

# **Diplomadolgozat**

**Juhász Hedvig Ágnes**  
**Növényorvos**

**Gödöllő**  
**2023**



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**  
**Szent István Campus**  
**Növényorvos Msc Szak**

**Egy új, CH2 törzsbe tartozó Pepino mozaik vírus izolátum  
megjelenése Magyarországon**

**Belső konzulens: Dr. Turóczy György**  
**egyetemi docens**

**Külső konzulens: Dr. Almási Asztéria**  
**tudományos főmunkatárs**  
**Hun-Ren ATK**  
**Növényvédelmi Intézet**

**Készítette: Juhász Hedvig Ágnes**  
**EElQPO**  
**nappali**

**Intézet/Tanszék:**

**Növényvédelmi Intézet Integrált Növényvédelmi Tanszék**

**Gödöllő**  
**2023**

# TARTALOMJEGYZÉK

1	Bevezetés .....	2
2	Célkitűzések .....	3
3	Irodalmi áttekintés .....	4
3.1	A paradicsomot fertőző fontosabb vírusok.....	4
3.2	PepMV elterjedése.....	5
3.3	A PepMV taxonómiai helye és genomszerveződés .....	6
3.4	A PepMV törzsei és jellemzése .....	8
3.5	Biológiai tulajdonságok .....	9
3.5.1	A PepMV gazdanövényköre .....	9
3.5.2	Makroszkópos tünetek paradicsomon .....	10
3.5.3	A vírus terjedése .....	12
3.5.4	A vírus elleni védekezés lehetőségei.....	13
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	16
4.1	Tesztnövények.....	16
4.2	Kísérleti módszerek.....	16
4.2.1	Növények fertőzése .....	16
4.2.2	Össznukleinsav kivonás .....	16
4.2.3	Komplementer DNS szál (cDNS) készítése, reverz transzkripció .....	17
4.2.4	Polimeráz láncreakció és agaróz gélelektroforézis.....	17
4.2.5	Szekvenálás és szekvencia analízis .....	18
5	Eredmények.....	20
5.1	Tesztnövényvizsgálatok.....	20
5.2	Molekuláris vizsgálatok.....	25
6	Következtetések .....	28
7	Összefoglalás.....	30
8	Köszönetnyilvánítás .....	32
	Irodalomjegyzék .....	33
	Ábrák és táblázatok jegyzéke.....	37
	Nyilatkozatok .....	38

# 1 BEVEZETÉS

A növényeket fertőző vírusok világszerte súlyos károkat okoznak a mezőgazdaságban. A növényi vírusos betegségek, melyek leginkább az intenzív kertészeti gyakorlat mellett termesztett zöldségeket érintik (Desbiez et al., 2020), jelentős terhet jelentenek a növényegészségügyben és a mezőgazdaságban. Egyes kórokozók csak néhány növényfajon ismertek, más vírusok azonban gazdanövények meglehetősen széles körére, sok növény család több száz fajtájára kiterjedhetnek. Ha a széles gazdanövénykör nagy patogenitással, erős alkalmazkodóképességgel és magas epidemiológiai potenciállal párosul, akkor olyan vírusok jönnek létre, amelyek ellen a védekezés csak összetett stratégiákkal lehet eredményes. Ezek közé sorolható a pepino mozaik vírus (*Pepino mosaic potexvirus*, PepMV) is, amely egyre nagyobb jelentőséggel bír és komoly fertőzéseket okoz a paradicsomtermesztésben.

Az epidemiológiában nem lehet figyelmen kívül hagyni, ha egy új gazdanövény fertőződésének előfordulási gyakorisága megnövekszik. Egy vírus megjelenése több ökológiai és genetikai tényezőt is magában foglal. A járványok kialakulását három fázisra lehet felosztani. Az első fázisban a vírus találkozik az új gazdaszervezettel, a vírus gyakran gyomnövényekről terjed termesztett rokonaikra. A második fázisban a vírus alkalmazkodik az új gazdaszervezethez, ez a folyamat a vírus genetikai változásait is magában foglalja. Végül a harmadik fázisban a járvány dinamikája megnövekedett terjedési sebességhez vezet. A különböző fázisok ismerete elengedhetetlen az előrejelzéséhez és megelőzéséhez szükséges intézkedésekhez (Moreno-Pérez et al., 2014).

A paradicsomot (*Solanum lycopersicum* L.) az egyik legfontosabb zöldségnövényként tartják számon, világszerte termesztik. A PepMV jelenleg az egyik legveszélyesebb kórokozója a globális kereskedelemben termesztett paradicsomnak. Először 1974-ben Peruban azonosították ezt a potexvírust pepino növényeken. Európában 1999-ben, Hollandiában fedezték fel üvegházi körülmények között termesztett paradicsomnövényeken, és azóta világszerte elterjedt a kórokozó. Jelenleg öt PepMV törzset/genotípust tartanak számon (Warman, B. 2017).

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

A PepMV hazánkban is elterjedt a paradicsom termesztésben, mely potenciálisan jelentős gazdasági károkat okozhat a gazdálkodók számára. Európában majd Magyarországon is először az EU törzs jelent meg, mostanra azonban több európai országban is a CH2 törzs vált dominánssá. Ezek a törzsek gyakran együttesen is előfordulnak. Hazánkban még nem történt meg annak a felmérése, hogy jelenleg melyik törzs milyen arányban van jelen a fertőzött állományokban. A megelőzés alapja a PepMV elleni védekezés a keresztvédettségen alapuló vakcinálás. Ezért fontos tudni, mely törzsek ellen kell védekezni, illetve mely törzsek elleni vakcinát kell beszerezni: 1 vagy 2 komponensűt, amelynek okszerű alkalmazása hazánkban is releváns.

Diplomamunkám során célul tűztük ki:

- paradicsomról gyűjtött vírus izolátumok jellemzését, tesztnövény- és molekuláris vizsgálatát,
- filogenetikai törzsfák készítését
- vírustörzsek azonosítását.

## 3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

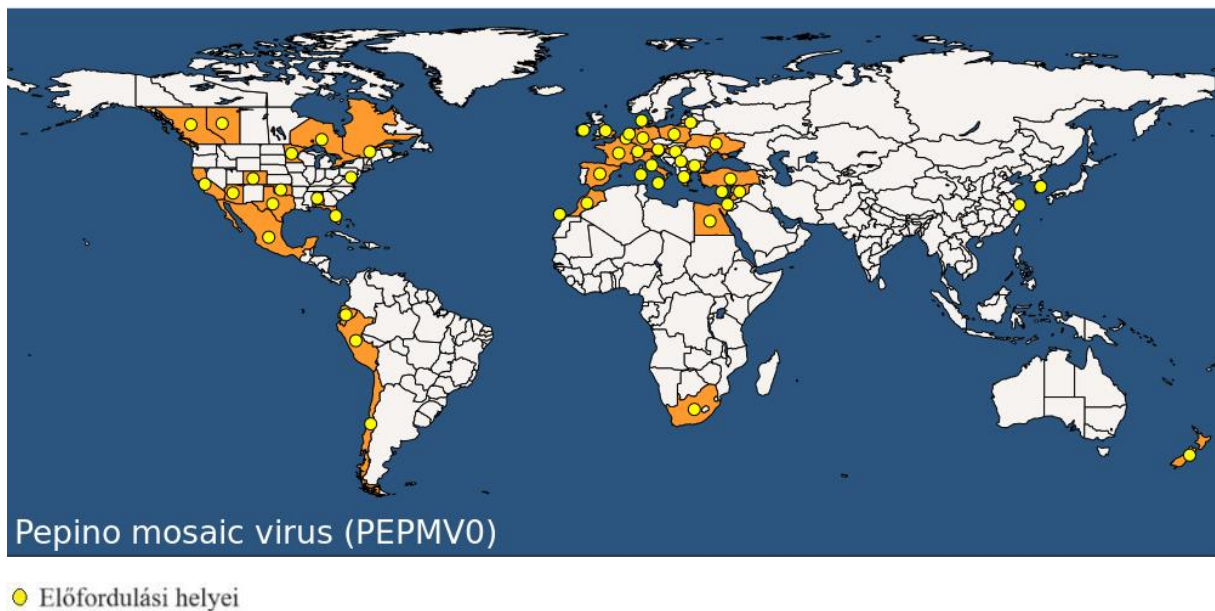
### 3.1 A paradicsomot fertőző fontosabb vírusok

A paradicsom termesztésben jelentősebb, leggyakoribb vírusok a tobamovírusok, a tripsz által terjesztett paradicsom foltos hervadás vírus (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV), a levéltetvekkel terjedő uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV), a burgonya Y vírus (*Potato Y virus*, PVY). A parietaria foltos vírus (*Parietaria mottle virus*, PMoV), pollen által terjesztett, üvegházi paradicsomban is gyakori volt Olaszországban és Spanyolországban, Magyarországon még nem írták le előfordulását. Az üvegházi molytetű (*Bemisia tabaci*) terjedésével együtt az általa terjesztett vírusok közül is egyre több faj megjelenik Európában és a mediterrán országokban, különösen a begomovírusok (pl. paradicsom sárga levélcsavarodás vírus, TYLCV és New Delhi vírus, ToLCNDV). Egyelőre ebben a régióban kevésbé jelentősek a krinivírusok képviselői pl. uborka sárga törpülés vírus (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV), uborka klorotikus sárgulás vírus (*Cucurbit chlorotic yellows virus*, CCYV), és a paradicsomot fertőző paradicsom sárgulás vírus (*Tomato chlorosis virus*, ToCV). Mechanikai úton és magvakkal terjedő vírusok a *Tobamovirus* nemzetségből a paradicsom mozaik vírus (*Tomato mosaic virus*, ToMV). Újabban terjed és nagyon komoly károkat okoz Európában a paradicsom barna termésráncosodás vírus (*Tomato brown fruit rugose virus*, ToBRFV) (Salem et al., 2016). A pepino mozaik potexvírus (*Pepino mozaik virus*, PepMV) világszerte és hazánkban is megjelent, különösen üvegházi körülmények között, a magvak vagy szaporítóanyag kereskedelme révén, súlyos károkat okoz.

Mivel a víruspopulációk egyes esetekben gyors változásokon, mutációkon eshetnek át, fontos az agronómiai jelentős régiók és kiemelt területek rendszeres virológiai felmérése a vírusok genetikai diverzitása tekintetében. Ez naprakész és pontosabb becslést tesz lehetővé a mezőgazdaságot érintő kockázatok és eredményes védekezési stratégiák alkalmazásában (Desbiez et al., 2020).

### 3.2 PepMV elterjedése

A pepino mozaik vírus a növényi vírusok között rövid időn belül jelentős mezőgazdasági problémákat okozott. A vírust pepinón (*Solanum muricatum* Ait.) azonosították először Peruban 1974-ben (Jones et al., 1980), paradicsomról azonban csak 1999-ben írták le Hollandiában, üvegházi körülmények között termesztett növényekről (van der Vlugt et al 2000). 1999 óta a vírus gyorsan elterjedt világszerte és Európában is, és fontos vírusbetegséggé vált a paradicsom termesztésben. Új vírustörzseket írtak le, amelyek különböznek az eredeti pepino izolátumtól. Ezek az új törzsek jelentős szerepet játszottak a vírusbetegség jelentőségének növekedésében (van der Vlugt és Stijger, 2021).



**1. ábra:** PepMV előfordulása a világon (forrás: EPPO)

A vírus Ausztrália kivételével az összes kontinensen megtalálható: Afrikában, Ázsiában, Észak- és Dél -Amerikában (1. ábra) (EPPO). Európa nagyrészen szintén elterjedt már a vírus: Ausztria, Belgium, Bulgária, Ciprus, Dánia, Franciaország, Németország (Lesemann et al., 2000), Görögország, Magyarország, Írország, Izrael, Olaszország (Roggero et al., 2001), Litvánia, Marokkó, Hollandia, Lengyelország, Szerbia, Spanyolország (Jordá et al., 2001), Svájc, Törökország, Ukrajna, Egyesült Királyság (Wright és Mumford, 1999).

Hazánkban 2004-ben Kiskunfélegyháza térségében üvegházi hajtású paradicsom ültetvényben izolálták először az addig itthon még ismeretlen PepMV-t (Forray et al., 2004).

### 3.3 A PepMV taxonómiai helye és genomszerveződés

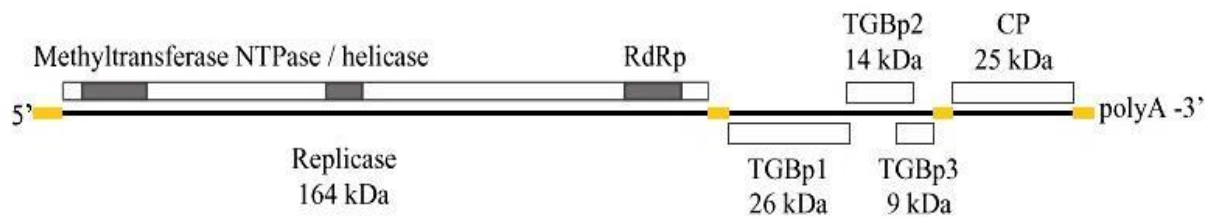
A PepMV az *Alphaflexiviridae* családba tartozik (korábban *Flexiviridae* család) a *Tymovirales* renden belül (Adams et al., 2004). A család elnevezését azért kapta, mert tagjai hajlékony, fonalas virionokkal rendelkeznek, melyek 470-800 nm hosszúságúak és 13 nm átmérőjűek, osztatlan genomját egy pozitív egyszálú RNS alkotja, amely 5,5-9 kb (Kreuze et al., 2020).

A PepMV a *Potexvirus* nemzetség tagja. A nemzetség vírusainak genomja egy pozitív egyszálú RNS-ből áll, mely általában 5 nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz. Az RNS-dependens RNS polimeráz (RdRP), a köpenyfehérje (CP) egy szubgenomiális (sg) RNS-ről, a mozgási fehérjék (a három gént blokkoló fehérje) pedig az RdRP génnel átfedő génből vagy további sgRNS-ekből expresszálódnak. A három gént blokkoló fehérje (TGB) a növényen belüli sejtről-sejtre terjedést és a hosszútávú mozgást segíti elő (Blystad et al., 2015).

A potexvírusokhoz sorolt jelentősebb vírusok: tulipán X vírus (*Tulip virus X*, TVX), nárcisz mozaik vírus (*Narcissus mosaic virus*, NMV), papaja mozaik vírus (*Papaya mosaic virus*, PapMV), burgonya X vírus (*Potato virus X*, PVX) (Park et al., 2013).

A PepMV genomja 6410 nt hosszúságú. Az ORF 1 az RdRp-t kódolja, jellegzetes metiltranszferáz (cap), NTP-kötő, helikáz és polimeráz motívumokkal rendelkezik. Az ORF 2-4 átfedő génei hármasszámú génblokkba szerveződnek, a PepMV tripla génblokk fehérjéket kódolja (TGBp1, TGBp2 és TGBp3). Az ORF 5 a kapszid fehérjét (CP, 22-27 kDa méretű) kódolja. Két rövid, nem átíródozó régió (UTR) szegélyezi a kódoló régiókat, és a genomi RNS 3' végén van egy poliadenilált (poliA) farok (5,9–7,0 kb) (Adams et al., 2004; Aguilar et al., 2002; Moreno-Pérez et al., 2014).





**2. ábra:** A PepMV genomfelépítése (forrás: Hanssen és Thomma, 2010)

## Vírus replikáció

A növényvírusok által kódolt néhány fehérjének fontos szerepe van a gazda-kórokozó kapcsolat kialakításában/meghatározásában, a gazdanövényekben történő vírus replikációban és a sejtről-sejtre terjedésben, valamint a hosszútávú mozgás szempontjából is. A gazdanövény sejtfalalkotóit és a növényi RNS-t használják fel a vírusok a replikációjukhoz és mozgásukhoz, de mivel a növényekben hiányzik az RNS-függő RNS polimeráz (RdRp, replikáz), a növényi RNS vírusoknak szükségük van saját RNS polimerázukra a vírus RNS szintéziséhez növényekben. A vírus replikáz a gazdasejt membránjához kapcsolódik, és átrendezi azt, így létrejön a megfelelő környezet a vírus RNS replikációjához (Mackenzie, 2005; Salonen et al., 2004; Salonen és Zhang, 2008; Schwartz et al., 2004). A vírusgenom replikációja egy vírusreplikációs komplex (VRC) kialakulásával indul, amely tartalmazza a vírus RNS genomot, a vírus replikáz és a gazdafaktorokat (a gazdasejt membránja). Miután a vírus RNS-t a VRC szintetizálja, a virionnak a sejtről-sejtre való terjedésére és a virion összeállítására van szüksége ahhoz, hogy a vírusfertőzés szisztemizálódjon a növényekben. A mozgás és az összeszerelés megköveteli a vírus mozgási fehérjék és a köpenyfehérje (CP) asszociációját specifikus gazdasejt-faktorokkal. Ezek a vírusfehérjék avirulencia faktorként (Avr) működhetnek, mint effektorok a gazdaszervezet védekezésével kapcsolatos sejtfehérjék vagy molekulák indukálásával a vírusfertőzés kezdeti szakaszában. Ezért az a növényi víruselemek és a gazdasejt-faktorok közötti kölcsönhatás különbsége a gazdanövényekben a vírus életciklusának és a gazdaszervezet vírusfertőzésre adott válaszána kritikus aspektusa. A vírusfertőzés és a gazdaszervezet védekező mechanizmusait tanulmányozták a potexvírus csoportba tartozó növényi RNS vírusok esetében is.

### 3.4 A PepMV törzsei és jellemzése

A vírus a tünetek széles skáláját idézi elő a paradicsomnövényekben. A PepMV-vel fertőzött növények terméstünetei gyakran a piaci értékesíthetőségének a csökkenéséhez vezetnek. A PepMV fertőzés tünetmentes is lehet, ami megnehezíti a betegség pontos diagnosztizálását. A PepMV meglehetősen fertőző, mechanikai úton könnyen terjed, és képes életben maradni természetberendezések felületein, szerszámokon, valamint a dolgozók ruházatán. Ez azt jelenti, hogy a paradicsomtermesztésben alkalmazott gyakorlati megoldások a vírus gyors elterjedését eredményezhetik az üvegházi környezetben és más természetberendezésekben, valamint szabadföldi körülmények között is. Alapvető fontosságú, hogy a termelők képesek legyenek azonosítani a PepMV fertőzést az állományukban, hogy eleget tudjanak tenni a szigorú higiéniai protokoll elvégzésének. Ennek célja, hogy megakadályozzák a PepMV terjedését a nem fertőzött növényeknél (Warman, B. 2017).

Jelenleg öt PepMV törzset/genotípust jellemeztek; az eredeti perui (LP) (Jones et al., 1980) törzset, az európai (EU) törzset, az észak-amerikai (US1/CH1) törzset, a chilei-2 (CH2) törzset és a perui vadon élő paradicsomban nemrégiben felfedezett PES törzset. Európában kezdetben a PepMV európai populációja genetikailag homogén volt. Az EU genotípusba tartozó izolátumok dominánsak voltak a víruspopulációban, ami igazolja a közös eredetet. A 2005–2014 közötti időszakban az európai országok helyzete megváltozott, és az EU genotípust szinte teljesen felváltották a CH2 genotípust képviselő izolátumok. Jelenleg az EU izolátumok szórványosan megtalálhatók Európában és Észak-Amerikában, főként CH2 genotípusú izolátumokkal kevert fertőzésekben figyelték meg. Több PepMV törzs együttes fertőzését is megfigyelték. A kevert PepMV fertőzések gyakran súlyosabb betegségi tüneteket váltanak ki (Warman, B. 2017).

A PepMV törzsek a paradicsomon okozott tünetekben is különböznek. A fertőzés kezdeti szakaszában a különböző levéltünetek és a termés márványosodása a paradicsom PepMV-fertőzésével együtt járnak. Mivel a levél- vagy csúcsi tünetek általában enyhék szoktak lenni, a fertőzés után csak rövid ideig maradnak fenn, a termés elszíneződését általában a PepMV-fertőzés legsúlyosabb következményének tekintik (Roggero et al., 2001; Soler et al., 2000). Mindazonáltal az új PepMV törzsek megjelenése óta a tünetek súlyossága fokozódni látszik,

mivel nemcsak a gyakori levél- és csúcsi tünetek válnak tartósabbá és súlyosabbá, hanem új tünetek is megfigyelhetők (Hanssen et al., 2008; Spence et al., 2006). Korábban nem figyeltek meg összefüggést a különböző PepMV genotípusok és a tünetek kifejeződésének súlyossága között a fertőzött paradicsomnövényekben (Hanssen et al., 2008; Pagán et al., 2006), azonban két genotípussal való együttes fertőzés súlyosabb tüneteket eredményezhet (Hanssen et al., 2008). A paradicsomnövényekben kiváltott tünetek súlyossága és jellege izolátumonként, sőt ugyanazon genotípuson belül is eltérő lehet (Hanssen et al., 2009).

Az elmúlt években számos üvegházban azonosították a sárgulást okozó patotípust Lengyelországban (Pospieszny et al., 2003), Belgiumban, Hollandiában és Franciaországban.

A PepMV izolátumok genomdiverzitására jellemző, hogy a törzsek között az RNS-szekvencia azonossága 78% és 95% között van. Ezek a törzsek az eredeti perui genotípus (LP); az európai genotípus (EU); az amerikai US1 genotípus; és a chilei CH2 genotípus (Hanssen és Thomma, 2010).

### **3.5 Biológiai tulajdonságok**

#### **3.5.1 A PepMV gazdanövényköre**

A PepMV gazdaszervezet köre meglehetősen korlátozott, tekintve, hogy a vírus elsősorban a pepinót (*Solanum muricatum* Aiton) és a paradicsomnövényeket fertőzi meg. Laboratóriumi mechanikai inokulációs kísérletek igazolták, hogy a PepMV a *Solanaceae* családba tartozó több növényfajt is megfertőzheti, mint a burgonya (*Solanum tuberosum*), padlizsán (*Solanum melongena*), dohány (*Nicotiana tabacum*). A paprikát nem fertőzi, legalábbis tüneteket nem okoz rajta. Különböző fűszer-, dísz- és gyomnövényeket is fertőzhet: Olaszországban bazsalikomban (*Ocimum basilicum*) és petúniában (*Petunia × hybrida* Hort) is kimutatták. Kimutatták még csattanó maszlagon (*Datura stramonium*), sövényuszulákon (*Calystegia sepium*) valamint európai kunkoron (*Heliotropium europaeum*) (Córdoba et al. 2004). A közelmúltban a vírust Spanyolországban találták meg disznóparéjféléken (*Amaranthaceae*), fekete nadálytőn (*Symphytum officinale*), mályván (*Malva subovata*) és szelíd csorbókán (*Sonchus oleraceus*) (Panno et al., 2021).

### 3.5.2 Makroszkópos tünetek paradicsomon

A fertőzés a levelek és a szárak rendellenes torz és visszamaradt növekedését eredményezi. A paradicsom növényen a látenstől a súlyosig változhatnak a szisztemikus tünetek. Két-három héttel a PepMV fertőzés után figyelhetők meg az első tünetek a paradicsomnövényeknél. A levéltünetek sokfélék lehetnek: mozaikosodás, klorózis, (3.ábra A) sárga szögletes alakú foltok, levélhólyagosodás és a levelek elhalása. A tünetek között szerepelhet még a szárnekrózis is. A termés márványosodása (3. ábra B), foltos érése és torzulása (5. ábra) újabb tüneteket is megfigyeltek pl. levélperzselődést vagy a fiatal levelek öregedését, valamint a termésein megjelenő hegeket (5. ábra). Ez komoly gazdasági veszteséget okoz a paradicsomtermelőknek. Ezek a tünetek általában néhány héten belül eltűnnek. A tünetek megjelenése a fény intenzitásától és a hőmérséklettől is függhet. A tünetek gyakrabban jelentkeznek ősszel és téli hónapokban, amikor a hőmérséklet és a fényszint minimális (Vermunt és Kaarsemaker, 2017). Megfigyelték, hogy 25 °C feletti hőmérsékleten a vírus csak enyhe levéllemez-elváltozásokat vagy tünetmentes fertőzést okoz, míg alacsonyabb hőmérsékleten a tünetek nagyon erősek lehetnek, levél és szár elhalás formájában, akár a növény teljes pusztulásához is vezethet (4. ábra) (Minicka et al., 2015). A későbbi tünetek a levelek foltosságában és a csúcslevelek göndörödésében/csavarodásában nyilvánulnak meg. A gyenge fényviszonyok is kedveznek a tünetek megjelenésének. A fertőzött paradicsom levelei és a termése a vírust nagy koncentrációban tartalmazza. A növények visszamaradhatnak a fejlődésben az egészséges növényekhez képest (<http1>).



**3. ábra:** Tünetes levél és termés (forrás: <http4>)



**4. ábra:** Nekrózis (forrás: <http5>)



**5. ábra:** Márványosodás, nekrotikus foltok és hegek (forrás: <http6>)

### 3.5.3 A vírus terjedése

A vírus mechanikailag könnyen átvihető, így a terjedés a fertőzött növények mechanikai érintkezésével a leggyakoribb. Az elhalt gyökerek is jelentős mennyiségben vírus partikulumokat tartalmaznak, amelyek a taljakkolloidokhoz kötődve újabb fertőzést indukálhatnak. A vírus levéltetvekkal nem terjed. A maggal történő fertőzésre nincs adat, azonban a fertőzött paradicsomból gyűjtött magvak felületén a vírus kimutatható, és fertőzést okozhat. Specifikus transzmissziós vektorokról nem számoltak be (Moreno-Pérez et al., 2014; Soler-Aleixandre et al., 2007).

A gyökérfertőző élősködő gomba, az *Oplidium virulentus*, amely több fertőzés átvitelében is szerepet játszik, a PepMV terjedését is elősegíti (Alfaro-Fernández et al., 2010). Emellett a poszméheket is megvizsgálták, hiszen üvegházakban rendszeresen alkalmazzák őket a



növények megporzása érdekében. Az eredmények szerint a poszméh hatékony vírusvektora a PepMV-nek (Hanssen és Thomma, 2010).

#### **3.5.4 A vírus elleni védekezés lehetőségei**

A PepMV európai megjelenése óta szerepel az A2 EPPO karanténlistáján. A megfelelő védekezés érdekében integrált védekezésen alapuló stratégiai lépéseket kell végrehajtani. Ilyen intézkedések például egészséges és minősített szaporítóanyag felhasználása; a kórokozó-átvivő rovarok bejutásának megakadályozása védett termőterületekre; üvegházak, ruházat és vágószerszámok tisztántartása, fertőtlenítése. További stratégiai lépések lehetnek a vírus terjedésének a lehető legalacsonyabb előfordulása érdekében a vírusfertőzött növények negatív tőszelekciója; fertőtlenítőszerekkel impregnált szőnyegek elhelyezése az üvegházak bejáratánál; valamint a dolgozók és a munkaeszközök gondosan kialakított beosztása a termesztés területén a nyomon követhetőség érdekében. A talaj szolarizálása is hatékony eszköz. A vetőmag készleteket át kell vizsgálni a vírus lehetséges kimutatása érdekében, mivel csak egészséges szaporítóanyagok használhatóak fel a palántaneveléshez. A megfelelő biztonság érdekében a kórokozók elpusztítására hőkezelést vagy magcsávázást szoktak alkalmazni (http1). A paradicsommagok száraz melegítése vagy fertőtlenítése (0,5–1,0% nátrium-hipoklorit vagy 10% trinátrium-foszfát) hatékony lehet a PepMV eltávolítására a szennyezett magvakból (Panno, S. et al., 2021). A leghatékonyabb védekezésnek minden esetben a megelőzésen kell alapulnia.

A keresztvédettség természetes jelenség, amikor egy gyengített vírustörzsszel történt előzetes fertőzés toleranciát vagy rezisztenciát indukál a növényben egy második vírussal való fertőzés esetén. 1929-ben írta le először McKinney ezt a jelenséget, aki megfigyelte, hogy a dohány mozaik vírus világoszöld mozaikot okozó törzsével szisztemikusan fertőzött dohány növényekben a gyengített vírussal való beoltás után sárga tünetek jelentkeztek. TMV-vel „sárga mozaik törzs” -ek elnyomták (Burgyán és Gáborjányi, 1984). Ezzel szemben az „enyhe sötétzöld mozaikos” törzs nem szorította vissza ezeket a sárga tüneteket a fertőzés során. Sok éven át szerológiai és keresztvédettségi tesztek alkalmaztak rutin módszerként a törzsek közötti kölcsönhatások meghatározására növényi vírusok esetében. A keresztvédettség általános jelenségnek tűnt azoknál a vírusoknál, amelyeknél különböző törzsek fordulnak elő (Gal-On és Shibolet, 2006).

A paradicsomban a PepMV elleni keresztvédelettséget indukáló legyengített PepMV izolátumokkal történő fertőzésnek nem volt negatív hatása a termésmennyiségre vagy minőségre. A keresztvédelem mögött meghúzódó mechanizmus a legyengített vírus által kiváltott RNS-csendesítés lehet. A növényekben az RNS csendesítéséről kimutatták, hogy védekező mechanizmusként szolgál vírusfertőzések ellen. A PepMV elleni keresztvédelem mechanizmusa csak paradicsomnövények esetén működik. A növényeket gyengített izolátumokkal oltják be, így megelőzhető a virulens izolátumok elszaporodása. A keresztvédelettség kialakításához, illetve a vakcina összeállításához szükséges a fő PepMV genotípusok összehasonlítása. A PepMV törzsei európai (EU), perui (LP), chilei (CH2) és észak-amerikai (US1). Az EU-genotípus, ami nagyon hasonlít az LP-genotípusra (95-96%-os azonosság), volt a domináns genotípus Európában. 2004 után a CH2-genotípus vált uralkodóvá. A CH2-genotípusú fertőzések egyedüli fertőzőként, illetve EU-genotípussal kevert fertőzőként is előfordulnak. A CH2-genotípus genetikailag különbözik az EU-genotípustól (79% nukleotid identitás). Az US1-genotípus izolátumai, amelyek genetikailag egyértelműen különböznek az EU-, LP- és CH2-genotípusoktól, Európában csak elvétve fordulnak elő (Vermunt és Kaarsemaker, 2017).

A keresztvédelettség célja, hogy a legyengített vírus izolátumok alkalmazásával megóvjuk a növényeket az agresszívabb vírustörzsekkel szemben. A vakcinázást követően a növények védetté válnak az adott és közeli rokon kórokozókval szemben, így a súlyos tünetek csökkenthetőek vagy ki is védhetőek. A védettség mértéke attól függ mennyire közeli a rokonság a két vírus törzs között (Schenk et al., 2010).

Kereskedelmi forgalomban nincsenek rezisztens paradicsom fajták, keresztvédelettség kialakításával - „vakcinálás” - enyhe tüneteket produkáló törzsekkel (melyek kereskedelmi forgalomban kaphatók) igyekeznek az agresszív vírus izolátumok negatív hatását csökkenteni. A kórokozó elleni védekezéshez vírusmentes vetőmag és szaporító anyag, megfelelő higiénia és megfelelő monitorozás szükséges.

A vakcinázást megelőző jelleggel, fiatal növényeken alkalmazzák. A V10 a Valto által kifejlesztett és a Koppert Biological Systems által forgalmazott természetes növényvédőszer. A V10-et a fertőző PepMV megjelenésének megelőzésére használják. A V10 a pepinó mozaik vírus két enyhe izolátumából (VX1 és VC1) áll, és kettős védelmet nyújt a PepMV EU, a PepMV LP és a PepMV CH2 különböző káros tünetei ellen. A V10 gátolja a PepMV US1(CH1) által produkált tüneteket is. A vírus gyakran növényi nedveken keresztül is terjedhet, valamint



mechanikailag is átvihető. Egy üvegházon belül gyakran két vírus törzs is jelen lehet. A V10 mindkét törzs ellen védelmet nyújt, így a mutáció kevésbé valószínű, és a növények természetes védelemben részesülnek (<http3>).

## 4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Tesztnövények

A kísérleteket Budapesten a HUN-REN ATK Növényvédelmi Intézetben végeztem. A vírus tüneteket mutató paradicsom növény mintákat (levél és bogyó) Szentes térségéből kaptuk az ottani zöldségtermesztőktől a 2022-2023 szezonban.

Munkám során *Nicotiana tabacum cv Xanthi nc* valamint *Solanum lycopersicum cv Moneymaker* tesztnövényeket használtam. A tesztnövényeket fitotronban neveltük 21 °C-on 14 órás megvilágítás mellett, és 16 °C-on a 10 órás sötét periódusban. A növények fertőzése mechanikailag történt 4 leveles korukban.

### 4.2 Kísérleti módszerek

#### 4.2.1 Növények fertőzése

A tesztnövényeket az egyes vírus izolátumokkal mechanikailag fertőztük. A tüneteket mutató növényi szöveteket (paradicsom levél, illetve bogyó) jégen hűtött dörzsmozsárban eldörzsöltük Sörensen-féle foszfát pufferben (a mikrosezéshez 400 mesh karborundum port használtunk) 1:5 w/v arányban, majd üvegspatulával felvittük a tesztnövények alsó 3-4 levelére.

#### 4.2.2 Össznukleinsav kivonás

A fertőzött növények tünetes leveleiből vettünk mintát (2 levélkorongot,  $d= 8-9$  mm), az össznukleinsav kivonást a Sigma-Aldrich Spectrum Plant Total RNA kittel végeztük a gyártó pontos utasításai szerint. Összesen 5 mintával és a kontrollal dolgoztunk. Jégen eldörzsöltük a mintákat dörzsmozsárban majd 500  $\mu$ l lizáló oldatot (amely 1 v/v % merkaptó-etanolt tartalmazott) hozzáadva tovább homogenizáltuk az elegyet. Tiszta Eppendorf csövekbe pipettáztuk az így kinyert szövetnedvet, majd 30 másodpercig vortexeltük. Ezután a termosztátba helyeztük, 56 °C-on 3-5 percig inkubáltuk. Ezt követően szobahőmérsékleten 3

percig centrifugáltuk 13400 rpm-en. A felülúszót rápipettáztuk egy gyűjtőcsőre helyezett filteroszlopra, majd szobahőmérsékleten 1 percig 13400 rpm-en centrifugáltuk. Az átszűrt oldathoz 500 µl binding (kötő) oldatot adtunk majd óvatosan 5x összeforgattuk. Ezek után egy gyűjtőcsőre egy másik binding oszlopot helyeztünk és az oldatot 700 µl-enként rápipettáztuk. Egy percig centrifugáltuk az előzőekhez hasonló módon. Az átszűrt folyadékot előntöttük, majd az oszlopot átmostuk először 500 µl Wash solution 1 mosóoldattal, majd egy perc centrifugálás következett. Ezután 2x mostuk 500 µl Wash solution 2 oldattal. Harminc másodperc centrifugálás után még egy percig üresen centrifugáltuk az oszlopot, hogy nehogy visszamaradjon a mosó folyadék. Végül az oszlopot tiszta Eppendorf csőre helyeztük, rápipettáztunk 50 µl elution (leoldó) oldatot. 1-2 perc várakozás után 1-2 perc centrifugálás következett. Az így kapott össznukleinsavat (TNS-t) -70 fokon tároltuk.

#### **4.2.3 Komplementer DNS szál (cDNS) készítése, reverz transzkripció**

A PCR során a vírusok kimutatására szolgáló, vírus specifikus primerekkel DNS fragmentumokat tudunk felszaporítani, amihez a tisztított RNS-ből előbb cDNS-t kell szintetizálni. A polimeráz lánreakció alkalmazásához a vírus RNS-ekről cDNS-t írtam át az alábbiak szerint:

Összemértünk egy Eppendorf csőben 3 µl-t az adott növényből kivont TNS-ből, 1 µl random hexamer oligonukleotid primert (ThermoFisher Scientific) és 1 µl nukleázmentes steril vizet, hogy a végtérfogat 5 µl legyen. 65 °C-on denaturáltuk az RNS-t 5 percig. A melegítés után 2 percre jégre helyeztük az Eppendorf csöveket és hozzá mértünk 2 µl 5-szörös reverz transzkriptáz puffert (Thermo Scientific), 1 µl 10 mM-os dNTP mixet (Thermo Scientific), 1 µl M-MuLV reverz transzkriptáz enzimet (200 U/µl, Thermo Scientific,) és 0,5 µl RNáz inhibitor (RiboLock), ami gátolja az RNáz aktivitást, így megakadályozza az RNS bomlását. Az elegyet 10 µl végtérfogatra egészítettük ki 0,5 µl nukleázmentes steril vízzel. Végül 42 °C-on inkubáltuk 1 órán át. A kapott cDNS-t -20 °C-on tároltuk.

#### **4.2.4 Polimeráz lánreakció és agaróz gélelektroforézis**

A vírus kimutatására és meghatározására polimeráz lánreakciót alkalmaztunk, amellyel amplifikálni lehet a vírus genomból meghatározott régiókat specifikus oligonukleotid primerek

hozzáadásával. A vírus specifikus primerek a felszaporítani kívánt génszakasz 5' (forward irány) és 3' (reverz irány) végére kapcsolódnak.

A PCR elegyet összemértük egy PCR csőben; 5 µl 10-szeres Taq polimeráz puffert (Thermo Scientific), 3 µl Magnézium-kloridot, 2µl dNTP mixet, 1-1 µl forward és reverz szintetikus oligonukleotid primert, 707 Forward 5'-CACACCAGAAGTGCTTAAAGCA -3' és a 708 Reverz 5'- CTCTGATTAAGTTTCGAGTG-3' melyek az amplifikálandó vírus szekvencia két végével komplementerek, 1 µl Taq polimeráz enzimet (5 U/µl, Thermo Scientific), 36 µl steril vizet. A reakciót Eppendorf Mastercycler gradient készüléken végeztük el.

PCR reakció pontos adatai:

- 95 °C-5 perc (kezdeti denaturáció)

Ciklus:

- 95 °C-1 perc (denaturáció)
- 58 °C-30 másodperc (primer kötés)
- 72 °C-1 perc (lánc hosszabítás) 30-szor ismételve
- 72 °C-5 perc (terminálás)

A PCR termékeket (amplikont) horizontális agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk tovább, a különböző méretű DNS darabokat elválasztva egymástól egy molekula marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific) mellett futtatva, 1%-os agaróz gélen, így megbizonyosodhattunk róla, hogy a kívánt termék megfelelő bázispár hosszúságú lett-e. Így 2 µl PCR terméket, 2 µl kék festéket (Thermo Scientific), 6 µl steril vizet összemértünk, és felvittük a géltre. A gélen lévő DNS-mintázatot UV-transzilluminátor és az AlphaImager géldokumentációs szoftver segítségével (Alpha Innotech) vizsgáltuk.

#### **4.2.5 Szekvenálás és szekvencia analízis**

A PepMV köpenyfehérjét (CP) kódoló gén és a TGB (Tripart Gene Block) fehérjét kódoló gén egy szakaszának nukleotid sorrendjét a tisztított PCR termékből meghatároztuk (Eurofins BIOMI Kft.). Az egyes vírus izolátumok DNS szakaszainak a forward és reverz szekvenciáit illesztettük egymáshoz (Clone Manager 7 szoftver) és összehasonlítást végeztünk a MEGAX szekvenciaelemző program segítségével.

## **Filogenetikai törzsfa elemzés**

Az izolált vírusok és az NCBI Génbankból választott vírusszekvenciák TGB-CP-t kódoló szakaszának nukleotid sorrend, illetve az abból képzett aminosav sorrend alapján filogenetikai elemzést végeztünk. Maximum Likelihood törzsfát készítettünk a MEGAX program segítségével, 1000-szeres bootstrap-et alkalmazva (Kumar et al., 2018; Tamura és Nei 1993).

## 5 EREDMÉNYEK

### 5.1 Tesztnövényvizsgálatok

A Szentesről származó paradicsom mintákról, a tüneteket mutató növényi részekből (6. ábra) készült homogenátummal fertőztük a tesztnövényeket, majd több héten keresztül figyelemmel kísértük a tünetek alakulását. A 6. ábra A és B képen megfigyelhető a termés márványosodása a bogyó egész felületén. A C képen terméstorzulás, a felület egyenetlensége látható a még éretlen termésen.



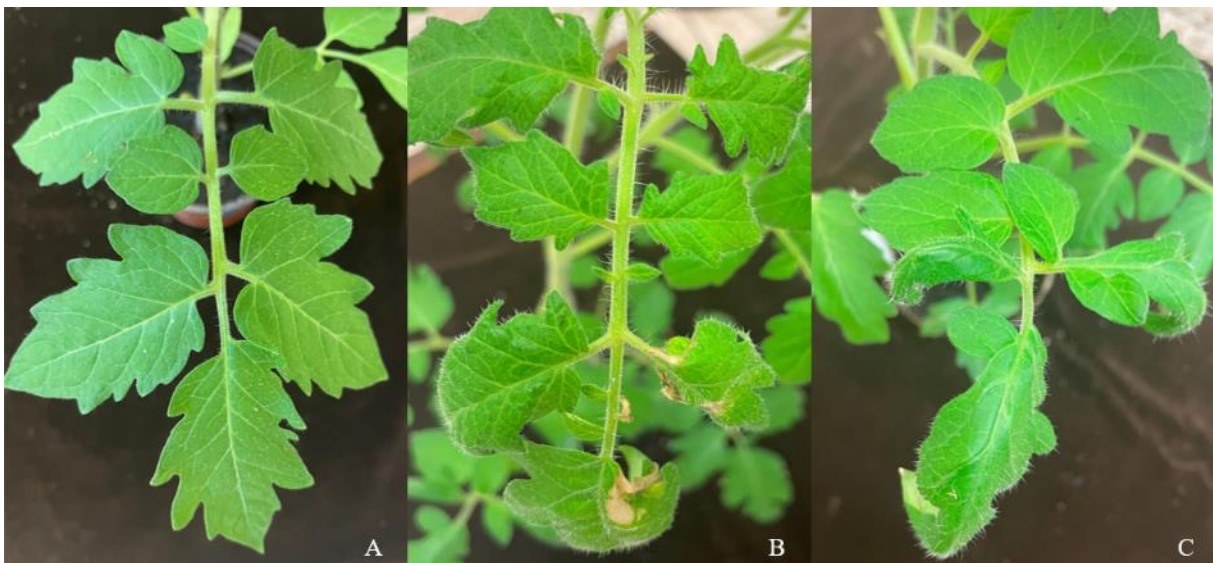
**6. ábra:** Tüneteket mutató paradicsom bogyók. A, B: sárga márványosodás C: Termés deformáció, torzulás (Fotó: Salánki Katalin)

A *Nicotiana tabacum cv Xanthi* fertőzése után 2-3 nap elteltével a lokális nekrotikus léziók jól megfigyelhetők voltak az inokulált leveleken (7. ábra B). Öt nappal a fertőzést követően szisztemizálódott a vírus, mely erős makroszkópos tüneteket okozott, minden izolátum közel azonos tüneteket eredményezett. Nekrózisba átmenő klorotikus léziók jelentek meg, amelyek összefüggő mintázatot alkottak (7. ábra C). A 7. ábra A képen a nem inokulált kontroll növény látható.



**7. ábra:** Tünetek a *Nicotiana tabacum* cv Xanthi növényeken A: Kontroll növény B: Inokulált levélen nekrotikus léziók C: szisztemikus nekrotikus rajzolatok (Fotó: Almási Asztéria)

A teszt növény vizsgálatok során a különböző izolátumokkal fertőzött paradicsomnövényeken eltérő tüneteket figyeltünk meg. A tünetek lassabban jelentek meg, mint a dohánynövényeken. A 8. ábrán (B, C) a PepMV 39-es izolátummal fertőzött paradicsom levelei láthatóak (A: az egészséges kontroll növény levele). A vírusfertőzést követően másfél hónappal váltak kifejezettebbé a szisztemikus tüneteket. A felső leveleken nekrotikus léziók (8. ábra B) láthatók elszórtan, valamint enyhe és fokozottabb levél deformitás és csavarodás (8. ábra C) is megfigyelhető.



**8. ábra:** Szisztemikus tünetek a paradicsom növényeken A: Kontroll (egészséges növény) B: A felső leveleken nekrotikus léziók C: Torz deformálódott levelek (Fotó: Juhász Hedvig)



A PepMV 40-es izolátummal fertőzött növények esetében hasonlóan a 39-es izolátumhoz a levelek csavarodása figyelhető meg valamint nekrotikus léziók (9. ábra A). Az előbbiektől eltérően ezen a növényen a fertőzés hatására a csúcsilevelek nekrozisa is megfigyelhető volt (9. ábra B), valamint a fejlődési stádiuma is visszamaradt a többi izolátummal fertőzött tesztnövényhez képest.



**9. ábra:** Szisztemikus tünetek a paradicsom növényeken A: Deformált levelek nekrotikus léziókkal B: Fejletlen levelek és levélcsőcs elhalás (Fotó: Juhász Hedvig)



Az PepMV 52- es izolátummal fertőzött paradicsom tünetei eltértek az előzőkéhez képest. A levelek felületén hólyagosodás/ buborékosodás (10. ábra A) volt megfigyelhető, valamint torz deformált (10. ábra B) levél növekedés.



**10. ábra:** Szisztémikus tünetek a paradicsom növényeken A: Hólyagosodás B: Deformáció  
(Fotó: Juhász Hedvig)

A PepMV 54-es izolátummal fertőzött paradicsom levelein a többi izolátum esetében tapasztalt tünetek mellett nekrotikus elváltozást figyeltünk meg a levélnyélén és a levelek felületein (11. ábra A, C), valamint sárga téglalap alakú mozaikos foltok (11. ábra B) mutatkoztak elszórtan a növény levelein.



**11. ábra:** Szisztemikus tünetek a paradicsom növényeken A: Nekrózis a levélnyélen, leveleken és mozaikfoltok B: Téglalap alakú mozaikfoltok C: Nekrózis (Fotó: Juhász Hedvig)

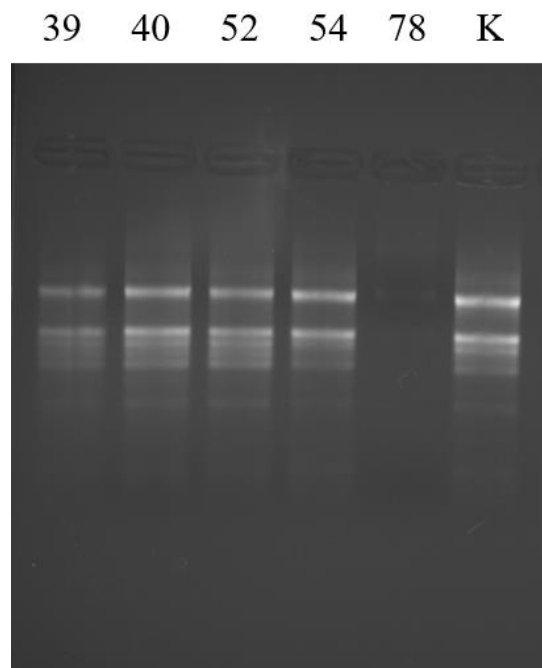
A vizsgált izolátumok közül a 78-as izolátum esetében az érett bogyókon világos sárga kerek foltokat, mozaikos foltokat (12. ábra) figyeltünk meg.



**12. ábra:** Szisztemikus tünetek a paradicsom bogyóján A, B: Mozaikos foltok (Fotó: Almási Asztéria)

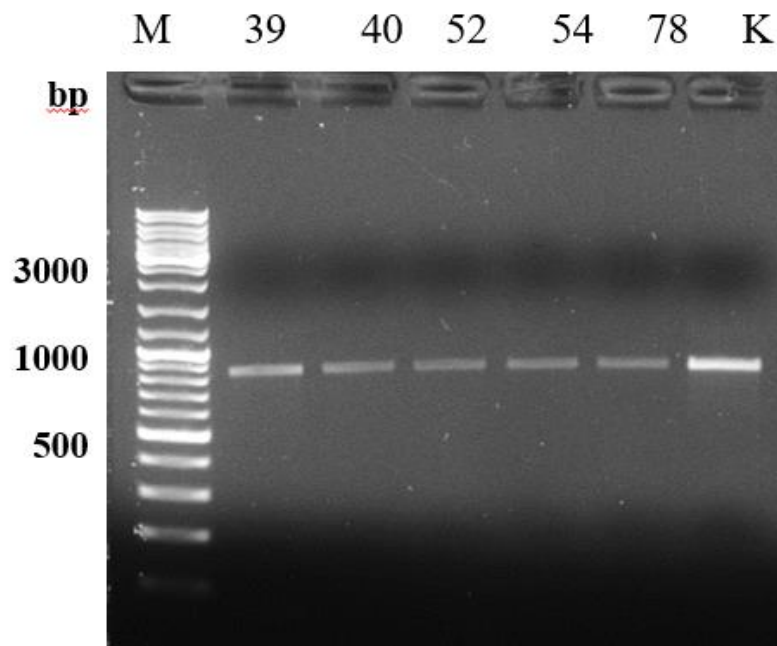
## 5.2 Molekuláris vizsgálatok

Az össznukleinsav kivonás minden minta esetében sikerült, nem bomlott le az RNS (13. ábra). A PepMV 78-as izolátum esetében a kivonás paradicsom termésből történt, ezért a gélelektroforézissel kapott RNS sávok gyengébbek a levelekhez képest (a többi minta esetében levélből vontuk ki az össznukleinsavat), ahol intenzívebbek az anyagcsere folyamatok. A számok a vírusizolátumokat jelölik, K: a negatív kontroll, az egészséges paradicsom növény leveléből kivont minta.



**13. ábra:** TNS gélelektroforézis eredménye 1% agarózgélben (Fotó: Juhász Hedvig)

Az egyes izolátumokból kivont TNS-ekről reverz transzkripcióval készített komplementer DNS-ekről (cDNS) PepMV köpenyfehérjét és a TGB3 fehérje egy szakaszát kódoló gént RT-PCR-rel felszaporítottuk. Az így nyert amplikonokat 1%-os agarózgélből izoláltuk. A tisztított PCR termékek méretét gélelektroforézissel ellenőriztük (14. ábra). A kapott termékek hossza 800-900 nukleotid (nt) közé esett.

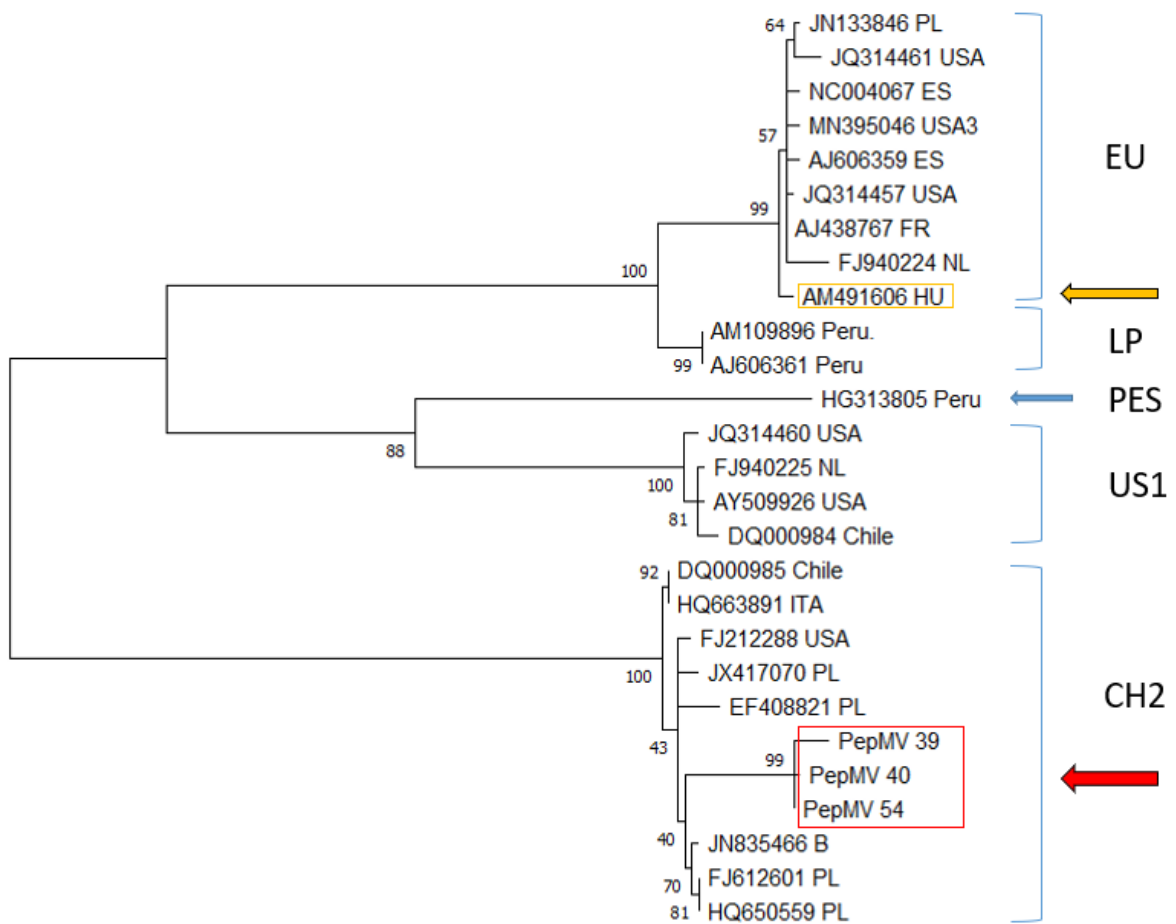


**14. ábra:** Gélből izolált PCR- termékek 1%-os agarózgélen (Fotó: Juhász Hedvig)

A PCR termékek hossza a nukleotid szekvencia meghatározás alapján 742 bázispár (bp) volt. Az NCBI génbankban található PepMV törzsek közül a MU14\_7.11b\_Ra spanyol izolátummal (MK860536 génbanki szám) mutatta a legnagyobb azonosságot, 99,37%-ot, amely a CH2 törzsbe tartozik.

A filogenetikai törzsfák készítéséhez a génbankból különböző törzsbe tartozó szekvenciákat választottunk. Az általunk izolált vírus szekvenciák közül 3-mat választottunk (PepMV 39,40,54), mivel a PepMV 78-as izolátum több szekvenciát tartalmazott, a PepMV 52-es pedig azonos helyről származott, mint a PepMV 54-es mintánk.

A filogenetikai törzsfán az öt eddig leírt PepMV törzs/genotípus (EU, LP, PES, US1, CH2) elkülönült egymástól. A három saját izolátumunk a CH2-es kládba tartozik melyeket piros nyíllal és kerettel kiemeltünk (15. ábra) (Abrahamian P, és mtsai. 2020).



**15. ábra:** Filogenetikai törzsfa a PepMV teljes CP és részleges TGB3 nukleotid szekvenciák alapján. (Készítette: Almási Asztéria és Juhász Hedvig)

## 6 KÖVETKEZTETÉSEK

A paradicsomról gyűjtött mintákból sikerült izolálni a PepMV-t. A tesztnövény vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az átfertőzött paradicsomokon (*Solanum lycopersicum L.*) sokkal lassabban jelentek meg (32 nappal az inokulálást követően) a vírusra utaló (gyengébb) tünetek, mint a dohány növényeken (*Nicotiana tabacum cv. Xanthi nc.*). Az egyes izolátumok esetében paradicsomon eltérő tünettípusok jelentkeztek, bár a molekuláris vizsgálatokban a szekvenciák között csak néhány pontmutációt detektáltunk a vizsgált génszakaszban (TGB3-CP).

A PepMV első megjelenését (Jones és mtsai. 1980) és az egész világon való elterjedését követően a vírust filogenetikai vizsgálatok alapján öt törzsbe (genotípusba) sorolták, melyek kontinensenként nagyjából homogének voltak. Dél-Amerikából származott az LP eredeti perui törzs majd Chiléből ettől eltérő CH2 törzset azonosítottak. Az észak-amerikai izolátumok az US1 törzsbe tartoztak. Miután Európában is megjelentek a PepMV izolátumok ezeket filogenetikai analízisük szerint egy újabb, az addigiaktól eltérő EU törzsbe osztották.

Magyarországon 2004-ben izolálták és jellemezték először a PepMV-t (Forray és mtsai. 2004). Később a molekuláris vizsgálatok teljes genomsekvenciájának elemzése alapján az európai (EU) kládba került a többi Európából származó izolátumokkal együtt. Az utóbbi években egyre több olyan cikk jelent meg, mely a PepMV törzsek homogenitásának megváltozását taglalja (Alcaide és mtsai. 2020).

Leírtak újabb olyan izolátumokat az USA-ban (pl. USA3), amelyek az európai EU genotípussal kerültek a filogenetikai törzsfán egy kládba (Abrahamian et al., 2020). Másrészt Európában különböző országokban gyűjtött izolátumok a chilei 2 CH2 kládba kerültek, és ez a jellemző tendencia. Az eredetileg homogén törzsek egyre heterogénebbé válnak. Szintén egyre gyakoribb jelenség, hogy az adott földrajzi régióban domináns törzs mellett újonnan megjelenő törzs együtt fordul elő az előbbivel, és akár dominánssá válik, mint pl. Európában az újabb leírt CH2 törzsbe tartozó izolátumok az eredetileg elterjedt EU törzs izolátumaival szemben (Alcaide et al., 2020).

A hazai paradicsom termesztőktől gyűjtött PepMV izolátumok a filogenetikai elemzés alapján a CH2 törzsbe tartoznak (16. ábra). A korábban 2004-ben azonosított hazai izolátum (Forray et al., 2004) még az európai genotípusú törzsbe tartozott, ami az EU kládban található (a törzsfán sárga nyíllal jelöltük). A PepMV első hazai megjelenése óta nem vizsgálták/közölték a



jelenlévő PepMV izolátumok genotípusát. Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az európai régiókhoz hasonlóan Magyarországon is megjelent a CH2 genotípus, és az általunk vizsgált minták mind ebbe a kládba kerültek.

A hazai paradicsom termesztésben is jelentős veszteségeket okoznak a PepMV fertőzések/járványok, ezért elterjedten alkalmazzák a palánták vakcinálását. Az eredményes védekezéshez tisztában kell lenni az előforduló, illetve domináns PepMV vírus törzsek összetételével, a víruspopulációt alkotó genotípusokkal, a forgalomban lévő megfelelő összetételű vakcina kiválasztása céljából. Másrészt a különböző egy-, két, illetve többkomponensű vakcinák anyagi vonzata is eltérő, ezért mérlegelni kell, melyik a legmegfelelőbb adott viszonyok között.

## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

A világ mezőgazdaságában súlyos károkat okoznak a növényeket fertőző vírusok. A pepino mozaik vírus (*Pepino mosaic potexvirus*, PepMV), egyre jelentősebbé válik a paradicsomtermesztésben. Először 1974-ben Peruban azonosították ezt a potexvírust, pepino növényeken. Európában 1999-ben, Hollandiában jelent meg. A PepMV országunkban is elterjedt és jelentős károkat okozhat a paradicsomtermesztő gazdák számára. Európában beleértve Magyarországot is először az EU törzs volt jelen, mostanra azonban több európai országban is a CH2 törzs vált dominánssá. Gyakran egyszerre is előfordulnak ezek a törzsek. A PepMV a *Tymovirales* renden belül az *Alphaflexiviridae* családba tartozik (Adams et al., 2004). Jelenleg öt PepMV törzset/genotípust tartanak számon; az eredeti perui (LP) (Jones et al., 1980) törzset, az európai (EU) törzset, az észak-amerikai (US1/CH1) törzset, a chilei-2 (CH2) törzset, valamint nemrégiben felfedezett perui vadparadicsom növényben talált PES törzset. A paradicsomon megjelenő tünetek intenzitása és jellege izolátumonként és genotípuson belül is eltérő lehet (Hanssen et al., 2009). PepMV a *Solanaceae* családba tartozó több növényfajt, mint például a burgonyát (*Solanum tuberosum*), padlizsánt (*Solanum melongena*), dohány növényt (*Nicotiana tabacum cv Xanthi nc*) valamint gyom- és fűszernövényeket, is megfertőzhet. A fertőzés mechanikailag könnyen átadható, így terjedése a fertőzött növények mechanikai érintkezésével a leggyakoribb. A PepMV elleni keresztvédetség csak paradicsomnövények esetén működik. A növényeket gyengített izolátumokkal oltják be, így megelőzhető a virulens izolátumok felszaporodása.

A vizsgálatok során *Nicotiana tabacum cv Xanthi nc* valamint *Solanum lycopersicum cv Moneymaker* teszt növényeket használtunk. A növényi minták fertőzése mechanikailag történt 4 leveles korukban. A PepMV köpenyfehérjét (CP) kódoló gén és a TGB (Tripal Gene Block) fehérjét kódoló gén egy szakaszának nukleotid sorrendjét a tisztított PCR termékből határoztuk meg (Eurofins BIOMI Kft.). Az egyes vírus izolátumok DNS szakaszainak a forward és reverz szekvenciáit illesztettük egymáshoz (Clone Manager 7 szoftver) és összehasonlítást végeztünk a MEGAX szekvenciaelemző program segítségével. Az össznukleinsav kivonás minden mintánál eredményes volt, nem bomlott le az RNS. A PCR termékek hossza a nukleotid szekvencia meghatározás alapján 742 bázispár (bp) volt. Az NCBI génbankban található PepMV törzsek közül a MU14\_7.11b\_Ra spanyol izolátummal (MK860536 génbanki szám) mutatta a legnagyobb azonosságot, 99,37%-ot, amely a CH2 törzsbe tartozik. A filogenetikai



törzsfa készítéséhez a génbankból különböző törzsbe tartozó szekvenciákat vizsgáltunk. Az általunk izolált vírus szekvenciák közül 3-mat választottunk PepMV 39, 40, 54 (a PepMV 78-as izolátum több szekvenciát foglalt magában, a PepMV 52-es és a PepMV 54-es minták azonos helyről származtak). A vizsgálatok során három saját izolátumunk a CH2-es kládba tartozik. A korábban, 2004-ben azonosított hazai izolátum (Forray és mtsai, 2004) még az EU genotípusú törzsbe tartozott. Vizsgálatainkban megbizonyosodhattunk, hogy az európai régiókhöz hasonlóan Magyarországon is megjelent a CH2 genotípus, és az általunk vizsgált minták mind ebbe a kládba kerültek.

## **8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Turóczy György egyetemi docensemnek és külső konzulensemnek, Dr. Almási Asztériának a rengeteg szakmai segítségért és iránymutatásért. Köszönetet szeretnék mondani az Hun-Ren ATK Növényvédelmi Intézet munkatársainak, akik a vizsgálatok elvégzése alatt hasznos tanácsokkal és gyakorlatias tudással láttak el. Valamint köszönettel tartozok a párom a családom és barátaim támogatásáért.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Abrahamian P, Hammond J, Hammond RW. 2020. Complete genome sequence of an American isolate of pepino mosaic virus. *Microbiol Resour Announc* 9: e01124-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01124-19>.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., & Fauquet, C. M. (2004). The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149(5), 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0384-x>
- Aguilar, J. M., Hernández-Gallardo, M. D., Cenis, J. L., Lacasa, A., & Aranda, M. A. (2002). Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome. *Archives of Virology*, 147(10), 2009–2015. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0848-9>
- Alcaide, C., Rabadán, M. P., Juárez, M., & Gómez, P. (2020). Long-Term Cocirculation of Two Strains of Pepino Mosaic Virus in Tomato Crops and Its Effect on Population Genetic Variability. *Phytopathology*®, 110(1), 49–57. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0247-FI>
- Alfaro-Fernández, A., del Carmen Córdoba-Sellés, M., Herrera-Vásquez, J. Á., Cebrián, M. del C., & Jordá, C. (2010). Transmission of *Pepino mosaic virus* by the Fungal Vector *Oplidium virulentus*. *Journal of Phytopathology*, 158(4), 217–226. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01605.x>
- Blystad, D. R., van der Vlugt, R., Alfaro-Fernández, A., del Carmen Córdoba, M., Bese, G., Hristova, D., Pospieszny, H., Mehle, N., Ravnikar, M., Tomassoli, L., Varveri, C., & Nielsen, S. L. (2015). Host range and symptomatology of Pepino mosaic virus strains occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 143(1), 43–56. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0664-1>
- Burgyán, J., & Gáborjányi, R. (1984). Cross-Protection and Multiplication of Mild and Severe Strains of TMV in Tomato Plants. *Journal of Phytopathology*, 110(2), 156–167. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1984.tb03404.x>
- Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Millot, P., Berthier, K., Girardot, G., Gognalons, P., Hirsch, J., Moury, B., Nozeran, K., Piry, S., Schoeny, A., & Verdin, E. (2020). Distribution and evolution of the major viruses infecting cucurbitaceous and solanaceous crops in the French Mediterranean area. *Virus Research*, 286, 198042. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198042>
- Forray, A., Tüske, M., & Gaborjanyi, R. (2004). First report on the occurrence of Pepino mosaic virus in Hungary. *Növényvédelem*, 40(9), 471-473.
- Gal-On, A., & Shibolet, Y. M. (2006). Cross-Protection. In *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses* (o. 261–288). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3780-5\\_12](https://doi.org/10.1007/1-4020-3780-5_12)
- Jordá C., A. Lázaro-Pérez, P.V. Martínez-Culebras, P. Abad, A. Lacasa and M.M. Gerrero, 2001. First report of Pepino mosaic virus on tomato in Spain. *Plant Disease* 85, 1292.

- Hanssen, I. M., Paeleman, A., Vandewoestijne, E., Van Bergen, L., Bragard, C., Lievens, B., Vanachter, A. C. R. C., & Thomma, B. P. H. J. (2009). Pepino mosaic virus isolates and differential symptomatology in tomato. *Plant Pathology*, 58(3), 450–460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.02018.x>
- Hanssen, I. M., Paeleman, A., Wittemans, L., Goen, K., Lievens, B., Bragard, C., Vanachter, A. C. R. C., & Thomma, B. P. H. J. (2008). Genetic characterization of Pepino mosaic virus isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology*, 121(2), 131–146. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9255-0>
- Hanssen, I. M., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Pepino mosaic virus: A successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 179–189. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00600.x>
- Jordá, C., Pérez, A. L., Martínez-Culebras, P., Abad, P., Lacasa, A., & Guerrero, M. M. (2001). First Report of *Pepino mosaic virus* on Tomato in Spain. *Plant Disease*, 85(12), 1292–1292. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1292C>
- Kreuze, J. F., Vaira, A. M., Menzel, W., Candresse, T., Zavriev, S. K., Hammond, J., & Ryu, K. H. (2020). ICTV virus taxonomy profile: Alphaflexiviridae. *Journal of General Virology*, 101(7), 699–700. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001436>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549
- Lesemann D.E., J. Dalchow, S. Winter and E. Pfeilstetter, 2000. Occurrence of Pepino mosaic virus in European tomato crops: identification, etiology and epidemiology. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fuer Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem (Germany)* 376, 323.
- Mackenzie, J. (2005). Wrapping Things up about Virus RNA Replication. *Traffic*, 6(11), 967–977. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00339.x>
- Minicka, J., Otulak, K., Garbaczewska, G., Pospieszny, H., & Hasiów-Jaroszewska, B. (2015). Ultrastructural insights into tomato infections caused by three different pathotypes of Pepino mosaic virus and immunolocalization of viral coat proteins. *Micron*, 79, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2015.08.006>
- Moreno-Pérez, M. G., Pagán, I., Aragón-Caballero, L., Cáceres, F., Fraile, A., & García-Arenal, F. (2014). Ecological and Genetic Determinants of Pepino Mosaic Virus Emergence. *Journal of Virology*, 88(6), 3359–3368. <https://doi.org/10.1128/JVI.02980-13>
- Pagán, I., Córdoba-Sellés, M. D. C., Martínez-Priego, L., Fraile, A., Malpica, J. M., Jordá, C., & García-Arenal, F. (2006). Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology*, 96(3), 274–279. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0274>

- Panno, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., Noris, E., & Matic, S. (2021). A Review of the Most Common and Economically Important Diseases That Undermine the Cultivation of Tomato Crop in the Mediterranean Basin. *Agronomy*, *11*(11), 2188. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112188>
- Park, M.-R., Seo, J.-K., & Kim, K.-H. (2013). *Viral and Nonviral Elements in Potexvirus Replication and Movement and in Antiviral Responses* (o. 75–112). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407698-3.00003-X>
- Pospieszny, H., Borodynko, N., & Palczewska, M. (2003). First record of *Pepino mosaic virus* in Poland. *Journal of Plant Disease and Protection*, *100*, 97.
- Roggero, P., Masenga, V., Lenzi, R., Coghe, F., Ena, S., & Winter, S. (2001). First report of *Pepino mosaic virus* in tomato in Italy. *Plant Pathology*, *50*(6), 798–798. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00621.x>
- Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., & Turina, M. (2016). A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology*, *161*(2), 503–506. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Salonen, A., Ahola, T., & Kääriäinen, L. (2004). *Viral RNA Replication in Association with Cellular Membranes* (o. 139–173). [https://doi.org/10.1007/3-540-26764-6\\_5](https://doi.org/10.1007/3-540-26764-6_5)
- Sanfaçon, H., & Zhang, G. (2008). *Analysis of Interactions Between Viral Replicase Proteins and Plant Intracellular Membranes* (o. 361–375). [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-102-4\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-102-4_25)
- Schwartz, M., Chen, J., Lee, W.-M., Janda, M., & Ahlquist, P. (2004). Alternate, virus-induced membrane rearrangements support positive-strand RNA virus genome replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(31), 11263–11268. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404157101>
- Soler-Alexandre, S., López, C., Cebolla-Cornejo, J., & Nuez, F. (2007). Sources of Resistance to Pepino mosaic virus (PepMV) in Tomato. *HortScience*, *42*(1), 40–45. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.1.40>
- Spence, N. J., Basham, J., Mumford, R. A., Hayman, G., Edmondson, R., & Jones, D. R. (2006). Effect of Pepino mosaic virus on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology*, *55*(5), 595–606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01406.x>
- Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* *10*:512-526.
- van der Vlugt, R. A. A., & Stijger, C. C. M. M. (2021). Pepino Mosaic Virus (Alphaflexiviridae). In *Encyclopedia of Virology* (o. 539–544). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21525-2>

van der Vlugt, R. A. A., Stijger, C. C. M. M., Verhoeven, J. Th. J., & Lesemann, D.-E. (2000). First Report of *Pepino Mosaic Virus* on Tomato. *Plant Disease*, 84(1), 103–103. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.1.103C>

Vermunt, A. M. W., & Kaarsemaker, R. C. (2017). Multi-genotype cross-protection against Pepino mosaic virus in tomato. *Crop Protection*, 96, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.02.007>

Wright, D., & Mumford, R. (1999). *Pepino mosaic potexvirus (PepMV): first records in tomato in the United Kingdom*. *Plant disease notice* (89th ed.). York, UK: Central Science Laboratory.

Internetről származó források:

http: <https://agraragazat.hu/hir/paradicsom-virusbetegsegek-es-vedekezes-ellenuk-mezogazdasag/> Agrárágazat-2021/01. lapszám cikke - 2021 február 01.

http2: <https://gd.eppo.int/taxon/PEPMV0/distribution> (1.ábra)

http3: <https://www.koppert.hu/hiruezenetek/v10-biologiai-vedelem-a-pepmv-ellen/>

http4: <https://www.fructidor.com/newsdetail.aspx?idn=52448> (3.ábra)

http5: <https://www.valto.nl/en/about-v10/symptoms> (4.ábra)

http6: <https://www.biobestgroup.com/challenges/pepmv> (5.ábra)

## ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

- 1. ábra:** PepMV előfordulása a világon (forrás: [http](http://gd.eppo.int/taxon/PEPMV0/distribution))  
<https://gd.eppo.int/taxon/PEPMV0/distribution>
- 2. ábra:** A PepMV genomfelépítése (forrás: Hanssen és Thomma, 2010)
- 3. ábra:** Tünetes levél és termés (forrás: <http4>)  
<https://www.fructidor.com/newsdetail.aspx?idn=52448>
- 4. ábra:** Nekrózis (forrás: <http5>) <https://www.valto.nl/en/about-v10/symptoms>
- 5. ábra:** Márványosodás, nekrotikus foltok és hegek (forrás: <http6>)  
<https://www.biobestgroup.com/challenges/pepmv>
- 6. ábra:** Tüneteket mutató paradicsom bogyók. A, B: sárga márványosodás C: Termés deformáció, torzulás (Fotó: Salánki Katalin)
- 7. ábra:** Tünetek a *Nicotiana tabacum* cv Xanthi növényeken A: Kontroll növény B: Inokulált levélen nekrotikus léziók C: szisztemikus nekrotikus rajzolatok (Fotó: Almási Asztéria)
- 8. ábra:** Szisztemikus tünetek a paradicsom növényeken A: Kontroll (egészséges növény) B: A felső leveleken nekrotikus léziók C: Torz deformálódott levelek (Fotó: Juhász Hedvig)
- 9. ábra:** Szisztemikus tünetek a paradicsom növényeken A: Deformált levelek nekrotikus léziókkal B: Fejletlen levelek és levélcsúcs elhalás (Fotó: Juhász Hedvig)
- 10. ábra:** Szisztemikus tünetek a paradicsom növényeken A: Hólyagosodás B: Deformáció (Fotó: Juhász Hedvig)
- 11. ábra:** Szisztemikus tünetek a paradicsom növényeken A: Nekrózis a levélnyélen, leveleken és mozaikfoltok B: Téglalapalakú mozaikfoltok C: Nekrózis (Fotó: Juhász Hedvig)
- 12. ábra:** Szisztemikus tünetek a paradicsom bogyóján A, B: Mozaikos foltok (Fotó: Almási Asztéria)
- 13. ábra:** TNS gélelektroforézis eredménye 1% agarózgélén (Fotó: Juhász Hedvig)
- 14. ábra:** Gélből izolált PCR- termékek 1%-os agarózgélén (Fotó: Juhász Hedvig)
- 15. ábra:** Filogenetikai törzsfá a PepMV teljes CP és részleges TGB3 nukleotid szekvenciák alapján. (Készítette: Almási Asztéria és Juhász Hedvig)

# NYILATKOZATOK

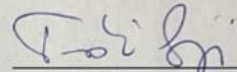
## NYILATKOZAT

JUHÁSZ HEDVIG ÁGNES (név) (hallgató Neptun azonosítója: EEIGPO)  
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a  
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót<sup>1</sup> áttekintettem, a hallgatót az  
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól  
tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő  
védésre javaslom / nem javaslom<sup>2</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem<sup>3</sup>

Kelt: Gödöllő, 2023 év november hó 8. nap

  
belső konzulens

<sup>1</sup> A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törölendő.

<sup>2</sup> A megfelelő aláhúzendő.

<sup>3</sup> A megfelelő aláhúzendő.



## NYILATKOZAT

### a záródolgozat/szakedolgozat/diplomadolgozat/portfólió<sup>1</sup> nyilvános hozzáféréseről és eredetiségéről

A hallgató neve: JUHÁSZ HEDVIG ÁGNES  
A Hallgató Neptun kódja: EEIQPO  
A dolgozat címe: EGY ÚJ CH2 TÖRZSBE TARTOZÓ PEPINO MOZAIK  
A megjelenés éve: 2023 VIRUS IZOLÁCIÓ MEGJELÉSEZÉS  
MAGYARORSZÁGON  
A konzulens intézetének neve: Növényvédelmi Intézet  
A konzulens tanszékének a neve: Integrált Növényvéd. Tsz.

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakedolgozat/diplomadolgozat/portfólió<sup>2</sup> egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

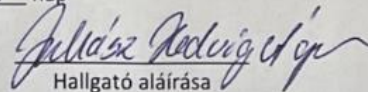
A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Gödöllő, 2023 év November hó 08 nap

  
Hallgató aláírása

<sup>1</sup> A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törölendő.

<sup>2</sup> A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törölendő.