényi présnedvől lehetséges akár több hónapnyi szobahőmérsékleten való tárolás után is (Roy és Nassuth, 2005).

Az FTA Card vizsgálatában részt vevő minták Bulgáriából származtak szilva levél és virág szövetekből (4. táblázat). A dolgozatomban a virágminták eredményeit mutatom be. A november 3-án gyűjtött minták vesszők hajtatásával lettek előállítva.

4. táblázat: Az FTA technológia tesztelésére kapott minták adatai

	Hely	Gyűjtés ideje	fajta/alany
1	Drayanova gyűjtemény	November 3.	Stanley/Brompton
2	Drayanova gyűjtemény	November 3.	Stanley/Brompton
3	Drayanova gyűjtemény	November 3.	Stanley/ SJ A
4	Drayanova gyűjtemény	November 3.	Stanley/Wavit
5	Drayanova gyűjtemény	November 3.	Stanley/*P. cerasifera*
6	Drayanova gyűjtemény	November 3.	Hanita/Brompton
7	Drayanova gyűjtemény	November 3.	Hanita/GF 655-2
8	Drayanova gyűjtemény	November 3.	Hanita/ SJ A
9	Transzformátor - labor	November 3.	Stanley
10	Transzformátor - labor	November 3.	Stanley
11	Transzformátor - labor	November 3.	Strinava
12	Háromszög kert	November 3.	fajtajelölt
13	Háromszög kert	November 3.	fajtajelölt
14	Háromszög kert	November 3.	fajtajelölt
15	Francia kert	November 3.	Reklonda
16	Francia kert	November 3.	Reklonda
17	Francia kert	November 3.	Reklonda
18	Francia kert	November 3.	Reklonda
19	Francia kert	November 3.	Reklonda
20	Francia kert	November 3.	Reklonda
21	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
22	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
23	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
24	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
25	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
26	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
27	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita

	Hely	Gyűjtés ideje	fajta/alany
28	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
29	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
30	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
31	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita
32	Drayanova gyűjtemény	Március 31.	Hanita

4.2.7. A vizsgálat során alkalmazott kit-ek és vegyszerek

A tRNS kivonáshoz két kit-et használtunk, ezek a Spektrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) és a GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific). A PCR-termékek tisztítását High Pure PCR Product Purification Kittel (Roche) végeztük. A reverz transzkripcióhoz RevertAid reverz transzkriptáz enzimet, RiboLock ribonukleáz inhibitort, 5x RT puffert és 10 mM-os dNTP keveréket használtunk.

A hazai felmérést kivéve a PCR-hez a DreamTaq Green PCR Master Mix-et (amiben DreamTaq DNS polimeráz enzim, 2X DreamTaq Green puffer, dNTPs és 4 mM $MgCl_2$, valamint külön kiszerelésben nukleázmentes víz található – Thermo Scientific) használtuk fel. A hazai felmérés esetén a PCR-hez Taq DNS polimeráz enzimet (rekombináns, 5 u/µl); pufferként 10x-es Taq puffer +KCl – $MgCl_2$-ot (pH: 8,8 25 °C-on) adtunk.

Az RFLP során felhasznált enzimeket a Fermentas cégtől szereztük be. A vírustörzsek meghatározásához *Eco*RI, *Eco*RV és *Dde*I restrikciós endonukleázokat használtunk.

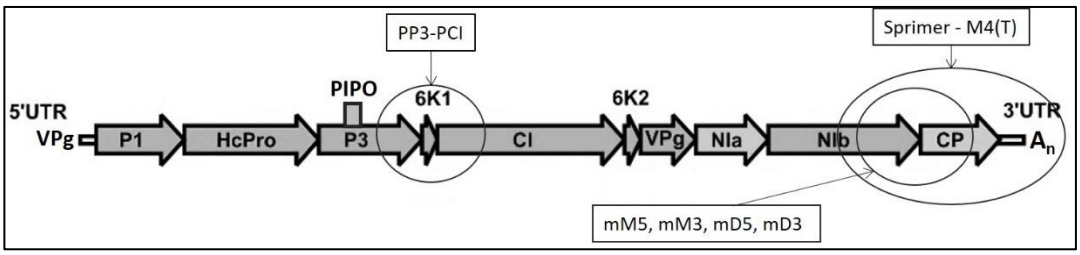
Az FTA Card technológia tesztelésénél FTA Whatman Card-ra vittük fel a mintákat 1x PBS (10x Foszfát puffer – 800 g NaCl, 20 g KCl, 144 g Na_2HPO_4 $2H_2O$, 24 g KH_2PO_4, 8 liter desztillált víz, pH 7.4) pufferben eldörzsölve, majd azok tisztításához FTA tisztító reagenst valamint TE oldatot (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) használtunk, ezután közvetlenül felhasználhatók voltak RT-PCR kimutatási módszerre.

4.2.8. Felhasznált primerek

A felhasznált primereket az IDT (Integrated DNA Technologies) cégtől rendeltük, adataikat a 5. táblázat, a célzott genomi régiót a 11. ábra mutatja.

5. táblázat: A PCR-ek során felhasznált primerek

Primer neve	Szekvencia (5'-3')	Hivatkozás
Sprimer (for)	GGNAAYAAYAGYGGNCARCC	(Chen és Adams, 2001)
M4T (rev)	GTTTTCCCAGTCACGACT$_{(15)}$	
M4 (rev)	GTTTTCCCAGTCACGAC	
PP3 (for)	TTATCTCCACCAGGARTTGGAGC	(Glasa *et al.*, 2002b)
PCI (rev)	TTGAGTCAAATGGRACAGTTGG	
mM5 (for)	GCTACAAAGAACTGCTGAGAG	(Šubr *et al.*, 2004)
mM3 (rev)	CATTTCCATAAACTCCAAAAGAC	
mD5 (for)	TATGTCACATAAAGGCGTTCTC	
mD3 (rev)	GACGTCCCTGTCTCTGTTTG	



11. ábra: A PPV genomja és a vizsgálatok során felhasznált primerek

4.2.9. A PCR készülék

A polimeráz láncreakciókat az Applied Biosystem GeneAmp 9700, valamint az Eppendorf Mastercycler Nexus Gradient típusú PCR készülékkel végeztük.

4.3. Vizsgálati módszerek

4.3.1. Összribonukleinsav-kivonás (TRNS) levélszövetből

A folyamat célja az, hogy a növényi szövetekben található összes növényi és víruseredetű ribonukleinsavakat kivonjuk és elkülönítsük a többi sejtalkotótól. Minden kivonáshoz mintánként 100 mg szövetet használtunk fel. A művelethez rendelkezésünkre álló eszközöket és vegyszereket a Kit-ek tartalmazzák. A teljes ribonukleinsav kivonást a gyártók utasításait alapul véve végeztük. A mintákból kinyert TRNS-t használtuk a további lépésekhez. A megmaradt mennyiséget további felhasználásig -70 °C-on fagyasztva tároltuk.

4.3.2. Reverz transzkripció

A PCR folyamatához dezoxiribonukleinsav szükséges, ezért cDNS-t, vagyis komplementer DNS szálat kell készíteni az egyszálú vírus nukleinsavból (+ssRNS-ből). Mintánként nagyjából 1500 ng/µl TRNS-t, vagy 2 mm átmérőjű tisztított FTA korongot használtunk, melyhez 1 µl 100 pmol-os antiszenz primert adtunk, majd 12,5 µl végtérfogatra nukleáz mentes vízzel egészítettük ki. Az elegyet 65 °C-on öt percig inkubáltuk, ezután tíz percig jégen hűtöttük, mely alatt a következő elegyet állítottuk össze, és mértük a mintákhoz: 4 µl 5x RT puffer, 2 µl 10 mM-os dNTPs, 1 µl (200 u) RevertAid reverz transzkriptáz enzim, 0,5 µl 20 u RiboLock ribonukleáz inhibitor. A reverz transzkripció 42 °C-on egy órán keresztül zajlott, majd 70 °C-on tíz percig inkubálva elimináltuk az enzimet. Az így kapott cDNS-t további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

4.3.3. Polimeráz láncreakció (RT-PCR, nested PCR)

A polimeráz láncreakciók során a két vizsgált genomi régió a vírus 3' végéhez közel található 3'NIb–CP géneket kódoló, valamint a 3'P3–6K1–5'CI géneket kódoló volt. A PCR-hez a következőket mértük össze 20 µl végtérfogatra:

- 2 µl 10x Taq puffer
- 1,2 µl $MgCl_2$
- 1 µl 5mM-os dNTPs
- 0,2 µl 20 pmol/µl antiszenz primer (4. táblázat)
- 0,2 µl 20 pmol/µl szenz primer (4. táblázat)
- 0,2 µl 2,5 u Taq polimeráz enzim
- 14,4 µl nukleáz mentes víz
- 0,8 µl cDNS, vagy nested PCR esetén korábbi PCR termék

A két különböző genomi régióban végzett PCR vizsgálatok során ugyanazt a cDNS-t használtuk, mert az M4T reverz primer a 3' vég polyA részére tapad, így a cDNS-ben mindkét régió megtalálható. A PCR-ek programja az 6. táblázatban található. A nested PCR során cDNS helyett a reakcióelegybe a korábbi NIb-CP PCR terméke került. A DreamTaq Master Mix esetén a PCR elegy a következők szerint került összemérésre 25 µl végtérfogatra:

- 12,5 µl MasterMix
- 10 µl nukleázmentes víz
- 0,5 µl 20 pmol/µl reverz primer
- 0,5 µl 20 pmol/µl forward primer

- 1,5 µl cDNS vagy PCR termék (nested PCR esetén)

6. táblázat: A PCR programja az eltérő primerek esetében

Primerek (for-rev)	Elődenaturáció 94 °C	40 ciklus			Végső láncépítés
		Denaturáció 94 °C	Primerkötés	Láncépítés 72 °C	
PP3-PCI	5 min	60 sec	50 °C-60 sec	60 sec	10 min
Sprimer-M4	3 min	15 sec	48 °C-30 sec	2 min	10 min
mM5;mD5-mM3;mD3	3 min	30 sec	55 °C-30 sec	60 sec	10 min

A folyamat 4 °C fokra hűtéssel zárult. A PCR termékeket rövid időn belüli felhasználás esetén 4 °C-on, hosszabb ideig való tárolás esetén -20 °C-on tartottuk.

4.3.4. A PCR-termék visszaizolálása és tisztítása

3 µl PCR-terméket 3 µl festékkel keverve 1%-os agaróz gélben (0,5 g agaróz, 1 ml 50x TBE puffer (2,0 M Tris, Bórsav, 0,05 M EDTA, pH 8,0, 49 ml desztillált víz) futtattuk 3 µl 1 kb DNA Ladder mellett. Ezt követően a High Pure PCR Product Purification Kit-tel a gyártó utasításait követve megtisztítottuk a szekvenálásra szánt PCR-terméket.

4.3.5. Törzsmeghatározás Restrikciós analízissel (RFLP)

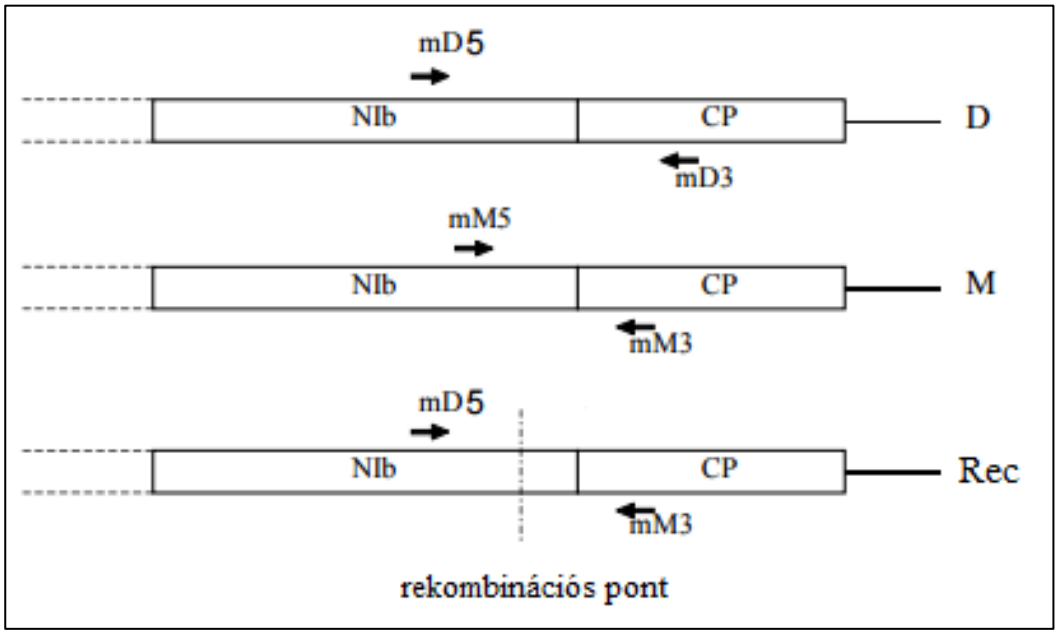
Annak megállapításához, hogy az egyes minták a PPV-nek melyik törzsébe tartoznak, a PCR-termékeket 3 féle restrikciós endonukleázzal, a *Dde*I-gyel, az *Eco*RI-gyel és az *Eco*RV-tel hasítottuk. Ehhez az enzimek gyártóinak utasításai alapján mértük össze a megadott hozzávalókat (1 µl enzim, 1 µg PCR termék pufferrel kiegészítve 50 µl végtérfogatra) és inkubáltuk a mintákat a megfelelő időtartamig 1 óra) a megfelelő hőmérsékleten (37 °C fokon).

4.3.6. Törzsmeghatározás M, D és Rec törzs specifikus primerekkel

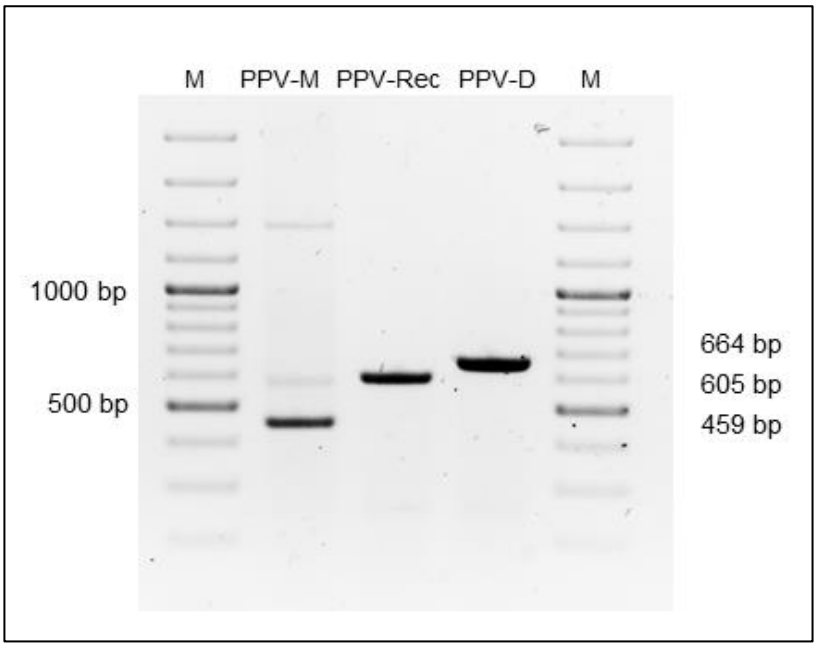
Egy vírustörzs kimutatásához törzsspecifikus forward és reverz primerekre van szükség, amelyek a sokszorosítani kívánt szakasz mindkét végéhez kapcsolódnak a primerkötés (anelláció) során. A D törzshöz tartozó minta esetében a D specifikus forward és reverz primer kötődik (mD5 és mD3), M törzsnél pedig az M törzs specifikus forward és reverz primer (mM5, mM3). Az általunk alkalmazott PCR azért alkalmas a Rec kimutatására, mert a vizsgált régió tartalmazza a rekombinációs pontot (12. ábra). A Rekombináns törzs genomja az NIb génről keletkező cDNS-en

tartalmazza a D törzs forward primerének kötési helyét, az M törzsét azonban nem, így 5' vég felől a D törzs specifikus forward primer (mD5) kapcsolódik hozzá. A Rec törzs genomja az CP génről keletkező cDNS-en tartalmazza az M törzs reverz primerének kötési helyét, az D törzsét azonban nem, így 3' vég felől az M törzs specifikus reverz primer (mM3) kapcsolódik hozzá.

A PCR eredményét 1%-os agarózgélen való futtatással tesszük láthatóvá. A gélelektroforézis során megjelenített PCR termékeket hosszúságuk alapján soroljuk törzsekbe (13. ábra). A legrövidebb (459 bp) szakasz az M törzs esetében jön létre, míg a D törzsnél kapjuk a leghosszabb (664 bp) PCR terméket. A Rec törzs esetében a felszaporított cDNS szakasz hossza a kettő közé fog esni (605 bp).



12. ábra: Az NIb génben található rekombinációs pont és a törzsspecifikus primerek (Šubr *et al.*, 2004)



13. ábra: A PCR eredménye az M, D és Rec törzs esetén (Fotó: Ádám J.)

4.3.7. Nukleotid szekvencia meghatározása és analízise

A PCR termékeket PCR termék tisztítása után küldük szekvencia meghatározásra Hollandiába, ahol a BaseClear cég Barcode Sequencing szolgáltatását vettük igénybe.

Az összehasonlításhoz és a rokonsági viszonyok megállapításához egy korábban végzett hazai kutatás (Ádám *et al.*, 2015b) eredményeiből származó szekvenciákat (COS azonosítóval ellátott izolátumok), egy még nem publikált ’Goldrich’ fajtájú soroksári kajsziról származó izolátumot, egy sóskútról származó korábban vizsgált (Szathmáry és Palkovics, 2010) FN179155-es NCBI azonosítóval ellátott izolátumot, az SK 68-as izolátumot (Palkovics *et al.*, 1993), valamint minden eddig azonosított PPV törzshöz tartozó egy darab izolátumot használtunk (7. táblázat). Az összehasonlítást és a filogenetikai törzsfát a CLC Sequence Viewer 7.0-ás verziójával végeztük. A törzsfa elkészítése során 1000 ismétléses bootstrap analízist használtunk, mely során a program 1000 alkalommal rajzolja meg a törzsfát. A törzsfán az elágazásokban a számok azt mutatják, hogy hány alkalommal rajzolta meg a program ugyan úgy, ahogy a képen látjuk.

7. táblázat: Az összehasonlításhoz használt referencia izolátumok

NCBI azonosító	PPV-Törzs	Hivatkozás
AB576080	PPV-D (Dideron)	(Maejima *et al.*, 2011)
AY184478	PPV-C (Cherry - SoC izolátum)	(Fanigliulo *et al.*, 2003)
DQ431465	PPV-EA (El Amar)	(Glasa *et al.*, 2006)
EU734794	PPV-T (Turkey)	(Serçe *et al.*, 2009)
HF585104	PPV-M (Marcus)	(Vozarova *et al.*, 2013)
HF674399	PPV-M-An (M-Ancestor)	(Palmisano *et al.*, 2012)
JX013532	PPV-Rec (Recombinant)	(Kajic *et al.*, 2008)
KC020126	PPV-CR (Cherry Russian)	(Glasa *et al.*, 2013)
KC347608	PPV-W (Winona)	(Sheveleva *et al.*, 2013)

4.3.8. Statisztikai módszerek

Az eredmények statisztikai elemzésére az IBM SPSS Statistics 20 programcsomagot használtuk.

Függetlenségvizsgálat Khi-négyzet-próbával

E próbával két eseményrendszer és ezen keresztül két változó függetlenségét teszteltük (Harnos és Ladányi, 2005). A nullhipotézis a változók függetlenségét mondja ki. Esetünkben a következő kérdésekre kerestük a választ függetlenségvizsgálattal:

- Igazolható-e, hogy az alanyfajtának hatása van a vírusfertőzöttségre?
- Igazolható-e, hogy a nemesfajtának hatása van a vírusfertőzöttségre?
- Igazolható-e, hogy az alany és nemes kombinációknak hatása van a vírusfertőzöttségre?

Amennyiben a szignifikanciaszint kisebb volt, mint az α elsőfajú hibavalószínűség ($p<\alpha$), elutasítottuk a H_0 hipotézist, azaz szignifikáns összefüggést mutattunk ki. Ha szignifikáns hatást tudunk kimutatni, az azt jelenti, hogy az alanyfajták, nemesfajták, és kombinációik között különbség van a fertőzöttséggel szembeni ellenállóképesség szempontjából. Vizsgálatainkban $\alpha=0,05$ esetén szignifikanciáról, $\alpha=0,01$ érték esetén erős szignifikanciáról beszélünk.

Bináris logisztikus regresszió

A fák fertőzöttségét befolyásoló tényezők vizsgálatára logisztikus regressziós modellt is alkalmaztunk, amelyben a vizsgált esemény (az adott időszakban történő megfertőződés) bekövetkezési valószínűségét becsüljük. A logisztikus regressziós modell szignifikanciája mellett az alanyok, fajták, és kombinációjuk közötti

különbségeket az esélyhányadossal vizsgáltuk. A nemesfajták összehasonlításakor referenciaszintként a ’Michelini’ nemesfajtát választottuk irodalmi adatok alapján rezisztenciát mutató mivolta miatt. A kombinációk összehasonlításakor referenciaszintként a mandula magonc x ’Michelini’ kombinációt választottuk az irodalmi adatok alapján a mandula magonc PPV-vel szembeni fogékonyságából és a ’Michelini’ rezisztenciájából kifolyólag.

4.3.9. Az FTA technológia – mintagyűjtéstől PCR-ig

A minták gyűjtését Whatman FTA Card segítségével végeztük. A növényi minták az FTA Card-on lévő nukleinsav kötő membránra blottolással (rádörzsöléssel) kerültek. A mintákat hagyományos postai úton borítékban kaptuk meg Bulgáriából. Harris Micro-Punch^{TM} segítségével 2 mm átmérőjű korongokat helyeztünk steril 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe, mintánként egyet. A mintavevő eszközt 2 mintavétel között alkoholos lemosással fertőtlenítettük. Ezután 200 µl FTA Purification Reagent hozzámérése következett. Öt perc szobahőmérsékleten való inkubálás után a reagenst eltávolítottuk, majd megismételtük a mosást. A második mosás és eltávolítás után 200 µl TE puffert (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) adtunk a membránhoz, és szintén 5 perc inkubálás után eltávolítottuk azt, majd megismételtük ezt a lépést is. A membrán ezután 1 órán keresztül száradt szobahőmérsékleten a Eppendorf csőben. A száraz 2 mm átmérőjű FTA Card darabot használtuk a már korábban leírt RT-PCR analízishez RNS templátként, a PCR-t 25 µl végtérfogatban végeztük.

5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. A hazai felmérés eredményei

Munkánk során 105, a PPV fertőzés jellegzetes tüneteit mutató és tünetmentes mintát gyűjtöttünk. A minták gyűjtése egy már folyamatban lévő vizsgálat következő szakaszát képezte, a minták sorszáma ezért indul a kilences számmal (9. táblázat).

5.1.1. A PCR vizsgálat eredménye

A PCR vizsgálat során alkalmazott PCI és PP3 primerek - a genom 3'P3–6K_1–5'CI régiójának megfelelő - 836 bp hosszú PCR-terméket emeltek ki, mely alapján 42 minta bizonyult szilva himlő vírussal fertőzöttnek (8. táblázat).

8. táblázat: A vizsgálat során gyűjtött minták elnevezése, a gyűjtés helyének, az eredeti gazdanövény nevének, továbbá a PCR vizsgálat eredményének feltüntetésével

Minta száma	Mintagyűjtés helye	Megye	gazdanövény	vírus +/-
9	Kemence	Pest megye/Észak	*Prunus domestica*	+
10	Kemence		*Prunus domestica*	+
11	Kemence		*Prunus domestica*	+
12	Kemence		*Prunus domestica*	+
13	Kemence		*Prunus domestica*	+
14	Kemence		*Prunus domestica*	+
15	Bernecebaráti	Pest megye/Észak	*Prunus domestica*	+
16	Bernecebaráti		*Prunus domestica*	+
17	Bernecebaráti		*Prunus domestica*	-
18	Bernecebaráti		*Prunus domestica*	+
19	Vámosmikola	Pest megye/Észak	*Persica vulgaris*	-
20	Vámosmikola		*Persica vulgaris*	-
21	Kemence	Pest megye/Észak	*Prunus domestica*	-
22	Kemence		*Prunus avium*	-
23	Kemence		*Prunus domestica*	-
24	Budapest	Pest megye	*Prunus domestica*	-
25	Boldogkőváralja	Borsod-Abaúj-Zemplén	*Prunus cerasifera*	+
26	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'	+
27	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'	-
28	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'	+
29	Boldogkőváralja		*Prunus cerasifera*	-
30	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'	-
31	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'	+
32	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'	-
33	Boldogkőváralja		*Prunus domestica* 'Big blue'	+
34	Kozárd	Nógrád	*Prunus domestica*	+
35	Kozárd		*Prunus domestica*	+
36	Kozárd		*Prunus domestica*	-

Minta száma	Mintagyűjtés helye	Megye	gazdanövény	vírus +/-
37	Kozárd	Nógrád	*Prunus domestica*	+
38	Kozárd		*Prunus domestica*	+
39	Kozárd		*Prunus domestica*	-
40	Kistokaj	Borsod-Abaúj-Zemplén	*Prunus cerasifera*	-
41	Kistokaj		*Prunus domestica* 'Stanley'	-
42	Kistokaj		*Prunus domestica* 'Stanley'	-
43	Kistokaj		*Prunus domestica* 'Stanley'	-
44	Kistokaj		*Prunus armeniaca*	-
45	Nyírtelek	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus domestica* 'Besztercei'	+
46	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Besztercei'	-
47	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Elena'	-
48	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Besztercei'	-
49	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Besztercei'	+
50	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Besztercei'	-
51	Nagykálló-Ludastó	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus domestica* 'Bluefre'	+
52	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'	+
53	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'	-
54	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'	-
55	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre'	+
56	Nagykálló-Ludastó		*Prunus domestica* 'Bluefre’	+
57	Sóskút	Pest megye/Nyugat	*Prunus domestica* 'Bluefre'	-
58	Salgótarján	Nógrád	*Prunus domestica*	-
59	Ludastó	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Persica vulgaris*	-
60	Szentendre	Pest megye	*Prunus domestica*	-
61	Szentendre		*Prunus domestica*	-
62	Szentendre		*Prunus domestica*	-
63	Szentendre		*Prunus cerasifera*	+
64	Szentendre		*Prunus domestica*	-
65	Szentendre		*Prunus cerasifera*	+
66	Tata	Komárom-Esztergom	*Prunus domestica*	+
67	Tata		*Prunus domestica*	+
68	Tata		*Prunus domestica*	+
69	Tata		*Prunus domestica*	+
70	Tata		*Prunus domestica*	-
71	Tata		*Prunus domestica*	-
72	Ismeretlen		*Prunus salicina*	+
73	Szigethalom	Pest megye/Dél	*Prunus domestica*	+
74	Győr-Ménfőcsanak	Győr-Moson-Sopron	*Prunus domestica*	+
75	Sóskút	Pest megye/Nyugat	*Prunus domestica* 'Bluefre'	+

Minta száma	Mintagyűjtés helye	Megye	gazdanövény	vírus +/-
76	Piliscsév	Komárom-Esztergom	*Prunus domestica* 'Stanley'	+
77	Piliscsév		*Prunus domestica* 'Besztercei'	+
78	Csömör	Pest megye-Kelet	*Prunus domestica*	-
79	Csömör		*Prunus domestica*	-
80	Csömör		*Prunus domestica*	-
81	Gönc	Borsod-Abaúj-Zemplén	*Prunus domestica*	-
82	Gönc		*Prunus armeniaca* ceglédi kísérleti fajta	-
83	Gönc		*Prunus domestica* ismeretlen román fajta	-
84	Gönc		*Prunus domestica* 'Besztercei'	-
85	Boldogkőváralja	Borsod-Abaúj-Zemplén	*Prunus armeniaca* 'Yellowcot'	+
86	Atkár	Heves	*Prunus armeniaca* ceglédi	-
87	Atkár		*Prunus domestica* 'Besztercei'	+
88	Atkár		*Prunus domestica* 'Cacanska lepotica'	-
89	Bernecebaráti	Pest megye/Észak	*Prunus domestica*	-
90	Bernecebaráti		*Prunus domestica*	-
91	Bernecebaráti		*Prunus domestica*	-
92	Sóskút	Pest megye/Nyugat	*Prunus domestica* 'Cacanska lepotica'	-
93	Sóskút		*Prunus domestica*	-
94	Sóskút		*Prunus domestica* 'Stanley'	-
95	Sóskút		*Prunus armeniaca*	-
96	Cegléd	Pest megye/Dél	*Prunus armeniaca*	+
97	Cegléd		*Prunus domestica* 'Stanley'	+
98	Cegléd		*Prunus domestica* 'Tuleu Gras'	-
99	Cegléd		*Prunus domestica* 'Cacanska lepotica'	-
100	Cegléd		*Prunus domestica* 'Tuleu Gras'	-
101	Cegléd		*Prunus domestica* 'Stanley'	-
102	Érd	Pest megye/Nyugat	*Prunus domestica*	-
103	Érd		*Prunus domestica*	-
104	Érd		*Prunus domestica*	-
105	Tiszadob	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus persica* 'Suncrest', 'Cresthaven'	+
106	Tiszadob		*Prunus domestica* 'Cacanska lepotica'	-
107	Tiszadob		*Prunus persica* 'Suncrest', 'Cresthaven'	-
108	Tiszadob		*Prunus persica* (var. *nectarina*) 'Andosa'	+

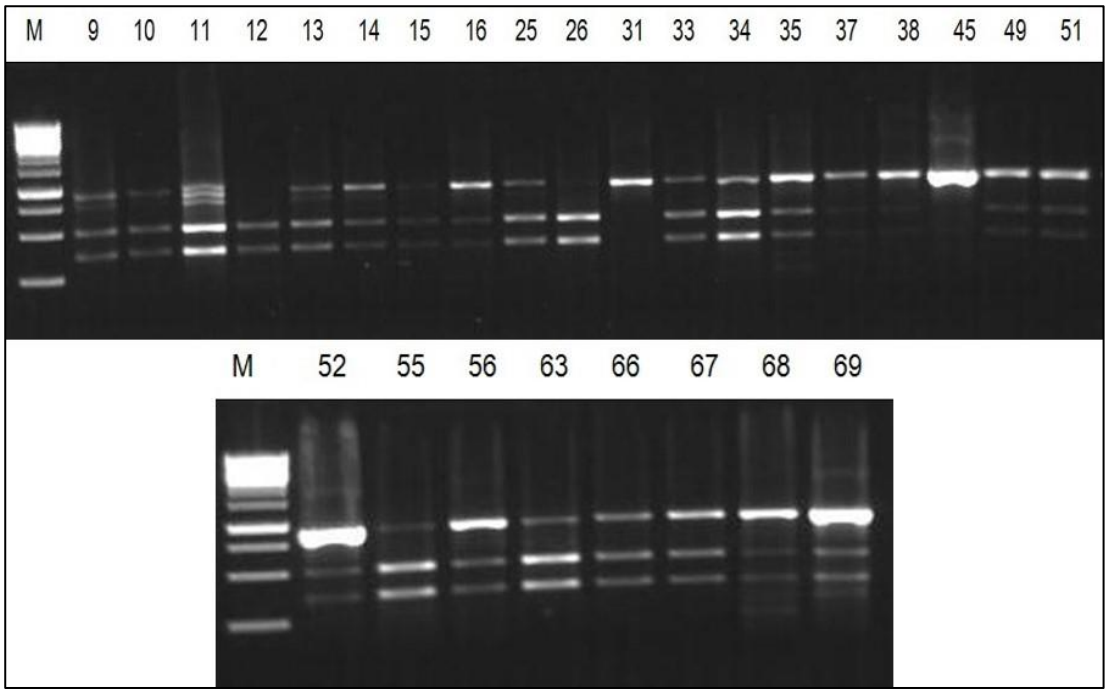
Minta száma	Mintagyűjtés helye	Megye	gazdanövény	vírus +/-
109	Nagykálló	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus domestica* 'Besztercei'	-
110	Nagykálló		*Prunus domestica*	-
111	Nagykálló		*Prunus domestica*	-
112	Nyírtelek	Szabolcs-Szatmár-Bereg	*Prunus domestica*	-
113	Nyírtelek		*Prunus domestica* 'Besztercei'	-

Jelmagyarázat: +: a PCR vizsgálat során fertőzöttnek bizonyult, - a PCR vizsgálat során nem bizonyult fertőzöttnek

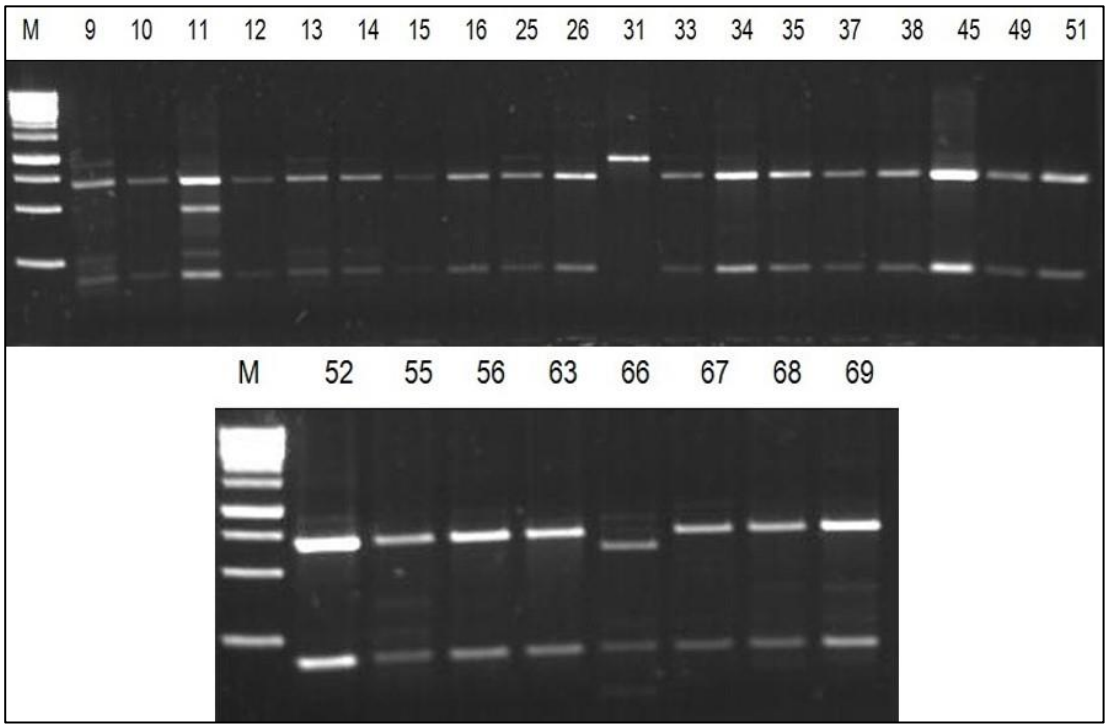
5.1.2. A restrikciós analízis eredménye

A PCR során keletkezett termékeket két féle restrikciós endonukleázzal (*Eco*RI, illetve *Dde*I) hasítottuk, mivel a hasítási mintázat alapján következtetni lehet arra, hogy egy adott PPV izolátum melyik törzsbe tartozik. Ha az *Eco*RI enzim elhasítja egy helyen a PCR-terméket, akkor az izolátum PPV-D vagy PPV-Rec típusú, ha nincs a PCR-terméken hasítóhelye, akkor pedig PPV-M típusúnak bizonyul (14. ábra). Ugyanígy a *Dde*I-gyel való hasítás során, ha a PCR-termék egy vagy két hasítóhelyet tartalmaz, akkor PPV-D vagy PPV-Rec típusú izolátumról van szó, ha pedig nincs az enzimnek hasítóhelye a szekvencián, akkor PPV-M típusú az izolátum (15. ábra) (Glasa *et al.*, 2002b). A restrikciós analízis során vizsgált 27 minta közül 24 rendelkezik a vizsgált szakaszon egy *Eco*RI és egy *Dde*I hasító hellyel, további 1 minta esetében az egy *Eco*RI hely mellett két *Dde*I felismerő hely található. Egy minta a vizsgált régióban egyik enzim felismerő helyét sem tartalmazza, míg 1 minta PCR vizsgálata során a keletkezett PCR-terméket a két enzim közül csak a *Dde*I hasította (9. táblázat).

A 10. táblázat utolsó oszlopában, a sikeresen szekvenált minták bázissorendje alapján megállapított törzs látható. A szekvencia alapján meghatározott törzs szinte mindenhol összhangban van a *Dde*I-gyel végzett hasítás eredményével. Két mintát emelnénk ki, az egyik a 31-es, mely a többitől eltérően PPV-M típusúnak bizonyult, a másik a 45-ös, mely az *Eco*RI hasítóhely hiánya alapján az PPV-M típusba tartozna, míg a *Dde*I enzim felismerő hely jelenléte miatt PPV-D izolátumokhoz lenne sorolható. Ez utóbbi izolátum a vizsgált régió nukleotid szekvenciája alapján azonban egyértelműen a PPV- D csoporthoz tartozik.



14. ábra: Hasítás *Eco*RI-gyel



15. ábra: Hasítás *Dde*I-gyel

9. táblázat: A restrikciós analízis során vizsgált minták és a nukleotid szekvencia alapján meghatározott törzsek eredményei

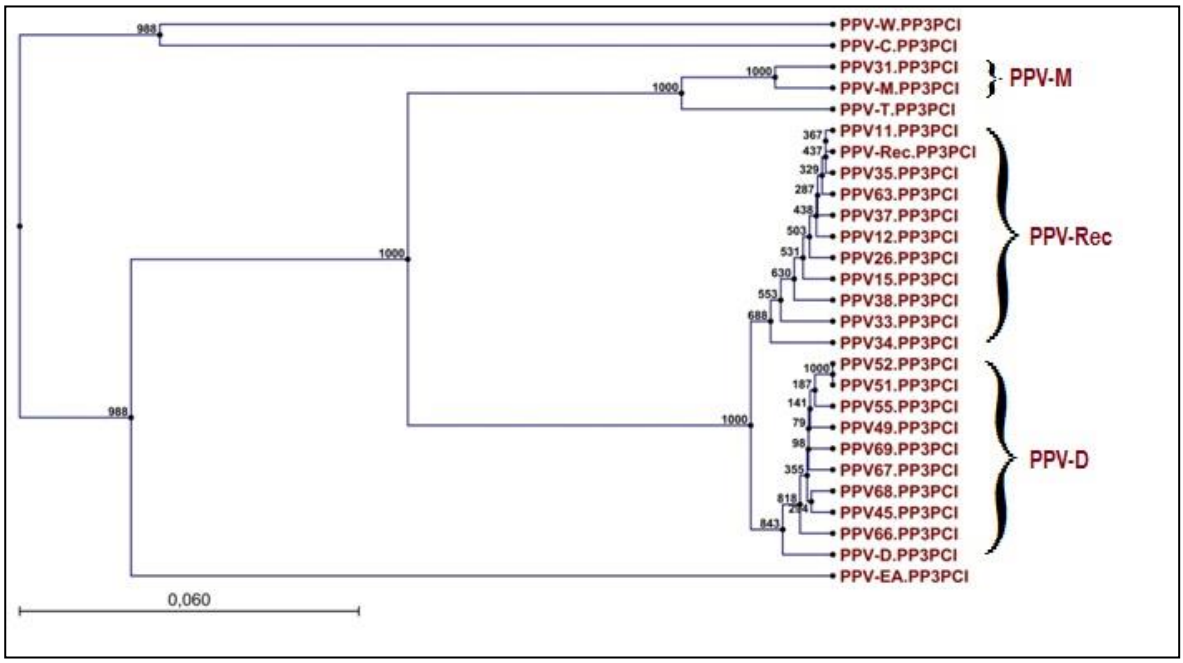
Sorszám	*Eco*RI		*Dde*I		szekvencia
	hasító helyek száma	törzs	hasító helyek száma	törzs	törzs
9	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	-
10	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	-
11	1	D vagy Rec	2	D vagy Rec	Rec
12	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec
13	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	-
14	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	-
15	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec
16	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec
25	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D
26	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec
31	0	M	0	M	M
33	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec
34	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec
35	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec
37	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec
38	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec
45	0	M	1	D vagy Rec	D
49	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D
51	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D
52	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D
55	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D
56	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D
63	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	Rec

66	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D
67	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D
68	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D
69	1	D vagy Rec	1	D vagy Rec	D

5.1.3. Szekvencia analízis és rokonsági kapcsolat feltárása

A PCR során felszaporított klónozott szakaszok nukleotid sorrendjének meghatározása után a saját izolátumaink szekvenciáit néhány a nemzetközi adatbázisból származó izolátummal hasonlítottunk össze és filogenetikai törzsfát is készítettünk (16. ábra). Az adatbázisból úgy választottuk ki az izolátumokat, hogy a 7 vizsgálataink idején ismert PPV törzsből szerepeljen egy-egy izolátum.

Mivel az 56-os, a 25-ös, a 16-os és a 31-es minta esetében a klónozottnál rövidebb szakasznak kaptuk meg a szekvenciáit, a 31-es minta kivételével ezeket ki kellett hagynunk a törzsfa alkotásakor. A 31-es minta érdekessége miatt került mégis a törzsfába, mivel ez M törzsbe tartozónak tűnt az előzetes vizsgálatok alapján.



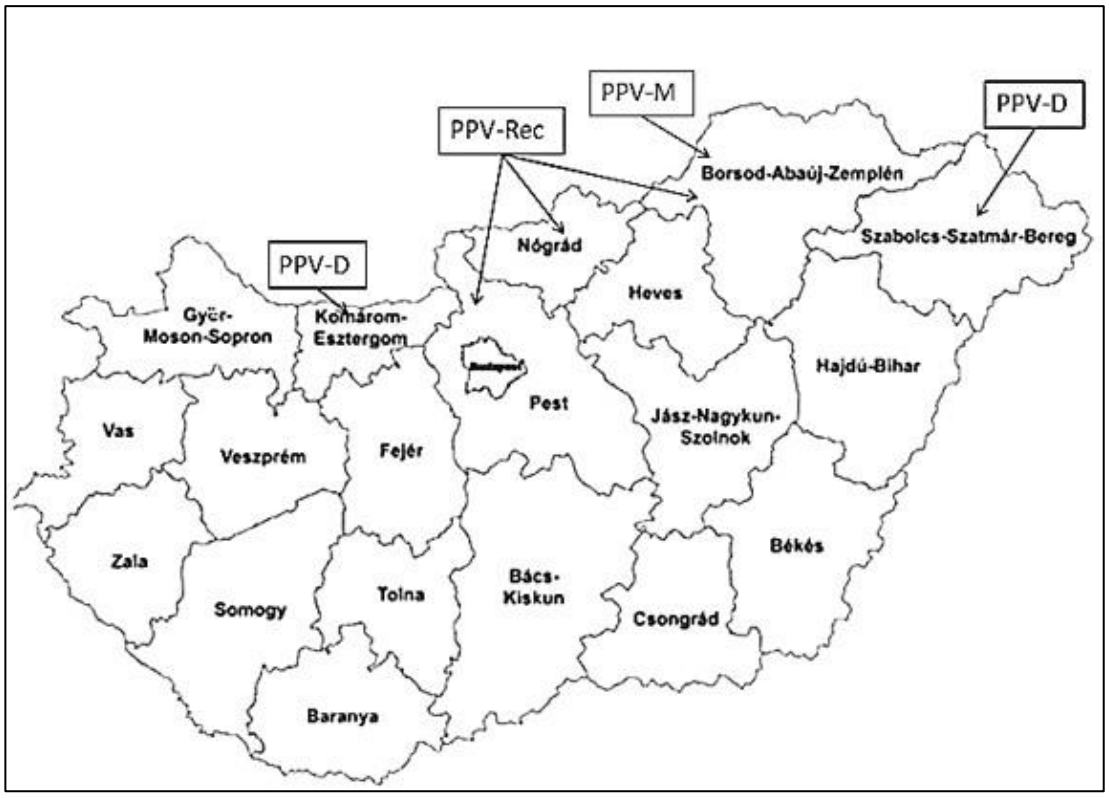
16. ábra: Az általunk gyűjtött izolátumok és a nemzetközi adatbázisból származó izolátumok filogenetikai törzsfája

A törzsfa alapján is megállapítható, hogy a következő minták a rekombináns törzsbe tartoznak: 11, 35, 63, 37, 12, 26, 15, 38, 33, 34; az alábbiak pedig a D törzsbe:

52, 51, 55, 49, 69, 67, 68, 45, 66; a 31-es minta pedig valóban az M törzzsel mutatja a legnagyobb hasonlóságot. A szekvenciákat nem töltöttük fel az NCBI adatbázisába.

5.2. A hazai felmérés eredményeiből levont következtetések

Az általunk gyűjtött és nukleotid sorrend szintjén is elemzett 23 izolátum közül 12 a D, 10 a Rec és 1 az M törzsbe tartozónak bizonyult. Így eredményeink alapján megállapítható, hogy Magyarország északi megyéiben a két legelterjedtebb törzs a D és a Rec, de az M törzs is jelen van. A törzsek megoszlását megyénként tekintve, a D főként Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében és Komárom-Esztergom megyében elterjedt, a Rec pedig Pest, Nógrád és Borsod-Abaúj-Zemplén megyékben a leggyakoribb. Az M törzs képviselőjét is Borsod-Abaúj-Zemplén megyéből gyűjtöttük (17. ábra).



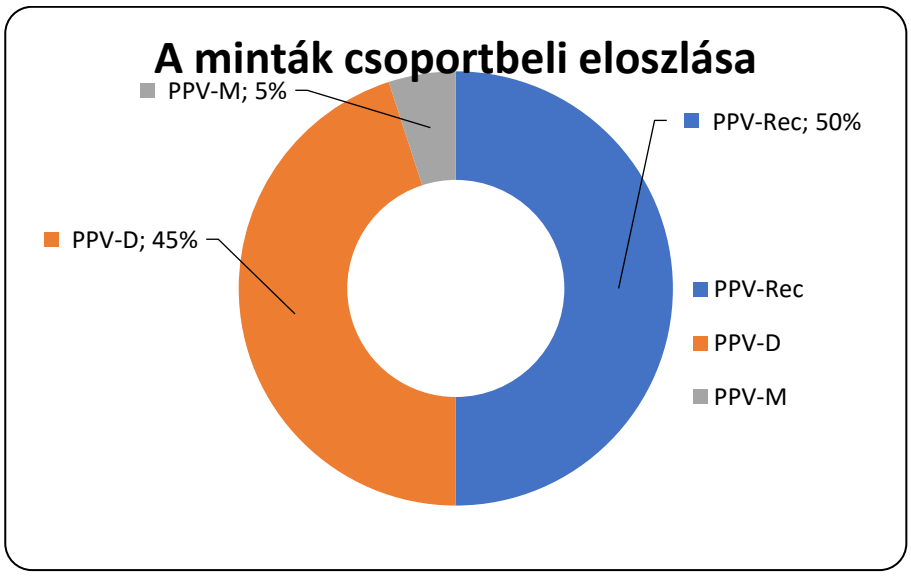
17. ábra: A vizsgált megyékben jellemző törzsek

A nukleotid szekvencia vizsgálata alapján meghatározott törzsek szinte minden izolátum esetében összhangban vannak a restrikciós endonukleázokkal végzett hasítás eredményével. Három mintát emelnék ki: az első a 11., melynél a vizsgált szakaszon 2 *Dde*I hasítóhely található, a második a 31., mely a cDNS vizsgált szakaszán a többitől eltérően, egyik enzim hasító helyét sem hordozza, így PPV-M típusúnak bizonyult (Glasa *et al.*, 2002b), a harmadik a 45-ös, mely az *Eco*RI hasítóhely hiánya

alapján az PPV-M típusba tartozna, míg a *Dde*I enzim felismerő hely jelenléte miatt a PPV-D, vagy a PPV-Rec izolátumokhoz lenne sorolható. Ez utóbbi izolátum a vizsgált régió nukleotid szekvenciája alapján azonban egyértelműen a D törzshöz tartozik. Korábban már beszámoltak olyan D törzsbe tartozó izolátumról, mely esetében a cDNS-t a vizsgált szakaszon - saját tapasztalatainkhoz hasonlóan - a *Dde*I restrikciós enzim hasította, az *Eco*RI viszont nem (Szathmáry és Palkovics, 2009).

A D, illetve a Rec törzsekbe tartozó izolátumok a 3'P3–6K1–5'CI régiónak megfelelő cDNS-en általában 1 *Eco*RI és 1 *Dde*I hasító hellyel rendelkeznek (Glasa *et al.*, 2002b), ritkán azonban az 1 *Eco*RI felismerő hely mellett 2 *Dde*I helyet hordoznak (Glasa *et al.*, 2002a). Ezzel összhangban vannak saját eredményeink is, ugyanis a PPV-D, illetve a PPV-Rec törzsekbe sorolt 22 PPV-izolátum közül csupán 1 esetében (11. izolátum) figyelhető meg 2 *Dde*I hely a szekvencián.

A vizsgált izolátumok közül a Rec törzs előfordulása volt a legnagyobb, mely alátámasztja a korábbi megfigyeléseket, miszerint a rekombináns izolátumok előfordulása gyakori ebben a régióban (Glasa *et al.*, 2004). Myrta és Boscia (2001) beszámolt M törzsbe tartozó izolátumról szilva gazdanövényen, mely a mi eredményeinkben is megmutatkozik 'Big blue' fajtán. Ez igazolja Dallot és munkatársai (1997) megállapítását, miszerint a régióban megfigyelhető ez a törzs. A D törzs az irodalmi adatoknak megfelelően hazánkban is képviselteti magát, vizsgált mintáink között a második legnagyobb gyakorisággal (18. ábra).



18. ábra: A minták törzsbeli százaléka

5.3. Az alany-nemes kombinációk vizsgálatának eredményei

Munkánk során 91 tünetmentes, illetve PPV jellegzetes tüneteit mutató növényről származó mintát gyűjtöttünk Sóskúton.

5.3.1. A PCR vizsgálatok eredményei

A 3'P3-6K_1-5'CI genomi régióban a PP3 és PCI primerekkel végzett PCR vizsgálatok során a pozitív minták esetében megkaptuk a várt 836 bp hosszúságú szakaszt. A 3'NIb-CP régióban M4T, M4 és S primerekkel végzett PCR vizsgálatok során a pozitív minták esetében szintén megkaptuk a megközelítőleg 1800 bp hosszúságú szakaszokat. Vizsgálataink során a 91 mintából 45-ben sikerült kimutatni a PPV jelenlétét (10. táblázat).

10. táblázat: A vizsgált minták PCR és RFLP eredményei

Minták:'GF677'-'Cresthaven'

	Szám	Azonosító	PCR	Törzs
1	69	Cr GF677 43/1/4		
2	68	Cr GF677 43/21/9		
3	34	Cr GF677 43/41/5	+	M
4	43	Cr GF677 43/41/8		
5	19	Cr GF677 43/61/5		
6	8	Cr GF677 43/61/8		
7	47	Cr GF677 G 43/1/8		
8	59	Cr GF677 G 43/21/4		

Minták: 'GF677'-'Michelini'

	Szám	Azonosító	PCR	Törzs
1	6	Mic GF677 29/1/3		
2	14	Mic GF677 29/1/7	+	D
3	22	Mic GF677 29/21/3		
4	33	Mic GF677 29/21/8		
5	40	Mic GF677 29/41/1	+	D
6	49	Mic GF677 29/41/9		
7	57	Mic GF677 29/61/2		
8	91	Mic GF677 29/61/9		

Minták: 'GF677'-'Babygold 6'

	Szám	Azonosító	PCR	Törzs
1	10	Bg GF677 15/1/3		
2	84	Bg GF677 15/1/6		
3	83	Bg GF677 15/21/4	+	D+M
4	62	Bg GF677 15/21/8	+	D+M
5	82	Bg GF677 15/41/3	+	M
6	38	Bg GF677 15/41/6	+	D

7	26	Bg GF677 15/61/2	+	D+M
8	29	Bg GF677 15/61/6	+	D

Minták: ’Cadaman’-’Cresthaven’

	Szám	Azonosító	PCR	Törzs
1	77	Cr Cad 42/1/2	+	D+M
2	72	Cr Cad 42/1/2 R	+	M
3	78	Cr Cad 42/1/4		
4	71	Cr Cad 42/1/4 R	+	D+M
5	58	Cr Cad 42/21/10	+	M
6	76	Cr Cad 42/21/10 R	+	M
7	79	Cr Cad 42/21/4		
8	70	Cr Cad 42/21/4 R	+	D
9	73	Cr Cad 42/41/2	+	D
10	75	Cr Cad 42/41/2 R	+	M
11	74	Cr Cad 42/41/7	+	M
12	46	Cr Cad 42/41/7 R	+	M
13	16	Cr Cad 42/61/4	+	D+M
14	9	Cr Cad 42/61/4 R	+	D+M
15	44	Cr Cad 42/61/7	+	D+M
16	36	Cr Cad 42/61/7 R	+	D

Minták: ’Cadaman’-’Michelini’

	Szám	Azonosító	PCR	Törzs
1	5	Mic Cad 30/1/4		
2	15	Mic Cad 30/1/6		
3	41	Mic Cad 30/21/2		
4	50	Mic Cad 30/21/2 R	+	M
5	97	Mic Cad 30/21/3		
6	55	Mic Cad 30/41/2		
7	95	Mic Cad 30/41/6		
8	96	Mic Cad 30/41/6 R		
9	92	Mic Cad 30/61/4		
10	94	Mic Cad 30/61/8		
11	93	Mic Cad 30/61/8 R	+	M

Minták: ’Cadaman’-’Babygold 6’

	Szám	Azonosító	PCR	Törzs
1	89	Bg Cad 13/1/4		
2	88	Bg Cad 13/1/9		
3	87	Bg Cad 13/21/3		
4	61	Bg Cad 13/21/8		
5	86	Bg Cad 13/21/8 R	+	D+M
6	37	Bg Cad 13/41/4	+	M
7	90	Bg Cad 13/41/4 R	+	D+M

8	85	Bg Cad 13/41/6	+	D
9	25	Bg Cad 13/41/6 R	+	D+M
10	52	Bg Cad 13/61/2		
11	11	Bg Cad 13/61/2 R	+	D
12	28	Bg Cad 13/61/5	+	D+M

Minták: Mandula-'Cresthaven'

	Szám	Azonosító	PCR	Törzs
1	60	Cr Man 46/1/3	+	M
2	65	Cr Man 46/1/5		
3	66	Cr Man 46/21/5		
4	67	Cr Man 46/21/9		
5	20	Cr Man 46/41/2	+	D+M
6	35	Cr Man 46/41/7	+	M
7	45	Cr Man 46/41/7 R	+	M
8	7	Cr Man 46/61/7 R		
9	18	Cr Man 46/61/4	+	M
10	64	Cr Man 46/61/7		

Minták: Mandula-'Michelini'

	Szám	Azonosító	PCR	Törzs
1	56	Mic Man 31/1/5		
2	98	Mic Man 31/1/6		
3	99	Mic Man 31/21/3 R	+	D
4	51	Mic Man 31/21/4		
5	42	Mic Man 31/21/6	+	M
6	31	Mic Man 31/41/3		
7	24	Mic Man 31/41/5		
8	13	Mic Man 31/61/6	+	M
9	4	Mic Man 31/61/7		

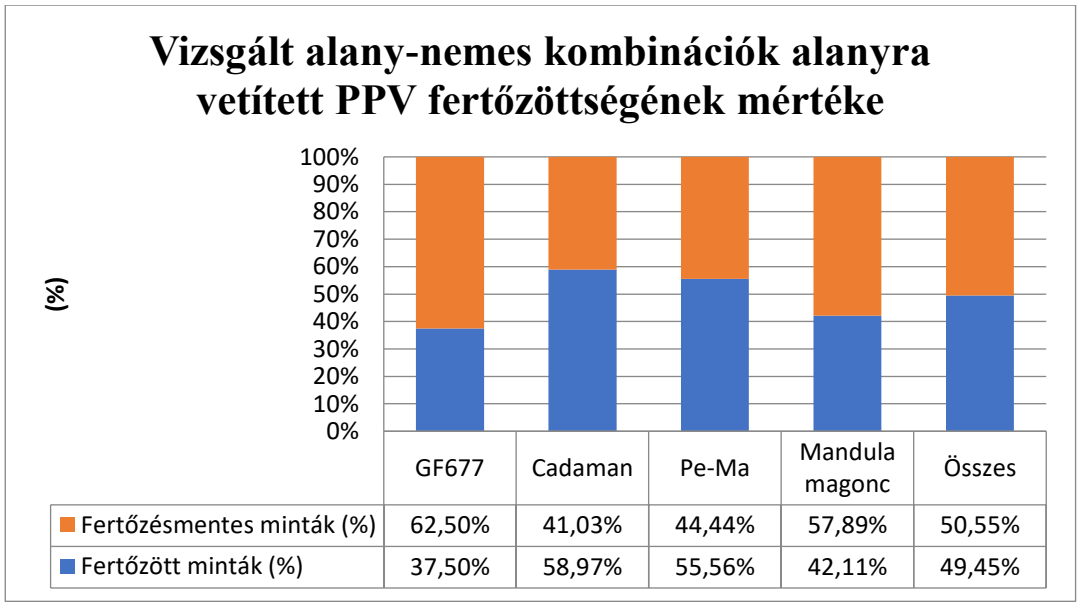
Minták: 'Pe-Ma'-'Babygold 6'

	Szám	Azonosító	PCR	Törzs
1	30	Bg Pe-Ma 14/17/3		
2	63	Bg Pe-Ma 14/17/6		
3	80	Bg Pe-Ma 14/27/2		
4	81	Bg Pe-Ma 14/27/5	+	M
5	39	Bg Pe-Ma 14/27/6	+	D
6	54	Bg Pe-Ma 14/37/1	+	D
7	27	Bg Pe-Ma 14/47/1	+	M
8	1	Bg Pe-Ma 14/37/6		
9	12	Bg Pe-Ma 14/47/7	+	D+M

Jelmagyarázat: Vastaggal a minták alany-nemes kombinációi láthatók, az első oszlop a minták csoportonkénti sorszáma, a második oszlop a minták összsorszáma. Az

azonosító elnevezésű oszlopban a nemes (Mic-'Michelini', Bg-'Babygold 6', Cr-'Cresthaven') és az alany ('GF677', Cad-'Cadaman', Man-Mandula magonc, 'Pe-Ma'), az ültetvényben elfoglalt helye (sor/parcella/fa) látható. Ha ebben az oszlopban R (rootstock) megkülönböztetést használtunk, akkor a minta alanysarjról származik. A PCR oszlopban a pozitív mintákat jelöltük, a törzs oszlopban pedig az RFLP és a nested PCR eredményét tüntettük fel.

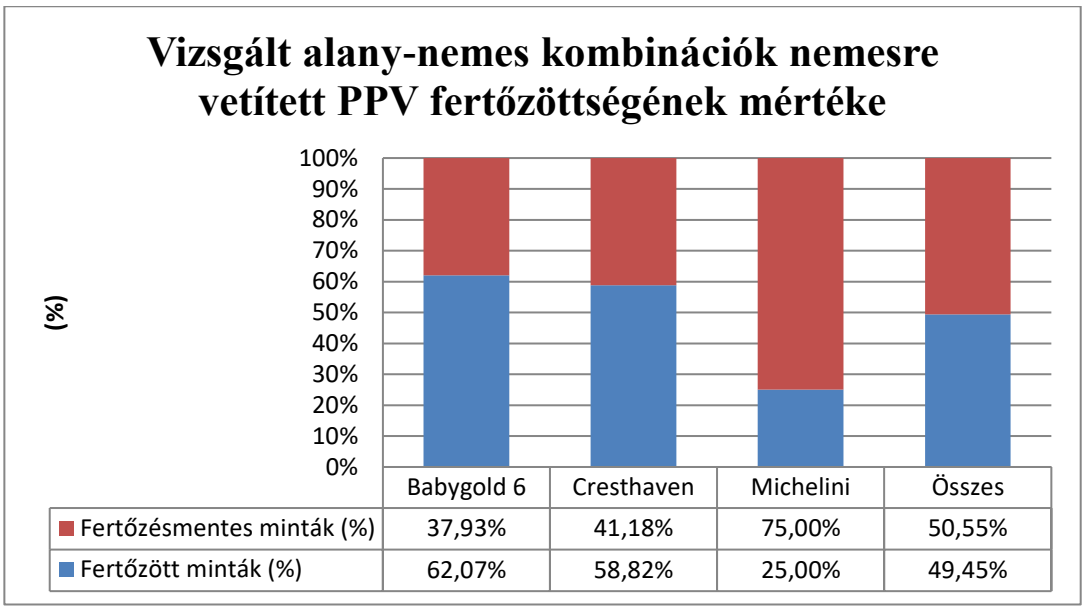
A PCR vizsgálatok alapján az oltványok alanyfajtára vetített PPV fertőzöttsége kismértékű eltérést mutatott (19. ábra). Alanyfajtákra vetítve 37,50–58,97%-os fertőzöttségről beszélhetünk. A 'GF677' alanyfajtát tartalmazó oltványok 37,50%-os fertőzöttséggel kicsivel jobb arányt mutat a többihez képest. A szakirodalmi adatokkal ellentétben a mandula magonc alanyokat tartalmazó oltványok nem bizonyultak a legfogékonyabbnak a vírussal szemben. A legtöbb fertőzött minta a 'Cadaman' alanyfajtát tartalmazó oltványokról származott.



	GF677	Cadaman	Pe-Ma	Mandula magonc	Összes
Fertőzésmentes minták (%)	62,50%	41,03%	44,44%	57,89%	50,55%
Fertőzött minták (%)	37,50%	58,97%	55,56%	42,11%	49,45%

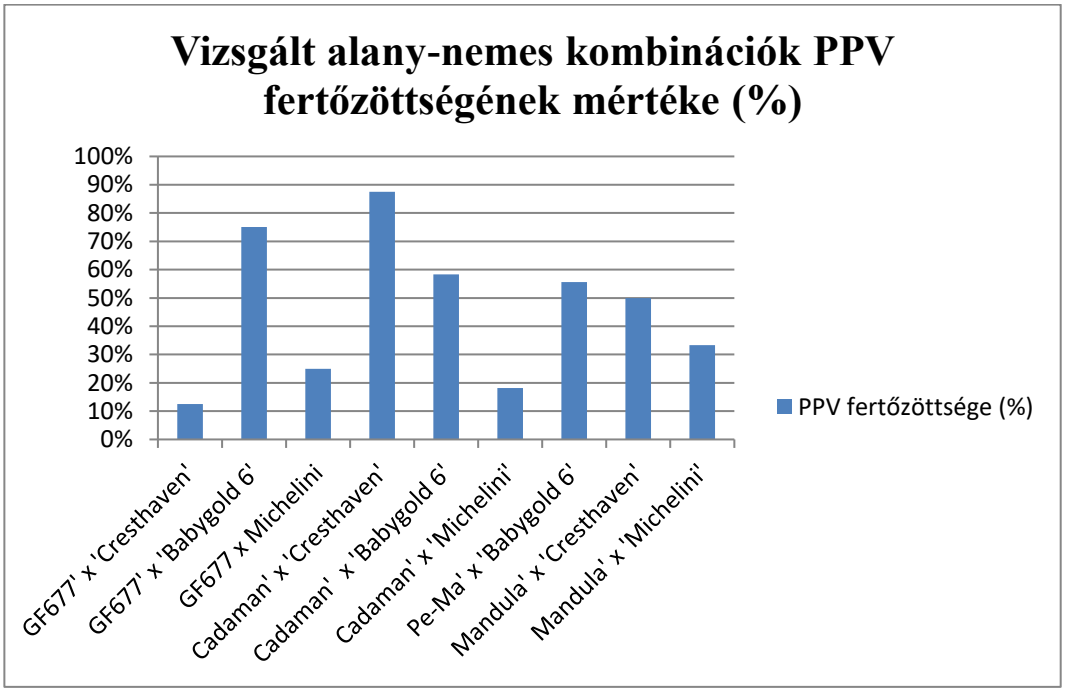
19. ábra: Vizsgált alany-nemes kombinációk alanyra vetített PPV fertőzöttségének mértéke

A kísérletben szereplő nemesfajták közül a 'Michelini' fajtát tartalmazó oltványok mintái jóval alacsonyabb mértékben mutattak fertőzöttséget, a többi nemesfajtát tartalmazókhoz viszonyítva (20. ábra). 'Babygold 6' és a 'Cresthaven' fajtákat tartalmazó oltványok mintái közel azonos mértékben voltak fertőzöttek.



20. ábra: Vizsgált alany-nemes kombinációk nemesre vetített PPV fertőzöttségének mértéke

Alany-nemes kombinációk mintáinál a ’Cadaman’ x ’Michelini’, ’GF677’ x ’Cresthaven’, ’GF677’ x ’Michelini’ kombinációknál alacsonyabb mértékben fertőződtek meg, a többi kombinációhoz viszonyítva (21. ábra). A ’Cadaman’ x ’Cresthaven’ kombinációk ezzel ellentétben nagyobb arányban fertőződtek meg a többi kombinációhoz képest.



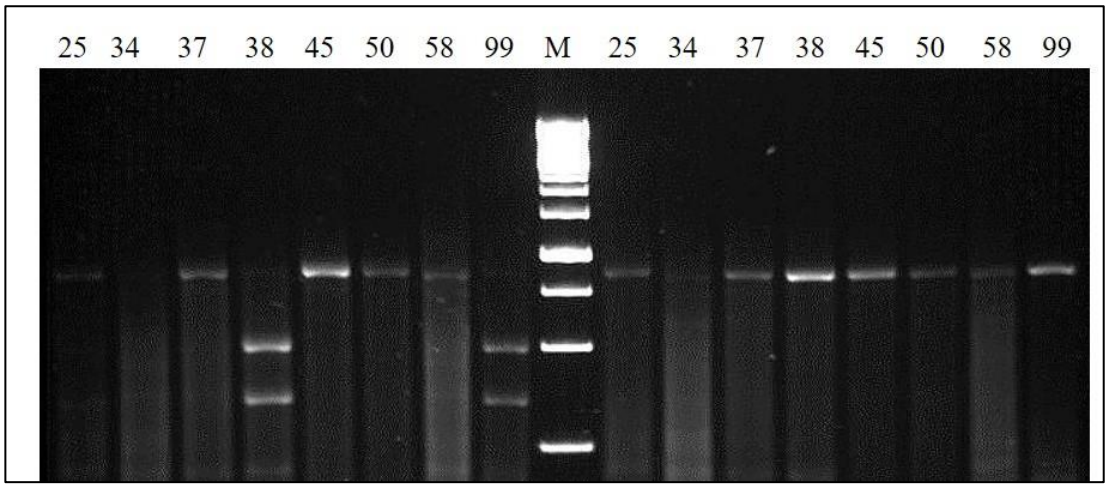
21. ábra: Vizsgát alany-nemes kombinációk PPV fertőzöttségének mértéke (%)

5.3.2. A törzsmeghatározás eredményei

A 3'P3-6K$_1$-5'CI genomi régióban elvégzett PCR során keletkezett 836 bp hosszúságú termékeket háromféle restrikciós endonukleázzal (*Dde*I, *Eco*RI és *Eco*RV) hasítottuk. Ha az *Eco*RV enzim elhasítja a PCR-terméket, akkor az izolátum Rec típusú. Ebben a genomi régióban a PPV kilenc jelenleg ismert törzse közül csak a Rec és a W izolátumoknak van *Eco*RV hasítási helye. Ha nincs a PCR-terméken *Eco*RV hasítóhely, akkor hazánkban az M vagy D törzsbe tartozik az izolátum, mely további hasításokkal elkülöníthető. Ha a *Dde*I és *Eco*RI hasítóhely sem található a szekvencián, akkor az izolátum az M törzsbe tartozik. Ugyanakkor nagyon ritkán előfordul, hogy a *Dde*I-nek egy hasítóhelye megtalálható az M szekvencián is. A PPV-D törzs nagyszámú izolátumainak vizsgálatakor azt figyeltük meg, hogy minden esetben jelen van az *Eco*RI és a *Dde*I hasítóhely, ilyenformán elkülöníthető a három törzs, a vizsgálatot azonban kiegészítettük az *Eco*RV enzimmel (12. táblázat) (Glasa *et al.*, 2002b). A 45 pozitív minta közük 16-on végeztünk el RFLP analízist a törzsek megállapításának érdekében. Az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált 16 minta közül 10 db az őszibarackon gyakorinak számító PPV-M törzzsel, 4 db a PPV-D törzzsel, 2 db pedig mindkét törzzsel fertőzött volt. Ebben az esetben a részlegesen hasított minták adták az eredményt, mely kevert fertőzésre utal (22. ábra, 11. táblázat).

11. táblázat: Az RFLP vizsgálathoz használt restrikciós enzimek hasítóhelyeinek száma és helye a 836 bp hosszúságú PCR terméken

Törzs	Restrikciós enzimek hasító helyének száma és helye a PP3-PCI primerekkel felszapoírtott szakaszon		
	*Eco*RI	*Eco*RV	*Dde*I
PPV-Rec	1$_{(495bp)}$	1$_{(145bp)}$	1$_{(188bp)}$
PPV-M	0	0	0 v. 1$_{(188bp)}$
PPV-D	0 v. 1$_{(495bp)}$	0	1$_{(188bp)}$

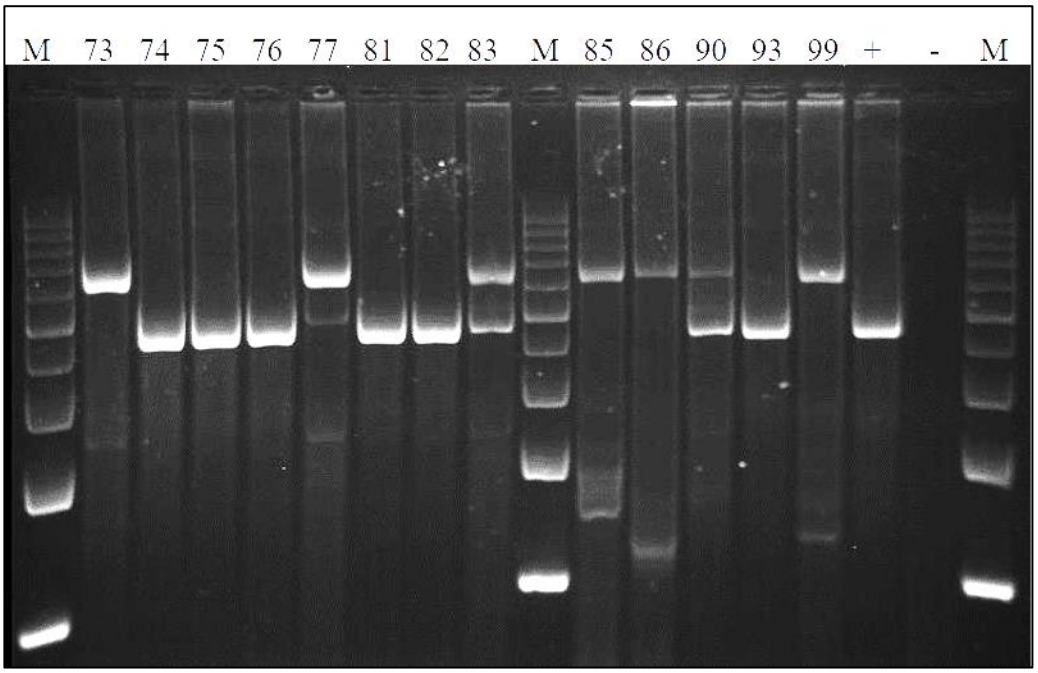


22. ábra: RFLP vizsgálat *Eco*RI (bal) és *Eco*RV (jobb) enzimekkel

Jelmagyarázat: az ábrán látható 8 mintát EcoRI és EcoRV enzimmel emésztettük, középen M: marker.

Az eredmény ezek alapján: Rec nincs, D a 38-as és a 99-es minta, részlegesen emésztett, ezért M+D a 25-ös, és M a 34, 37, 45, 50, 58-as minta.

A nested PCR során használt törzsspecifikus primerek az M, D és Rec törzsek elkülönítésére alkalmasak. Az elkülönítést gélkép alapján végeztük (23. ábra). A 45 pozitív mintán végzett vizsgálat eredményeképpen 19 PPV-M, 12 PPV-D és 14 D+M kevert fertőzést diagnosztizáltunk.



23. ábra: A nested PCR gélképe

Jelmagyarázat: az ábrán látható 13 mintát 2,5 %-os agaróz gélben futtattuk. A PPV-M törzsre jellemző szakasz 459 bp, a rekombinánsra jellemző 605 bp, a D törzsre jellemző 664 bp hosszúságú. A képen az M oszlopok 100 bp felosztású markert

jelölnek, a számok a minták sorszámai, pozitív és negytív kontroll + és – jellel jelölve található.

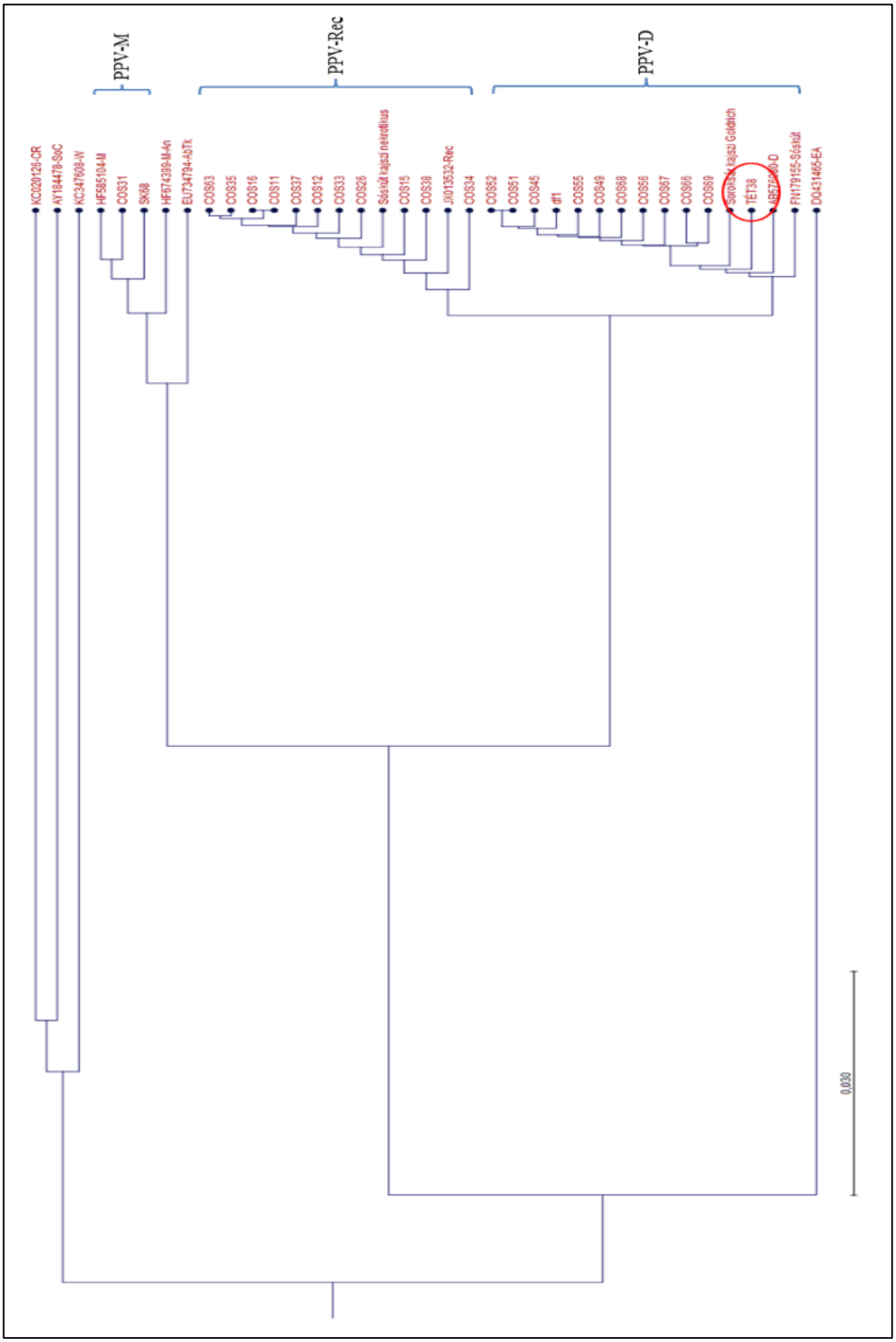
Az eredmény ezek alapján: Rec nincs, D a 73, 85, 99-es minta, M a 74, 75, 76, 81, 82, 93-as minta, M+D a 77, 83, 86 (halvány), 90-es minta.

5.3.3. Szekvencia analízis és rokonsági kapcsolatok feltárása

A szekvencia analízishez a TÉT38-as mintát választottuk, mert az RFLP alapján PPV-D törzsbe tartozó izolátum PCR terméke tiszta és erős volt, valamint a D törzs ritkább őszibarackon, mint az M, ezért érdekesebb lehet a későbbiek során. A PCR során felszaporított TÉT38-as azonosítóval ellátott izolátum 3'P3-6K_1-5'CI genomi régióját PCR termék tisztítás után küldtük mindkét irányból (forward és reverz primerrel is) nukleinsav sorrend meghatározásra Hollandiába. Az adatbázisból kiválasztottuk az eddig ismert magyar izolátumokat, valamint minden PPV törzsből egy reprezentatív izolátumot. Az összehasonlítást nem az egész termékkel (836 bp), hanem egy 689 bp hosszúságú köztes régióval végeztük el a szekvencia elején és végén található szekvenálási bizonytalanságok kiszűrése érdekében (3. melléklet). Az izolátum szekvenciáját az említett bizonytalanságok miatt nem töltöttük fel az NCBI adatbázisába.

A törzsfát a CLC Sequence Viewer 7.0 szoftverrel, UPGMA módszerrel készítettük 1000 ismétléses bootstrap analízist alkalmazva. A törzsfa alapján megállapítható, hogy a TÉT38-as izolátum a PPV-D törzsbe tartozik, legnagyobb hasonlóságot a vizsgált genomi régió alapján a Soroksáron talált 'Goldrich' fajtájú kajsziról származó, valamint a referencia izolátumul szolgáló japán származású *Prunus mume* cv. 'Koushuoujuku' gazdanövényen megtalált (Maejima *et al.*, 2011) mintával mutatta (24. ábra).

24. ábra: A TÉT38-as izolátum rokonsági viszonyai hazai és nemzetközi izolátumokhoz viszonyítva



5.3.4. Statisztikai eredmények

Igazolható-e, hogy az alanyfajtának hatása van a vírusfertőzöttségre?

A két változó (az alanyfajta és a fertőzöttségi változó) kereszttáblájából (12. táblázat) elvégeztük a függetlenségvizsgálati Khi-négyzet-próbát. A megfigyelt szignifikanciaszint p=0,43. Ebből adódóan nem találtunk szignifikáns összefüggést. Más szóval nem volt kimutatható szignifikáns eltérés az alanyfajták között a fogékonyságot/ellenállóképességet illetően.

Külön elvégzett logisztikus regressziós elemzéssel sem volt kimutatható szignifikáns különbség az alanyfajták között, mint ahogy ebben az esetben az egész logisztikus regressziós modell sem volt szignifikáns.

12. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációk alanyra vetített fertőzöttségének megoszlása

Alany	Fertőzésmentes	Fertőzött	Összes
'Cadaman'	16 42,1%	22 57,9%	38 100,0%
'GF677'	15 62,5%	9 37,5%	24 100,0%
Mandula	11 55,0%	9 45,0%	20 100,0%
'Pe-Ma'	4 44,4%	5 55,6%	9 100,0%
Összesen	46 50,5%	45 49,5%	91 100,0%

Igazolható-e, hogy a nemesfajtának hatása van a vírusfertőzöttségre?

A két változó (a nemesfajta és a fertőzöttségi változó) kereszttáblájából (13. táblázat) elvégeztük a függetlenségvizsgálati Khi-négyzet-próbát. A megfigyelt szignifikanciaszint p=0,008. Ebből adódóan erősen szignifikáns összefüggésről beszélünk. A kísérletben szereplő nemesfajták közül a 'Michelini' fajta jóval alacsonyabb mértékben fertőződött meg, a többi nemesfajtához viszonyítva.

13. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációk nemesre vetített fertőzöttségének megoszlása

Nemes	Fertőzésmentes	Fertőzött	Összes
'Babygold 6'	11 37,9%	18 62,1%	29 100,0%
'Cresthaven'	14 41,2%	20 58,8%	34 100,0%
'Michelini'	21 75,0%	7 25,0%	28 100,0%
Összesen	46 50,5%	45 49,5%	91 100,0%

Logisztikus regressziós modellben a 'Michelini' nemesfajtát vettük referenciaként az irodalmi adatok alapján feltételezhető rezisztenciája miatt. Az esélyhányados mindkét másik fajta esetén szignifikánsan nagyobb 1-nél, vagyis ezen nemesfajtáknál szignifikánsan nagyobb esély van a fertőzöttségre, mint a 'Michelini'-nél (14. táblázat).

Az adatokból külön elvégzett vizsgálatok alapján a 'Babygold 6' és a 'Cresthaven' fajták között nem mutatható szignifikáns különbség.

14. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációk nemesre vetített fertőzöttségének logisztikus regressziós elemzése

	Regres z-sziós együtt-ható (B)	Szten-derd hiba (S.E.)	Wald-féle statisz-tika	Szabads ági fok (df)	Szignifi kancias zint	Esélyhá nyados Exp (B)	95%-os konfidenciainterv allum Exp(B)	
							Alsó határ	Felső határ
Fajta			9,026	2	0,011			
'Babygold 6'	1,591	0,580	7,513	1	0,006	4,909	1,574	15,314
'Cresthaven'	1,455	0,558	6,790	1	0,009	4,286	1,434	12,806
Constant	-1,099	0,436	6,336	1	0,012	0,333		

Igazolható-e, hogy az alany és nemes kombinációknak hatása van a vírusfertőzöttségre?

A két változó (az alany-nemes kombináció és a fertőzöttségi változó) kereszttáblájából (15. táblázat) elvégeztük a függetlenségvizsgálati Khi-négyzet-próbát. A megfigyelt szignifikanciaszint p=0,004. Ebből adódóan erősen szignifikáns összefüggésről beszélünk.

A ’Cadaman’ x ’Michelini’, ’GF677’ x ’Cresthaven’, ’GF677’ x ’Michelini’ kombinációk alacsonyabb mértékben fertőződtek meg a többi kombinációhoz viszonyítva (16. táblázat). A ’Cadaman’ x ’Cresthaven’ kombinációk ezzel ellentétben nagyobb arányban fertőződtek meg a többi kombinációhoz viszonyítva.

Említést érdemel, hogy az kombinációkkal végzett statisztikai számításoknál a kereszttáblák bizonyos celláiban a várható gyakoriság kisebb, mint öt. Mivel azonban a minimális várható gyakoriság 3,96, a Khi-négyzet-próba eredményét elfogadhatónak tekintettük.

15. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációkat adó fajták fertőzöttségének megoszlása

Alany x nemes	Fertőzésmentes	Fertőzött	Összes
’Cadaman’ x ’Babygold 6’	5 41,7%	7 58,3%	12 100,0%
’Cadaman’ x ’Cresthaven’	2 13,3%	13 86,7%	15 100,0%
’Cadaman’ x ’Michelini’	**9** **81,8%**	**2** **18,2%**	11 100,0%
’GF677’ x ’Babygold 6’	2 25,0%	6 75,0%	8 100,0%
’GF677’ x ’Cresthaven’	**7** **87,5%**	**1** **12,5%**	8 100,0%
’GF677’ x ’Michelini’	**6** **75,0%**	**2** **25,0%**	8 100,0%
Mandula x ’Cresthaven’	5 45,5%	6 54,5%	11 100,0%
’Pe-Ma’ x ’Babygold 6’	4 44,4%	5 55,6%	9 100,0%
Mandula x ’Michelini’	6 66,7%	3 33,3%	9 100,0%
Összesen	46 50,5%	45 49,5%	91 100,0%

Logisztikus regressziós modellben a mandula magonc x ’Michelini’ kombinációt vettük referenciaként (16. táblázat) az irodalmi adatok alapján a mandula magonc PPV-vel szembeni fogékonyságából és a ’Michelini’ rezisztenciájából kifolyóan.

A ’GF667’ x ’Cresthaven’, ’GF677’ x ’Michelini’ és a ’Cadaman’ x ’Michelini’ kombinációknál az esélyhányados kisebb ugyan 1-nél (különösen a ’GF667’ x ’Cresthaven’ esetében), ami nagyobb rezisztenciára utal, de az eredmények statisztikai értelemben nem szignifikánsak. A ’Cadaman’ x ’Cresthaven’ kombinációnál az esélyhányados szignifikánsan nagyobb 1-nél, (Exp(B)=13,000; p=0,013), vagyis ezen kombinációnál szignifikánsan nagyobb esély van a fertőzöttségre a referenciához képest.

16. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációkat adó fajták fertőzöttségének logisztikus regressziós elemzése

	Regressziós együtt-ható (B)	Szteneder hiba (S.E.)	Wald-féle statisztika	Szabadsági fok (df)	Szignifikanciaszint	Esélhányados Exp (B)	95%-os konfidencia-intervallum Exp(B)	
							Alsó határ	Felső határ
Alany x Fajta			18,195	8	0,020			
’Cadaman’ x ’Babygold 6’	1,030	0,918	1,258	1	0,262	2,800	0,463	16,929
’Cadaman’ x ’Cresthaven’	**2,565**	**1,038**	**6,109**	**1**	**0,013**	**13,000**	**1,701**	**99,375**
’Cadama’n x ’Michelini’	**-0,811**	**1,054**	**0,592**	**1**	**0,442**	**0,444**	**0,056**	**3,508**
’GF677’ x ’Babygold 6’	1,792	1,080	2,752	1	0,097	6,000	0,722	49,837
’GF677’ x ’Cresthaven’	**-1,253**	**1,282**	**0,955**	**1**	**0,328**	**0,286**	**0,023**	**3,523**
’GF677’ x ’Michelini’	**-0,405**	**1,080**	**0,141**	**1**	**0,707**	**0,667**	**0,080**	**5,537**
Mandula x ’Cresthaven’	0,875	0,931	0,884	1	0,347	2,400	0,387	14,881
’Pe-Ma’ x ’Babygold 6’	0,916	0,975	0,884	1	0,347	2,500	0,370	16,888
Constant	-0,693	0,707	0,961	1	0,327	0,500		

5.4. Az alany-nemes kombinációk eredményeiből levont következtetések

Az ültetvényből származó őszibarack alany, és nemes minták vizsgálata során bebizonyosodott, hogy a 45 vizsgált pozitív minta közül 19 a PPV-M és 12 a PPV-D

törzzsel fertőződött meg. Tizennégy esetben PPV-M+D kevert fertőzést is diagnosztizáltunk. Eredményeink is alátámasztották más kutatók megfigyeléseit, miszerint őszibarackon a PPV Marcus törzse fordul elő a leggyakrabban (Dallot *et al.*, 1997). Rekombináns izolátumot nem mutattunk ki a vizsgált mintákból annak ellenére, hogy a törzsfán is jelzett *'Sóskút kajszi nekrotikus'* azonosítóval ellátott izolátumot ugyanebben az évben (2014) azonosítottuk az ültetvényből egy másik parcellán elhelyezkedő Gönci magyar kajszi állományból, tehát a rekombináns izolátumok is jelen vannak az ültetvény egyéb parcellájában.

Az ültetvény életkora 14 év a vizsgálatok idején, a telepítés éve 2000. Vizsgálatainkat olyan állományban végeztük, ahol közepesnek mondható a fertőzési nyomás. A vírus az ültetvény vizsgált parcelláiba nem a szaporítóanyaggal került be, mert 14 év után is jelentős számban vannak egészséges növények, és a fenti esetben sokkal nagyobb tételben lennének fertőzöttek a fák (akár 100%-ban is). A vizsgálatok során tanulmányozott parcellákba a PPV feltehetően vektorok útján került be, és így terjedt a kórokozó az állományban.

Az alanyfajták megközelítőleg egységes számban voltak fertőzöttek. Alanyfajtánként 37,50–58,97%-os fertőzöttségről beszélhetünk. A 'GF677' alanyfajta 37,50 %-os fertőzöttségével kicsivel jobb arányt mutat a többi alanyfajtához képest. Ez a fajta rezisztensnek bizonyult a PPV-D törzsével szemben (Rubio *et al.*, 2005). Jelen vizsgálataink ezt nem erősítik meg, PPV-D törzset a 'GF677' alanyt tartalmazó kombinációkból is mutattunk ki, azonban közvetlenül az alanyról származó mintáink nem voltak. A szakirodalmi adatokkal ellentétben a mandula magonc alanyok nem bizonyultak fogékonyabbnak a vírussal szemben, legalábbis nem ezek mutatták a legmagasabb fertőzöttségi arányt. Statisztikai értékelés során nem találtunk szignifikáns összefüggést. Nem volt kimutatható szignifikáns eltérés az alanyfajták között a fogékonyság/ellenállóképesség tekintetében.

A vizsgált nemesfajták esetében erős szignifikáns összefüggésről beszélünk. A kísérletben szereplő nemesfajták közül a 'Michelini' fajta jóval alacsonyabb mértékben fertőződött meg, a többi nemesfajtához viszonyítva. 'Babygold 6' és a 'Cresthaven' fajták esetében szignifikánsan nagyobb esély van a fertőződésre.

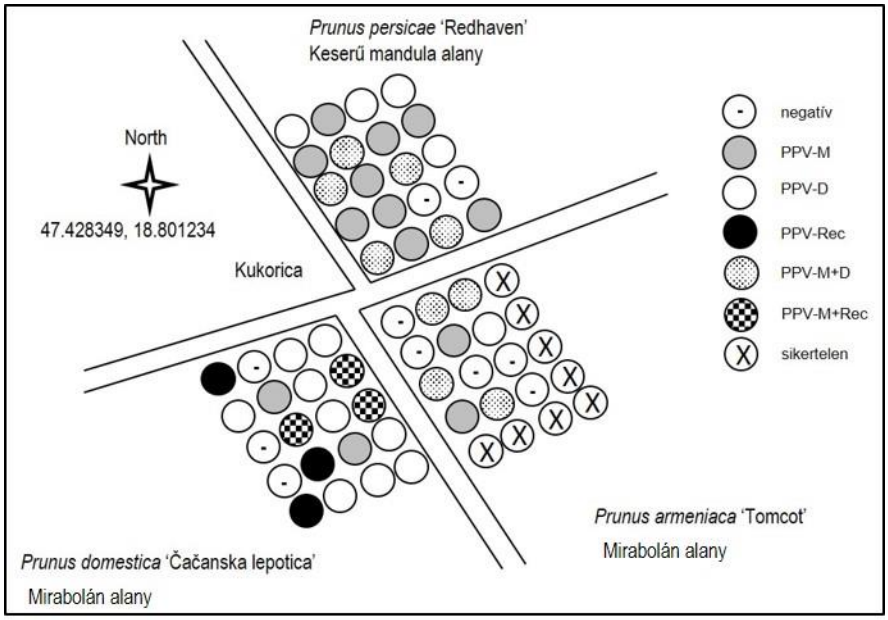
A kombinációk esetében a 'Cadaman' x 'Michelini', 'GF677' x 'Cresthaven', 'GF677' x 'Michelini' kombinációk alacsonyabb mértékben fertőződtek meg, a többi kombinációhoz viszonyítva. E három kombinációnál statisztikailag nagyobb ellenállóképesség látható, de az eredmények statisztikai értelemben nem

szignifikánsak. A ’Cadaman’ x ’Cresthaven’ kombinációk ezzel ellentétben nagyobb arányban fertőződtek meg a többi kombinációhoz képest, így a ’Cadaman’ x ’Cresthaven’ kombinációnál nagyobb esély van a fertőzöttségre.

A vizsgálatokból megállapítható, hogy az alanyfajták esetében nem beszélhetünk rezisztenciáról, még a jobb eredményeket mutató ’GF677’ fajtánál sem. A nemesfajták közül a ’Michelini’ az irodalmi adatoknak megfelelően teljesített. Kombinációk esetében a ’GF677’ x ’Cresthaven’ kimagasló eredményt produkált, amely további kísérletekre és vizsgálatokra ajánlható. A ’Cadaman’ x ’Cresthaven’ viszont nagymértékű fertőződési érzékenységet mutatott. A ’Michelini’ fajtát tartalmazó kombinációk összességében is az irodalmi adatoknak megfelelően teljesítettek.

5.5. Gazdanövény preferencia vizsgálatának eredményei

A TRNS kivonás mind a 20 szilva és 20 őszibarack minta esetén sikeres volt, de a kajszi mintáknál nehézségek merültek fel, ami miatt csak 12 mintánál van eredményünk. A minták sorszáma, melyekből nem sikerült a TRNS kivonás a 7. ábra alapján: 4/1, 4/2, 4/3, 4/4, 4/5, 3/5, 2/5, 1/5. A 25. ábrán ezeket „X”-szel jelöltük.



25. ábra: Vizsgált mintákra kapott eredmények

A sikeresen kivont 52 mintából összesen 42 pozitív és 10 negatív mintát kaptunk, azaz a vizsgált fák 80%-a PPV fertőzött volt (25. ábra). A pozitív minták aránya szilvánál 17/20 (85%), őszibaracknál 18/20 (90%), kajszinál pedig 7/12 (58%).

Összesen 25 mintánál állapítottunk meg M, 23 mintánál D, és csak 6 alkalommal Rec fertőzést törzsspecifikus primerekkel végzett RT-PCR alapján. A 17. táblázatban ábrázoltuk a pozitív mintákból azonosított PPV törzsek gazdanövények szerinti megoszlását. Az M törzset legtöbb alkalommal (56%) őszibarackról, 24 illetve 20%-ban pedig kajsziról és szilváról mutattuk ki. A D törzset egyenlő arányban találtuk meg szilva és őszibarack mintákban (39,1%). Rekombináns törzset csak szilváról sikerült azonosítani (17. táblázat).

17. táblázat: PPV törzsek gazdanövény szerinti megoszlása

PPV törzs	Szilva	Őszibarack	Kajszi
PPV-M	20%	56%	24%
PPV-D	39,1%	39,1%	21,8%
PPV-Rec	100%	-	-

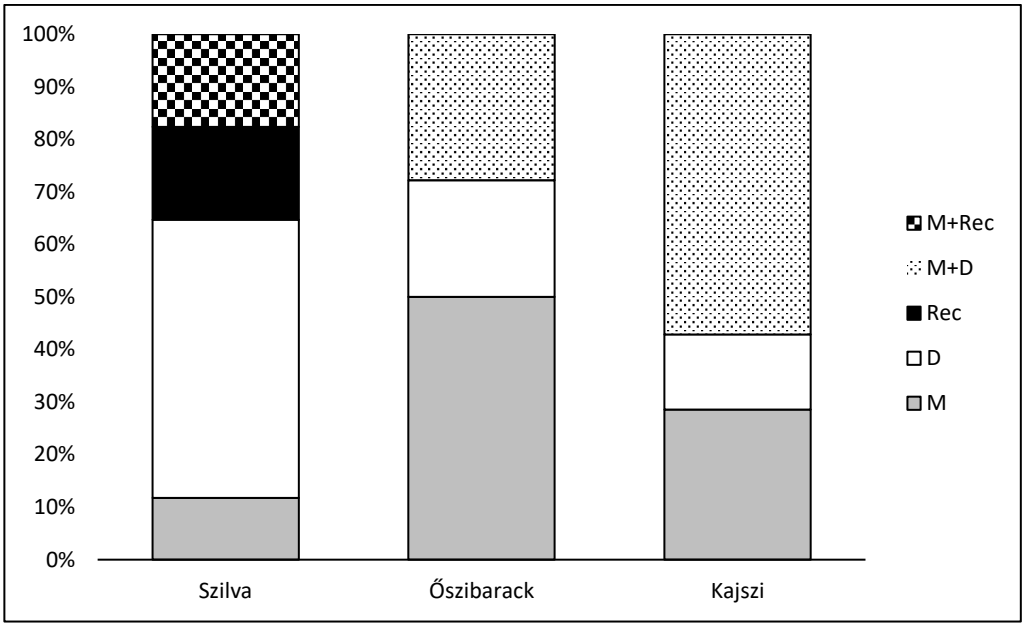
A vizsgált mintákból többször kevert fertőzést azonosítottunk, azaz egy fáról több vírustörzs jelenlétét is sikerült kimutatnunk. A 42 pozitív mintából összesen 12 esetben tapasztaltunk valamilyen kevert fertőzés (28,6%). A 18. táblázatban a minták fertőzésének komplexitását mutatjuk be. Leggyakrabban az M és D törzsek közös fertőzését sikerült kimutatni, összesen 9 alkalommal, őszibarackon és kajszin. Szilva mintákon PPV-M és PPV-Rec kevert fertőzést találtunk. Három törzses komplex fertőzést, illetve D + Rec közös fertőzést nem sikerült kimutatnunk.

18. táblázat: PPV törzsek egyedi és kevert fertőzésének gazdanövényenkénti előfordulása

Törzs	Szilva (db)	Őszibarack (db)	Kajszi (db)
M	2	9	2
D	9	4	1
Rec	3	-	-
M + D	-	5	4
M + Rec	3	-	-

A PPV törzsek egyéni és kevert fertőzéseinek gazdanövényenkénti megoszlását a 26. ábrán mutatjuk be. A vizsgált szilvamintákból azonosított izolátum típusok megoszlása: 53% D, 18% Rec, 18% kevert Rec +M fertőzés, 11% M. Őszibarack

minták esetén ugyanez: 50% M, 28% kevert M+D fertőzés, 22% D. Kajszi minták esetében: 57% kevert M+D fertőzés, 28% M, 15% D.



26. ábra: A PPV törzsek egyedi és kevert fertőzésének gazdanövények szerinti megoszlása

5.6. A gazdanövény preferencia vizsgálat eredményeiből levont következtetések

A szilva, kajszi és őszibarack ültetvényekből vett pozitív minták PCR termékeinek elemézésekor sikerült gazdanövény preferenciát megállapítanunk. A D, M és Rec törzsek előző fejezetben közölt megoszlása a három táblában lényeges eltéréseket mutat, így megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált ültetvényekben a M leginkább őszibarackon volt jelen (56%), amíg a D egyenlően magas arányban volt kimutatható szilva és őszibarack mintákból (39,1%) - igaz viszont, hogy őszibarack esetén a D fertőzések fele M törzzsel közös kevert fertőzésként jelentkezett. Rekombináns törzset csak szilván találtunk, 50%-ban M törzzsel közös kevert fertőzésben.

A 42 pozitív mintánkból legtöbbször a PPV-M törzset sikerült kimutatnunk, mely adat alátámasztja az M törzs agresszivitásával kapcsolatos megfigyeléseket (Predajňa *et al.*, 2012b). A vizsgált vírustörzsek általunk megállapított gazdanövény preferenciája nagyon hasonló eredményt mutat a SharCO (Sharka Containment) nemzetközi PPV Project eredményeivel, amelynek keretein belül több, mint 1300 pozitív mintánál vizsgáltak gazdanövény szerinti vírustörzs eloszlást. A felmérés korábbi adatai szerint (927 pozitív minta alapján) az M és a Rec törzs esetében a mi kutatásunkhoz hasonló eredményt kaptak: előbbit legnagyobb arányban őszibarackból

(59%), utóbbit pedig szinte kizárólag csak szilvamintákból azonosították (94%). A D törzs esetében a kutatás erőteljes szilvafertőzőttséget (62%) mutatott (Sihelská *et al.*, 2017). A mi felmérésünkben a D törzs a szilvával megegyező arányban fordult elő őszibarackon is. A két eredmény különbségét a sikeresen kivont kajszi minták alacsony száma, valamint a vizsgált ültetvények speciális elhelyezkedése, és az ennek köszönhető zavartalan vírustörzs terjedés is magyarázhatja.

Ha a saját minták gazdanövények szerinti megoszlását vizsgáljuk, csak részben kapunk a SharCO Projecttel megegyező eredményt. Az őszibarack esetében mindkét kísérlet során egyértelmű a M törzs kiemelkedő aránya. Szilva mintáknál a D törzs nagy aránya és a Rec törzs jelenléte is megegyezik, de az általunk vizsgált mintákban az M törzs jóval nagyobb számban volt jelen, mint a nemzetközi felmérésben. Ennek oka feltehetőleg az ültetvények egymáshoz való közelségében keresendő. Mivel a három növényfajt csak a keresztbe futó művelőutak választják el egymástól, a kis távolság miatt a sokkal agresszívebb és levéltetvekkel könnyebben terjedő M törzs nagyobb arányban jelenik meg a szilvaültetvényben. A kajszi esetében is hasonló eredményre jutottunk (az általunk vizsgált mintákban nagyobb volt az M törzs aránya, mint a nemzetközi felmérésben), de itt a kis távolság mellett a sikeresen kivont kajszi minták alacsony száma is közrejátszhatott (Sihelská *et al.*, 2017).

Az őszibarack esetében a kapott eredményeinket egy szintén Magyarországon végzett kutatás eredményeivel is össze tudtuk hasonlítani. A fertőzések megoszlása mindkét esetben szinte teljesen megegyezik; közel 50%-os M fertőzést (korábbi felmérés: 42%, saját felmérés: 50%), kb. 25%-os D fertőzést (korábbi felmérés: 27%, saját felmérés: 22%), és kb. 30%-os M és D kevert fertőzést (korábbi felmérés: 31%, saját felmérés: 28%) tapasztaltunk (Ádám *et al.*, 2015a).

A szilvamintáink eredményét a CO-SHARKA Európai Uniós pályázat keretein belül végzett magyarországi PPV felmérés eredményeivel vetettük össze. Az ország 7 megyéjéből származó minták alapján a szilvaültetvényekben nagyarányú Rec törzs fertőzöttséget állapítottak meg (59%), és szinte elenyésző számban találtak csak M törzzsel fertőzött szilvát (Ádám *et al.*, 2015b). A mi megfigyelésünk ezzel szemben az, hogy az M törzs majdnem olyan arányban jelent meg szilván, mint a Rekombináns, ráadásul többször kevert M+Rec fertőzésként. A nagyobb arányú M fertőzést szilván az őszibarack ültetvények közelségének tulajdonítjuk.

A saját és az előbb ismertetett kutatások eredményeiből érdemes a mindennapi, gyakorlati növényvédelem számára következtetéseket levonni. Az eredményeink

alapján megállapítható, hogy egymáshoz közel elhelyezkedő csonthéjas ültetvényekben a PPV könnyebb, akadálytalan terjedésével a vírustörzsek nagyobb mértékben keverednek. A táblák közelsége miatt az egyes vírustörzsek a levéltetvek által könnyebben megtalálják maguknak a számukra megfelelőbb gazdanövényt, sőt, a kevert fertőzések aránya is megnövekedhet, ami még tovább súlyosbíthatja a megjelenő tüneteket, tovább rontva ezzel a növény kondícióját. Javaslatunk a PPV-re fogékony csonthéjas gyümölcsfajok esetében az izolációs távolság betartása a vírustörzsek szabad terjedésének megakadályozására.

A vírustörzsek gazdanövény preferenciáját ismerve lehetőség nyílik a célzott törzsek elleni rezisztencianemesítésre is. A fajták törzsspecifikus rezisztenciájának vizsgálatakor azonban több nehézség is felmerülhet. A vírustörzsek diverzifikációjának köszönhetően egy rezisztensnek nevezett fajta akár az egy vírustörzshöz tartozó, de különböző izolátumokra eltérő eredményeket adhat. Ilyen esetet figyeltek meg a ’Goldrich’ kajszifajtánál, amely különböző PPV-M, illetve PPV-D izolátumokra egyaránt mutatott rezisztens, toleráns és fogékony tulajdonságokat (Karayiannis és Mainou, 1994; Karayiannis *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 1998; Martínez-Gómez *et al.*, 2000b).

A PPV vírustörzsek gazdanövény preferenciájának okairól ma még nagyon keveset tudunk. A pontos mechanizmus megértéséhez, és a tapasztalatok gyakorlatban való hasznosításához a gazdanövény preferencia molekuláris hátterének vizsgálatára lenne szükség.

5.7. Az FTA technológia vizsgálatának eredményei és következtetések

Az FTA Card vizsgálata során kimutattuk a PPV jelenlétét a számunkra küldött virág mintákból, melyeket 2013 és 2014 folyamán gyűjtöttek különböző szilva mintákról. 32 mintából M és Rec izolátumokat mutattunk ki Nested PCR technikával, bár az első NIb-CP régióban végzett PCR vizsgálat után 3 mintában nem tudtunk kimutatni fertőzést. Hat esetben M + Rec kevert fertőzést detektáltunk, egy esetben rekombináns törzs egyedi fertőzését mutattuk ki, míg 25 esetben PPV-M törzs fertőzte a mintákat. A vizsgálat hatékonynak bizonyult a fertőzések kimutatására annak ellenére, hogy 3 esetben a nested PCR első lépése során negatív eredményt kaptunk. A két mintavétel között eltelt 5 hónap különbség ellenére (1. mintavétel 2013

november, 2. mintavétel 2014 március) a 3 negatív minta a márciusi gyűjtésből származott. Az RT-PCR vizsgálatokat 2014 májusában végeztük. Az RNS degradációja ebben a vizsgálatban nem volt számottevő, a legidősebb FTA Card 7 hónap szobahőmérsékleten való tárolás után került felhasználásra, és az eredmények kielégítőek voltak. A levélminták vizsgálata során a minták leromlása sokkal erősebb volt, 32 mintából csak 7 esetében sikerült vírust detektálnunk, így ebből arra következtethetünk, hogy a növényi szövetek között is van különbség az RNS degradációjának tekintetében (Ádám *et al.*, 2015c). Ez az eredmény összecseng azzal a megállapítással, hogy nem mindegy milyen sejt tartalmazza a vizsgálni kívánt nukleinsavat az FTA membránon (Natarajan *et al.*, 2000).

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Hazai kertekben és ültetvényekben felmértem a PPV elterjedését. 20 minta esetében a molekuláris vizsgálatok alapján meghatároztam az izolátumok filogenetikai helyét és törzsekbe soroltam azokat.

2. Négy alany és három őszibarack nemes kombináció PPV fogékonyságát vizsgálva megerősítettem, hogy a vizsgált alanyfajtáknak nincs szignifikáns hatása a PPV fertőzésre. Továbbá bizonyítottam, hogy a 'Michelini' fajta szignifikánsan kevésbé fogékony a többi vizsgált nemes fajtához képest.

3. Szilván, kajszin és őszibarackon megállapítottam a PPV törzsek gazdanövény preferenciáját, az M törzs őszibarackon, a D és Rec törzs szilván a leggyakoribb.

4. A P3-CI genomi régióban alkalmazott RFLP vizsgálatot tovább fejlesztettem az *Eco*RV restrikciós endonukleáz alkalmazásával. Az *Eco*RV hasítóhelye a GAT|ATC nukleotidok között található, és a P3-CI genomi régióban így már egyértelműen elkülöníthetők a rekombináns izolátumok.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A sharka betegséget okozó PPV a legsúlyosabb veszteségeket okozó növényi vírusok közé tartozik. Számos gazdasági szempontból jelentős csonthéjas gyümölcsfajt képes megbetegíteni (szilva, kajszi, őszibarack, cseresznye, meggy). A vírusfertőzés gazdasági szempontból a gyümölcskártétellel okozza a legnagyobb problémát. Veszélyességét fokozza, hogy a szaporítóanyag-kereskedelemnek köszönhetően mára világszerte elterjedtté vált, minden fontosabb csonthéjas gyümölcsfajt termesztő országban kimutathatóan jelen van. A PPV nagyfokú genetikai variabilitással rendelkezik, jelenleg 9 törzsét különböztetjük meg, melyek közül hazánkban a három legfontosabb, a D (Dideron) törzs, az M (Marcus) törzs és a Rec (Rekombináns) törzs fordul elő. A vírus termésmennyiség-csökkenést idéz elő, valamint megváltoznak a fertőzött gyümölcsök beltartalmi értékei. Az EPPO nemzetközi szervezet a kórokozót az A2 karantén kategóriába sorolja 1975 óta. A PPV elleni védekezés kiemelkedő fontosságú módja a rezisztencianemesítés.

Munkám során felmérést készítettünk a vírus jelenlétének kimutatására hazánk északi megyéiben, vizsgáltam gyakorlatban használt alany-nemes kombinációk hatását a vírusfertőzés mértékére, felmértem a legsúlyosabban károsított csonthéjasokon (szilva, kajszi, őszibarack) a vírus törzseinek gazdanövény preferenciáját, a három törzs elkülönítésére szolgáló RFLP módszert tökéletesítettem, valamint teszteltünk egy új módot a PPV izolátumok gyűjtésére, tárolására és kimutatására. Eredményeim az alábbiakban foglalhatók össze:

Az északi megyékben végzett felmérés során 105, a PPV fertőzés jellegzetes tüneteit mutató és tünetmentes levélmintát gyűjtöttünk. Az RT-PCR vizsgálat során alkalmazott PCI és PP3 primerek – a genom 3’P3–6K_1–5’CI régiójának megfelelő – 836 bp hosszú PCR-terméket emeltek ki, mely alapján 42 minta bizonyult PPV-vel fertőzöttnek. Ezeket a mintákat RFLP módszerrel, valamint szekvencia analízis segítségével törzsekbe soroltuk. Az általunk gyűjtött és nukleotid szinten is elemzett 23 izolátum közül 12 a D, 10 a Rec és 1 az M törzsbe tartozónak bizonyult. Így eredményeink alapján megállapítható, hogy Magyarország északi megyéiben a két legelterjedtebb törzs a D és Rec, de az M törzs is jelen van. A törzsek megoszlását megyénként tekintve, a D törzs főként Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében és Komárom-Esztergom megyében elterjedt, a Rec törzs pedig Pest, Nógrád és Borsod-Abaúj-Zemplén megyékben a leggyakoribb. Az M törzs képviselőjét is Borsod-Abaúj-Zemplén megyéből gyűjtöttük.

Az alany-nemes kombinációk vizsgálata során 91 tünetmentes, illetve PPV jellegzetes tüneteit mutató őszibarackfáról származó mintát gyűjtöttünk Sóskúton. Vizsgálataink során a 91 mintából 45-ben sikerült kimutatni a *PPV* jelenlétét. Az ültetvényből származó őszibarack alany, és nemes minták vizsgálata során bebizonyosodott, hogy a 45 vizsgált pozitív minta közül 19 az M és 12 a D törzzsel fertőződött meg. Tizennégy esetben M+D kevert fertőzést is diagnosztizáltunk. Az eredményeken elvégzett statisztikai analízisek során arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgált alanyoknak nem volt hatása a vírussal való fertőződésre. A nemes fajták vizsgálata során megállapítottuk, hogy a kísérletben szereplő nemesfajták közül a ’Michelini’ fajta jóval alacsonyabb mértékben fertőződött meg, a többi nemesfajtához viszonyítva, a különbség szignifikáns volt. A kombinációk vizsgálata során Khi-négyzet próbával a ’Cadaman’ x ’Michelini’, ’GF677’ x ’Cresthaven’, ’GF677’ x ’Michelini’ kombinációk alacsonyabb mértékben fertőződtek meg a többi kombinációhoz viszonyítva. A ’Cadaman’ x ’Cresthaven’ kombinációk ezzel ellentétben nagyobb arányban fertőződtek meg a többi kombinációhoz viszonyítva. Logisztikus regressziós modellben a Mandula x ’Michelini’ kombinációt vettük referenciaként az irodalmi adatok alapján a mandula magonc PPV-vel szembeni fogékonyságából és a ’Michelini’ toleranciájából kifolyóan. A ’GF667’ x ’Cresthaven’, ’GF677’ x ’Michelini’, ’Cadaman’ x ’Michelini’ kombinációknál az esélyhányados kisebb ugyan 1-nél (különösen a ’GF667’ x ’Cresthaven’ esetében), ami magasabb ellenállóképességre utal, de az eredmények statisztikai értelemben nem szignifikánsak. A ’Cadaman’ x ’Cresthaven’ kombinációnál az esélyhányados szignifikánsan nagyobb 1-nél, (Exp(B)=13,000; p=0,013), vagyis ezen kombinációnál szignifikánsan nagyobb esély van a fertőzöttségre a referenciához képest.

A gazdanövény preferencia vizsgálatában a vizsgált szilvamintákból azonosított PPV izolátum típusok megoszlása: 53% D, 18% Rec, 18% kevert Rec+M fertőzés, 11% M. Őszibarack minták esetén ugyanez: 50% M, 28% kevert M+D fertőzés, 22% D. Kajsziminták esetén 57% kevert M+D fertőzés, 28% M, 15% D. A szilva, kajszi és őszibarack ültetvényekből származó minták elemzésénél sikerült gazdanövény preferenciát megállapítanunk. A D, M és Rec törzsek fajonkénti eloszlása a három táblában lényeges eltéréseket mutatott, így megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált ültetvényekben az M törzs leginkább őszibarackon volt jelen (56%), amíg a D egyenlően magas arányban volt kimutatható szilva és őszibarack mintákból (39.1%) - igaz viszont, hogy őszibarackban a D fertőzések fele M törzzsel közös kevert

fertőzésként jelentkezett. Rekombináns törzset csak szilván találtunk, 50%-ban M törzzsel közös kevert fertőzésként.

A PPV diagnosztikai módszereinek tökéletesítését és tesztelését célzó vizsgálatok eredményeként megállapíthatjuk, hogy a genom 3'P3–6K1–5'CI régiójának *Eco*RV restrikciós endonukleázzal végzett RFLP vizsgálata hatékonyan kimutatja a Rekombináns törzset, valamint az Whatman FTA Card alkalmas a PPV izolátumok gyűjtésére, szobahőmérsékleten való tárolására és RT-PCR módszerrel való kimutatására.

8. SUMMARY

Sharka disease caused by PPV is one of the most devastating viral diseases. It affects many economically important stone fruit species (plum, apricot, peach, cherry and sour cherry). In economic terms the fruit symptoms cause the greatest problems. The risk of the virus is aggravated since it has become widespread throughout the world and is present in all stone fruit producing countries as a result of international propagation material trade. PPV has great genetic variability, 9 strains have been differentiated to date, and the three major strains D (Dideron), M (Marcus) and Rec (Recombinant) are present in Hungary. The infection causes yield loss and negative changes in nutritional content. PPV has been classified as an A2 quarantine pathogen since 1975 by EPPO. One of the most important prevention and defense methods against the virus is the breeding of resistant cultivars.

During my work a survey was conducted in the northern counties of Hungary measuring the presence of the virus, I studied rootstock scion combinations' effect on the infection rate. Also, the host preference of the strains was investigated on the three most threatened stone fruit species (plum, apricot and peach), the RFLP method was simplified to separate the three strains and we tested a new method for sample collection, preservation and virus diagnostics. My results can be summarized as follows:

During the survey conducted in the northern counties 105 showing symptoms of PPV infection and symptomless samples were collected. The targeted genomic region by the PP3 and PCI primers – 3'P3–6K_1–5'CI – resulted in an 836 bp long PCR product. Based on the results 42 samples were positive for PPV. Some of these positive samples were categorized into strains by RFLP method and sequence analysis. From 23 samples 12 were found to be D, 10 were Rec and only 1 was M. According to our results D and Rec strains are the most widespread in the northern counties, but M is present as well. D is dominant in Szabolcs-Szatmár-Bereg and in Komárom-Esztergom counties, Rec is dominant in Pest, Nógrád and Borsod-Abaúj-Zemplén counties. The single M isolate also originated from Borsod-Abaúj-Zemplén county.

In our study conducted on rootstock-scion combinations 91 symptomless and visually infected leaf samples were collected from one orchard located in Sóskút. From 91 samples we were able to detect the PPV in 45 samples. From the 45 positive samples originated from rootstocks and scions 19 were infected by M and 12 were infected by

D strains. In 14 cases M+D mixed infections were also detected. Based on the statistical analysis conducted on the results the rootstocks had no effect on the severity of the infection. During the study of scions we found that the cv. 'Michelini' showed significantly lower chance of infection compared to other scion cultivars.

In case of the 'Cadaman' x 'Michelini', 'GF677' x 'Cresthaven', and 'GF677' x 'Michelini' combinations the infection rate was lower than in other cases based on the chi-square test. In contrast the 'Cadaman' x 'Cresthaven' combination was significantly more susceptible to the virus. In the logistic regression model, the reference combination used was the almond seedlings x 'Michelini' based on former studies, because of the susceptibility of the almond seedlings and the tolerance of cv. 'Michelini'. In case of 'GF667' x 'Cresthaven', 'GF677' x 'Michelini' and 'Cadaman' x 'Michelini' combinations the odds ratio (OR) was lower than 1 which shows higher tolerance, but the results are not statistically significant. In case of 'Cadaman' x 'Cresthaven' the OR is higher than one (Exp(B)=13,000; p=0,013), hence the chance of infection is significantly higher compared to the reference.

In the host preference study the results in plum samples are the following: 53% D, 18% Rec, 18% mixed Rec+M and 11% M infection. In peach samples: 50% M, 28% mixed M+D and 22% D infection. In apricot samples 57% mixed M+D, 28% M and 15% D infection was detected. During the analysis of the results host preference was detected. The number of D, M or Rec isolates in the three species shows significant differences. We can conclude that M were mostly present in peach (56%) meanwhile D were equally detected in plum and apricot samples – however in peach half of the D infection was in mixed infection with the M strain. Recombinant isolates were only detected in plum samples, and half of these infections were in mixed infection with the M strain.

Based on the results of the experiments aiming at improvement of the PPV diagnostic methods it can be concluded that the RFLP in the 3'P3–6K_1–5'CI genomic region with the *Eco*RV restriction endonuclease effectively detects the recombinant strain, and the Whatman FTA Card is suitable for collecting PPV samples, storing them at room temperature and it is applicable to former RT-PCR analysis.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. ÁDÁM, J., BORSOS, Á., BALLA, I., ITTZÉS, A. és PALKOVICS, L. 2015a. PPV susceptibility of commonly used peach rootstock-scion combinations. *Acta virologica*, 59, 429–433.
2. ÁDÁM, J., PALKOVICS, L., TÓBIÁS, I. és ALMÁSI, A. 2015b. Presence of Sharka disease in the North-Hungarian counties. *Acta horticulturae*, 55–60.
3. ÁDÁM, J., STEFANOVA, B., DRAGOYSKI, K., TÓBIÁS, I. és PALKOVICS, L. 2015c. Use of FTA®(Whatman) membrane for collection and detection of Bulgarian PPV isolates. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 18, 334-343.
4. AL-RWAHNIH, M., MYRTA, A., TERLIZZI, B. D. és BOSCIA, D. 2000. First record of *Plum pox virus* in Jordan. *Journal of Plant Pathology*, 82.
5. ATANASSOV, D. 1932. Plum pox. A new virus disease. *Annals of the University of Sofía Faculty of Agriculture and Silviculture*, 11, 49-69.
6. AVINENT, L., DE MENDOZA, A. H. és LLÁCER, G. 1994. Transmission of *plum pox potyvirus* in Spain 1. *EPPO Bulletin*, 24, 669-674.
7. BADENES, M. és LLÁCER, G. 2006. Breeding for resistance: breeding for *Plum pox virus* resistant apricots (*Prunus armeniaca* L.) in Spain. *EPPO Bulletin*, 36, 323-326.
8. BIANCO, P., ALIVERTI, I., CASATI, P., BELLI, G., COMES, S., FANIGLIULO, A. és CRESCENZI, A. 2004. Detection and characterization of *Plum pox virus* isolates in Lombardia and Veneto Regions (Italy). *Acta horticulturae*, 657, 165-169.
9. BLATTNY, C. és HEGER, M. 1965. Some remarks to the economical importance of sharka disease in Czechoslovakia. *Zaštita Bilja*, 16, 417.
10. BLYSTAD, D. és MUNTHE, T. 2006. *Plum pox virus* (PPV) in Norway. *EPPO Bulletin*, 36, 212.
11. BOSCIA, D., ZERAMDINI, H., CAMBRA, M., POTERE, O., GORRIS, M., MYRTA, A., DI TERLIZZI, B. és SAVINO, V. 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of *plum pox potyvirus*. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 477-480.

12. BOULILA, M., BRIARD, P. és RAVELONANDRO, M. 2004. *Plum pox virus* in Tunisia: sources and preliminary characteristics. *Acta horticulturae*, 657, 189-193.

13. BRÓZIK, S. és KÁLLAY, T. 2000. Csonthéjas gyümölcsfajták. (Stonefruit cultivars) Mezőgazda Kiadó, Budapest.

14. BRÓZIK, S., KÁLLAY, T. és APOSTOL, J. 2003. Mandula, Budapest, Mezőgazda Kiadó

15. CAMBRA, M., ASENSIO, M., GORRIS, M., PÉREZ, E., CAMARASA, E., GARCIA, J., MOYA, J., LÓPEZ–ABELLA, D., VELA, C. és SANZ, A. 1994. Detection of *plum pox potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non–structural proteins. *Eppo Bulletin*, 24, 569-577.

16. CAMBRA, M., CAPOTE, N., MYRTA, A. és LLÁCER, G. 2006. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bulletin*, 36, 202-204.

17. CANDRESSE, T. és CAMBRA, M. 2006. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *EPPO Bulletin*, 36, 239-246.

18. CAPOTE, N., CAMBRA, M., BOTELLA, P., GORRIS, M., MARTÍNEZ, M., LÓPEZ-QUÍLEZ, A. és CAMBRA, M. 2010. Detection, characterization, epidemiology and eradication of *Plum pox virus* Marcus type in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 619-628.

19. CERVERA, M. T., RIECHMANN, J. L., MARTIN, M. T. és GARCIA, J. A. 1993. 3'-terminal sequence of the *plum pox virus* PS and o6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *Journal of General Virology*, 74, 329-334.

20. CHEN, J. és ADAMS, M. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of virology*, 146, 757-766.

21. CHIRKOV, S., IVANOV, P. és SHEVELEVA, A. 2013. Detection and partial molecular characterization of atypical *plum pox virus* isolates from naturally infected sour cherry. *Archives of virology*, 158, 1383-1387.

22. CHRISTOFF, A. 1947. Sharka disease of plum. *Bulletin de la Chambre de culture Nationale de Sofia, Série Biologique*, 1, 261-296.

23. CHRISTOFF, A. 1958. Die Odstvirosen in Bulgarien. *Phytopathology*, 31, 381-436.

24. CHUNG, B. Y., MILLER, W. A., ATKINS, J. F. és FIRTH, A. E. 2008. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 105, 5897-5902.

25. CRESCENZI, A., D'AQUINO, L., COMES, S., NUZZACI, M., PIAZZOLLA, P., BOSCIA, D. és HADIDI, A. 1997. Characterization of the sweet cherry isolate of *plum pox potyvirus*. *Plant Disease*, 81, 711-714.

26. CRESCENZI, A., NUZZACI, M., PIAZZOLLA, P., LEVY, L. és HADIDI, A. 1994. *Plum pox virus* (PPV) in sweet cherry. XVI International Symposium on Fruit Tree Virus diseases 386, 219-225.

27. CROFT, H., MALINOWSKI, T., KRIZBAI, L., MIKEC, I., KAJIC, V., REED, C., VARGA, A. és JAMES, D. 2008. Use of Luminex xMAP-derived Bio-Plex bead-based suspension array for specific detection of PPV W and characterization of epitopes on the coat protein of the virus. *Journal of virological methods*, 153, 203-213.

28. DAL ZOTTO, A., ORTEGO, J., RAIGÓN, J. M., CALOGGERO, S., ROSSINI, M. és DUCASSE, D. A. 2006. First report in Argentina of *Plum pox virus* causing sharka disease in Prunus. *Plant Disease*, 90, 523-523.

29. DALLOT, S., GOTTWALD, T., LABONNE, G. és QUIOT, J. B. 2004. Factors affecting the spread of *Plum pox virus* strain M in peach orchards subjected to roguing in France. *Phytopathology*, 94, 1390-1398.

30. DALLOT, S., LABONNE, G., BOEGLIN, M., QUIOT-DOUINE, L., QUIOT, J. és CANDRESSE, T. 1997. Peculiar *plum pox potyvirus* D-populations are epidemic in peach trees. XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops 472, 355-366.

31. DULIC–MARKOVIC, I. és JEVREMOVIC, D. 2006. *Plum pox virus* (PPV) in Serbia. *EPPO Bulletin*, 36, 213-214.

32. DUNEZ, J. 1986. Preliminary observations on virus and virus-like diseases of stone-fruit trees in the Mediterranean and Near East countries. *FAO Plant Protection Bulletin*, 34, 43-48.

33. EDWARDSON, J., CHRISTIE, R. és KO, N. 1984. *Potyvirus* cylindrical inclusions-- Subdivision-IV. *Phytopathology*, 74, 1111-1114.

34. FANIGLIULO, A., COMES, S., MAISS, E., PIAZZOLLA, P. és CRESCENZI, A. 2003. The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. *Archives of virology*, 148, 2137-2153.

35. FOS, A. és MASSONIÉ, G. 1993. Transmission expérimentale du virus de la sharka par Brachycaudus persicae Passerini. *Agronomie*, 13, 515-518.

36. FUCHS, E., GRUNTZIG, M. és KEGLER, H. 1998. Investigation on the *plum pox virus* resistance in different apricot genotypes. *Acta Virologica*, 42, 222-225.

37. FUJITA, Y. és KUBO, S.-I. 2006. Application of FTA® technology to extraction of sperm DNA from mixed body fluids containing semen. *Legal medicine*, 8, 43-47.

38. GARCÍA, J. A. és CAMBRA, M. 2007. *Plum pox virus* and sharka disease. *Plant Viruses*, 1, 69-79.

39. GÁBORJÁNYI, R., HORVÁTH, J. és WOLF, I. 1999. Növényvírusok és növényvirológiai vizsgálati módszerek, Budapest, Mezőgazda Kiadó.

40. GILDOW, F., DAMSTEEGT, V., STONE, A., SCHNEIDER, W., LUSTER, D. és LEVY, L. 2004. Plum pox in north america: identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. *Phytopathology*, 94, 868-874.

41. GLASA, M. 2006. *Plum pox virus* (PPV) in Slovakia. *EPPO Bulletin*, 36, 214.

42. GLASA, M. és CANDRESSE, T. 2005. Partial sequence analysis of an atypical Turkish isolate provides further information on the evolutionary history of *Plum pox virus* (PPV). *Virus research*, 108, 199-206.

43. GLASA, M., KÚDELA, O., MARIE-JEANNE, V. és QUIOT, J. 2001. Evidence of a naturally occurring recombinant isolate of *Plum pox virus* from Slovakia. *Plant Disease*, 85, 920.

44. GLASA, M., MALINOWSKI, T., PREDAJNA, L., PUPOLA, N., DEKENA, D., MICHALCZUK, L. és CANDRESSE, T. 2011. Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the W strain of *Plum pox virus*. *Phytopathology*, 101, 980-985.

45. GLASA, M., MARIE-JEANNE, V., LABONNE, G., ŠUBR, Z., KÚDELA, O. és QUIOT, J.-B. 2002a. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 843-853.

46. GLASA, M., MARIE-JEANNE, V., MOURY, B., KÚDELA, O. és QUIOT, J.-B. 2002b. Molecular variability of the P3-6K 1 genomic region among geographically and biologically distinct isolates of *Plum pox virus*. *Archives of virology*, 147, 563-575.

47. GLASA, M., PALKOVICS, L., KOMÍNEK, P., LABONNE, G., PITTNEROVÁ, S., KUDELA, O., CANDRESSE, T. és ŠUBR, Z. 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, 85, 2671-2681.

48. GLASA, M., PRIKHODKO, Y., PREDAJŇA, L., NAGYOVA, A., SHNEYDER, Y., ZHIVAEVA, T., ŠUBR, Z., CAMBRA, M. és CANDRESSE, T. 2013. Characterization of sour cherry isolates of *plum pox virus* from the Volga Basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103, 972-979.

49. GLASA, M., PRICHODKO, Y., ZHIVAEVA, T., SHNEIDER, Y., PREDAJŇA, L., ŠUBR, Z. és CANDRESSE, T. 2012. Complete and partial genome sequences of the unusual *Plum pox virus* (PPV) isolates from sour cherry in Russia suggest their classification to a new PPV strain. 22nd International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops (ICVF), Rome, June, 3-8.

50. GLASA, M., SVANELLA, L. és CANDRESSE, T. 2006. The complete nucleotide sequence of the *Plum pox virus* El Amar isolate. *Archives of Virology*, 151, 1679-1682.

51. GOTTWALD, T. 2006. Epidemiology of sharka disease in North America. *EPPO Bulletin*, 36, 279-286.

52. GOTTWALD, T., AVINENT, L., LLÁCER, G., DE MENDOZA, A. H. és CAMBRA, M. 1995. Analysis of the spatial spread of sharka (*plum pox virus*) in apricot and peach orchards in eastern Spain. *Plant Disease*, 79, 266-278.

53. GOTTWALD, T. R., WIERENGA, E., LUO, W. és PARNELL, S. 2013. Epidemiology of Plum pox 'D'strain in Canada and the USA. *Canadian journal of plant pathology*, 35, 442-457.

54. GRUND, E., DARISSA, O. és ADAM, G. 2010. Application of FTA® Cards to Sample Microbial Plant Pathogens for PCR and RT-PCR. *Journal of Phytopathology*, 158, 750-757.

55. GUSTAVSSON, I., LINDELL, M., WILANDER, E., STRAND, A. és GYLLENSTEN, U. 2009. Use of FTA card for dry collection, transportation and storage of cervical cell specimen to detect high-risk HPV. *Journal of Clinical Virology*, 46, 112-116.

56. GYÖRGY, B. 1976. Biochemical changes of plums caused by *plum pox virus*. X International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases 67, 77-82.

57. GYURÓ, F. és DÁVID, M. 1990. Gyümölcstermesztés, Mezőgazdasági Kiadó

58. HADIDI, A. 1998. Fruit tree diseases: 17th International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops, Bethesda, MD, USA, 23-27 June, 1997, Leuven, Belgium, International Society of Horticultural Science.

59. HAMDORF, G. 1985. The susceptibility of some plum cultivars to *plum pox virus*. XIII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases 193, 223-228.

60. HAMMOND, J., PÜHRINGER, H., DA CÂMARA MACHADO, A. és LAIMER DA CÂMARA MACHADO, M. 1997. A broad-spectrum PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of *plum pox virus* isolates. XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops 472, 483-490.

61. HARI, V. 1981. The RNA of *Tobacco etch virus*: Further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology*, 112, 391-399.

62. HARNOS, Z. és LADÁNYI, M. 2005. Biometria agrártudományi alkalmazásokkal. Aula Kiadó, Budapest. 274-324.

63. HARTMANN, W. 1998. Breeding of plums and prunes resistant to *plum pox virus*. *Acta Virologica*, 42, 230-232.

64. HARTMANN, W. és NEUMÜLLER, M. 2006. Breeding for resistance: breeding for *Plum pox virus* resistant plums (*Prunus domestica* L.) in Germany. *EPPO Bulletin*, 36, 332-336.

65. HORVÁTH, J. 1972. Növényvírusok, vektorok, vírusátvitel, Budapest, Akadémiai Kiadó.

66. HROTKÓ, K. 1995. Gyümölcsfaiskola, Mezögazda Kiadó.

67. HUSZ, B. és KLEMENT, Z. 1951. A csonthéjas gyümölcsfák víruszos mozaikbetegsége, Alföldi Nyomda.

68. ISAC, M., PREDA, S. és MARCU, M. 1998. Aphid species--vectors of *plum pox virus*. *Acta Virologica*, 42, 233-234.

69. JAMES, D. és GLASA, M. 2006. Causal agent of sharka disease: new and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization. *EPPO Bulletin*, 36, 247-250.

70. JAMES, D. és VARGA, A. 2005. Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain. *Virus Research*, 110, 143-150.

71. JAMES, D., VARGA, A. és SANDERSON, D. 2013. Genetic diversity of *Plum pox virus*: strains, disease and related challenges for control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35, 431-441.

72. JAMES, D., VARGA, A., THOMPSON, D. és HAYES, S. 2003. Detection of a new and unusual isolate of *Plum pox virus* in plum (*Prunus domestica*). *Plant Disease*, 87, 1119-1124.

73. JENSER, G. 1989. A szilvahimlő vírus epimológiájáról. *Növényvédelem*, 6, 241-246.

74. JORDOVIĆ, M. 1963. Investigation of the spead and some factors of spreading *Plum pox virus* disease. *Phytopathologia mediterranea*, 167-170.

75. JORDOVIĆ, M. 1968. Recent advances on studies of Sarka virus disease. Symposium of Working Group on Plum Genetics and Plum Breeding 10, 487-501.

76. JORDOVIĆ, M. 1975. Study of sharka spread pattern in some plum orchards. *Acta horticulturae*, 44, 147-154

77. JORDOVIĆ, M. és JANDA, L. 1963. Morphological, anatomical and chemical changes on the fruits of some plum varieties infected by virus plum pox disease. *Zaštita bilja*, 14, 653-670.

78. KAJIC, V., CERNI, S., KRAJACIC, M., MIKEC, I. és ŠKORIC, D. 2008. Molecular typing of *Plum pox virus* isolates in Croatia. *Journal of Plant Pathology*, S9-S13.

79. KALASHYAN, Y. A., BILKEY, N., VERDEREVSKAYA, T. és RUBINA, E. 1994. *Plum pox potyvirus* on sour cherry in Moldova. *EPPO bulletin*, 24, 645-649.

80. KARAYIANNIS, I., DI TERLIZZI, B. és AUDERGON, J. 1997. Susceptibility of apricot cultivars to *plum pox virus*. XI International Symposium on Apricot Culture, 488, 753-760.

81. KARAYIANNIS, I. és MAINOU, A. 1994. Resistance to *plum pox potyvirus* in apricots. *EPPO Bulletin*, 24, 761-765.

82. KEGLER, H., FUCHS, E., GRÜNTZIG, M. és SCHWARZ, S. 1998. Some results of 50 years of research on the resistance to *plum pox virus*. *Acta virologica*, 42, 200-215.

83. KERLAN, C. és DUNEZ, J. 1979. Différenciation biologique et sérologique de souches du virus de la sharka. *Annales de Phytopathologie*, 241-250.

84. KING, A. M., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J. és CARSTENS, E. B. 2011. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier.

85. KOLLEROVÁ, E., NOVÁKOVÁ, S., ŠUBR, Z. és GLASA, M. 2006. *Plum pox virus* mixed infection detected on apricot in Pakistan. *Plant Disease*, 90, 1108.

86. KONDRATENKO, P. és UDOVYCHENKO, V. 2006. *Plum pox virus* (PPV) in Ukraine. *EPPO Bulletin*, 36, 217.

87. KÖLBER, M., NÉMETH, M., CHERNETS, A., KALASHIAN, Y., DULIC–MARKOVIC, I., GLASA, M., ISAC, M., KRISKA, B., MALINOWSKI, T. és ZAWADZKA, B. 2001. Current situation of plum pox disease on stone fruit species in middle and eastern europe. Proceedings of the 18th international symposium on virus & virus–like diseases of temperate fruit crops–top fruit diseases, 1, 73-78.

88. KÖLBER, M., NÉMETH, M., TŐKÉS, G., KRIZBAI, L., SZŐNYEGI, S., EMBER, I., BERECZKY, Z., POCSAI, E., HANGYÁL, R. és VOLLENT, A. 1997. A five-year study to determine the eventual occurrence of *plum pox virus* in cherry cultivars in Hungary. XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops, 472, 495-502.

89. KRÁLIKOVÁ, K. 1963. The research on some virus diseases of stone fruits in Czechoslovakia. *Phytopathologia Mediterranea*, 203-204.

90. KRCZAL, H. és KUNZE, L. 1972. Untersuchungen zur Ubertragung des Scharkavirus durch blattlause. *Berlin Biologischen Bundesanst Land forstwirtsch Mitteilungen*.

91. KRÖLL, J. 1973. Natural and experimental host plants of the sharka virus of plum trees. Plant Virology, Proceedings of the 7th Conference of the Czechoslovak Plant Virologists, 397-403.

92. LABONNE, G. és DALLOT, S. 2006. Epidemiology of sharka disease in France. *EPPO bulletin*, 36, 267-270.

93. LABONNE, G., LAURIAUT, F., YVON, M. és QUIOT, J. 1994a. Aphid transmission of *plum pox potyvirus*: analysis of potential vectors in an apricot orchard. *Bulletin OEPP*, 24, 681-690.

94. LABONNE, G., YVON, M., QUIOT, J., AVINENT, L. és LLACER, G. 1994b. Aphids as potential vectors of *plum pox virus*: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. XVI International Symposium on Fruit Tree Virus diseases, 386, 207-218.

95. LECLANT, F. 1973. Aspect ecologique de la transmission de la sharka (plum pox) dans le sud-est de la France: Mise en evidence de nouvell es especes d'aphides vectrices. *Annales de phytopathologie*.

96. LEVY, L., DAMSTEEGT, V. és WELLIVER, R. 2000. First report of *Plum pox virus* (Sharka disease) in *Prunus persica* in the United States. *Plant Disease*, 84, 202-202.

97. LLÁCER, G. és CAMBRA, M. 1986. Occurrence of *plum pox virus* in Spain in Japanese plum, a new natural host. *Plant Disease*, 70.

98. LLÁCER, G. és CAMBRA, M. 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting *Prunus* species. *EPPO Bulletin*, 36, 219-221.

99. LLÁCER, G., CAMBRA, M. és LAVINA, A. 1985. Detection of *plum pox virus* in Spain. *EPPO Bulletin*, 15, 325-329.

100. MAEJIMA, K., HIMENO, M., KOMATSU, K., TAKINAMI, Y., HASHIMOTO, M., TAKAHASHI, S., YAMAJI, Y., OSHIMA, K. és NAMBA, S. 2011. Molecular epidemiology of *Plum pox virus* in Japan. *Phytopathology*, 101, 567-574.

101. MAEJIMA, K., HOSHI, H., HASHIMOTO, M., HIMENO, M., KAWANISHI, T., KOMATSU, K., YAMAJI, Y., HAMAMOTO, H. és NAMBA, S. 2010. First report of *plum pox virus* infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *Journal of general plant pathology*, 76, 229-231.

102. MAGHRABY, I. E., MATIĆ, S., FAHMY, H. és MYRTA, A. 2007. Viruses and viroids of stone fruits in Egypt. *Journal of Plant Pathology*, 427-430.

103. MARENAUD, C., MAZY, K. és CHAFFURIN, M. 1976. Observations sur la diffusion et la detection du virus de la Sharka dans un verger de pechers d'Aquitaine. *Phytoma*.

104. MARTÍNEZ–GÓMEZ, P., DICENTA, F. és AUDERGON, J. 2000a. Behaviour of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars in the presence of sharka (*plum pox potyvirus*): a review. *Agronomie*, 20, 407-422.

105. MARTÍNEZ–GÓMEZ, P., DICENTA, F. és WEBER, W. 2000b. Evaluation of resistance of apricot cultivars to a Spanish isolate of *plum pox potyvirus* (PPV). *Plant Breeding*, 119, 179-181.

106. MASSONIE, G. és MAISON, P. 1979. Peach resistance to aphid vectors of *plum pox virus*. XI International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, 94, 89-96.

107. MATIC, S., ELMAGHRABY, I., LAW, V., VARGA, A., REED, C., MYRTA, A. és JAMES, D. 2011. Serological and molecular characterization of isolates of *Plum pox virus* strain El Amar to better understand its diversity, evolution, and unique geographical distribution. *Journal of Plant Pathology*, 93, 303-310.

108. MATTHEWS, R. E. F. 2013. Plant virology, Academic press.

109. MAVRODIEVA, V., JAMES, D., WILLIAMS, K., NEGI, S., VARGA, A., MOCK, R. és LEVY, L. 2013. Molecular analysis of a *Plum pox virus* W isolate in plum germplasm hand carried into the USA from the Ukraine shows a close relationship to a Latvian isolate. *Plant disease*, 97, 44-52.

110. MAVRODIEVA, V., MOCK, R. és LEVY, L. 2008. Molecular characterization of PPV isolates from plum germplasm illegally imported from Ukraine. 20th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, May, 22-26.

111. MILIUS, S. 1999. First plum pox turns up in North America. *Science News*, 156, 325-325.

112. MILUSHEVA, S., GERCHEVA, P., BOZHKOVA, V. és KAMENOVA, I. 2008. Experiments on transmission of *Plum pox virus* through Prunus seeds. *Journal of Plant Pathology*, S23-S26.

113. MILUSHEVA, S. és RANKOVA, Z. 2001. *Plum pox potyvirus* detection in weed species under field conditions. VII International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology, 577, 283-287.

114. MINOIU, N. 1973. Vectorii virusului varsatului la prun *Prunus virus* 7 Christ. *An Inst Cer Pentru Prot Plant*.

115. MINOIU, N. 1975. Neue Untersuchungen über das Scharka-Virus (plum pox virus). *Archives of Phytopathology & Plant Protection*, 11, 389-397.

116. MIŠIĆ, P. D. 2000. Šljiva, Partenon.

117. MOHÁCSY, M. és MALIGA, P. 1963. Az öszibarack, Mezögazdasági kiadó.

118. MUMFORD, R. 2006. *Plum pox virus* (PPV) in the United Kingdom. *EPPO Bulletin*, 36, 217-217.

119. MYRTA, A. és BOSCIA, D. 2001. *Plum pox virus*: a risk for the Mediterra-nean fruit tree industry. *Option Méditerranéennes*, 37-42.

120. MYRTA, A., BOSCIA, D., POTERE, O., KÖLBER, M., NÉMETH, M., DI TERLIZZI, B., CAMBRA, M. és SAVINO, V. 2001. Existence of two serological subclusters of *Plum pox virus*, strain M. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 845-848.

121. MYRTA, A., POTERE, O., CRESCENZI, A., NUZZACI, M. és BOSCIA, D. 2000. Properties of two monoclonal antibodies specific to the cherry strain of *Plum pox virus*. *Journal of Plant Pathology*, 95-101.

122. MYRTA, A., VARGA, A. és JAMES, D. 2006. The complete genome sequence of an El Amar isolate of *plum pox virus* (PPV) and its phylogenetic relationship to other PPV strains. *Archives of Virology*, 151, 1189-1198.

123. NAGY, P., MEZEI, G. és LANTOS, A. 1992. Új hazai fajhibrid őszibarack klónalanyok. A „Lippay János" Tudományos Ülésszak előadásai, Budapest. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem.

124. NATARAJAN, P., TRINH, T., MERTZ, L., GOLDSBOROUGH, M. és FOX, D. 2000. Paper-based archiving of mammalian and plant samples for RNA analysis. *Biotechniques*, 29, 1328-1333.

125. NAVRATIL, M., SAFAROVA, D., KARESOVA, R. és PETRZIK, K. 2005. First incidence of *Plum pox virus* on apricot trees in China. *Plant Disease*, 89, 338-338.

126. NEMCHINOV, L. és HADIDI, A. 1998. Specific oligonucleotide primers for the direct detection of *plum pox potyvirus*-cherry subgroup. *Journal of Virological Methods*, 70, 231-234.

127. NÉMETH, M. 1963. Field and greenhouse experiments with *plum pox virus*. *Phytopathologia Mediterranea*, 162-166.

128. NÉMETH, M. 1979. A csonthéjas termésűek vírusbetegségei. In: Gyümölcsfák vírusos, mikoplazmás és rickettsiás betegségei. Budapest, Mezőgazda Kiadó, 199-422.

129. NÉMETH, M. 1986. Virus, mycoplasma and Rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.

130. NÉMETH, M. 1994. History and importance of plum pox in stone–fruit production 1. *EPPO Bulletin*, 24, 525-536.

131. NÉMETH, M. és KÖLBER, M. 1982. Additional evidence on seed transmission of *plum pox virus* in apricot, peach and plum proved by ELISA. XII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, 130, 293-300.

132. NOVAKOVIĆ, V. 1955. Die Verbreitung des *Prunus virus* 7 in Bosnien. *Plant Protection*, 28, 107-112.

133. OEPP/EPPO 2004. Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/32(1): *Plum pox potyvirus*. *EPPO Bulletin*, 34, 247-256.

134. OGAŠANOVIC, D., RANKOVIC, M., PLAZINIC, R. és PAPIC, V. 1993. Performance of newly-bred Cacak plum cultivars and current breeding tendencies. V International Symposium on Plum and Prune Genetic, Breeding and Pomology, 359, 75-81.

135. OH, J., PARK, C., LEE, H.-K., YEOM, Y.-A., LIM, S., MOON, J.-S. és LEE, S.-H. 2017. First report of *Plum pox virus* strain D isolate in peach (*Prunus persica*) in Korea. *Plant Disease*, 101, 265-265.

136. OWOR, B. E., SHEPHERD, D. N., TAYLOR, N. J., EDEMA, R., MONJANE, A. L., THOMSON, J. A., MARTIN, D. P. és VARSANI, A. 2007. Successful application of FTA® Classic Card technology and use of bacteriophage ϕ29 DNA polymerase for large-scale field sampling and cloning of complete maize streak virus genomes. *Journal of virological methods*, 140, 100-105.

137. PALKOVICS, L., BURGYÁN, J. és BALÁZS, E. 1993. Comparative sequence analysis of four complete primary structures of *plum pox virus* strains. *Virus Genes*, 7, 339-347.

138. PALMISANO, F., BOSCIA, D., MINAFRA, A., MYRTA, A. és CANDRESSE, T. 2012. An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. 22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, June 3–8, Rome, Book of Abstracts, 33.

139. PASCAL, T., PFEIFFER, F. és KERVELLA, J. 2001. Preliminary observations on the resistance to sharka in peach and related species. V International Peach Symposium, 592, 699-704.

140. PASQUINI, G. és BARBA, M. 2006. The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *EPPO Bulletin*, 36, 287-292.

141. PASQUINI, G., SIMEONE, A., CONTE, L. és BARBA, M. 1998. Detection of *plum pox virus* in apricot seeds. *Acta Virologica*, 42, 260-263.

142. PASQUINI, G., SIMEONE, A., CONTE, L. és BARBA, M. 2000. RT-PCR evidence of the non-transmission through seed of *Plum pox virus* strains D and M. *Journal of Plant Pathology*, 221-226.

143. POLAK, J. 2000. European spindle tree and common privet a new natural hosts of *plum pox virus*. XVIII International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Top Fruit Diseases, 550, 125-128.

144. PREDAJŇA, L., ŠUBR, Z., ÁDÁM, J., PALKOVICS, L. és GLASA, M. 2012a. Use of FTA (Whatman) membranes for efficient and easy-to-use sampling and molecular detection of stone fruit and grapevine RNA viruses. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 15, 44-45.

145. PREDAJŇA, L., ŠUBR, Z., CANDRESSE, T. és GLASA, M. 2012b. Evaluation of the genetic diversity of *Plum pox virus* in a single plum tree. *Virus research*, 167, 112-117.

146. PRIBÉK, D. és GÁBORJÁNYI, R. 1997. Hungarian *plum pox virus* isolates represent different serotypes. *Acta phytopathologica et entomologica hungarica*, 32, 281-288.

147. PRIBÉK, D., PALKOVICS, L. és GÁBORJÁNYI, R. 1998. A hazai szilvahimlő virus izolátumok genetikai polimorfizmusának bizonyítása a RT-PCR-módszerrel. *Növényvédelem*, 34, 601-605.

148. PRIBÉK, D., PALKOVICS, L. és GÁBORJÁNYI, R. 2000. Molecular characterization of *Plum pox virus* almond isolate. XVIII International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Top Fruit Diseases, 550, 91-96.

149. QUIOT, J., LABONNE, G., BOEGLIN, M., ADAMOLLE, C., RENAUD, L. és CANDRESSE, T. 1995. Behaviour of two isolates of *plum pox virus* inoculated on peach and apricot trees: first results. *Acta horticulturae*, 386, 290-298.

150. RAVELONANDRO, M., SCORZA, R., BACHELIER, J., LABONNE, G., LEVY, L., DAMSTEEGT, V., CALLAHAN, A. és DUNEZ, J. 1997. Resistance of transgenic *Prunus domestica* to *plum pox virus* infection. *Plant disease*, 81, 1231-1235.

151. RIECHMANN, J. L., LAIN, S. és GARCIA, J. A. 1989. The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of *plum pox potyvirus*. *Journal of General Virology*, 70, 2785-2789.

152. RIECHMANN, J. L., LAIN, S. és GARCIA, J. A. 1992. Highlights and prospects of *potyvirus* molecular biology. *Journal of General Virology*, 73, 1-16.

153. ROY, A. és SMITH, I. 1994. Plum pox situation in Europe. *EPPO Bulletin*, 24, 515-523.

154. ROY, Y. és NASSUTH, A. 2005. Detection of plant genes, gene expression and viral RNA from tissue prints on FTA cards. *Plant molecular biology reporter*, 23, 383-395.

155. RUBIO, M., MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., PINOCHET, J. és DICENTA, F. 2005. Evaluation of resistance to sharka (*Plum pox virus*) of several *Prunus* rootstocks. *Plant Breeding*, 124, 67-70.

156. SALAMON, P. és PALKOVICS, L. 2002. Characterization of *Plum pox virus* PPV-BT-H isolated from naturally infected blackthorn (*Prunus spinosa* L.) in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 903-907.

157. SCHNEIDER, W. L., DAMSTEEGT, V. D., GILDOW, F. E., STONE, A. L., SHERMAN, D. J., LEVY, L. E., MAVRODIEVA, V., RICHWINE, N., WELLIVER, R. és LUSTER, D. G. 2011. Molecular, ultrastructural, and biological characterization of Pennsylvania isolates of *Plum pox virus*. *Phytopathology*, 101, 627-636.

158. SEBESTYÉN, D., NÉMETH, M., HANGYÁL, R., KRIZBAI, L., EMBER, I., NYERGES, K., KÖLBER, M., KISS, E. és BESE, G. 2008. Ornamental prunus species as new natural hosts of *plum pox virus* and their importance in the spread of the virus in hungary. *Journal of Plant Pathology*, S57-S61.

159. SERÇE, Ç. U., CANDRESSE, T., SVANELLA-DUMAS, L., KRIZBAI, L., GAZEL, M. és ÇAĞLAYAN, K. 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142, 121-126.

160. SHEVELEVA, A., IVANOV, P., PRIHODKO, Y., JAMES, D. és CHIRKOV, S. 2012. Occurrence and genetic diversity of Winona-like *Plum pox virus* isolates in Russia. *Plant disease*, 96, 1135-1142.

161. SHEVELEVA, A., KUDRYAVTSEVA, A., SPERANSKAYA, A., BELENIKIN, M., MELNIKOVA, N. és CHIRKOV, S. 2013. Complete genome

sequence of a novel *Plum pox virus* strain W isolate determined by 454 pyrosequencing. *Virus Genes*, 47, 385-388.

162. SHUKLA, D. D., WARD, C. W. és BRUNT, A. A. 1994. The *Potyviridae*, CAB international.
163. SIHELSKÁ, N., GLASA, M. és ŠUBR, Z. W. 2017. Host preference of the major strains of *Plum pox virus*—Opinions based on regional and world-wide sequence data. *Journal of integrative agriculture*, 16, 510-515.
164. SOLTÉSZ, M. 1997. Integrált gyümölcstermesztés, Mezőgazda kiadó, Budapest.
165. SPIEGEL, S., KOVALENKO, E., VARGA, A. és JAMES, D. 2004. Detection and partial molecular characterization of two *Plum pox virus* isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan. *Plant disease*, 88, 973-979.
166. STANIULIS, J., STANKIENE, J., SASNAUSKAS, K. és DARGEVICIUTE, A. 1998. First report of sharka disease caused by *Plum pox virus* in Lithuania. *Plant Disease*, 82, 1405-1405.
167. SUBR, Z., KAMENCAYOVÁ, M. és GLASA, M. 2013. Experimental mixed infection by *Plum pox virus* strains confirms their natural host preference. II International Symposium on Plum Pox Virus, 1063, 29-32.
168. ŠUBR, Z., PITTNEROVA, S. és GLASA, M. 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta virologica*, 48, 173-176.
169. ŠUTIC, D., BABOVIC, M. és MARKOVIC, S. 1976. Transmissibility of some Sharka virus strains by *Myzus persicae* Sulz., depending on various infection sources. X International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, 67, 171-178.
170. ŠUTIĆ, D., JORDOVIĆ, M., RANKOVIĆ, M. és FESTIĆ, H. 1971. Comparative studies of some sharka virus isolates. *Annales de Phytopathologie*, 185-194.
171. SYRGIANNIDIS, G. 1979. Selection of two apricot varieties resistant to sharka virus. XI International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, 94, 85-88.
172. SZABÓ, Z. 2001. Őszibarack. In: Tóth M.(szerk.): Gyümölcsészet. Második, bôvített kiadás.*)* Primom, Nyíregyháza, 165-199.
173. SZATHMÁRY, E. és PALKOVICS, L. 2009. Magyarországi, kajsziról származó szilva himlő vírus (*Plum pox virus*) izolátumok jellemzése. *55. Növényvédelmi Tudományos Napok*, Budapest. 34.

174. SZATHMÁRY, E. és PALKOVICS, L. 2010. Natural deletion is not unique in the coat protein (CP) of recombinant *Plum pox virus* (PPV) isolates in Hungary. *Julius-Kühn-Archiv*, 151.

175. SZEMES, M., KÁLMÁN, M., MYRTA, A., BOSCIA, D., NÉMETH, M., KÖLBER, M. és DORGAI, L. 2001. Integrated rt–pcr/nested pcr diagnosis for differentiating between subgroups of *plum pox virus*. *Journal of virological methods*, 92, 165-175.

176. SZIRMAI, J. 1948. A kajszi vírusbetegsége. *Magyar Bor és Gyümölcs*, 3, 7-8.

177. SZIRMAI, J. 1961. Report on fruit tree virus diseases in Hungary. *Tidsskrift for Planteavl*, 65, 220-229.

178. THAKUR, P., BHARDWAJ, S., GARG, I., KISHORE, K. és SHARMA, D. 1994. *Plum pox virus* on stone fruits from India-a new record. *Plant Disease Research*, 9, 100-102.

179. THOMPSON, D., MCCANN, M., MACLEOD, M., LYE, D., GREEN, M. és JAMES, D. 2001. First report of *plum pox potyvirus* in Ontario, Canada. *Plant Disease*, 85, 97-97.

180. TIMON, B. 1974. Őszibarack, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

181. TÓBIÁS, I., GYŐZŐ, K., BARKASZI, I. és SZABÓ, Z. 1992. A Szilva-himlővírus kimutatása őszibarackból és a fajták érzékenysége. *Kertgazdaság*, 24, 70-77.

182. TÓTH, M. 2001. Gyümölcsészet. Primom Vállalkózásélénkítő Alapítvány, Nyíregyháza, 244-247.

183. TÓTH, M. 2009. Gyümölcsfaj-és fajtaismeret. Fruit species and cultivars) Egyetemi jegyzet. BCE Gyümölcstermő Növények Tanszék, Budapest.

184. TRIFONOV, D. 1974. Susceptibility to the *plum pox virus* of twelve varieties of the. cultivar Kjustendilska sinya silva. Publ. House Bulg. Acad. Sci. Virol., Sofia, 131-138.

185. URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A. L. és BERNARDI, F. 2001. *Potyvirus* proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74, 157-175.

186. VERHOEVEN, J. T. J., ROENHORST, J. és JONGEDIJK, G. 2006. *Plum pox virus* (PPV) in the Netherlands. *EPPO Bulletin*, 36, 211-212.

187. VIRŠČEK, M., MAVRIČ, I., URBANČIČ-ZEMLJIČ, M. és ŠKERLAVAJ, V. 2003. Detection of *Plum pox potyvirus* in weeds. XIX International Symposium

on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases, 657, 251-254.

188. VOZAROVA, Z., KAMENCAYOVA, M., GLASA, M. és SUBR, Z. 2013. *Plum pox virus* accumulates mutations in different genome parts during a long-term maintenance in *Prunus* host plants and passage in *Nicotiana benthamiana*. *Acta virologica*, 57, 369-372.

189. WANG, A., SANFAÇON, H., STOBBS, L. W., JAMES, D., THOMPSON, D., SVIRCEV, A. M. és BROWN, D. C. W. 2006. *Plum pox virus* in Canada: progress in research and future prospects for disease control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28, 182-196.

190. WETZEL, T., CANDRESSE, T., RAVELONANDRO, M., DELBOS, R. P., MAZYAD, H., ABOUL-ATA, A. E. és DUNEZ, J. 1991a. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the El Amar strain of *plum pox potyvirus*. *Journal of General Virology*, 72, 1741-1746.

191. WETZEL, T., CANDRESSE, T., RAVELONANDRO, M. és DUNEZ, J. 1991b. A polymerase chain reaction assay adapted to *plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*, 33, 355-365.

192. ZAWADZKA, B. 1979. The response of several plum cultivars to infection with *plum pox virus*. XI International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, 94, 215-222.

INTERNETES HIVATKOZÁSOK

1. https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm
2. https://www.cabi.org/isc/datasheet/42203

10. MELLÉKLETEK

M1. – Ábrajegyzék

1. ábra: A PPV elterjedése Európában (forrás: CABI, 2018) 9
2. ábra: A PPV elterjedése a világon (forrás: CABI, 2018) 9
3. ábra: A PPV genomjának sematikus ábrája 11
4. ábra: PPV tünetei szilva levelén (a) és termésén (b) (Fotó: Ádám J., Palkovics L.) 16
5. ábra: PPV tünetei őszibarack levelén (a) és termésén (b) (Fotó: Ádám J.) 17
6. ábra: PPV tünetei kajszi levelén (a) és csonthéján (b) (Fotó: Ádám J., Nagy G.) 18
7. ábra: A hazai felmérés helyszínei (Google Maps) 25
8. ábra: Az alany-nemes kombinációk vizsgálatában részt vevő minták helye (Google Maps) 26
9. ábra: A gazdanövény preferencia vizsgálat mintáinak származási helye (GPS: 47.428339, 18.801402) (Google Maps) 27
10. ábra: A gazdanövény preferencia vizsgálataihoz kiválasztott terület és a minták 34
11. ábra: A PPV genomja és a vizsgálatok során felhasznált primerek 37
12. ábra: Az NIb génben található rekombinációs pont és a törzsspecifikus primerek (Šubr *et al.*, 2004) 40
13. ábra: A PCR eredménye az M, D és Rec törzs esetén (Fotó: Ádám J.) 41
14. ábra: Hasítás *Eco*RI-gyel 48
15. ábra: Hasítás *Dde*I-gyel 48
16. ábra: Az általunk gyűjtött izolátumok és a nemzetközi adatbázisból származó izolátumok filogenetikai törzsfája 50
17. ábra: A vizsgált megyékben jellemző törzsek 51
18. ábra: A minták törzsbeli százaléka 52
19. ábra: Vizsgált alany-nemes kombinációk alanyra vetített PPV fertőzöttségének mértéke 56
20. ábra: Vizsgált alany-nemes kombinációk nemesre vetíett PPV fertőzöttségének mértéke 57
21. ábra: Vizsgát alany-nemes kombinációk PPV fertőzöttségének mértéke (%) 57
22. ábra: RFLP vizsgálat *Eco*RI (bal) és *Eco*RV (jobb) enzimekkel 59
23. ábra: A nested PCR gélképe 59
24. ábra: A TÉT38-as izolátum rokonsági viszonyai hazai és nemzetközi izolátumokhoz viszonyítva 61
25. ábra: Vizsgált mintákra kapott eredmények 67
26. ábra: A PPV törzsek egyedi és kevert fertőzésének gazdanövények szerinti megoszlása 69

M2. – Táblázatjegyzék

1. táblázat: PPV megjelenése a világon kontinensenként időrendi sorrendben (http://www.cabi.org) 8
2. táblázat: Magyarország északi megyéiben végzett felmérésben szereplő minták adatai 28
3. táblázat: Vizsgálati minták darabszáma és megoszlása 33
4. táblázat: Az FTA technológia tesztelésére kapott minták adatai 35
5. táblázat: A PCR-ek során felhasznált primerek 37
6. táblázat: A PCR programja az eltérő primerek esetében 39
7. táblázat: Az összehasonlításhoz használt referencia izolátumok 42
8. táblázat: A vizsgálat során gyűjtött minták elnevezése, a gyűjtés helyének, az eredeti gazdanövény nevének, továbbá a PCR vizsgálat eredményének feltüntetésével 44
9. táblázat: A restrikciós analízis során vizsgált minták és a nukleotid szekvencia alapján meghatározott törzsek eredményei 49
10. táblázat: A vizsgált minták PCR és RFLP eredményei 53
11. táblázat: Az RFLP vizsgálathoz használt restrikciós enzimek hasítóhelyeinek száma és helye a 836 bp hosszúságú PCR terméken 58
12. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációk alanyra vetített fertőzöttségének megoszlása 62
13. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációk nemesre vetített fertőzöttségének megoszlása 63
14. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációk nemesre vetített fertőzöttségének logisztikus regressziós elemzése 63
15. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációkat adó fajták fertőzöttségének megoszlása 64
16. táblázat: Vizsgált alany-nemes kombinációkat adó fajták fertőzöttségének logisztikus regressziós elemzése 65
17. táblázat: PPV törzsek gazdanövény szerinti megoszlása 68
18. táblázat: PPV törzsek egyedi és kevert fertőzésének gazdanövényenkénti előfordulása 68

M3. – A TÉT38-as azonosítóval ellátott izolátum szekvenciája

A szekvencia 689 bp hosszúságú, az SK 68-as izolátum alapján a PPV 2985–3673 bp közötti szakasza, mely a P3 gént kódoló szekvencia 3’ végét, a $6K_1$ gént és a CI gént kódoló szakasz 5’ végét foglalja magába.

tcgcagcggtggcgaaaacatataccaaaacctttcatcccgaaagacggcgcagatttaggaggcaggtacgac
atctccgttcggtcattacttggcaaccagtacaaacgcctgagagacgtagtccgacggaaaagagacgatgtggtttgt
tatacacaccagtcgatggggaagctattttgcaaagccatcggaatttccacaagttttcttccaagcactcttaaaatgctt
gatatgctcatcgtgttcggtctcttgctttcaataggagccacatgcaactcaatgatcaatgagcataaacatcttaagcaa
cttgccgccgatcgggaagataagaaaaggttcaaaagattgcaagtcttatacacgaggttatcagagaaggttggttgc
acaccaacagcagatgaattcctggagtatgtgggaggtgaaaaccctgatttactgaaacatgcagaggatctaattggg
gatggtcaagttgttgttcatcaaagcaagagagactcacaagcaaatttggaacgggttgtagcatttgtagctcttgttatg
atgctgtttgactcggagcgaagtgacggcgtgtacaagattctcaataaacttaaaggcatcatggggagtattgwccag
wytgatcgtcaccagagcttggatgatatagaacatat

10.14751/SZIE.2020.011

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Palkovics László egyetemi tanárnak, az MTA doktorának, aki nagy türelemmel és önzetlenül tanított a molekuláris virológia tudományára. Megteremtette a kutatáshoz szükséges anyagi és technikai feltételeket, valamint a nyugodt hátteret. Széleskörű szakmai ismereteivel, gyakorlati tapasztalataival és hasznos tanácsaival mindvégig segítette munkámat, és biztosította a disszertáció elkészítésének feltételeit sűrű teendői mellett is.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Tóbiás Istvánnak, Dr. Almási Asztériának, valamint a Szlovák Tudományos Akadémia munkatársainak Dr. Miroslav Glasának és Dr. Šubr Zdenonak akik a COSHARKA pályázat során munkám kezdetén megkedveltették velem a növény virológia tudományát és szakmai tapasztalataikkal segítették munkámat.

Hálával tartozom Dr. Balla Ildikónak és Dr. Ittzés Andrásnak, akik az alany-nemes kombinációk vizsgálata során segítettek az eredmények virológiai és statisztikai elemzésében, valamint hallgatómnak Borsos Árpádnak, aki nagy kitartással dolgozott a témán.

Hálásan köszönöm a Sóskút Fruct Kft. munkatársainak és Dr. Nagy Gézának a sok segítségét a kísérleti helyszínek biztosításáért, valamint gyakorlati látásmódjáért mely sokszor terelte új utakra munkámat. A gazdanövény preferencia vizsgálata nem sikerült volna Sáray Réka nélkül, személyében az eddigi legkiválóbb hallgatómat ismerhettem meg. Az FTA membránnal végzett kísérleteimben is nagy támogatást nyújtott Dr. Tóbiás István, valamint bolgár kapcsolatai, Borjana Stefanova és Kalin Dragoyski, köszönöm nekik segítségüket.

Köszönettel tartozom a Növénykórtani Tanszék minden volt és jelenlegi munkatársainak szakmai tanácsaikért és barátságukért.

Végül pedig szeretnék köszönetet mondani feleségemnek, Fábián Katalinnak, szüleimnek és testvéreimnek, akik a hosszú munka során mindvégig mellettem álltak.