

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Szabó Luca Krisztina

Budapest

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Prunus fajokon végzett *in vitro* vírusmentesítési eljárások
hatékonyságának értékelése

DOI: 10.54598/007030

Szabó Luca Krisztina

Budapest

2024

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Kertészeti biológia

vezetője: Zámboriné Dr. Németh Éva

egyetemi tanár, DSc
MATE, Kertészettudományi Intézet
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető: Dr. Preininger Éva

tudományos főmunkatárs, PhD
MATE, Kertészettudományi Intézet
Gyümölcsstermesztési Kutatóközpont

Társ témavezető: Dr. Hegedűs Attila

egyetemi tanár, DSc
MATE, Genetika és Biotechnológia Intézet
Növénybiotechnológiai Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

A munka előzményei, a kitűzött célok

A csonthéjas gyümölcsfák természetes gazdanövényei számos vegetatív úton terjedő kórokozónak. Az ismert vírusos betegségek jelentős gazdasági kárt okoznak a csonthéjas ültetvényekben. A vírusok rovarvektorokkal és a vegetatív szaporítás során könnyen átjutnak növényről növényre, ellenük a megelőzés a legfontosabb eszköz: elengedhetetlen az egészséges szaporítóanyag használata az ültetvények létrehozásakor és a vektorok elleni folyamatos védekezés a fenntartás során.

Az egészséges gyümölcs szaporítóanyagok fenntartása állami feladat. Hazánkban a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kertészettudományi Intézet Gyümölcstermesztési Kutatóközpontjában történik a kórokozómentes csonthéjas gyümölcs szaporítóanyagok előállítása és ezek fenntartása izolált központi törzsupltetvényekben.

Az Európai Unió szabályozás alapján Magyarországon a 14/2017. (III. 23.) FM rendelet 9. melléklete tartalmazza a törzsupltetvények fenntartásának növény-egészségügyi követelményeit, amely évenként kötelező víruseszteléseket ír elő sharka-gazda csonthéjasoknál szilvahimlő vírusra (PPV), *Prunus* nekrotikus gyűrűsfoltosság vírusra (PNRSV) és szilva törpülés vírusra (PDV), valamint kajszi (*Prunus armeniaca*) fajtákon évente nested PCR tesztet kell végezni a csonthéjasok európai sárgaság fitoplazma betegségének (ESFY) kimutatása céljából. A tesztelendő kórokozókön túl számos vírust, viroidot hordozhatnak a csonthéjasok, egyre több, akár látens módon, tüneteket nem okozva jelenlevő vírust azonosítanak *Prunus* fajokban.

Vírusmentes növények előállítására számos technikát alkalmaznak szerte a világon, a hagyományos cserepes kezeléseket *in vitro* módszerek váltották fel. Általánosan használható, megbízható, gyors megoldás azonban nem áll rendelkezésre csonthéjasok vírusmentesítésére. Nagyon jelentős tényező a genotípus-függés, vagyis a növényfajoknak, fajtáknak különböző a toleranciájuk az alkalmazott kezelésekkal szemben, a csonthéjasok különösen érzékenyek pl. a magas hőmérsékletre, és a merisztémából történő

regeneráció hatékonysága is elmarad a lágyszárú vagy például az almatermésű növényekhez képest. A különböző vírusok is eltérően reagálnak a kezelésekre, így előfordulhat, hogy a vírus eliminálásához szükséges erősségű kezelés már a növényi tűréshatáron túllép, és a növény elpusztul a kezelés során. A mentesítési eljárás szerves része a tesztelés, a vírusok jelenlétének megbízható, gyors kimutatása, ami nagyban hozzájárul a folyamat sikerességéhez és lerövidítéséhez.

Doktori munkám során célul tűztem ki

- a korábban csak cseresznye, illetve meggy gazdanövényekből azonosított cseresznye vírus A (CVA) és cseresznye aprógyümölcsűség 1 (LChV-1) vírusokkal fertőzött szilva és kajszi fajtákból steril hajtástenyészetek létrehozását és azokon különböző *in vitro* vírusmentesítési technikák alkalmazását,
- az alkalmazott módszerek hatékonyságát összehasonlítani, vizsgálni a gazdanövényeknek ill. a vírusoknak a kezelésekre adott válaszát,
- a fertőzött kiindulási anyagokból egészséges, vírusmentes hajtástenyészeteket létrehozni,
- a jelenlegi idő- és precíz kézimunka-igényes, alacsony túléléssel és bizonytalan kimenetellel járó eljárások helyett olyan vírusmentesítési módszert találni, ami hatékonyabb és szélesebb körben is alkalmazható különböző vírusokkal fertőzött csonthéjas fajok, fajták vírusmentesítésére.

Anyag és módszer

Növényanyag

A MATE Gyümölcsstermesztési Kutatóközpont Érd Elvira központi és üzemi törzsültetvényéről 2017 nyarán történt mintagyűjtés *in vitro* kultúrák létrehozásához. Kutatócsoportunk kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálásával (HTS) Magyarországon elsőként azonosított a korábban csak cseresznye és meggy gazdanövényekből ismert cseresznye vírusokat (CVA, LChV-1) szilva és kajszi fajtákban, ezért ezekkel az új gazdanövényen előforduló vírusokkal fertőzött fák vizsgálatába kezdtünk. Az alábbi RT-PCR-rel is megerősített vírusos növényanyaggal dolgoztunk:

- cseresznye vírus A (CVA)-val fertőzött két kajszi fajta ('Magyar kajszi' és 'Pannónia'),
- cseresznye vírus A (CVA)-val fertőzött szilva ('Besztercei Bt. 2'),
- cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (LChV-1)-gyel és szilvahimlő vírussal (PPV) egyidejűleg fertőzött kajszi ('Magyar kajszi').

Későbbi mintavétel és víruseszt után (2019. tavasz) a cseresznyében és meggyben komoly gondokat okozó

- *Prunus* nekrotikus gyűrűsfoltosság vírussal (PNRSV) fertőzött meggyet ('Éva') is kiválasztottunk *in vitro* hajtástenyészetek létrehozására.

In vitro kultúrák létrehozása és növénynevelési körülmények

A friss hajtásokról a leveleket eltávolítottuk és 1-2 rügyes darabokra vágtuk, amit steril lamináris boxban először 70%-os etanolban 3 percig áztattunk, majd HgCl₂-oldatban (0,4%, 6 perc) végzett felületi sterilizálás után, steril desztillált vízben háromszor leöblítettünk. Ezt követően kerültek a hajtásdarabok a növényfaj-specifikus táptalajra. Az *in vitro* hajtástenyészeteket növénynevelő szobában tartottuk 24±1 °C-on 16 órás megvilágítás mellett, 60 μM m⁻²s⁻¹ fényintenzitással, melyet meleg és hideg fehér fénycsövek biztosítottak. A növények négyhetente kerültek friss táptalajra. A

sikeres tenyészet indítást követően RT-PCR-rel visszaigazoltuk a vírus jelenlétét az *in vitro* növényekből, majd az igazoltan vírusfertőzött vonalakat többszörítöttük a tervezett kísérletekhez. A doktori munka személyes okok miatti szüneteltetése a hajtástenyészetek hosszú távú hűtőben tárolását tette szükségessé. A tenyészeteket a fajspecifikus szaporító táptalajaikon hűtőkamrába helyeztük (5,5°C, teljes sötét) 1,5, majd újabb kísérletek után további 1 évre. A hűtés folyamán 4-6 havonta friss táptalajra passzálás történt, amit 1-2 hét fényszobában tartás követett és a tenyészetek visszakérültek a hűtőbe, majd ahogy lehetőség nyílt rá, folytatódtak a kísérletek a fent ismertetett nevelési körülmények mellett.

In vitro vírusmentesítési kezelések

Hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztés

Hőkezeléshez a kéthetes hajtástenyészeteket (átrakástól számított két hét elteltével) hőkezelő kamrába (Panasonic MLR-352) helyeztem nappalra 38, éjszakára 36°C-ra 12 órás megvilágítás mellett (160 $\mu\text{mol/s/m}^2$). ‘Besztercei Bt.2’ szilvából 14, 15, 17, 18, 23 nap elteltével, ‘Pannónia’ kajsziból 14, 15, 16, CVA-s ‘Magyar kajsziból’ 13, 16, PPV- és LChV-1 fertőzött ‘Magyar kajsziból’ 15, 16, 20, 24 nap hőkezelés után a hőkezelést toleráló, élő hajtásokból steril körülmények között sztereomikroszkóp alatt 1-2 mm hosszú, 2-4 levélprimordiumot tartalmazó hajtáscsúcsokat metszettem ki és helyeztem táptalajra Petri-csészébe. A regenerálódó hajtáscsúcsokat 4 hetente helyeztem friss táptalajra, majd a sikeresen regenerált hajtástenyészeteket fenntartottam vírus tesztelésig.

Kemoterápia

Autoklávozás után ribavirint (Duchefa, Hollandia) vagy zidovudint (Sigma-Aldrich, USA) adtam a táptalajhoz steril szűrőn át (Millipore, 0,22 μm , PES membrán) 25 ill. 50 mg/l koncentrációban. Üvegenként 3 darab 1 cm hosszúságú *in vitro* hajtás (5 üvegben, összesen 15 db kezelésként) nevelkedett az antivirális szert tartalmazó szaporító táptalajon nyolc héten keresztül (4 hét után friss táptalajra kerültek), majd antivirális szert nem tartalmazó táptalajon tartottam őket vírustesztelésig.

A kontroll csoportban azonos korú, 1 cm hosszú hajtások kerültek 8 hétig vírusellenes szer nélküli szaporító táptalajra. Minden kezelési csoport 15 hajtásból indult.

Hőkezelés és kemoterápia kombinációja

Két hét *in vitro* hőkezelés után 1 cm-es hajtáscsúcsi darabokat helyeztem zidovudin vírusellenes szert tartalmazó táptalajra 8 hétig (4 hét után friss táptalajra kerültek), majd antivirális szert nem tartalmazó táptalajon tartottam őket vírusesztelésig. A kontroll csoportban itt 2 hétig hőkezelt, 1 cm-es hajtások voltak, normál, antivirális szert nem tartalmazó táptalajon nevelve.

Vírus diagnosztika

A bazális kallusz nélküli teljes mikroszaporított növényeket használtuk fel a vírusjelenlét meghatározására. Az *in vitro* növényi mintákból CTAB módszerrel történt az RNS-kivonás. A kivont RNS-ből cDNS szintézist végeztünk RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével, random primerek felhasználásával a gyártó utasításai szerint. A vírusok kimutatására RT-PCR módszert alkalmaztunk, mely során a DNS amplifikációt Phire Hot Start II DNS-polimeráz (Thermo Fisher Scientific) enzimmal végeztük. A reakcióhoz 9,4 µl MQ vizet, 3 µl 5x Phire puffert, 0,75 µl - 0,75 µl forward és reverse primert (10 pmol/µl), 0,3 µl dNTP-t (10mM), 0,3 µl (0,6 U) Phire polimerázt és 0,5 µl cDNS-t adtunk, így 15 µl végtérfogattal dolgoztunk.

A PCR reakciót a következő beállításokkal végeztük:

98°C - 30 másodperc

98°C - 10 másodperc

* °C - 10 másodperc

72°C - 20 másodperc

} 40x

72°C - 1 perc

*Az alkalmazott primerre jellemző tapadási (anellációs) hőmérséklet

A kapott PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el.

Az eredmények

***In vitro* kultúrák létrehozása vírusfertőzött fákról**

A felszíni sterilizálást követően a kontaminációt nem mutató üvegekben az alvórügyek kihajtása után a friss hajtásokat a szárról lemetszve és fajspecifikus szaporító táptalajra helyezve megindult a steril hajtástenyészetek felszaporítása. Minden indított növény fajtáról sikerült *in vitro* kultúrát létrehozni és azokat a kísérletek teljes ideje alatt fenntartani, kísérleti anyagot biztosítani.

CVA fertőzött szilva hajtástenyészeteken végzett *in vitro* vírusmentesítési kísérletek eredményei

Hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztés eredménye

A hőkezelés kezdetétől 14-23 nap elteltével összesen 49 db 1-2 mm hosszú hajtáscsúcsot metszettem ki és helyeztem táptalajra a még életképes hajtástenyészetekről, amiből 19 db (39%) korán elpusztult (elbarnult vagy elkalluszosodott és nem volt képes regenerálódni).

A hőkezelési időtartam hatását vizsgálva azt találtuk, hogy a szilva tenyészeteken a 3 hetet meghaladó 38/36°C-os kezelés elteltével már láthatóvá váltak a hosszú távú hőkezelés káros következményei, a növények jelentősen legyengültek, sárgultak, csúcsuk elhalt. Legtovább, 23 napig hőkezelt növényről szedtem hajtáscsúcsot, de táptalajra kerülés után azok hamar elpusztultak és nem voltak képesek regenerálódni. A növények jól tolerálták a 14-18 napig tartó hőkezelést, a hajtások zöldek és erőteljesek maradtak, hajtáscsúcsaik épek és preparálásra alkalmasak voltak. A kimetszett hajtáscsúcsok néhány hónap elteltével nagy arányban (64%) regenerálódtak felszaporításra alkalmas növénykékké. Legkisebb arányban (43%) 17 nap hőkezelés után, legnagyobb arányban (69%) 15 nap után regenerálódtak a növények.

Több hónapos mikroszaporítás után a sikeresen regenerált hajtásokból mintát szedtünk a vírusdiagnosztika elvégzéséhez. Összesen 20, hajtáscsúcsból regenerált *in vitro* növényt teszteltünk RT-PCR-rel CVA jelenlétére. Tizenöt növény (75%) vált CVA-mentessé, míg 25% fertőzött maradt. A 14-18 napos hőkezelési

időintervallumon belül nem mutatkozott nagy különbség a vírusmentes rátát tekintve, 17 nap után 67%, a 15 napig hőkezelt, tesztelt növények 78%-a lett vírusmentes, míg a 14 és 17 napig kezelt növények egyaránt 75%-ban lettek vírusmentesek.

Kemoterápia hatása önmagában vagy hőkezeléssel kombinálva

A 'Besztercei Bt. 2' szilvafajta toleránsnak bizonyult a zidovudin és ribavirin kezelésekre. A növények túlélési arányát a 25 vagy 50 mg/l koncentrációban alkalmazott vírusellenes szerek egyike sem befolyásolta negatívan. Ezen kezelések során nem figyeltünk meg jelentős mértékű fitotoxikus hatást.

A zidovudin önmagában egyik koncentrációban sem volt képes hatékonyan eliminálni a CVA-t (20%), hőkezélést követően azonban a zidovudin (25 mg/l) kezelés 7%-ról 40%-ra növelte a CVA-mentes növények számát. A kisebb koncentrációban (25 mg/l) alkalmazott ribavirin nagyon hatékony volt, a vizsgált növényekben nem volt kimutatható a CVA. Magasabb ribavirin koncentrációt alkalmazva (50 mg/l) a kezelt növények 40%-a lett vírusmentes. Meglepő módon néhány kontrollnövény (7-25%) CVA-negatívnak bizonyult a tesztek során.

A CVA- és LChV-1+PPV-fertőzött kajszi tenyészeteken végzett *in vitro* vírusmentesítési kísérletek eredményei

Hőkezélést követő hajtáscsúcstenyésztés eredményei

Kajszi fajtákból a hőkezelés kezdetétől 13-24 nap elteltével összesen 74 db 1-2 mm hosszú hajtáscsúcsot metszettem ki és helyeztem táptalajra a még életképes hajtástenyészetekről. A hajtáscsúcsok közül mindössze 6 db (8%) indult regenerációnak, a maradék (92%) korán elpusztult (elbarnult vagy elkalluszosodott és nem volt képes regenerálódni). A kajszi fajták bár tolerálták a 2-3 hetes *in vitro* hőkezélést, a kipreparált hajtáscsúcsok nagy része regenerációra alkalmatlan volt. A 'Pannónia' regenerációs képessége (26,3%) meghaladta a 'Magyar kajsziét' (1,8%). 1 db. 'Magyar kajszi' (20 napig hőkezelt) hajtáscsúcsból regenerált növényt tudunk tesztelni, ez PPV-re és LChV-1-re is negatív lett.

Kemoterápia hatása önmagában vagy hőkezeléssel kombinálva

A kajszi hajtástenyészetek kemoterápiás kezelése során a zidovudinos táptalajon nevelt növények túlélése az esetek többségében 100% volt, egyedül az 50 mg/l koncentrációban kezelt CVA-s ‘Magyar kajszi’ esetében csökkent 87%-ra. Hasonló eredményt kaptunk, amikor a zidovudin kezelést hőkezelés is megelőzte, a túlélés szintén csak a CVA-s ‘Magyar kajszi’ 50 mg/l koncentrációban kezelt csoportban csökkent, ekkor 80%-ra.

Ribavirin esetében 0-93% közötti túlélési eredményeket kaptunk a kajszi tenyészeteken. A ribavirinnel (25 ill. 50 mg/l) kezelt ‘Pannónia’ tenyészetek 100 ill. 93%-ban éltek túl a kezelést. A LChV-1+PPV fertőzött ‘Magyar kajszi’ hajtástenyészetén végzett ribavirin kezelés gyenge túlélési eredményei miatt a kezelést megismételtük. Az ismételt kezelés nagyobb mértékű túlélést eredményezett a kontroll csoportban és megnőtt a ribavirin 25 mg/l kezelést túlélő növények száma is (27%-ról 93%-ra), azonban a magasabb koncentrációban (50 mg/l) kezelt növények 40%-os túlélése 0%-ra csökkent. A CVA-fertőzött ‘Magyar kajszi’ ribavirin kezelésére és a LChV-1+PPV-fertőzött ‘Magyar kajszi’ hőkezeléssel kombinált zidovudin kezelésére nem került sor.

A CVA-fertőzött kajszi tenyészeteken végzett zidovudin kezelés 0-13% közötti vírusmentességet eredményezett. ‘Pannónia’ tenyészetekből nem kaptunk CVA-negatív eredményt, csak megelőző hőkezeléssel kombinálva, ekkor 20 ill. 27%-ban lettek vírusmentesek a növények a zidovudint 50 ill. 25 mg/l koncentrációban alkalmazva. ‘Magyar kajszi’ esetében is megnövelte a vírusmentesítés hatékonyságát a megelőző hőkezelés 25 mg/l zidovudin esetén 13%-ról 80%-ra, és 50 mg/l-nél 8%-ról 50%-ra.

A 2 különböző vírussal fertőzött ‘Magyar kajszi’ tenyészetek a zidovudin kezelés (25 ill. 50 mg/l) hatására LChV-1-től 40 ill. 37%-ban, míg PPV-től 87 ill. 67%-ban mentesek lettek.

A ribavirin kezelés eredményeként a ‘Pannónia’ növények 93%-a vírusmentes lett, azonban ezzel a kezeléssel egyidejűleg fenntartott kontroll növényekben sem volt kimutatható a vírus. A 2 különböző vírussal fertőzött ‘Magyar kajszi’ tenyészetekből nem sikerült vírusmentes növényt létrehozni az I. ribavirin kezeléssel,

azonban a II. kezelés eredményeként a kisebb koncentrációjú ribavirin hatására a növények 20%-a LChV-1- és 100%-a PPV-mentes lett. Mindkét vírustól a zidovudin 25 mg/l kezelés eredményezett legnagyobb mértékű, 40%-os mentességet, a ribavirin (25 mg/l) mindössze 20%-ban.

PNRSV fertőzött meggy tenyészetén végzett in vitro vírusmentesítési kísérletek eredményei

A PNRSV-vel fertőzött 'Éva' meggy hajtástenyészeteinek kemoterápiás kezelése során a növények túlélése 80-100% között alakult. A zidovudin (25, ill 50 mg/l) 80-93% közötti túlélést, míg a hőkezeléssel kombinált zidovudin kezelések 100%-os túlélést eredményeztek. A ribavirin kezelés végeztével nem figyelhattunk meg növénypusztulást egyik koncentrációban sem.

A kemoterápián átesett meggytenyészetek 73-93%-a lett vírusmentes. A zidovudin (25 ill. 50 mg/l) 83 ill. 86%-ban PNRSV-mentes növényt eredményezett és hőkezeléssel kombinálva is nagy arányban (73 ill 93%) mentes növényeket kaptunk. A ribavirin mindkét koncentrációban 93% vírusmentes növényt eredményezett. Meg kell jegyezni, hogy a meggyen végzett kezelések minden kontroll csoportjában nagy volt a vírusmentes növények száma.

A vírusfertőzött *Prunus* hajtástenyészeteken végzett vírusmentesítési kísérletek eredményei az idő függvényében

A kontroll csoportokban kapott negatív minták kapcsán felmerült a spontán vírusmentessé válás kérdése. A kezelések elvégzése és vírusesztelése után minden növényfajtából 10-10 kezeletlen kontroll növényt (4 hetes felszaporított, teljes hajtás csokor, alapi kallusz nélkül) leteszteltünk. A kajszi és szilva tenyészetek indításától számítva 5,5, a meggy indítása után 3,5 évvel végzett RT-PCR eredményeként 100%-ban negatív mintákat kaptunk vírustól és növény fajtától függetlenül. A jelenség magyarázatra szorult, ezért megvizsgáltuk a nevelési körülményeket, ami a háttérben húzódott, illetve a kísérleteket követő vírusesztek elvégzésének időpontját.

A kezeletlen kontroll 'Besztercei Bt. 2' szilvában a kezdeti CVA fertőzés nem csökken 4 év elteltével, az első évben vizsgált

hajtástenyészetek 25%, 4 év után 7%-a volt CVA-mentes. A szilván végzett vírusmentesítési kísérletek ezért összevethetők, és megerősíthető a ribavirin nagyobb hatékonysága a zidovudinnal szemben. A hőkezelésnek önmagában (hőkezelt kontroll csoport) nem volt vírusmentesítő hatása, zidovudinnal (25 mg/l) kombinálva 2x-esére nőtt a vírusmentes növények aránya (20-ról 40%-ra) a zidovudin kezeléshez képest. 5,5 év elteltével azonban mind a 10 tesztelt kontroll növény negatív lett.

A két vírussal komplexen fertőzött 'Magyar kajszi' vizsgálatokor azt figyeltük meg, hogy a kezdeti vírusfertőzöttség az idő előrehaladtával csökken. LChV-1 esetében 1 év után 0%, 2 év után 60%, 4 év után 80%, míg PPV esetében 1 év után 0%, 2 év után 20%, 4 év után 93% a vírusmentesség aránya. 5,5 év elteltével mind a 10 tesztelt kontroll növény mindkét vírusra negatív lett. A mentesítési kísérletek eredményei ezért nehezebben értékelhetők a kontrollok egyre nagyobb arányú mentessége miatt. A kisebb koncentrációjú ribavirin kezelés hatása azonban így is szembetűnő, a 2 év után végzett kísérletben a kontroll 20% mellett 100% mentes növényeket eredményezett. A komplex fertőzött kajsziiban a két vírus ellenállósága közti különbség is megmutatkozik, a PPV hatékonyabban eliminálódott ribavirinnel (100%), mint a LChV-1 (20%).

A kezeletlen CVA-s 'Magyar kajsziiban' 3,5 év elteltével 11% volt a vírusmentesség aránya, a 4 év után végzett kísérletben a hőkezelt kontrollok 20%-a volt vírusmentes, így itt a hőkezeléssel kombinált kemoterápia jelentős hatékonyságnövelése (25 mg/l-nél 13-ról 80%, illetve 50 mg/l-nél 8-ról 50%) igazolható. 5,5 év elteltével azonban itt is mind a 10 tesztelt kontroll növény negatív lett.

'Pannónia' kajsziiban a 2 év után végzett kísérlet kontroll növényei még 100%-ban fertőzöttek voltak, az egyidejűleg végzett hőkezeléssel kombinált kemoterápiás kísérlet hőkezelt kontrollojaiban 33%-ra nőtt a vírusmentesség. 4 év elteltével a kontroll csoportban már nem lehetett kimutatni a CVA-t, ezért a 4 éves ribavirin kezeléssel kapott 93% vírusmentesség ribavirinnek tulajdonítható eredménye kétséges. Az 5,5 éves kontrollok egyöntetű negatív tesztje tovább erősítette a megfigyelést, miszerint a 'Pannóniában' jelentősen lecsökkent a CVA-fertőzöttség az idő előrehaladtával.

A PNRSV-fertőzött ‘Éva’ meggy hajtástenyészeteiben már 1,5 év után is kicsi volt a vírusfertőzöttség mértéke, amiből arra következtethetünk, hogy a PNRSV könnyen eliminálható vírus, spontán, már a mikroszaporításban tartás következtében is képes eltűnni a növényből.

Új tudományos eredmények

- Sikerült steril hajtástenyészeteket létesítenem olyan kajszi és szilva növényekből, melyek korábban Magyarországon csak cseresznyékből kimutatott vírusokkal voltak megfertőződve. Molekuláris módszerrel igazoltuk bennük a vírusok jelenlétét.
- CVA-fertőzött szilvából *in vitro* hőkezelést követő hajtáscsúcs-tenyésztéssel sikeresen regeneráltam vírusmentes *in vitro* növényt.
- Kimutattuk, hogy ribavirin (25 mg/l) kezeléssel 100%-os hatékonysággal eltávolítható volt a CVA ‘Besztercei Bt. 2’ szilvából és a PPV ‘Magyar kajsziából’ jó túlélési arány mellett, és rövidebb idő alatt, mint a hőkezeléssel kombinált hajtáscsúcs-tenyésztéssel.
- Fertőzött *Prunus* hajtástenyészetekből elsőként távolítottam el a CVA-t és a LChV-1-et.
- Kimutattuk, hogy a ‘Pannónia’ kajszi CVA-fertőzése, valamint a két vírussal (PPV+LChV-1) komplexen fertőzött ‘Magyar kajszi’ kezdeti vírusfertőzöttsége *in vitro* kultúrában csökken az idő előrehaladtával. Hosszú távú (>5 év) *in vitro* rendszerben tartás eredményeként a növények 100%-a vírusmentessé vált (PCR-rel ellenőrizve), minden vizsgált, kezdetben fertőzött növény faj- és fajta és valamennyi vírus esetében.

Következtetések és a javaslatok

A gyakorlat szempontjából egy kórokozómentesítési program célja az egészséges, kezdeti vírusjelenléttől mentes *in vitro* növény létrehozása, amiből már mikroszaporítással fel lehet szaporítani olyan növényanyagot, amelyből gyökeresítés után üvegházba kiültethető, majd akklimatizált *in vivo* növény állítható elő. Minden fázisban (*in vitro* szaporítás, gyökeresítés, akklimatizáció) ráhagyással kell számolni, mert nem várható 100%-os túlélés. Már egyetlen igazoltan vírusmentes hajtáscsokor is elegendő lehet, hogy az adott növényfajtát a certifikációs rendszeren való átfutása után a központi törzsültetvénybe be lehessen vonni az előírt ismétlésszámmal (ált. 4 egyed/fajta) és fent lehessen tartani egészséges szaporítóanyag-előállítás alapjául.

A vírusmentesítési kísérletek során minden növényfajtból kaptunk a kezdeti vírusfertőzéstől mentes egyedet. A módszerek összehasonlítása alapján nagy eltérések tapasztalhatók az egyes kísérleti csoportokban. A csoportokban lévő kis mintaszámok (10-15 db), a mikroszaporítás sajátosságai és az időbeli eltérések a kísérletek között a statisztikai elemzést nem teszik lehetővé vagy feltétlenül szükségessé. Fontos lehet ezért a jövőben a legjobb eredményt adó kezelések megismétlése nagyobb mintaszámon, és az eredmények statisztikai eszközökkel történő verifikálása.

Munkám alapján a kemoterápia alkalmas módszernek bizonyul csonthéjas gyümölcsfajok vírusmentesítésére. A zidovudin és a ribavirin is kisebb (25 mg/l) koncentrációban javasolt a tapasztalt nagyobb arányú mentesség és az esetleges fitotoxikus hatások minimalizálása érdekében. Előzetes hőkezeléssel kombinálva növelhető a mentesítési hatékonyság, így kevesebb kiindulási anyagból, kevesebb teszteléssel, rövidebb idő alatt juthatunk vírusmentes növényhez. Szilva növényben antivirális vegyszer használata nélkül, hőkezelést követő hajtáscsúcs-tenyésztéssel is nagy arányú vírusmentes növény érhető el. Itt azonban sok a veszteség, nagymértékű a pusztulás, gyenge és lassú a regeneráció, de nem elhanyagolható a kemoterápiás szerek egészségre gyakorolt kockázata sem. Kajszi tenyészetén is érdemes lehet ezért a korábban

említett nagyobb hajtáscsúcs és hosszabb hőkezelési idő eredményes kombinációját kidolgozni. Fontosnak tartom a hosszú távú fenntartás során kapott vírusmentes diagnosztikai eredményeket megemlíteni. A több éves mikroszaporítás mint vírusmentesítő módszer elsőre nem tűnik gyakorlatias lehetőségnek, azonban előfordulnak hőre, hajtáscsúcsból történő regenerációra, valamint antivirális vegyszerekre érzékeny növények, amelyek kezelése nem kivitelezhető, így igaz, hogy sok évbe beletelhet, de mégis eredményes lehet ilyen esetekben is a mentesítési eljárás.

A szerzőnek az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációi

Impakt faktoros vagy Q1-Q2 folyóiratban közölt cikkek

Szabó, L. K., Desiderio, F., Kirilla, Z., Hegedűs, A., Várallyay, É., & Preininger, É. (2024). Elimination of cherry virus A from *Prunus domestica* ‘Besztercei Bt. 2’ using in vitro techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 157(2), 45. [Q1, IF: 2,3]

Szabó, L. K., Desiderio, F., Kirilla, Z., Hegedűs, A., Várallyay, É., & Preininger, É. (2024). A mini-review on in vitro methods for virus elimination from *Prunus* sp. fruit trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 156(2), 42. [Q1, IF: 2,3]

Baráth, D., Jaksa-Czotter, N., Molnár, J., Varga, T., Balássy, J., Szabó, L. K., ... & Várallyay, É. (2018). Small RNA NGS revealed the presence of Cherry virus A and Little cherry virus 1 on apricots in Hungary. *Viruses*, 10(6), 318. [Q2, IF: 3,8]

Lektorált folyóiratban megjelent tudományos közlemények

Szabó Luca Krisztina, Kirilla Zoltán, Preininger Éva (2019). Csonthéjasok vírusmentesítése in vitro technikákkal (irodalmi áttekintés) *KERTGAZDASÁG* 51(2)

Baráth, D., Czotter, N., Bükki, A., Oláh, B., Balássy, J., Varga, T., ... Várallyay, É. (2018). Új csonthéjasokat fertőző vírusok kimutatása Magyarországon. *Georgikon for Agriculture: A Multidisciplinary Journal in Agricultural Sciences*, 22(1), 28–33.

Egyéb közlemény

Preininger, É., Kirilla, Z., & Szabó, L. (2020). A mikroszaporító laboratórium, 2012-től napjainkig. In *70 év a gyümölcs- és dísznövénytermesztés szolgálatában Budatétény-Érd* (pp. 159–164).

Konferencia kiadványok

Szabó, L. K., Francesco, D., Kirilla, Z., Várallyay, É., & Preininger, É. (2023). Kísérletek csonthéjasok vírusmentesítésére *in vitro* technikákkal. In XXIX. Növénynevelési Tudományos Napok (p. 152).

Szabó, L. K., Desiderio, F., Preininger, É., & Várallyay, É. (2022). The effect of *in vitro* chemotherapy and heat treatment used for virus elimination from stone fruit species. In „FIBOK 2022”: Fiatal Biotechnológusok V. Országos Konferenciája (p. 43).

Baráth, D., Jaksa-Czotter, N., Varga, T., Bükki, A., Balássy, J., Oláh, B., ... Várallyay, É. (2019). Kajszi és őszibarack ültetvény vírusdiagnosztikai vizsgálata kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával. In 65. Növényvédelmi Tudományos Napok (p. 57).

Dániel, B., Nikoletta, J.-C., Tünde, V., Luca, S., Zoltán, K., Éva, P., & Éva, V. (2019). Virome of Hungarian peach plantations identified by small RNA NGS. In Hungarian Molecular Life Sciences 2019: Programme and Books of abstracts (p. 326).

Alexandra, B., Dániel, B., Nikoletta, C., Júlia, B., Tünde, V., Luca, S., ... Éva, V. (2018). Detection of new, cherry infecting viruses in apricot in Hungary. In Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája “FIBOK 2018”: Abstract Book (p. 115).

Dániel, B., Alexandra, B., Dávid, C., Nikoletta, C., Luca, K. S., Zoltán, K., ... Éva, V. (2018). Detection of CVA, LChV1 and PLMVd in *Prunus* spp in Hungarian stock collections. Power of Viruses : Programme and Abstracts Zagreb, Horvátország : Croatian Microbiological Society (2018) p. 99 , 1 p.

Luca, K. S., Nikoletta, C., Dániel, B., Zoltán, K., Attila, H., Éva, V., & Éva, P. (2018). Establishment of phytoplasma and virus infected *in vitro* shoot cultures of apricot cultivars. In Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája “FIBOK 2018”: Abstract Book (p. 130).