

Zárójelentés

OTKA K 67658 Hazai szőlőültetvények virológiai vizsgálata

Bevezetés

A vírusmentes szőlő szaporítóanyag használata alapvetően fontos tényező a megfelelő termésmennyiség és minőség elérése érdekében.

A vírusbetegségek gazdasági következménye a fokozott tőkeleromlás és elhalás, a hozamok csökkenése és a minőség romlása, a tőkék produktív időszakának megrövidülése, az oltványkészítés eredményességének csökkenése, a szaporítóanyag gyökeresedő képességének romlása, a beteg tőkék környezeti tényezőkkel szembeni ellenálló képességének csökkenése. Az elmúlt két évtizedben több vírusbetegség leírására és a kórokozók hagyományos virológiai módszerekkel történt azonosítására is sor került. A kórokozók rendszertani megítélésében történt változások ugyanakkor számos félreértésre is alapot adtak. Célszerű ezért a hazai eredményeket egységes rendszerbe foglalni és megemlíteni azokat a kórokozókat is, amelyek rövid időn belül megjelenhetnek Magyarországon.

Az utóbbi 50 évben jelentős eredmények születtek a szőlővírusok szabadföldi körülmények között történő kutatásában. Ez alapján azonosították a kórokozókat és alakították ki a szaporítóanyagok vírusfertőzöttségét ellenőrző programot. Hazánkban ez idáig a szőlőről 15 vírusbetegséget írtak le és rendeltek hozzá kórokozót. A vizsgálatokat hagyományosnak tekinthető lágyszárú és fás szárú teszteléssel végezték, valamint Lehoczky János által előállított antiszérumok segítségével szerológiai módszert is alkalmaztak.

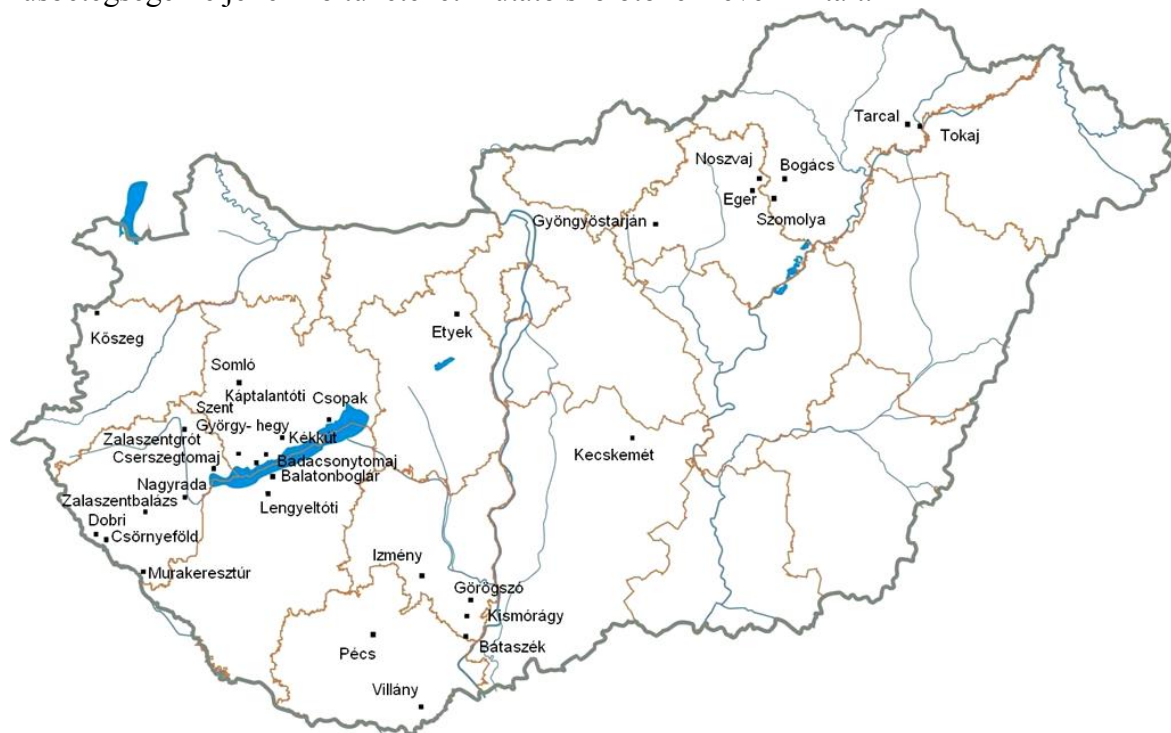
Napjainkban az országok közötti kereskedelem, és szaporítóanyag csere miatt fennáll a veszélye Magyarországon eddig még le nem írt, új kórokozók behurcolásának. Indokolttá vált az előzetes felmérések adatai alapján vírusizolátumok gyűjtése, génbankban való elhelyezése a további molekuláris vizsgálatok elvégzéséhez.

A technika fejlődésével előtérbe kerültek a molekuláris módszerek. Előnyük, hogy kisebb víruskoncentrációnál is megbízhatóan alkalmazhatók, olyan vírusok kimutatására is használhatók, amelyek esetében nem áll rendelkezésre antiszérum. Segítségükkel, sokkal pontosabb képet kaphatunk a vírusgenom szerkezetéről, tulajdonságairól, a kódolt fehérjék szerepéről, továbbá információkat nyerhetünk arról is, hogy egyes vírusok mely más hazai, esetleg más országban megtalált és molekulárisan jellemzett izolátumokhoz hasonlítanak, illetve állnak rokonságban, vagy honnan származnak.

Anyag és módszer

Növényi minta gyűjtése

A három éves felmérés során 17 borvidék, mintegy 31 mintavételi helyéről (1. ábra) - különböző korú, fajta-összetételű és méretű termőültetvényekből - Balatonboglár, Lengyeltóti (Balatonboglári borvidék), Kőszeg (Soproni borvidék), Badacsonytomaj, Káptalantóti, Szent György- hegy (Badacsonyi borvidék), Cserszegtomaj, Kékkút (Balatonfelvidéki borvidék), Csopak (Balatonfüred-Csopaki borvidék), Etyek (Etyek-Budai borvidék), Kecskemét (Kunsági borvidék,) Tokaj, Tardos (Tokaji borvidék), Szomolya, Noszvaj, Eger (Egri borvidék), Bogács (Bükkaljai borvidék), Gyöngyöstarján (Mátrai borvidék), Görögyszó, Bátaszék (Szekszárdi borvidék), Kismórág, Izmény (Tolnai borvidék), Somló (Somlói borvidék), Pécs (Pécsi borvidék), Villány (Villányi borvidék) és Nagyrada, Csörnyeföld, Dobri, Zalaszentbalázs, Zalaszentgrót, Murakeresztúr, (Zalai borvidék) gyűjtöttük be a vírusbetegségekre jellemző tüneteket mutató szőlőtőkék levélmintáit.



1. ábra Mintagyűjtések helye Magyarországon

A *Nepovirus*, *Maculavirus*, *Alfamovirus* nemzetségekhez tartozó vírusok kimutatására alkalmas a szőlő virágzásától a nyári meleg beköszöntéig tartó időszak. A legjobb erre, a virágzástól bogyókötődésig gyűjteni a fiatalabb leveleket, a vitorla közeléből. A másik mintagyűjtési időszak a bogyó zsendülésétől nyár végéig, ősz elejéig terjedő időszak, amely a *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Vitivirus* nemzetségbe tartozó vírusok kimutatására alkalmas. Ilyenkor célszerű az idősebb levelekből mintát gyűjteni, az alsóbb levél emeletekről, mert a víruskoncentráció, ezekben az időszakokban a legmagasabb és így a szerológiai felmérés eredménye is megbízhatóbb (Vanek, 2006).

A vizsgálatokhoz gyűjtött szőlő levélminták a vizsgálni kívánt vírusok által okozott tünetek alapján történt, amelyek a levéldeformáció, mozaik, vörösödés, sárgulás, klórozis,

nekrotikus foltosság, krómsárga mozaik, sárga mozaik, érmenti mozaik, érnekrozis, faszöveti elváltozások voltak.

Az azonosíthatóság miatt a vizsgált szőlőtökéket műanyag szalaggal, megjelöltük, a tapasztalt tüneteket feljegyeztük. A mintákat a vizsgálat helyszínére hűtőtáskába szállítottuk és a vizsgálat elvégzéséig 4 °C-on tároltuk.

Lágyszárú biotesztek elvégzése

A szerológiai vizsgálattal egy időben lágyszárú biotesztet is végeztünk. A mechanikai átvitelhez *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranthicolor*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *Cucumis sativus* és *Gomphrena globosa* lágyszárú tesztnövényeket alkalmaztunk. A szőlőlevél felületi fertőtlenítésére 2%-os NaOH oldatot használtunk, majd vízzel leöblítettük. A minta homogenizálását 0,067 M-os foszfát- pufferrel (pH 7,2) és 3%-os polietilén- glikol (PEG 6000) hozzáadásával történt, mintánként 3 ml/g-os mennyiségben.

A tesztnövények leveleit karborundum porral beszórtuk és üvegspatulával vittük a levelek felületére az inokulumot. A növényeket félárnyékos, párás helyre tettük.

Szerológiai vizsgálatok

A növényvírusok kimutatására leggyakrabban alkalmazott szerológiai módszer a Double Antibody Sandwich (DAS) Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) azaz a kettős antitest szendvics enzimhez kötött immunválasz eljárás volt.

A vizsgálat első lépésként egy szilárd felülethez - polisztirol mikrotitráló lemezhez - kötjük a vizsgálni kívánt vírusra szelektív antitesteket. Majd az inkubációs idő letelte után történik meg a minták felvitele. A pozitív minták esetében a vírus adszorbeál az antitestekhez. Ezután következik az enzimhez kötött antitestek felvitele. Azokban a mintákban, ahol a vírus jelen van, az enzimhez kötött antitestek komplexet alkotnak a vírus fehérjéivel. A lépések közötti mosásokkal a nem kötődött anyagok eltávolítása történik. Utolsó, negyedik lépésként megfelelő szubsztrát (para-nitrofenil-foszfát, amely színtelen, fényérzékeny vegyület) hozzáadása történik. Az enzim lehasítja a szubsztrát molekulákról a foszfát csoportokat, amely során para-nitrofenol keletkezik és a vírus antigén mennyiségétől függő intenzitású sárga színreakciót ad. A színreakció erőssége spektrofotometriával mérhető 405 nm hullámhosszon (Clark és Adams, 1977).

A vizsgálat során Labsystems Multiskan EC ELISA fotométert használtunk. Negatívnak azokat a mintákat tekintettük, amelyek extinkciós értékei nem haladták meg a negatív kontrollnál mért extinkciós érték háromszorosát. A szőlő levélminták esetében a mintafeltárási puffer, más növényi részek esetében használatostól eltérő TRIS (Tris-hidroximetil-aminometán) és PEG (polietilén-glikol) tartalmú. A puffer pH értéke 8,2 volt.

A vizsgálatokhoz LOEWE, Bioreba és Agritest cég reagenseit használtuk, az általuk kiadott ajánlások alapján.

A szőlő vírusos leromlását okozó Nepovírusok közül a GFLV, az ArMV, TBRV és a GCMV jelenlétét teszteltük. A vizsgálatok során még a szőlő látens foltosságát okozó GFkV, a szőlő vonalas és gyűrűs mintázottságát okozó AMV, valamint a levélsodródás tünetet okozó GLRaV-1, GLRaV-2 és a GLRaV-3, valamint a Kober stem grooving vírusbetegséget okozó GVA jelenlétét ellenőriztük.

A szerológiai pozitív eredményt adó minták esetében visszakerestük a tökéket késő ősszel a vesszők beérése után, amelyekről a minta származott. Tőkéenként 3 vesszőt

gyűjtöttünk be és következő év tavaszán meggyökereztettük őket. Jelenleg szabadföldi és üvegházi körülmények között perlit- föld keverékben tartjuk őket, létrehozva a Pannon Egyetem Georgikon Kar Növényvédelmi Intézetének Virologiai Üvegházában élő szőlőnövénnyen fenntartott vírus szőlővírus génbankját további vizsgálatok elvégzése céljából.

Molekuláris módszerek

A molekuláris virológiai vizsgálatok során olyan hazai izolátumokat választottunk, amelyek korábban a tesztnövény kísérletek és a DAS-ELISA vizsgálat során *Grapevine leafroll- associated virus -1* és *-3* vírusnak bizonyultak. Célunk volt, hogy a Magyarországon eltérő helyről begyűjtött vírus izolátumokat molekuláris módszerrel is azonosítsuk, illetve az izolátumok HSP70 fehérjéjének adott primerekkel történő reverz transzkripció polimeráz láncreakción alapuló vizsgálata során felszaporított PCR termék nukleotid sorrendjét meghatározzuk és más országokban már leírt izolátumok szekvenciáival összehasonlítsuk. A HSP70-nel homológ fehérje 70 kDa-os hősokk fehérje. A *Closteroviridae* az egyetlen olyan víruscsalád, amely ilyen típusú fehérjét kódol. Funkciója a sejtről sejtre terjedésben van elsősorban (Premyslov és mtsai, 1999). A HSP70 gént használják leginkább a *Closteroviridae* család tagjainál a molekuláris jellemzés kezdő lépéseként és a genetikai diverzitás meghatározásához (Komínek és mtsai, 2005).

Össznukleinsav kivonás

Össz-nukleinsav kivonást és tisztítást a SPEKTRUM Plant total RNA Kit-tel (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) végeztük. Vörösdést és sodródás tüneteket mutató szőlőlevél lemezéből származó 3 levélkorongot dörzsmozsárban, jégen, hűtött körülmények között homogenáltunk, majd a Kit előírásainak megfelelően elvégeztük az össznukleinsav kivonását és 50 µl oldószerbe oldottuk vissza.

Az RNS-ről a DNS másolatot reverz transzkripcióval készítettünk. A 3 µl tisztított és visszaoldott vírus RNS-hez 1 µl 3' indítószekvenciát (primert) adtunk (100 pmol/ µl), majd 65°C-on denaturáltuk. Ezután az oldathoz adtuk a reverz transzkriptáz M-MuLV enzimet (0,5 µl), annak pufferjét 2 µl mennyiségben, 0,25 µl RiboLock RNase inhibítort és 1 µl mennyiségben 5 mmol/µl koncentrációjú nukleotidokat (Fermentas), 10 µl végtérfogatra hígítottuk steril desztillált vízzel, majd a reakcióelegyet 1 órára 42°C-ra tettük. Ily módon a vírus RNS-sel komplementer DNS másolatot (cDNS) hoztunk létre (Sambrook és mtsai, 1989).

Polimeráz láncreakció (PCR)

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz olyan univerzális primerpárt terveztünk, amely felismeri a GLRaV-1 és -3 HSP70 fehérjéjét.

A GLRaV-1 540 bp nagyságú, a HSP70 gén középső részének 416-955 nukleotid közti fragmentumát kívántuk felszaporítani, ehhez az AF 195822 számú génbanki, a mintegy 1632 nukleotidból álló, teljes HSP70 szekvenciát alapul véve Komínek és munkatársainak 2005-ben megjelent publikációjában említett primereket használtunk.

A GLRaV-3 esetében az 546 bp nagyságú fragmentumát kódoló LC1 és LC2 jelzésű primereit használtuk Turturo és munkatársainak 2005-ös és Mekuria és munkatársainak 2009-es publikációi alapján génbanki adatokra - GLRaV-3 NY1 izolátum szekvencia adataira -

támaszkodva (AF037268). A PCR-hez használt primerek a Bio-Science Kft.-től (Budapest) származnak.

Specifikus primerek:

GLRaV-1 esetében:

1FHSP70-

5'- CAG GGC TCG TTT GTA CTG G- 3'

1RHSP70-

5'- TCG GAC AGC GTT TAA GTT CC- 3'

GLRaV-3 esetében:

LC1F-

5'- CGC TAG GGC TGT GGA AGT ATT- 3'

LC2R-

5'- GTT GTC CCG GGT ACC AGA TAT- 3'

A PCR reakcióelegy (50 µl) tartalmazta a cDNS-t (3µl), a felszaporítani kívánt szakasz kiemeléséhez szükséges 1-1 µl 5' és 3' foszforilált indító szekvenciákat (20 pmol/µl), 2 µl nukleotid keveréket (5 mmol/µl), a megfelelő körülményeket biztosító puffert (10x-es PCR puffer 5µl mennyiségben), 3 µl MgCl₂ (25 mmol/µl) és 0,5 µl *Taq* polimeráz enzimet. A reakciót a PCR Applied Biosystems GenAmp PCR System 9700 készülékkel végeztük.

A PCR ciklus első lépéseként a DNS-t elődenaturáltuk 94°C-on 1 percig, ezt követte a 40 cikluson át tartó denaturáció 94°C-on 1 perc 15 másodpercig, majd a primerek kapcsolódása a templáthoz (anellálás) 52°C-on (mindkét vírus primerének esetében) 30 másodpercig, majd a lánchosszabbítás 72°C-on 1 percig. A végső láncépítés 72°C-on 10 percig tartott.

Gélelektroforézis

Az elektromos térbe helyezett gélben a negatív töltésű nukleinsavak a pozitív pólus felé mozogtak. A vándorlás gyorsaságát a molekula mérete határozta meg. Az egyes fragmentumok fluoreszcens festék jelenlétében ultraibolya fényben láthatóvá váltak. A kapott PCR termékeket agaróz gélben (1,5%), gélelektroforézissel ellenőriztük 90 mA áramerősségnél. Az elektroforézishez használt gél fluoreszcens festéket, GelRed-et (Izinta) tartalmazott. Az első mintahelyre tömegmarkert tettünk (Invitrogen 1Kb DNA Ladder), hogy jól látható legyen a GLRaV-1 esetében 540, a GLRaV-3 esetében pedig 546 bázispár nagyságú PCR termék.

A PCR termék izolálása gélből

A PCR terméket a gélből steril szikékkel kivágtuk és Roche High Pure Purification Kit segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően kitisztítottuk, majd 30 µl oldószerbe oldottuk vissza.

Ligálás és transzformálás

A PCR termék felszaporítását Sambrook és mtsai (1989) szerint végeztük. A tisztítás után közvetlenül ampicillin rezisztencia gént tartalmazó pGEM-T Easy Vektorba kapcsoltuk. A ligálás (az inzert és a plazmid összekapcsolása) 4 órán át szobahőmérsékleten (20–24 °C) 10 µl végtérfogatban történt. A reakcióelegy 3 µl cDNS-t (inzert; tisztított, illetve tisztított és emésztett PCR-termék), 1 µl plazmidot, 1 µl 10x ligáz puffert és 1 µl T4 DNS ligáz enzimet tartalmazott, desztillált vízzel kiegészítve.

A ligálás után a genetikailag megváltoztatott (rekombináns) plazmidot *E. coli* DH5α plazmidmentes kompetens sejtekbe juttattuk (transzformálás). A hősokkos transzformálást Koósné (2006) munkája szerint végeztük. A 10 µl ligátumot, jégen 50 µl lassan kiolvasztott kompetens baktérium-szuszpenzióval finoman elegyítettük, majd 15 percen át jégen tartottuk. Ezután 1 percre 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd azonnal jégre tettük, ahol 2 percig állt. Végül 500 µl antibiotikum-mentes, folyékony LB táptalaj /2TY/ (10 g/l tripton; 5 g/l élesztőkivonat; 10 g/l NaCl; pH: 7,2) hozzáadása után 37 °C-on 1,5 órán keresztül ráztattuk, 190 rpm fordulatszámmal. Ezt követően 100 µl-nyi szuszpenziót ampicillin tartalmú szilárd LB/IPTG+X-Gal táptalajon (10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, 10 g/l agar; 50 µg/ml ampicillin) szélesztettünk. Szélesztés előtt a lemez felszínén 10 µl IPTG-t és 40 µl X-Galt oszlattunk szét egyenletes eloszlásban.

A kész lemezeket, táptalajt tartalmazó oldalukkal felfelé, egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Az antibiotikummal kezelt táptalajon csak azok a baktérium sejtek voltak képesek felszaporodni, amelyek ampicillin rezisztencia gént hordoztak. A ligálás sikerességét az ún. „kék-fehér” szelekció segítségével értékeltük. Azok a baktérium kolóniák, amelyekben az inzert beépülése következtében a plazmidban lévő enzim működésképtelenné vált fehér színűek lettek, míg azok, amelyekben az inzert nem épült be a plazmidba kék színűek voltak. Ennek ismeretében minden lemezről 4–6 különálló, fehér színű telepet oltottunk le steril fogpiszkáló felhasználásával. A fogpiszkálóval leemeltünk egy kolóniát, és először egy mesterlemezhez (masterplate) érintettük, majd 2 ml 50 µg/ml ampicillin tartalmú, folyékony LB táptalajt tartalmazó üvegcsőbe tettük. A csöveket lezártuk, és egy éjszakán át 37 °C-on ráztattuk, 190 rpm fordulatszámmal. Az eredeti telepek felszaporítására szolgáló mesterlemez, egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

A plazmid tisztítása és az inzert ellenőrzése

A baktérium sejtéből a rekombináns plazmid DNS tisztítását alkalikus lízisen alapuló minipreparálással végeztük. A ligálás sikerességének ellenőrzéséhez a plazmidot Sambrook és mtsai (1989) alapján szintén Koósné (2009) szerint a következőképpen izoláltuk. A táptalaj eltávolításához a folyékony baktérium sejt kultúrát 3 percig 13400 rpm fordulatszámon, szobahőmérsékleten centrifugáltuk, majd az összegyűjtött baktérium sejteket 200 µl „A” (sejt szuszpendáló) oldatban (15 mM Tris-HCl pH: 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM glükóz) szuszpendáltuk, és 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezután 400 µl „B” (sejt lízis) oldattal [0,2 M NaOH, 1% SDS], majd 300 µl „C” (semlegesítő) oldattal (3 M nátrium-acetát; 11,5% ecetsav) történt elegyítést követően 5 percig jégre tettük az elegyet. A kicsapott nemkívánatos sejtalkotók maradványait 5 perces, szobahőmérsékleten végzett centrifugálással távolítottuk el. A felülúszóból az oldott állapotban lévő nukleinsavakat kétszer csaptuk ki: először 600 µl izopropanollal, majd a centrifugálással összegyűjtött nukleinsavak 200 µl „D” oldatban (0,1 M nátrium-acetát pH: 7,0; 50 mM Tris-HCl pH: 8,0) történt visszaoldását

követően 400 µl abszolút alkohollal. A csapadékot vákuum koncentrátorban 7-10 percig szárítottuk. Végül a nukleinsavakat 50 µl 1x-es RN-áz TE oldószerben [10 mM Tris pH: 7,6; 1 mM EDTA; 10 µl (10 mg/ml) RN-áz] oldottuk fel.

Az inzertek ellenőrzését a Fast Digest *EcoRI* restrikciós enzim alkalmazásával végeztük. A reakcióelegyet, amelyben lévő puffer már gyárilag tartalmazta a fluoreszcens festéket is, 10 percig 37 °C-on tartottuk. A hasítás után keletkezett DNS-fragmentumokat fluoreszcens, 1 %-os TBE agaróz gélen tettük láthatóvá.

Szekvencia meghatározáshoz a plazmidot BIO-RAD Quantum Prep Plasmid Miniprep Kittel a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk.

A vírusgenomról készült cDNS nukleotid szekvenciájának meghatározása (szekvenálás)

A nukleotid sorrend meghatározását a BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bionergiai Intézet végezte Szegeden.

A nukleotid és aminosav szekvenciák vizsgálata

A nukleotid és aminosav szekvenciák hasonlóság-vizsgálatához, a szekvenciák illesztéséhez a filogenetikai vizsgálatokhoz és az UPGMA eljárással készített filogenetikai törzsfák elkészítéséhez a CLC Sequence viewer 6.5.1. (CLC bio, Dánia) szoftvercsomagot használtuk.

Statisztikai analízis

A filogenetikai törzsfák megbízhatóságának becslésére a nukleotid szekvencia-pozíciók véletlenszerű ismétléses mintavételét és az ezt követő törzsfaszerkesztést 1000-es ismétlésben alkalmazó bootstrap-analízist végeztünk.

Közönséges farkasalma (Aristolochia clematitis L.) levélminta vizsgálata

2009 őszén a pécsi mintagyűjtés alkalmával a szőlőültetvény gyomflórájában mozaikos és nekrotikus gyűrűsfoltosságot mutató közönséges farkasalma (*Aristolochia clematitis*) növényeket észleltünk. A szőlőmintákkal együtt begyűjtésre kerültek a további elektronmikroszkópos és molekuláris vizsgálatok elvégzése céljából.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz alkalmazott módszer a transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) volt. A tüneteket mutató levél 1-2 mm nagyságú szövetdarabjait felhasználva, fixáláskor 2,5 %-os glutáraldehidet tartalmazó oldatban (0,01 M foszfát puffer, pH 7,2) állt 3 órás időtartamig. Az ezt követő mosás mosópuffer felhasználásával, az utófixálás, 1%-os OsO₄ segítségével, a dehidratálás etanol (25, 50, 70, 90, 96, abszolút alkohol) sorozat segítségével, majd azt követő propilén oxidos kezeléssel zajlott. A beágyazás DURCUPAN ACM műgyantába (polimerizáció 60 °C termosztátban 72 óra) történt. Az ultravékony (70 nm) metszetek Reichert Jung Ultracut-E ultramikrotómmal készültek, gyémánt késsel. A metszetek réz-palládium gridre kerültek. A kontrasztolás 1% metanolos

uranil acetát oldattal 4 percig, ólom citrát oldattal 6 percig történt. A metszetek vizsgálatára Hitachi 7100 TEM készülékkel 90 kV gyorsítófeszültség került sor.

A molekuláris vizsgálatához Qiu és munkatársainak 1998-ban megjelent közleményében szereplő TSWV-S1983 5'-CCCTCGAGGCTTTCAAGCAAGTTCTGCG-3' és TSWV-S2767 5'-GCTCTAGAGCC-ATCATGTCTAAGGTTAAGCTCAC-3' primereket alkalmaztuk.

Vírusvektor fonálféregfajok vizsgálata

Magyarország szőlőültetvény talajainak vizsgálatát 2009 tavaszán kezdtük el. A vizsgálatok során célunk a vírusvektor fonálféreg fertőzöttség felmérése volt. Az ország 7 borvidékének (Tokaj-Hegyalja, Egri, Mátraaljai, Tolnai, Mecsekaljai, Villányi, Balatonmelléki), 12 településéről (Tokaj, Tarcál, Szomolya, Bogács, Noszvaj, Eger, Gyöngyöstarján, Izmény, Görögyszó, Kismórágy, Villány, Nagyrada) gyűjtöttünk talajmintát. Munkánk során párhuzamosan vizsgáltuk az ültetvények talajának fonálféreg fertőzöttségét, valamint a növények vírushatásosságát. A szőlőtőkék mellől történő talajmintavétellel egy időben sor került a levélminták gyűjtésére is a későbbi virológiai vizsgálatokhoz. A mintagyűjtés során feljegyeztük a szőlő fajtáját, az ültetvény korát, és a talaj típusát. A szőlő növények gyökér zónájából, kb. 40-50 cm mélységig gyűjtöttünk mintánként 1-1,5 kg talajt, amit feldolgozásig hűtőszekrényben tároltunk. A talaj mintavételezés május-június és szeptember-október hónapokban történt. A fonálféreg kinyerése céljából tölcse és szitálás futtatást alkalmaztunk. A tölcse futtatás során az ú.n. Baermann-féle módszerrel nyertük ki az állatokat a mintákból. A szitálás futtatás után minden esetben keverés után 500g talajt mérünk be a mintákból. Az utóbbi eljárást két eltérő módon alkalmaztuk. Az első esetben (az ú.n. Cobb- módszer) 4 különböző lyukbőségű szitát használtunk (1000, 500, 180 és 100 μ m), majd az átszűrt talajmintát 12-24 óráig futattuk kb. 80-90 μ m lyukbőségű szitában áztatva. A második esetben (Flegg nyomán) az 1000 μ m-es szita használata után a talajmintát háromszor a 180 μ m lyukátmérőjű szitán mostuk át, majd a mintát kb. 80-90 μ m lyukbőségű szitába gyűjtöttük össze, így gyorsabban (1-2 óra) és még nagyobb egyedszámban futtattuk a célcsoportba tartozó fonálférgeket.

Különböző nehézfémek hatása a Nematoda populációkra

A vizsgálat előzményei feltárták a talajlakó fonálféreg cönózisainak (valamely élőhely meghatározott minőségű és mennyiségű állat- és növény fajokból álló társulása) érzékenységét egyes szennyező mikroelemek, elsősorban a Cr és a Se iránt, de még mindig nagyon keveset tudunk a különböző fonálféregcsoportok érzékenységi- és toleranciaviszonyainak háttéréről. A vizsgálat célja ezen mechanizmusok megismerése. Ezért terepi és fél-terepi kísérleteket hajtottunk végre, eltérő hatóanyagformák, továbbá a szennyezés előregedésének vizsgálata céljából. Az analitikai vizsgálatok során az alkalmazott módszerek pontosságának és reprodukálhatóságának érdekében számos előkísérletet és próba-mérést bonyolítottunk le, nagyrészt még szennyezetlen állatok bevonásával. Teszteltük az alábbi, tárolás céljára, illetve kontrollként alkalmazható anyagok hatásait az állatok túlélési mintázataira: csapvíz, desztillált víz, nagy tisztaságú víz (Milli-Q), talajoldat. Azt tapasztaltuk, hogy a desztillált víz, illetve a nagy tisztaságú víz nagymértékben növeli a túlélő állatok számát. Újszerű megközelítést alkalmazunk a kémiai analízisekben is: egy TXRF alapú módszer révén kiküszöböltük az analízisnek a fonálféreg kis egyedi biomasszájából adódó nehézségeit. A különféle fémionokat megkötni képes szerves molekulák azonosítására egy

kapcsolt HPLC-ICP-MS méréstechnikát alkalmaztunk. (A zavaró hatások kiszűrésének érdekében a fonálférgek nyomelem-tartalmának meghatározását a talajrészecskéktől gondosan megtisztított és üres béltartalmú állatokkal végeztük.)

Vizsgálva a nagytisztaságú víz (Milli-Q) hatását, azt tapasztaltuk, hogy ez megváltoztatja az állatok nyomelem-összetételét (hiszen az erőteljesen hipoozmotikus közegnek köszönhetően az állat ionokat ad le). A fonálférgeket nagytisztaságú vízben tároltuk, majd az állatok eltávolítása után mértük az oldatok nyomelem tartalmát TXRF spektrometria módszerével. Az állatokat egyáltalán nem tartalmazó „vak” mintához képest növekedést tapasztaltunk az iontartalmat illetően. (Hasonló eredményre vezetett a nematódákat tartalmazó oldat néhány napig történő vizsgálata fajlagos vezetőképesség szempontjából). A TXRF spektrometriai módszer esetén mikroszkóp segítségével mértük az állatok hosszát és szélességét, ezen adatokból az állatok tömege megbecsülhető. A jelentési időszak végén lebonyolítottunk egy akut toxicitási tesztet réz különböző koncentrációinak (100 mmol/l, 10 mmol/l, 1 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,01 mmol/l) az állatok túlélésére, illetve mikroelemtartalmára gyakorolt hatásaira vonatkozóan.

A kutatás gyakorlati eredményei közül kiemelendő, hogy szélesebb körben is alkalmazható szempontokat adnánk a szennyezések háttérmechanizmusainak részleges tisztázásához. Másrészt a kísérletek eredményei hozzájárulhatnak a környezet- és élelmiszerbiztonság javításához.

***Trichoderma* talajlakó gombák hatása a *Xiphinema index* és *C. elegans* fonálféreg fajokra**

Számos kutatási eredmény bizonyítja hogy a *Trichoderma* talajlakó gomba hatással van a növényparazita fonálféreg populációk csökkenésére (pl. *Meloidogyne* fajok). Vizsgálatunk célja volt, hogy felmérjük a *Trichoderma* talajlakó gomba egyes fajai, milyen hatást gyakorolnak a *Xiphinema index* valamint a *C. elegans* fonálféregre. Mindkét fonálféreg esetében ugyanazon 16 *Trichoderma* fajt teszteltük. A *C. elegans*nál steril földben valamint homokban is vizsgáltuk a gombák férgekre gyakorolt hatását, még a *Xiphinema index* fonálféregnél csak az előbbi talajban mértük az állatok pusztulását. A kontroll petricsészékbe külön-külön csak a két fonálféreg fajt helyeztük el (gomba nélkül) ugyanolyan körülmények között, mint a vizsgált populációkat. A felmérés 8-8 napig tartott mind a hat esetben (*Xiphinema index*-steril föld; *C. elegans*- steril föld, homok; kontroll: *Xiphinema index*-steril föld; *C. elegans*- steril föld, homok).

Eredmények

Mintavételezés és lágyszárú bioteszt eredményei

Tünettani felmérések eredményei

A leggyakrabban tapasztalt tünetek a különböző fokú levél deformáció (2., 3. ábra), mozaikfoltosság (4., 5. ábra), levélklorózis (6. ábra), sárga mozaik (7. ábra), krómsárga mozaik (8. ábra), levélszíneződés (vörösödés, sárgulás) és levélsodródás (9., 10. ábra). Egyes tőkék esetében tapasztaltunk érmenti mozaikosságot, érkivilágosodást (11. ábra), érnekrózist (12. ábra) és nekrotikus foltokat, egy esetben figyeltünk meg törke barázdáltság komplexre utaló tüneteket (13. ábra).



2. ábra Levéldeformáció



3. ábra Levéldeformáció és nekrotikus foltok



4. ábra Mozaikos foltok levélen



5. ábra Mozaikos levél



6. ábra Klorózis



7. ábra Sárga mozaikos foltosság



8. ábra Krómmozaik



9. ábra Vörösödés és levélsodródás



10. ábra Sárgulás és levélsodródás



11. ábra Érkivilágosodás



12. ábra Érnekrózis



13. ábra Tőke barázdáltság tünete

Lágyszárú biotesztek eredménye

A *Chenopodium quinoa* és *Ch. amaranthicolor* esetében a vírusfertőzött minták átvitelekor a fertőzést követő 10. napon lokálisan klorotikus és nekrotikus léziókat tapasztaltunk, a nem inokulált leveleken pedig klorotikus pöttyöket és levéldeformációt (14. ábra). *Nicotiana benthamiana* tesztnövényeken lokálisan sárguló léziók, és klorotikus pöttyök voltak láthatók, szisztemikus tünetként levéldeformáció volt tapasztalható.



14. ábra *Chenopodium quinoa* és *Ch. amaranticolor* tesztnövényen látható lokális klorotikus léziók és levéldeformáció

Szerológiai vizsgálatok eredményei

A gyűjtött 277 mintából 76 minta esetében mutattuk ki a vizsgált vírusok valamelyikét. A vírusok megoszlását az 1. táblázat mutatja. Tizenöt esetben két-két vírus együttes jelenlétét tapasztaltuk. Négy mintában a GLRaV-1 és -3 fertőzését, míg 2-2 esetben GCMV-t találtunk együttesen GLRaV-1-gyel és GLRaV-3-mal. Ezen kívül 1-1 mintában GCMV-ArMV, GFkV-ArMV, TBRV-GFkV, ArMV-AMV és TBRV-AMV komplex fertőzést lehetett azonosítani.

Mintegy 26 esetben GFkV fertőzést mutattunk ki. GLRaV-1 és GLRaV-3, jelenlétét azonos arányban 16-16 minta esetében találtuk meg önálló vagy komplex fertőzést előidézve. A GLRaV-2 megjelenését egy esetben igazoltuk. Így a vírusos leromlást okozó nepovírusok (GFLV, ArMV, TBRV, GCMV) a vírusos leromlás tünetcsoportnál nagyobb számban fordultak elő. A GFLV előfordulását 5, az ArMV megjelenését 7, a TBRV fertőzést 5, a GCMV jelenlétét pedig 8 esetben sikerült szerológiaiilag kimutatni. AMV fertőzést 6 esetben találtunk. A GVA jelenlétét egyetlen esetben sem sikerült igazolni.

1. táblázat A szerológiai vizsgálatok eredménye

Vírus	Minták száma (db)
GFLV	5
ArMV	7
TBRV	5
GCMV	8
GFkV	26
AMV	6
GLRaV-1	16
GLRaV-2	1
GLRaV-3	16
GVA	0
Ebből komplex fertőzésben	

ArMV+GCMV	1
ArMV+GFkV	1
ArMV- TBRV	1
ArMV- GCMV	1
ArMV+AMV	1
TBRV+GFkV	1
TBRV+AMV	1
GCMV+GLRaV-1	2
GCMV+GLRaV-3	2
GLRaV-1+GLRaV-3	4

A szimptomatológiai és a szerológiai vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a GFLV-val fertőzött minták esetében a tapasztalt tünetek levéldeformáció, mozaik, klorózis, és sárga mozaik voltak. A begyűjtött minták közül több is ezekhez hasonló tüneteket mutatott, de a GFLV-t nem tudtuk azonosítani.

Az ArMV pozitív mintáknál megfigyelhető volt ugyancsak levéldeformáció, mozaik, sárga mozaik és egy esetben a lombozat vörösre színeződése.

A TBRV-re pozitív leveleken, mozaikon, levéldeformáción kívül, levélszíneződést (vörösödés) és levélsodródást is tapasztaltunk.

A GCMV esetében a pozitív eredményt adó minták olyan tökékről származtak, amelyek különféle levéldeformációkat, krómsárga mozaikot és a GLRaV-3-al komplex fertőzésben vörösödést és levélsodródást mutattak. A vírus jelenlétét olyan mintában is kimutattuk, amely nem mutatott vírufertőzésre utaló tüneteket.

Az egyik legnagyobb mennyiségben pozitív eredményt adó kórokozó a GFkV volt, amelyet nagy gyakoriságban elsősorban Magyarország északkeleti régióiban azonosítottunk. A tünetek rendkívül változatosak voltak és nem utaltak egyértelműen a vírus jelenlétére. Ezek a levél nekrotikus foltossága, klorózis, mozaik, levéldeformáció, esetenként krómmozaikszerű és sárgamozaikos tünetek, valamint érkivilágosodáshoz hasonló tünetek voltak.

Az AMV-ArMV komplex fertőzés esetében klorózis, levéldeformáció, levélszíneződés. A kórokozó jelenlétét tünetmentes levélminta esetében is kimutattuk.

A *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3* az általuk okozott tünetek alapján nem különíthető el. A megfigyelések szerint csak levélszíneződést (vörösödést, sárgulást) vagy az elszíneződés mellett levélsodródást is okoztak. A fertőzött növényeken néhány nem tipikus, de vírufertőzöttségre utaló tünetet is lejegyeztünk, mint a sárga vagy krómsárga mozaik, nekrotikus foltok, érmenti mozaik, levéldeformáció. Egy esetben a GLRaV-1-et mutattunk ki levéldeformációt mutató mintából, amelynek tökéje tipikus faszöveti barázdáltság kórokozóját jelezte.

A leggyakoribb komplex fertőzést előidéző vírusok a GLRaV-1 és GLRaV-3 voltak. Gyakran tapasztaltuk jelenlétüket és GCMV-vel együtt. A GLRaV-3-mal alkotott komplexben a levélsodródás és vörösödés tünete dominált, a GLRaV-1-gyel közösen, pedig a GCMV-re jellemzőbb levéldeformáció volt domináns.

Mindezek a levélminták az ország 17 borvidékéről származtak, így a vírusok jelenléte borvidékenként a 2. táblázat szerint alakult.

2. táblázat A szerológiai felmérés eredménye borvidékenként

Borvidékek	Gyűjtött minták száma	Fertőzött minták száma	Vírusok*	Vírus-komplexek
Badacsonyi	43	10	4 GLRaV1 2 GLRaV3 1 TBRV	2 GLRaV1-GLRaV3 1 GCMV-GLRaV1
Balatonboglári	10	5	1 GLRaV1 1 GLRaV3 1 GFLV	1 ArMV- GCMV 1 GCMV-GLRaV1
Balaton-felvidéki	56	19	3 AMV 3 GLRaV3 3 GFkV 2 GLRaV1 2 GFLV 1 TBRV 1 GLRaV2 1 GCMV	2 GCMV-GLRaV3 1 GLRaV1-GLRaV3
Balatonfüred-Csupaki	4	1	1 GFLV	
Bükki	3	-		
Egri	14	8	7 GFkV 1 ArMV	
Etyek- Budai	7	0		
Kunsági	12	3	2 GLRaV1 1 GLRaV3	
Mátrai	15	9	9 GFkV	
Nagy-Somlói	3	0		
Pécsi	8	1	1 GLRaV3	
Soproni	8	3	2 GLRaV3	1 GLRaV1-GLRaV-3
Szekeşárdi	21	4	2 GCMV 1 GFLV	1 ArMV-GFkV
Tokaji	15	6	4 GFkV 1AMV	1 ArMV-TBRV
Tolnai	13	2	1 GFkV	1 TBRV-GFkV
Villányi	11	1	1 GLRaV1	
Zalai	34	4	2 ArMV	1 ArMV-AMV 1 AMV-TBRV
Összesen	277	76	61	14

A Badacsonyi borvidék mintagyűjtő helyeiről származó mintákban leggyakrabban levéldeformációt, sárgulást, klorózist, nekrotikus foltosságot és levélsodródást tapasztaltunk. A gyűjtött 43 mintából 10 mintában mutattuk ki vírus jelenlétét. 4 mintában találtunk GLRaV-1-t, kettőben GLRaV-3-at, egy mintában pedig TBRV-t. Három esetében komplex fertőzést mutattunk ki. A sárgulást és érmenti mozaikot mutató tőkékről gyűjtött levelekben a GLRaV-1 és a GLRaV-3 együttes jelenlétét tapasztaltuk. Levéldeformációt mutattak a GCMV és GLRaV-1 vírusokkal fertőzött tőkék.

A Balatonboglári borvidék mintagyűjtő helyein 10 olyan levélminta gyűjtése történt, ahol krómsárga mozaik, levéldeformáció, vörösödés és levélsodródás tünetek voltak megfigyelhetők. 5 mintában találtunk vírust. Egy-egy esetben GLRaV-1, GLRaV-3, GFLV, valamint, egy-egy minta esetében igazoltuk a GCMV jelenlétét ArMV-sal és GLRaV-1-gyel. Az előbbi krómmozaikos elszíneződést mutatott, az utóbbi levéldeformációt.

A Balatonfelvidéki borvidékről származó 56 minta közül 19-ben mutattunk ki vírus jelenlétet. A leggyakoribb tünetek sárgulás, vörösödés, levélsodródás, levéldeformáció, mozaik és klorózis voltak. Három - három mintában bizonyítottuk szerológiai úton AMV, GLRaV-3 és GFkV vírusok jelenlétét. Két mintában GLRaV-1-et és GFLV-t, egy-egy mintában pedig a GCMV, ArMV és TBRV vírusokat azonosítottuk. Három mintában komplex fertőzést mutattunk ki. Vörösödést és levélsodródást mutatott az a három tőke, amelyek közül kettőben GCMV és GLRaV-1-et, egyben pedig GLRaV-1-et és GLRaV-3-at is kimutattunk.

A Balatonfüred-Csopaki borvidékről származó négy, sárga mozaikot mutató minta közül egyben sikerült GFLV-t találni.

Az Egri borvidékről származó 14 levélminta gyűjtésekor levéldeformációt, mozaikot, klorózt és sárgamozaikot figyeltünk meg. Közülük nyolcban találtunk vírusfertőzést. Hétben GFkV egyben pedig ArMV.

Az Etyek-Budai és a Nagy-Somlói és a Bükki borvidékekről származó levélmintákban, amelyeknél sárgulás, sárgamozaik és mozaik valamint levéldeformáció tüneteket figyeltünk meg, nem találtunk a vizsgált 10 víusból. A tünetek feltehetőleg tápanyaghiányt vagy vízhiányt jelezhettek, vagy olyan vírus jelenlétét, amelyre a vizsgálat nem terjedt ki.

A Kunsági borvidék 12 levélmintájából 3 mintában találtunk levéldeformáció, sárga mozaik, érnekroízis, vörösödés tüneteket, és egy esetben GLRaV-1-et és két esetben GLRaV-3-at mutattunk ki.

A Mátrai borvidéken mozaikot, sárgamozaikot, levéldeformációt, klorózt és krómsárga mozaikot tapasztaltunk. A begyűjtött 15 mintából 9 mintában találtunk GFkV-t.

A Pécsi borvidékről gyűjtött 8 mintából egy mintában tudtuk csak a GLRaV-3 jelenlétét bizonyítani. Vörösödés és levélsodródást több esetben is tapasztaltunk, ez mellett pedig levéldeformációt és mozaikot is megfigyeltünk. A tünetek kiváltó okai valószínűleg élettani eredetűek, esetleg fitoplazmás fertőzés vagy tápanyaghiány következményei.

A Soproni borvidékről származó nyolc mintából 3 minta volt fertőzött. Két mintában GLRaV-3-at, egy mintában pedig GLRaV-1 és -3 együttes jelenlétét mutattuk ki. A fertőzött tőkék lombozata vörös elszíneződést és levélsodródást mutatott. A krómsárga mozaikos levélmintából nem tudtunk kimutatni vírust.

A Szekszárdi borvidékről gyűjtött 21, leggyakrabban vörösödés, sárgulás, sárga mozaik és érkivilágosodás tüneteit mutató tőkékről származó levélmintákból négy esetben mutattunk ki vírust. Két mintában GCMV, egy mintában GFLV és egy mintában ArMV és GFkV együttes jelenlétét bizonyítottuk az ELISA teszttel.

A Tokaji borvidéken leggyakrabban megfigyelt tünetek levéldeformáció, mozaik, klorózis, sárga mozaik és nekrotikus foltosság voltak. A tüneteket mutató tőkékről 15 minta került begyűjtésre. Közülük hat minta esetében igazolódott vírus jelenléte. Négyben GFkV-t, egyben AMV-t, szintén egy minta esetében ArMV-TBRV komplexét mutattuk ki.

A Tolnai borvidékről gyűjtött 12 mintából kettő esetében azonosítottunk vírust. Az egyikben GFkV egyedül, a másikban pedig TBRV-vel együttesen volt jelen. Az első esetben a tőke lombzatán nekrotikus foltosságot, a második esetben mozaikfoltosságot tapasztaltunk.

A Villányi borvidékről 11 minta került begyűjtésre. A leveleken vörösödés, levélsodródás, mozaik és levéldeformáció is megfigyelhető volt. Közülük egy minta esetében tudtuk GLRaV-1 jelenlétét bizonyítani.

A Zalai borvidékről származó, leggyakrabban mozaikot, sárga mozaikot, vörösödést és levélsodródást mutató tőkék esetében 34 begyűjtött mintájából 4-ben mutattunk ki vírust. Kettőben ArMV, egy-egy esetben pedig AMV mellett ArMV és TBRV jelenléte is bizonyítható volt.

A 2010. évi felmérés alkalmával olyan vírusok jelenlétét is vizsgáltuk, amelyek hazánkban még egyáltalán nem, vagy csak szőlőről nem kerültek leírásra, viszont előfordulásuk feltételezhető vagy várható. Ilyenek voltak *Cherry leafroll virus* (CLRV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) és a *Tobacco ringspot virus* (TRSV).

A felmérés eredményeként szerológiai vizsgálattal pozitív eredményt kaptunk RBDV esetében 2 mintában, ahol a levélzet elszíneződése volt megfigyelhető, egyik minta esetében sárgulás, a másik esetben pedig vörösödés. RpRSV 1 esetben lett pozitív, nekrotikus foltokat tapasztaltunk a tőkéről begyűjtött levélmintán. A *Cherry leafroll virus* 3 esetben mutattunk ki szerológiai vizsgálattal mozaik tünetet mutató tőkéről. GCMV-val komplexben érkivilágosodást, ToRSV-t klorózist mutató tőke levélmintájából. ToRSV-t ezen kívül még 1 esetben mutattunk ki, ahol a tőke levélzetén klorózist figyeltünk meg. Valamint egy esetben TRSV vírus estében is pozitív eredményt kaptunk, levéldeformációt mutató tőkéről származó levélmintában.

A pozitív eredményeket adó levélmintákat -80 °C- os mélyfagyasztozóba helyeztük el a további vizsgálatok elvégzéséig.

Az eddigi eredmények meggyőzően bizonyították, hogy a betegségtünetek egyedül alkalmatlanok a kórokozó vírus pontos azonosítására, ezért mindenképp szükség van azoknak más módszerek eredményeivel való összevetésére.

Molekuláris vizsgálat eredményei

Szerológiai vizsgálat során a korábban begyűjtött GLRaV-1 és GLRaV-3 vírusokra pozitív eredményt adó szőlő levélminták molekuláris vizsgálatára került sor reverz transzkripció polimerizációs láncreakció (rt-PCR) módszerrel (3. táblázat).

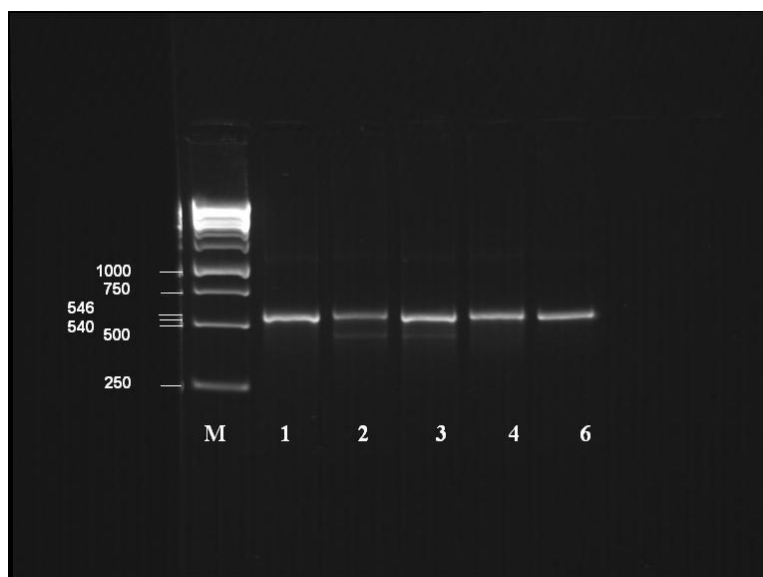
3. táblázat Molekuláris vizsgálatához felhasznált szőlőlevélminták

PCR vizsgálat sorszám	ELISA vizsgálat mintaszám	Minta eredete
1.	2.	Kőszeg
2.	3.	Kőszeg
3.	24.	Badacsonytomaj
4.	33.	Cserszegtomaj
5.	1.	Kőszeg
6.	9.	Badacsonytomaj
7.	15.	Balatonboglár
8.	20.	Badacsonytomaj
9.	137.	Pécs
10.	37.	Cserszegtomaj
11.	51.	Kecskemét

A GLRaV-1 és a GLRaV-3 vírusok HSP70h fehérjének kimutatására alkalmas primerek segítségével öt mintában (1. 2. 3. 4. és 6. számú) kaptunk olyan 546 illetve 540 bázispár nagyságú PCR termékeket, amelyek a GLRaV-3 illetve GLRaV-1 vírus jelenlétét bizonyítják. Az rt-PCR során pozitív eredményt adó minták közül az egyes és kettes számú

minták Kőszegről származnak, a hármasszámú minta Badacsonytomajról származik, a négyes izolátum Cserszegtomajról származó szőlőlevélminta. A hatos számú minta ugyancsak Badacsonytomajról származik.

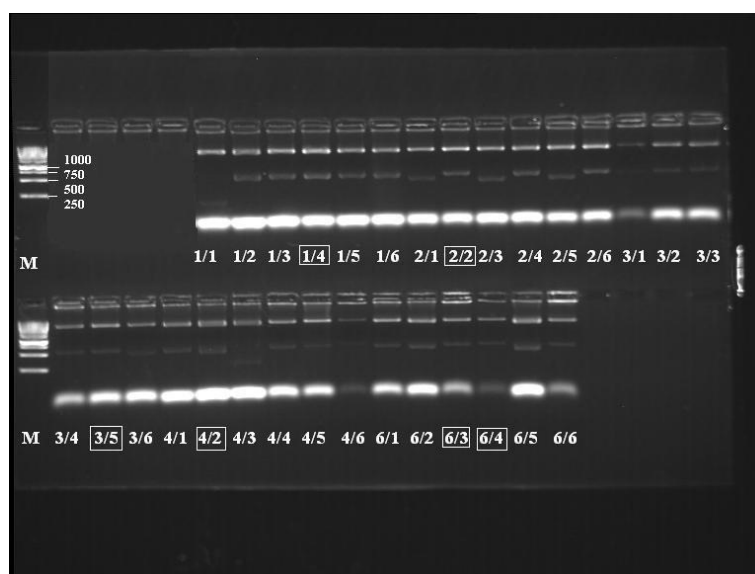
A termékeket gélből izoláltuk (15. ábra).



15. ábra Gélből izolált PCR termékek gél elektroforézis képe

Jelmagyarázat: M - marker, 1 - 1. mintaszámú GLRaV-3 izolátum, 2 - 2. mintaszámú GLRaV-3 izolátum, 3 - 3. mintaszámú GLRaV-3 izolátum, 4 - 4. mintaszámú GLRaV-3 izolátum, 6 - 6. mintaszámú GLRaV-1 izolátum

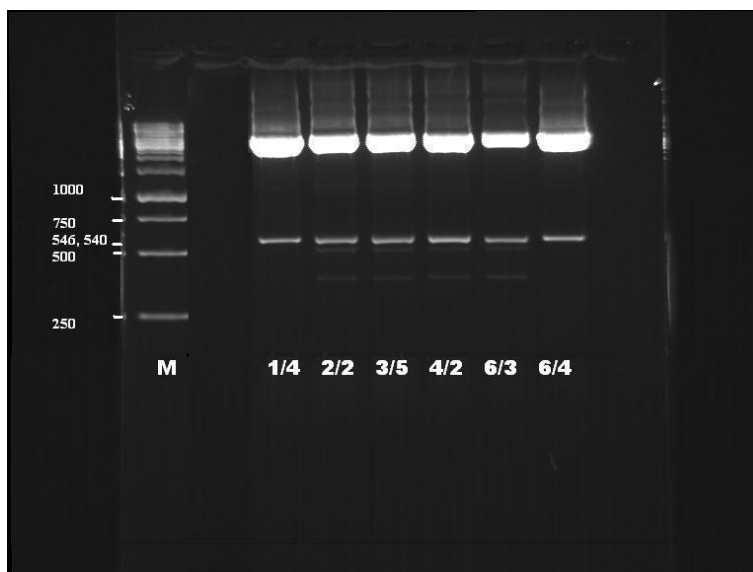
A ligálást és transzformálást követően a rekombináns plazmidokat felszaporításakor, az első négy minta esetében a mintánkénti hat minipreparátumból (16. ábra) az 1/4; 2/2; 3/5; 4/2 jelzetű minipreparátumokat választottuk ki, majd újra felszaporítottuk, tisztítottuk, és meghatároztuk a szekvenciájukat. A hatos számú minta esetében a minipreparátumokban felszaporított termékeknél két mérettartományba estek a PCR termékek, így két transzformált baktériumkolónia vizsgálatára is sor került a különbségek meghatározása céljából (6/3 és 6/4-es számú minipreparátumok).



16. ábra A klónozás során szekvenálásra kiválasztott minipreparátumok gélfotója

Jelmagyarázat: 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6 - az 1. számú minta PCR termékének minipreparátumai, 2/1, 2/2, 2/3, 2/4, 2/5, 2/6 - a 2. számú minta PCR termékének minipreparátumai, a 3/1, 3/2, 3/3, 3/4, 3/5, 3/6 - a 3. számú minta PCR termékének minipreparátumai, 4/1, 4/2, 4/3, 4/4, 4/5, 4/6 - a 4. számú minta PCR termékének minipreparátumai, a 6/1, 6/2, 6/3, 6/4, 6/5, 6/6 - a 6. számú minta PCR termékének minipreparátumai

A kiválasztott minipreparátumokban lévő baktériumokat felszaporítottuk, majd szekvenálásra előkészítettük, kitisztítottuk, és újra elvégeztük a gélelektroforézist. A 17. ábrán látható, hogy az egyes, kettes, hármas és négyes számú minta esetében a PCR termékek azonos magasságban vannak, a hatos számú minta esetében a 6/3 számú kolóniában felszaporított PCR termék mérete megegyezik az első négy mintáéval, míg a 6/4 jelzésű minipreparátumban felszaporított termék méretében magasabb tartományba esik.



17. ábra A tisztított és emésztett PCR termék minipreparátumok gelfotója

Jelmagyarázat: M - marker, 1/4 - az 1. számú minta 4. minipreparátuma által felszaporított PCR terméke, 2/2 - a 2. számú minta 2. minipreparátuma által felszaporított PCR terméke, 3/5 - a 3. számú minta 5. minipreparátuma által felszaporított PCR terméke, 4/2 - a 4. számú minta 2. minipreparátuma által felszaporított PCR terméke, 6/3 - a 6. számú minta 3. minipreparátuma által felszaporított PCR termék, 6/4 - a 6. számú minta 4. minipreparátuma által felszaporított PCR terméke

A felszaporított PCR termékek aminosav sorrendjének meghatározására 2011. február végén került sor. A 4. táblázatban a 6/4-es és 6/3-as *E. coli* baktérium kolóniák által felszaporított PCR termékek aminosavsorrendje látható. A 5. táblázat a 1/4, 2/2, 3/5 és 4/2 jelzésű baktérium kolóniák által felszaporított PCR termékek szekvenciája látható.

A 6/3 és 6/4-es számú minipreparátumok, - amelyek ugyanannak a 6. számú Badacsonytomaji GLRaV-1 vírusizolátumnak az *E. coli* DH5 α törzsének eltérő kolóniái -, által felszaporított PCR termékek a gélelektroforézis során méretükben eltérést mutattak. A szekvencia meghatározás során megállapítottuk, hogy aminosav sorrendjük majdnem teljesen megegyezik. Az 1/4, 2/2, 3/5 és 4/2-es számú kolóniák PCR termékeinek összehasonlításból látható, hogy az 1/4-es számú kolónia esetében több helyen is látható aminosav csere, a többi kolónia által felszaporított termékhez képest.

4. táblázat A 6/3-as és 6/4-es kolónia által felszaporított PCR termékek nukleotid szekvenciája

6_3	1	TGCCGGCGGAGTATAACTCGTTCAAGCGAAGTTTTGTGGGCGTCGCTTTGGAAGGGTTAG
6_4	1	TGCCGGCGGAGTATAACTCGTTCAAGCGAAGTTTTGTGGGCGTCGCTTTGGAAGGGTTAG

```

6_3 61 GTAAGCCGTTGAGAGCTCTCATAAACGAACCAACGTCAGCAGCTTTGTACGGCGCTGTTA
6_4 61 GTAAGCCGTTGAGAGCTCTCATAAACGAACCAACGTCAGCAGCTTTGTACGGCGCTGTTA
6_3 121 GGGGAGGTGCGCTGAAAGAGACGTACGCCGTCTTCGATTTTCGGAGGAGGGACTTTAG..A
6_4 121 GGGGAGGTGCGCTGAAAGAGACGTACGCCGTCTTCGATTTTCGGAGGAGGGACTTTAGATA
6_3 179 TATCGTTCATTTCAAGGTTCAATAACGTCGTGAGCGTCTTATTTTCGAAAGGAGACAACT
6_4 181 TATCGTTCATTTCAAGGTTCAATAACGTCGTGAGCGTCTTATTTTCGAAAGGAGACAACT
6_3 239 TTTTGGGAGGTGCGGACATAGACAGAGCGATAATACAATTCCTGCGTAAAGAGAAAACGAA
6_4 241 TTTTGGGAGGTGCGGACATAGACAGAGCGATAATACAATTCCTGCGTAAAGAGAAAACGAA
6_3 299 TAACCGGTGAGATAGATGCGGGTATATTGGCGGTTATGATAGCTGACCTAAAAGAGAAAA
6_4 301 TAACCGGTGAGATAGATGCGGGTATATTGGCGGTTATGATAGCTGACCTAAAAGAGAAAA
6_3 359 TTTGTGTTAATGGTGGTACACAATACACGCAAATGAAGACGTGGAACGGCTTAGAAAACCT
6_4 361 TTTGTGTTAATGGTGGTACACAATACACGCAAATGAAGACGTGGAACGGCTTAGAAAACCT
6_3 419 TATCATTGTCGGTAGACGAATTGAACACCGTCTCTGAACCATATATAGACAGAGCGATCA
6_4 421 TATCATTGTCGGTAGACGAATTGAACACCGTCTCTGAACCATATATAGACAGAGCGATCA
6_3 479 AAATCTTCGTAGAAGGTGCTGA
6_4 481 AAATCTTCGTAGAAGGTGCTGA

```

5. táblázat az 1/4, 2/2, 3/5 és 4/2 jelzésű kolóniák által felszaporított PCR termékek nukleotid szekvenciája

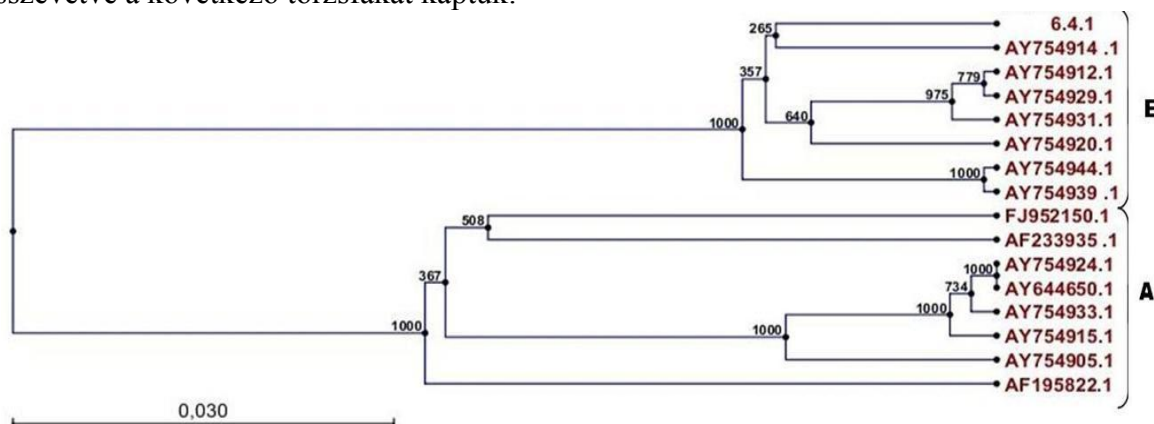
```

2.2 1 CAAAACTGGTCTTGACAACCTTTTACCCAGACCCGGTTATTGCTGTTATGACTGGGGGGTC
3.5 1 .....
4.2 1 .....
1.4 1 .....C.....T.....T.....T.....
2.2 61 AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGATGTGGCTAATTTGCCGCAGATATCTAAGGTCGT
3.5 61 .....
4.2 61 .....
1.4 61 .....C.....T..
2.2 121 GTTCGACAGTACCGATTTTAGATGTTCCGGTGGCTTGTGGGGCTAAGGTTTACTGCGATAT
3.5 121 .....
4.2 121 .....C.....
1.4 121 .....A...T.....G.....A..C.....T.....
2.2 181 TTTGGCAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGGACACTTTAACGAATACGCTAACGGACGA
3.5 181 .....
4.2 181 .....G.....
1.4 181 .....G.....
2.2 241 GGTAGTGGATTTTCAGCCGGTGGTAATTTTCCCGAAAGGTAGTCCAATACCCTGTTTCATA
3.5 241 .....
4.2 241 ..C.....
1.4 241 ...G.....C.....A.....
2.2 301 TACTCATAGATACACAGTGGGTGGTGGAGATGTGGTATACGGTATATTTGAAGGGGAGAA
3.5 301 .....
4.2 301 .....
1.4 301 C.....C.....G.....
2.2 361 TAACAGAGCTTTTCTAAATGAACCGACGTTCCGGGGCGTACCGAAACGTAGGGGAGACCC
3.5 361 .....T.....
4.2 361 .....T.....T.....
1.4 361 .....G.....A.....T.....
2.2 421 AGTAGAGACCGACGTGGCGCAGTTTAATCTCTCCACGGACGGAACGGTGTCTGTTATCGT
3.5 421 .....
4.2 421 .....
1.4 421 .AA.....A.....A.....T.A.....T.....A.....T..
2.2 481 TAATGGTGAGGAAGTAAAGAATGA
3.5 481 .....
4.2 481 .....
1.4 481 ...C.....

```

Az általunk gyűjtött izolátumok HSP70-es gén 500 bp hosszúságú szakaszának aminosav sorrend meghatározását követően a Biotechnológiai Információk Nemzetközi

Központi Adatbázisában (National Center for Biotechnology Information, NCBI) elhelyezett GLRaV-1 (18. ábra) és GLRaV-3 (19. ábra) HSP70-es fehérjetermék variánsainak adataival összevetve a következő törzsfákat kaptuk:



18. ábra GLRaV-1 HSP70-es génszakaszának rokonsági viszonyai

Jelmagyarázat: génbanki azonosítóval rendelkező izolátumok: AY754914.1 - sv12-5 (Csehország), AY754912.1 - sv12-3 (Csehország), AY754929.1 - sv26-1 (Csehország), AY754931.1 - sv26-3 (Csehország), AY754920.1 - sv17-1 (Csehország), AY754944.1 - Tl33-6 (Szlovákia), AY754939.1 - Tl33-1 (Szlovákia), FJ952150.1 - IR-S7 (Irán), AF233935.1 - (USA), AY754924.1 - sv20-1 (Csehország), AY644650.1 - Czech heat shock protein gene (Csehország), AY754933.1 - Tl29-1 (Csehország), AY754915.1 - sv15-1 (Csehország), AY754905.1 - sv11-1 (Csehország), AF195822.1 - (Ausztrália), a magyarországi izolátumok jelölése: 6.4.1. (Badacsonytomaj)

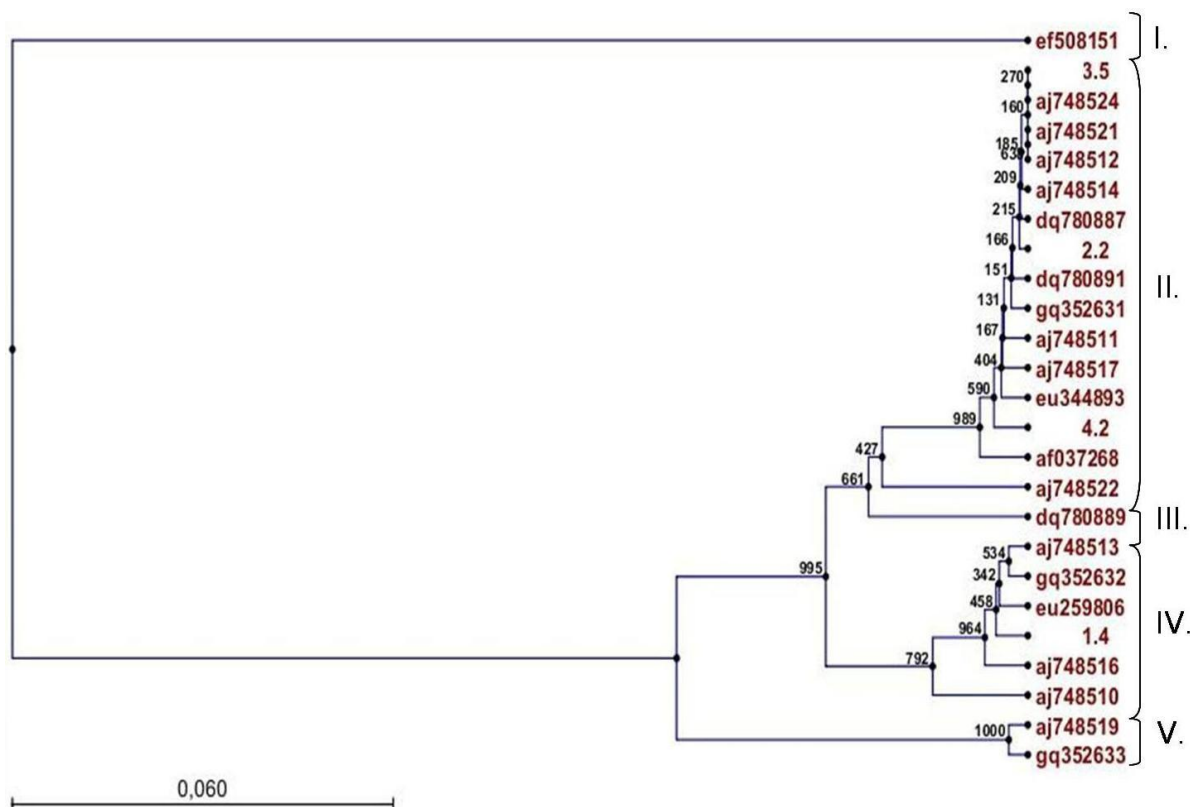
A GLRaV-1 HSP70-es gén 500 bp hosszúságú szakaszának génbankból és az általunk gyűjtött izolátum nukleinsav sorrendjének analíziséből kapott dendrogramon is jól látható, akárcsak Komínek és munkatársai (2005) publikációjában.

Az eddig ismert szekvenciaadatok alapján GLRaV-1 HSP70 gén esetében a genetikai változékonyság alapján két csoportot lehet elkülöníteni. Az egyik az általunk A csoportnak, a másik az E csoportnak nevezett. Az „A” csoportot alkotja az AF233935-ös génbanki azonosítószámú Amerikai Egyesült Államokból és az AF195822-es Ausztráliából való izolátumok (Amerikai-Ausztrál „A” csoport). Az „E” csoportba az 540 bp hosszúságú HSP70 gén szakaszának analízisekor pedig olyan európai izolátumok kerültek, mint az AJ404738 számú Ausztriából és az Y15891 azonosítóval ellátott Olaszországból származó vírusizolátumok. Komínek és munkatársai a saját csehországi és szlovákiai izolátumokat és azok izolátumainkénti 4-6 klónjait helyezték ebbe a rendszerbe. A 24. ábrán látszik, hogy valóban van genetikai távolság a két csoportosulás között.

Az első csoportot az AY754914.1 sv12.5., az AY754912.1 sv12.3., az AY754929.1 sv26.1, az AY754931.1. sv26.3. és az AY754920.1 sv17.1. csehországi izolátumok, valamint az AY754944.1. Tl33.6. és az AY754939.1. Tl33.1. Szlovákiából származó izolátumok alkotják.

A második csoportba az általunk készített dendrogram adatai alapján az FJ952150.1. IR-S7 (Irán), az AF233935.1 (USA), az AY754924.1 sv20.1., az AY644650.1., az AY754933.1 Tl29.1-es, az AY754915.1. sv15.1., valamint az AY754905.1 sv11.1. (Csehország) izolátumok tartoznak. Habár a fent említett publikáció adatai szerint az AF195822.1 jelzésű, ausztráliai vírusizolátum is ugyanebbe a csoportba sorolható, a többi izolátumtól jól láthatóan eltér.

A 6.4.1-es számmal ellátott Badacsonytomajról származó izolátum a filogenetikai elemzés után láthatóan az első csoportba tartozik.



19. ábra A GLRaV-3 HSP70-es génszakaszának összehasonlító elemzéséből elkészített filogenetikai törzsfa

Jelmagyarázat: génbanki azonosítóval rendelkező izolátumok: ef508151 - NZ-1 (Új- Zéland), aj748524 - IL1 (Izrael), aj748521-MT-48-4 (Olaszország), aj748512 - AUSG5-5 (Ausztria), aj748514 - C3 (Kína), dq780887 - C3-1 (Kína), dq780891 - WA N1-1 (USA), gq352631 - 621 (Dél- Afrika), aj748511 - AUSG5-4 (Ausztria), aj748517 - Sy2-7 (Szíria), eu344893 - CL-766 (Chile), af037268 - NY1 (USA), aj748522 - Tu32 (Tunézia), dq780889 - C5-1 (Kína), aj748513 - AUSG5-8 (Ausztria), gq352632 - 623 (Dél- Afrika), eu259806 - GP-18 (Dél-Afrika), aj748516 - Sy2-4 (Szíria), aj748510 - AUSG5-2 (Ausztria), aj748519 - MT-48-2 (Olaszország), gq352633 - PL-20 (Dél-Afrika), a magyarországi izolátumok jelölése: 3.5. (Badacsonytomaj), 2.2. (Kőszeg), 4.2. (Cserszegtomaj), 1.4. (Kőszeg)

A GLRaV-3 HSP70-es gén 500 bp hosszúságú szakaszának szekvencia analízise és a génbankban található külföldi izolátumok adatai alapján készített dendrogram adatai alapján 5 csoportot lehet elkülöníteni.

Az első csoportba az ef508151 génbanki azonosítójú NZ-1 Új Zélandból származó izolátum tartozik.

A második csoportba több izolátum is sorolható. Ezek az aj748524 IL1 (Izrael), aj748521 MT-48-4 (Olaszország), az aj748512 AUSG5-5 (Ausztria), aj748514 C3 (Kína), a dq780887 C3-1 (Kína), dq780891 WA N1-1, (USA), a gq352631 621 (Dél-Afrika), aj748511 AUSG5-4 (Ausztria), az aj748517 Sy2-7 (Szíria), az eu344893 CL-766 (Chile), az af037268 NY1 (USA) valamint az aj748522 Tu32 jelzéssel ellátott (Tunézia) GLRaV-3 HSP70-es gén szekvencia adatai. Ebbe a csoportba tartozik 3 magyarországi általunk gyűjtött és vizsgált izolátum is. A 3.5 jelzésű badacsonytomaji izolátum a legnagyobb hasonlóságot az IL1, az MT48-4 és az AUSG 5-5 izolátumokkal mutat azonosságot. Jól látható a dendrogramon, hogy nincs közöttük különbség. A 2.2 kőszegi minta a C3 és C3-1 kínai mintákhoz hasonlít leginkább, míg a 4.2 Cserszegtomajról származó izolátumunk a CL-766 izolátummal áll közelebbi rokonságba.

A harmadik csoportba, az általunk készített törzsfa adatai alapján csak a dq780889-es génbanki azonosítóval rendelkező C5-1-es kínai izolátum tartozik.

A negyedik csoportot az aj748513 számú AUSG5-8 ausztriai minta, a gq352632-es azonosítójú 623-as Dél- Afrikából származó, az eu259806- GP-18-as szintén dél- afrikai, az aj748516 génbanki azonosítójú Sy2-4-es szíriai minta és az, aj748510-es AUSG5-2 jelzésű ugyancsak Ausztriából aszármazó GLRaV-3 izolátumok alkotják. A vizsgált magyarországi izolátumok közül a szintén Kőszegről származó 1.4 jelzésű izolátum ebbe a csoportba került a vizsgálataink alapján.

Az ötödik utolsó csoportot a törzsfát alkotó izolátumok közül az aj748519-es számú MT-48-2 olaszországi izolátum és a gq352633 génbanki azonosítójú PI-20-as dél-afrikai izolátum alkotja.

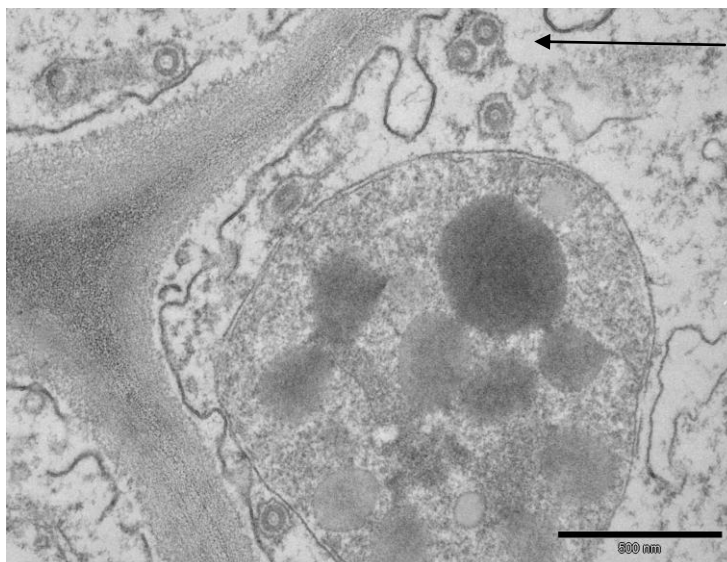
A vírus izolátumok szekvencia adatai a Nemzetközi Génbanki Adatbázisba HE794021-HE794025 nyilvántartási számokkal kerültek be a magyarországi szőlő levélsodródás vírus izolátumok közül.

A közösleges farkasalma (*Aristolochia clematitis* L.) levélminta vizsgálatának eredménye

A szőlő levélmintákkal egyidőben elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk a vírusfertőzésre utaló tüneteket mutató levélmintákon (20. ábra). Megállapítottuk, hogy a levélmintákban kb. 80-120 nm átmérőjű, közel izometrikus glükoproteid burokkal rendelkező virionok (vírus partikulumok) láthatók (21. ábra). A morfológiai felépítés alapján Toszovírus nemzetséghez tartozó Tomato spotted wilt virus (TSWV) jelenlétét valószínűsítettük, így további molekuláris vizsgálatokat végeztünk S1983 és S2767 primerek segítségével, melynek eredményeként RT- PCR-rel is igazoltuk (6. táblázat) a levélmintában a vírus jelenlétét.



20. ábra Klorotikus foltok közösleges farkasalma (*Aristolochia clematitis* L.) levelein



21. ábra *Tomato spotted wilt virus* virionok közönséges farkasalma (*Aristolochia clematitis*) levélben (Fotó: Bóka Károly)

6. táblázat TSWV köpenyfehérje régiójának nukleotid szekvenciája

```

ACCCCAAACATTTTCATAGAACTTGTTAAGAGTTTCACTGTAATGTTCCATAGCAATACTTCCTTTAGCATTAGGATTGCT
GGAGCTAAGTATAGCAGCATACTCTTCCCCTTCTTCACCTGATCTTCATTCATTTCAAATGCTTTGCTTTTCAGCACAG
TGCAAACCTTTCCCTAAGGCTTCCCTGGTGTCTACTTCTTTGGGTCGATCCCAAGGTCCTTGTATTTTGCATCCTGATAT
ATAGCCAGGACAACACTGATCATCTCAAAGCTATCGACTGAAGCAATAAGAGGTAAGCTACCTCCCAGCATTATGGCAAG
CCTCACAGACTTTGCATCATCAAGAGGTAATCCATAGGCTTGAATCAAAGGGTGGGAAGCAATCTTAGATTTGATAGTAT
TGAGATTCTCGGAATCCCAGTTTCCTCAACAAGCCTGACCCTGATCAAGCTATCAAGCCTTCTGAAGGTCATGTCAGTG
GCTCCAATCCTGTCTGAAGTTTTCTTTATGGTGATTTTACCAAAAGTAAAAATCACTTTGCTTAATAACCTTCATTATGCT
CTGACGATTCTTCAGGAATGTCAGACATGAAATAACACTCATCTTTTGGATCTGGTCAAGGTTTTCCAGACAAAAAGTCT
TGAAGTTGAATGCTCCC

```

Következtetések javaslatok

A tüneteket mutató mintákban azonosított alacsony vírusfertőzöttség oka részben abban keresendő, hogy más tényezők is szerepet kaphattak a tünetek kialakulásában, pl. a viroid és más általunk nem vizsgált vírusfertőzések is levélsodródást okoznak, a fitoplazmás tünetek pedig gyakran összetéveszthetők a vírusbeteg növények tüneteivel. Számos szőlővírus kimutatásához nem áll rendelkezésre antiszérum. A kimutathatóságot lényegesen befolyásolja a mintavétel ideje és a feltárás módja, a víruskoncentráció, valamint a növényi szövetek inhibitor tartalma, ami szintén eredménytelenségre vezethet. Ez lehet az oka annak, hogy a szimptomatológiailag fertőzöttnak tekinthető tőkék esetében a begyűjtött minták kevesebb, mint feléből sikerült kimutatni valamely vírust.

Számos esetben GFkV fertőzöttséget tudtunk kimutatni, olyan tőkékről, melyek a szakirodalomban leírt tüneteket nem mutatták. A vírussal fertőzött tőkék levelei sárgultak, levél deformációkat mutattak és néhány esetben mozaik foltosságot figyelhettünk meg. Ezeket a mintákat Tokaj, Gyöngyöstarján és Szomolya területéről gyűjtöttük be, itt a GFkV volt a leggyakrabban előforduló kórokozó.

A vírusos leromlást okozó nepovírusok nem voltak külön-külön nagy számban jelen. A felmérés eredményei azt mutatják, hogy a GLRV a korábbi eredményekkel ellentétben, már kevésbé gyakori, vagy a fertőző leromlás tünet együttesét más kórokozók is előidézhetik.

A szőlő fertőző leromlás tünetcsoportba sorolt vírusok együtt is kisebb gyakoriságban fordultak elő, mint a levélsodródás tünetet okozó GLRaV 1-3, amelyeket 33 esetben sikerült azonosítani. A tipikus levélsodródás és levélszíneződést mutató szőlőtőkékről származó mintáknál csak kisszámú GLRaV 1-3 jelenlétet tudtunk bizonyítani szerológiaián.

A tünettan és szerológiai vizsgálatok összevetése után arra következtetünk, hogy a növény az esetek legnagyobb részében valamilyen anyagcserezavarral jelzi a kórokozók jelenlétét, így a levelek deformációjával, mozaikfoltossággal, levélszíneződéssel. A szakirodalmi leírásoknak megfelelnek, viszont az adott vírusra jellemző és jól behatárolható tünetek ritkán fordultak elő. A GFkV esetében megfigyeltünk élettani elváltozásokat, ilyen tünetekre való utalást, azonban az indikátor fajtán kívül, e vírus esetében nem találunk. A levélsodródást okozó vírusok esetében a tünetek és vírusok jelenléte volt a legnagyobb biztonsággal kimondható a bármely vírussal fertőzött tőkék közül. Azonban a begyűjtött minták közül a hasonló tüneteket mutatók csak egy része volt vírusfertőzött, GLRaV-1, -2 vagy -3-mal. Egy hazai szőlőlevélmintából külföldön már kimutatott GLRaV-7-et, valamint a hatot nem tudtuk szerológiai úton kimutatni. A Magyarországon, szerológiai úton már egyszer kimutatott négyes csoportot, valamint a hazai mintákból eddig ki nem mutatott ötös, nyolcas és kilences számú csoportokat pedig antiszérum hiányában nem tudtuk vizsgálni. Arra lehet következtetni, hogy a tüneteket a nem vizsgált víruscsoportjainak is, de feltehetően fitoplazma fertőzés vagy a növény élettani sajátosságainak következménye. Esetleg a szerológiai kimutathatóság volt gátolt, a növények magas inhibitoranyagának, a tanninnak és a fenoloknak köszönhetően, vagy a víruskoncentráció nem volt kellően magas ezekben a levélmintákban.

A felmérés adataiból kitűnik a GFkV-val fertőzött minták nagyobb száma, különösen az ország Észak-Keleti részén: az Egri, a Mátrai, a Tokaji borvidéken, de jelen van a Tolnai és a Balatonfelvidéki borvidéken is. Jelenlétére utaló speciális tünet nincs, az indikátorfajon (*Vitis rupestris* cv. St. George) kívül más fajtákban nem írtak le tünetet, látens fertőzést idéző elő. A felmérés tapasztalata az volt, hogy levél deformáció, mozaik és klorózis is jelezheti a vírus fertőzését. Sok esetben a levélsodródás és vörös vagy sárga elszíneződés sem a Magyarországon gyakorinak számító GLRaV-1 és GLRaV-3 jelenlétét mutatta. Ezeket a vírusokat a Balaton körüli borvidékeken (Badacsonyi, Balaton-felvidéki), az ország Észak-Nyugati részén fekvő Soproni és a Déli- Dél- Nyugati Pécsi és Villányi borvidékeken találtuk meg nagyobb számban. Ezen kívül a Kunsági borvidéken is észleltük jelenlétét. AMV-t is

találtunk a Balatonfelvidéki, a Tokaji és a Zalai borvidékeken is. A *Nepovirus* nemzetség tagjai közül a GCMV és az ArMV voltak a gyakoribbak, különösen a Zalai borvidéken. A világszerte nagy problémát okozó korai vírusos leromlást előidéző *Nepovirus*ok valamelyikét, a tünettan felmérés alapján várthoz képest kevesebb esetben sikerült kimutatni. A legelterjedtebbnek tartott GFLV-t is csak öt minta esetében lehetett igazolni a Balatonboglári, Balatonfelvidéki, Balatonfüredi és a Szekszárdi borvidéken.

A kapott eredményekből jól látható, hogy a korábban nagy jelentőséggel bíró GFLV gyakoriságát tekintve a vártnál kisebb mértékű, bár a többi *nepovirus*s (GCMV, TBRV, ArMV) együtt még mindig jelentős arányt képvisel. Vizsgálataink alapján levélsodródás tüneteit okozó GLRaV-1 és GLRaV-3 jelentősége nagyobb. Továbbá a GFkV fertőzések magas száma.

Molekuláris úton egy Badacsonytomajról származó GLRaV-1 és négy Badacsonytomajról, Kőszegről és Cserszegtomajról származó GLRaV-3 izolátumot vizsgáltunk. A HSP70 homológ fehérjét kódoló gén 500 bázispár hosszúságú génszakaszának nukleinsav sorrendjének meghatározása után összevetettük a már génbanki adatbázisban szereplő külföldi izolátumok szekvencia adataival. Az így kapott filogenetikai törzsfadataiból jól látható, hogy a GLRaV-3 izolátumok közül a 3.5 Badacsonytomajról, a 4.2 számú Cserszegtomajról és a 2.2 számú Kőszegről származó izolátumok a genetikai távolságuk figyelembe vételével egy csoportba sorolhatók. A 3.5. minta közel azonos a génbankban már szereplő IL1 izraeli, MT48-4 olaszországi és az AUSG5-5 ausztriai vírusokkal. Ezekről kis mértékben tér el a 2.2 minta, a tőle legkevésbé eltérő a C3-1 és C3-as Kínából származó izolátumok. A 4.2 cserszegtomaji minta a dendrogram adatai alapján a legközelebbi rokonságot a CL-766-os chilei, az SY2-7-es szír és az AUSG5-4-es ausztriai izolátumokkal mutatja. Ebbe a csoportba tartozik két Amerikai Egyesült Államokból, egy Dél-Afrikából és egy Tunéziából származó izolátum is. Jól látható, hogy ezek között az országok között a földrajzi távolság olyan nagy, hogy pontosan nem lehet megállapítani, hogy melyik országból indulhatott ki a vírusfertőzés, viszont a terjedésben az adatok alapján a kereskedelemnek lehetett a legnagyobb szerepe.

Az 1.4 –es minta ugyancsak Kőszegről származó minta, habár ugyarról a tábláról származik, mint a 3.5 számú, a dendrogram adatai alapján egy másik csoportba tartozik, legnagyobb hasonlóságot a GP-18-as és 623-as dél-afrikai és az AUSG5-8-as ausztriai izolátumokkal mutatja. Ugyanide tartozik még SY2-4 jelzésű szír, valamint egy másik ausztriai AUSG5-2-es izolátum is. Az I. csoportba tartozó, jól láthatóan a többi csoporttól leginkább elkülönülő NZ-1-es Új Zélandról származó vírus, valószínűsíthetően a sajátos genetikai állományát az elszigetelt fejlődésének köszönheti.

A Magyarországról származó izolátumok hasonlóságot mutatnak a szomszédos Ausztriából származó vírusokkal, így akár más terjedési mód is közrejátszhatott a mindkét országban megjelenő vírusfertőzésnek. Akár természetes módon bizonyos pajzstetű fajok is szerepet játszhatnak, ennek megerősítése azonban további vizsgálatok elvégzését követeli meg.

A GLRaV1 esetében a korlátozottan rendelkezésre álló adatok tükrében korábbi munkák alapján csehországi, szlovákiai, iráni, Amerikai Egyesült Államokbeli és ausztrál izolátumokkal lehetett összehasonlító elemzést végezni. Megerősítést nyert, hogy valóban két csoportba lehet sorolni. Az 6.4.1 jelzésű badacsonytomaji izolátum az sv12.5-ös Csehországból származó vírussal mutatja a legnagyobb hasonlóságot, de egy csoportba sorolható az sv15.1-es, az sv12.3-as, az sv17.1-es, az sv26.1-es és az sv26.3-as csehországi, valamint a TI 33.1 és TI33.6-os szlovákiai izolátumokkal, amelyet korábban „E” európaiként neveztek el. A másik „A” amerikai-ausztrál csoportot egy iráni, egy amerikai, hat csehországi és egy ausztrál izolátum alkotja.

Ezen adatok alapján sem tudjuk biztosan igazolni, hogy a magyarországi vírusizolátum honnan származhat, feltehetőleg a terjedésében a fertőzött szaporítóanyag játszhat fontos szerepet.

A génbanki adatbázisban megtalálható információkra támaszkodva a genetikai hasonlóságok feltérképezhetők, azonban ahhoz, hogy minél helytállóbb következtetéseket lehessen levonni az egyes vírusok eredetét és így a vírus genetikai anyagában bekövetkező változásokat illetően, szükség van arra, hogy minél több adat álljon rendelkezésre és az egyes országokban megjelent vírusizolátumok szekvenciaadatai is elérhetők legyenek minél nagyobb számban.

A dolgozatban szereplő vírus izolátumok szekvencia adatai HE794021-HE794025 nyilvántartási számokkal elhelyezésre kerültek a génbankban.

Szükség lenne a továbbiakban a hazai vírusizolátumok molekuláris feltérképezését folytatni és szekvencia adataik elhelyezését a vírus génbank adatbázisába, hogy ezek is hozzáférhetők legyenek további genetikai vizsgálatokhoz, amellyel meg lehet pontosan állapítani a terjedésük módját. A jelenlegi adatok alapján valószínűsíthető a fertőzött szaporítóanyaggal való terjedés, amely a kereskedelmi tevékenységgel függ össze.

Eredményeink megerősítik azt a már korábbról ismert tényről, hogy csak a szimptómák alapján a vírusok pontos azonosítása nem lehetséges.

Ezeknek egy része élettani problémákkal függhet össze, tápanyaghiány (Bovey és mtsai, 1980), más részük valószínűsíthetően fitoplazmás eredetű, habár a tünetek nagyon hasonlóak (Martelli, 1993). Ezzel a felméréssel mód nyílt a szőlő vírusfertőzöttségében az utóbbi években bekövetkezett változások nyomán követésére, úgymint egyes kórokozók megjelenése illetve előretörése.

A hagyományos lágyszárú és fásszárú tesztelés a GFLV különböző törzseit, vagy az eltérő átviteli tulajdonsággal is rendelkező GLRaV szerológiai csoportjait nem tudja elkülöníteni, vagy új kórokozók esetén a pontos azonosítást biztosítani. További hátránya az időigénye és az egyéb biotikus és abiotikus környezeti tényezők befolyásoló hatásának érvényesülése. A jövőben mindenképp szükséges és kívánatos volna a szerológiai vizsgálatok mellett a molekuláris vizsgálatok párhuzamos elvégzése is és annak bevezetése a gyakorlatba a kórokozók pontos azonosítása érdekében.

A dolgozat elkészítéséhez szükséges vizsgálatok elvégzésekor a szőlőlevélminták mellett közönséges farkasalma (*Aristolochia clematitis*) levélminták is begyűjtésre kerültek. Az esetükben elvégzett elektronmikroszkópos és rt-PCR molekuláris vizsgálatok eredményeképpen Paradicsom bronzfoltosság vírus (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) azonosítottunk. Ez idáig a kórokozót hazánkban erről a fajról még nem írták le. Mivel a vírusfertőzött gyomnövényt szőlő ültetvényben találtuk, így további vizsgálatokat folytatunk a vírus szőlő levélminták esetében is.

A vírusvektor fonálféregfajok előfordulása a hazai szőlőültetvényekben

A vizsgált hazai szőlőültetvényekből gyűjtött 97 db talajmintából 42 esetben (40,7%) azonosítottuk a *Xiphinema* genus valamely fajtát. A *Xiphinema vuittenezi*-t az általunk vett minták egyharmadában találtuk meg. A 97 db talajmintából 37 esetben (35,9%) azonosítottuk ezt a fajt. A *Xiphinema index* fonálféreg 5 esetben volt jelen a mintákban. A vizsgált területekről elmondható, hogy a Villányi, Mecsekaljai és a Tolnai borvidék szőlőültetvényeiben megtaláltuk a *X. vuittenezi*-t, de csak alacsony egyedsűrűségben. A Balatonmelléki borvidék vizsgált talajaiban szintén a *X. vuittenezi* fonálféreg fajt azonosítottuk, nagyobb egyedszámban, mint az előbb említett területeken. A Mátraaljai és az Egri borvidék szőlőültetvényeiből nyertük ki a legnagyobb egyedsűrűségben a *X. vuittenezi*

fonálféreg fajt a vizsgált területek közül. Emellett a Mátraaljai és az Egri borvidékről a *X. index*-et azonosítottuk a begyűjtött talajmintákból. Az utóbbi faj itteni előfordulása az eddigi szakirodalomból nem ismert. A Tokaj-Hegyaljai borvidék vizsgált ültetvényeiből nem sikerült vírusvektor fonálféreg fajt kimutatnunk. Új eredménynek tekinthető a *X. index* előfordulása olyan területekről, ahonnan korábban nem volt ismert ennek a – hazánkban feltételezhetően ritka és sporadikus előfordulását – fajnak a jelenléte.

A nehézfémek hatása a nematódákra

Vizsgálva a nagytisztaságú víz (Milli-Q) hatását, azt tapasztaltuk, hogy ez megváltoztatja az állatok nyomelem-összetételét (hiszen az erőteljesen hipoozmotikus közegnek köszönhetően az állat ionokat ad le). A fonálférgeket nagytisztaságú vízben tároltuk, majd az állatok eltávolítása után mértük az oldatok nyomelem tartalmát TXRF spektrometria módszerével. Az állatokat egyáltalán nem tartalmazó „vak” mintához képest növekedést tapasztaltunk az iontartalmat illetően. (Hasonló eredményre vezetett a nematódákat tartalmazó oldat néhány napig történő vizsgálata fajlagos vezetőképesség szempontjából). A TXRF spektrometriai módszer esetén mikroszkóp segítségével mértük az állatok hosszát és szélességét, ezen adatokból az állatok tömege megbecsülhető. A jelentési időszak végén lebonyolítottunk egy akut toxicitási tesztet réz különböző koncentrációinak (100 mmol/l, 10 mmol/l, 1 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,01 mmol/l) az állatok túlélésére, illetve mikroelemtartalmára gyakorolt hatásaira vonatkozóan.

A kutatás gyakorlati eredményei közül kiemelendő, hogy szélesebb körben is alkalmazható szempontokat adnánk a szennyezések háttérmechanizmusainak részleges tisztázásához. Másrészt a kísérletek eredményei hozzájárulhatnak a környezet- és élelmiszerbiztonság javításához.

***Trichoderma* fajok hatása a fonálférgekre**

A *Trichoderma* fajok eltérő intenzitással 3-4 napon belül elérték a fonálférgeket. Már a 3. napnál megfigyelhető volt egyes gombafajok pusztító hatása. A vizsgálat eredményei mindenképpen pozitívnak mondhatóak, hiszen még a *C. elegans* fonálféreg faj rendkívül intenzív szaporodása mellett is a totális pusztítást érték el a vizsgált gomba fajok. A felmérés gyakorlati eredményei közül kiemelkedő, hogy a *Xiphinema index* vírusvektor fonálféreg faj esetében is igazolódott a hipotézisünk.

Irodalomjegyzék

- Clark, M. F. and Adams, A. N.** (1977): Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Komínek, P., Glasa, M. and Bryxiová, M.** (2005): Analysis of the molecular variability of *Grapevine leafroll-associated virus 1* reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. *Virus Genes* 31: (3) 247-255.
- Koósné, Szathmáry, E.** (2009): Különböző természetes és mesterséges rekombináns szilva himlő vírus (*Plum pox virus*, PPV) izolátumok jellemzése. Doktori értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar. Budapest.
- Premyslov, V. V., Hagiwara, Y and V. V. Dolja** (1999): HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: Abstr. 14771-14776.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989): *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Vanek, G.** (1996): A szőlő növényvédelme. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p. 224.