

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Fokhagymán előforduló vírusok molekuláris vizsgálata

KOCZOR ÁDÁM ANDRÁS

Témavezető:

DR. PALKOVICS LÁSZLÓ



Budapest

2024.

A doktori iskola

megnevezés: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományág: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Zámboriné Dr. Németh Éva
tanszékvezető egyetemi tanár, DSc.
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Gyógy- és
Aromanövények Tanszék

témavezető: Dr. Palkovics László Amand
egyetemi tanár, DSc.
Széchenyi István Egyetem, Növénytudományi Tanszék

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

1. KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A fokhagyma (*Allium sativum* L.) nemcsak gasztronómiai és gyógyászati felhasználása miatt kiemelkedő növény, hanem gazdasági jelentősége is meghatározó, hiszen termesztett zöldségnövényként a fokhagyma iránti piaci kereslet állandónak tekinthető, ugyanakkor a termesztést számos kihívás nehezíti. Az egyik legnagyobb problémát a vírusos betegségek jelentik, amelyek nemcsak a termésmennyiséget csökkentik, hanem a növény beltartalmi értékeit is jelentősen rontják. A fokhagyma vegetatív úton történő szaporítása különösen fogékonyra teszi a növényt ezekre a fertőzésekre, emiatt a fokhagyma vírusos leromlása egy jól ismert jelenségnek tekinthető.

A fokhagyma 2020-ban a világ 21. legnagyobb mennyiségben termelt növénye volt 28.054.318 tonna összmenyiséggel. A világ elsőszámú fokhagymatermesztője 2020-ban is Kína volt, amely 825.302 hektáron 20.712.087 tonna fokhagymát termelt - ez a világon megtermelt összes mennyiség 73,8%-a, a világ teljes fokhagyma termőterületének 50,5%-án. Európa és egyben az Európai Unió legjelentősebb fokhagymatermesztője Spanyolország a 2020-ban megtermelt, mintegy 269.090 tonna mennyiséggel. Magyarország 2020-ban a világ 56. legnagyobb fokhagymatermesztő országa volt, a FAOSTAT adatai szerint 5.210 tonna megtermelt fokhagyma mennyiséggel, mely eredményét 6,29 t/ha termés kihozatal mellett érte el. Ugyanezen év eredményét a KSH 5.216 tonnában határozza meg (KSH, 2020). Ez az eredmény messze elmarad a ~17,19 t/ha-os világátlagtól (FAOSTAT, 2020) és elmarad a Magyarországon szakirodalmi adatok alapján reálisan megvalósítható 12-16 t/ha mennyiségtől is (SZALAY, 2004).

A hagymaféléket jelen ismereteink szerint 10 víruscsalád 36 faja fertőzi. Ezek közül 24 faj, változó jelentőséggel ugyan, de bizonyítottan fertőzi a fokhagymát is, 13 fajt a szakirodalom veszélyesnek minősít, ugyanakkor ezen fajok nagy részének jelenlétét hazánkban eddig még nem dokumentálták.

A magyarországi hagymatermesztés eredményessége és a hagymát fertőző vírusok okozta veszély kapcsolatára először Szirmai János hívta fel a figyelmet 1958-ban (SZIRMAI, 1958). Az általa megnevezett hagyma sárgacsíkosságot, hagymamozaikot (*Marmor cepae* H.), illetve törpülő sárgaságot (*Yellow dwarf*) okozó vírus, az USA-beli Iowa államban, 1929-ben leírt hagyma sárga törpesége és levélcsíkossága vírust (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) jelöli (MELHUS et al., 1929). Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a megbetegedés okozta tünetek között a vírusos hagymák magasabb víztartalmának említésénél idézi Bremer 1937-es cikkét is, mely cikket azóta már a póréhagyma sárga csíkosság vírus (*Leek yellow stripe virus*, LYSV)

első leírásaként tartunk számon (BREMER, 1937). A makói térséget sújtó vírusos leromlás veszélyeire Szirmai már ekkor figyelmeztet, és a makói hagyma szelekciós rezisztencianemesítését sürgeti. Korábbi, 1956-os szemléik során fertőzött maghozó vöröshagyma táblákat vizsgáltak, ahol feltűnően egészséges példányokra is akadtak. Ezeket a példányokat robusztusabb, felfelé törő habitus jellemezte, leveleiken vastagabb, „kékes-hamvas” viaszréteggel. A fertőzött táblán tünetmentesnek tetsző növényeket Szirmai a rezisztencianemesítés céljaihoz alkalmas kiindulóanyagnak tartotta, noha azt nem tisztázta, hogy ezek a vírusos megbetegedésre rezisztens példányok voltak-e, toleránsok vagy a betegség a fertőzést követően csupán látenciában maradt (SZIRMAI, 1958).

1987-ben a „Hagymafélék termesztése” című, gyakorlati tanácsokat is tartalmazó szakkönyvben Tóbiás István, Szirmaihoz hasonlóan, elsősorban a vektorok elleni védekezésre és az egészséges szaporítóanyag fontosságára hívta fel a figyelmet (TÓBIÁS, 1987). Említést tett a LYSV vírusról is, azonban ennek első bizonyított leírása hazánkban még nem történt meg. 1991-ben Regős Antal számolt be röviden a fokhagyma víruskutatás akkori állásáról a Magyar Mezőgazdaság című folyóiratban. Ebben kitért a komplex fertőzések jelentőségére, a vírusok okozta terménykiesésre, illetve a vírusmentesítés fontosságára is (REGŐS, 1991). Kutatási eredményeit részletesen 1992-ben tette közzé a Kertgazdaság folyóiratban. Az ELISA módszerrel végzett vizsgálatok eredményeképpen hazánkban először mutatta ki szerológiai módszerrel az OYDV-t, továbbá első hazai leírását adta közzé a mogoróhagyma rejtett vírusának (*Shallot latent virus*, SLV) és a fokhagyma rejtett vírusának (*Garlic latent virus*, GLV) (REGŐS, 1992).

Valamivel később, a fokhagyma növényvédelmét részletező, Növényvédelem folyóiratban megjelent cikkükben a szerzők továbbra is a fenti három kórokozót emelik ki, mint hazánkban bizonyítottan fellelt és károsító vírusfajt (BUDAI et al., 1999). Ugyanebben a számban tudósítanak a Távol-Keleten azonosított új, atkavektorral terjedő fokhagymavírusokról. A koreai kutatás eredményire hivatkozva ezeket a vírusokat ekkor még a *Rymovirus* nemzetségbe sorolták, köztük a fokhagyma atkák által terjesztett mozaik vírust (*Garlic mite-borne mosaic virus*, GarMbMV) is, amelyet ma az *Allexivirus* nemzetségbe tartozó fokhagyma C vírus (*Garlic virus C*, GarV-C) kórokozóként azonosítunk (KOO, 1999; NCBI, 2019a).

A kétezres években a fokhagyma víruskutatása visszaszorult hazánkban, noha a termesztés gazdaságossági és technológiai akadályai továbbra is a figyelem középpontjában maradtak. Elsősorban termesztéstechnológiai és fajtaválasztási kérdésekkel foglalkoztak az akkori szerzők (LACZKÓ, 2003a; LACZKÓ, 2003b; SOMOGYI, 2006).

2010-ben a Debreceni Egyetemen indult el újra a kutatás a fokhagyma vírusos megbetegedéseit vizsgálva. A témából készült MSc. diplomamunka Makó környéki vörös-, és fokhagymamintákat vizsgált. A kutatás célja az írisz sárga foltosság vírus (*Iris yellow spotted virus*, IYSV) a LYSV, az OYDV és a fokhagyma közönséges rejtett vírus (*Garlic common latent virus*, GCLV) felderítése volt, a mintákat DAS-ELISA módszerrel vizsgálták. Eredményeikben csak a GCLV jelenlétét tudták megerősíteni (SZARVAS, 2010).

2011-ben a Nyugat-Magyarországi Egyetemen született a fokhagymatermesztéssel kapcsolatos doktori dolgozat, amely érintőlegesen a vírusos megbetegedések okozta termesztéstechnológiai kihívásokra is kitér, virológiai szempontból új eredményeket nem közöl (GOMBKÖTŐ, 2011).

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszékén 2015-ben indultak meg a fokhagyma vírusfertőzöttségével kapcsolatos kutatások, ahol a nemzetközi szakirodalom által említett három legfontosabb nemzetség (*Potyvirus*, *Carlavirus*, *Allexivirus*) fokhagymára veszélyes vírusfajait vizsgáltuk, hazánkban először, nukleinsav alapú, molekuláris diagnosztikai módszerekkel.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

- Fokhagymát fertőző vírusfajok azonosítása hazánkban.
- A fokhagymát fertőző *Allexivirus* nemzetségbe tartozó vírusfajok nemzetség- és fajspecifikus azonosítása saját tervezésű és szakirodalmi eredetű primerekkel.
- A fokhagymát fertőző legfontosabb *Carlavirus* nemzetségbe tartozó vírusfajok azonosítása saját tervezésű és szakirodalmi eredetű primerekkel.
- A fokhagymát fertőző *Potyvirus* nemzetségbe tartozó vírusfajok azonosítása saját tervezésű és szakirodalmi eredetű primerekkel.
- Az általunk azonosított, magyarországi LYSV izolátum szekvenciaadatainak meghatározása saját tervezésű és szakirodalmi eredetű, valamint szakirodalmi eredetű, de általunk módosított primerkészlettel.
- A komplex fertőzések előfordulásának vizsgálata, azok sajátosságainak értékelése.
- Az általunk azonosított, magyarországi LYSV izolátum átviteli tulajdonságainak tesztelése és értékelése.
- A vizsgált izolátumok nukleotid szekvenciaadatainak vizsgálata és a rokonsági viszonyok megállapítása.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

Felhasznált minták származási helye

A gyűjtött minták Kínából, Romániából, Magyarországról, Ausztriából, Csehországból, Franciaországból, Portugáliából, Hollandiából és Spanyolországból származtak. A magyarországi mintáinkat Hajdúnánás, Pusztatölke, Makó, Ferencszállás, Baja, Kalocsa, Tata, Jászfényszőlő, Nagykőrös, Szabadszállás, Nyársapát és Csór településekről szereztük be. Kutatásunkba a magyarországi szabályozások szerint certifikált vetőgerezdeket, illetve házikerti és piaci mintákat is egyaránt bevontunk.

HaPoty, HaCarla és HaAllexi primerkészlet és tervezésük szempontjai

A *Potyvirus* és *Carlavirus* nemzetségek fajspecifikus meghatározásához olyan szenz primereket (HaPoty, HaCarla) terveztünk, amelyek a nemzetségen belül konzerváltak, de a fajok között variábilis genomi régiókra illeszkednek. Ezek a primerek, az M4 antiszenz primerrel együtt, különböző hosszúságú PCR-termékeket eredményeztek, lehetővé téve a különböző fajok egyidejű kimutatását egy PCR reakcióban. Az allexivírusok esetében a magas fajszám miatt csak nemzetségspecifikus kimutatásra volt lehetőség a HaAllexi szenz és M4 antiszenz primerpár segítségével. Az általunk tervezett primerek mellett a kínai kutatók által publikált M4-M4T primereket is használtuk (CHEN et al., 2001b), amelyek az univerzális *Potyviridae* primerkészlet részeként szolgáltak a cDNS készítés során.

Az általunk tervezett szenz primerek mellé a kínai kutatók által publikált M4-M4T primereket használtuk (CHEN et al., 2001). Az univerzális *Potyviridae* primerkészlet M4T antiszenz primerét a cDNS készítés során alkalmaztuk, a primer poly-T régiója a *Potyviridae* családra jellemző poliadenilált véggel hibridizál, míg az M4 primer a PCR során használt antiszenz primer.

Gupta- és Yoshida-féle primerek optimalizációja

A 23A mintából kimutatott LYSV izolátum szekvenciaadatainak minél részletesebb feltérképezése érdekében szakirodalmi primereket kerestünk, azonban azt találtuk, hogy a szakirodalomban szereplő primerkészlet csak nagyon kismértékben illeszthető rá az NCBI adatbázisból származó LYSV teljes genomokra. Annak érdekében, hogy növeljük a primerkötődés specifitását, a primereket optimalizáltuk. A letöltött LYSV teljes genom szekvenciák közül a KP258216 referencia izolátum mutatta a legnagyobb genetikai azonosságot a 23A mintából származó LYSV izolátummal a CP-t kódoló régióban. Az eredeti Gupta- és Yoshida-féle LYSV teljes genom kimutatására tervezett primereket úgy módosítottuk, hogy azok jobban illeszkedjenek a KP258216 izolátumhoz, amelyhez egyes bázisokat kicseréltünk, illetve degenerált primereket terveztünk.

Fajspecifikus *Allexivirus* primerek

Az allexivírusok fajspecifikus meghatározásánál saját és szakirodalmi eredetű primereket is felhasználtunk. A szakirodalmi primerek vizsgálata során azonban arra jutottunk, hogy már a primerek BLAST analízissel való vizsgálat során sem minden esetben kapjuk vissza a célszerkezetet. Sok esetben a szakirodalmi primerek nem is illeszthetők rá azokra a referencia izolátumokra sem, amelyeket egyébként az adott primer felhasználásával publikáltak, továbbá a teljes genommal publikált egyéb, de ugyanazon fajba tartozó szekvenciákkal sem mutatnak azonosságot. A szakirodalmi eredetű, fajspecifikus allexivírus primerek kiválasztásakor ezért olyan primereket választottunk, amelyek a BLAST analízis során a primerek visszaadták a célszerkezetet, és az NCBI adatbázisában található referencia izolátumok közül minél többhöz illeszkedtek. Ideális esetben a célfajt már korábban leírták valamely európai országban, és szekvenciaanalízissel már kimutattuk, így pozitív kontrollként használhatjuk a primer működőképességének megerősítéséhez.

A szakirodalmi primerek felhasználása mellett saját primereket is terveztünk, melyek szerkesztésénél nagyban támaszkodtunk az NCBI adatbázisban megtalálható referencia izolátumokra.

RT-PCR protokoll

A HaPoty, HaCarla, HaAllexi és M4 primerkészletekkel, valamint a fajspecifikus allexivírus primerek esetében hagyományos RT-PCR eljárást alkalmaztunk, míg a Gupta- és Yoshida-féle, valamint a saját fejlesztésű LYSV primerkészletekkel a hagyományos PCR mellett touchdown-PCR (td-PCR) technikát is használtunk. A td-PCR célja a PCR reakció

specifitásának növelése, mivel a magasabb kezdő anellációs hőmérséklet nagyobb specifitást biztosít. Az alkalmazott td-PCR protokollok révén igyekeztünk maximalizálni a 23A LYSV izolátum szekvenciaadatainak megszerzését, miközben három különböző protokollal dolgoztunk a specifitás javítása érdekében.

Mesterséges fertőzés LYSV izolátummal

A LYSV-vel történő mesterséges fertőzéshez póréhagymát (*Allium porrum* 'Lincoln') és fokhagymát (*Allium sativum* 'Makói Tavaszi') használtunk. Az RT-PCR-rel előzetesen ellenőriztük a növények vírusmentességét, majd a fertőzést a 23A mintából származó, LYSV-vel fertőzött levélszövettel végeztük. A fertőzéshez abrazívumként cellitet használtunk, amelyet a levél felületére kentünk a homogenizált mintával és inokuláló pufferrel együtt. A sikeres fertőzés igazolása érdekében 14 nappal később újra mintát vettünk, és a HaPoty és M4 primerpárokkal ellenőriztük a vírus jelenlétét. A sikeres fertőzést követően a szövetmintákat -70 °C-on tároltuk további vizsgálatokhoz.

Kevert *Carlavirus* fertőzés provokációs kísérlete

A carlavírusokra irányuló provokációs kísérlet során célunk a kevert fertőzés létrehozása volt, mivel korábban nem találtunk olyan mintákat, amelyek mindkét carlavírussal (GCLV és SLV) fertőzöttek lettek volna. A kísérlethez 40 fokhagyma növényt hajtattunk, és előzetesen vírusmentes mintákat választottunk ki. A fertőzést négy, korábban GCLV és SLV fertőzött mintából készült inokulummal végeztük. Ezeket a mintákat egyazon dörzsmozsárban homogenizáltuk, hogy a két vírus egyidejű jelenlétét biztosítsuk, és a kevert fertőzést elérjük. Az inokulációt minden növény két különböző levelén végeztük, majd a fertőzés eredményességét HaCarla és M4 primerpárokkal ellenőriztük.

Szekvenciaanalízis, BLAST analízis, filogenetikai törzsfák

A szekvenciaanalízis eredményeinek pontosságát a Chromas Lite nevű program felhasználásával ellenőriztük, a BaseClear által rendelkezésünkre bocsátott kromatogram alapján. Amennyiben a kromatogram nem volt egyértelmű, úgy a szekvenciaanalízis során degeneráltan hagyott helyeket mi is változatlanul hagytuk. Az így kijavított szekvencia adatokat az NCBI BLAST analízis szolgáltatásának segítségével hasonlítottuk össze a nemzetközi adatbázisban található izolátumok nukleotid sorrendjével. Az így kapott rokonsági viszonyokat alapul véve választottuk ki a filogenetikai törzsfa megrajzolásához szükséges referencia izolátumokat, melyeket a CLC Sequence Viewer 7.0 bioinformatikai szoftver segítségével rajzoltunk meg, UPGMA módszerrel, Jukes-Cantor technikával, 1000 ismétléses bootstrap analízist alkalmazva.

4. EREDMÉNYEK

Munkám során 45 darab, különböző helyekről származó fokhagyma vírusfertőzöttségét vizsgáltam meg RT-PCR eljárással potyvírus, carlavírus és allexivírus fertőzöttség szempontjából. A vírusfertőzöttnek ítélt minták esetében 31 alkalommal szekvenciaanalízis is készült, melyekből filogenetika törzsfát is készítettünk.

A magyarországi 23A LYSV izolátumot számos további szempontból is vizsgáltam, a genom minél szélesebbkörű megismerése érdekében. Ehhez egy a szakirodalomból kölcsönzött és általam optimalizált szakirodalmi eredetű primerkészletet, továbbá egy általam tervezett, szintén a teljes genom megismerését célzó primerkészletet használtam fel. Ehhez több hagyományos PCR és td-PCR protokollokat is alkalmaztam.

A magyarországi LYSV izolátummal végzett mesterséges fertőzési kísérlet során még 8 fokhagyma és 8 póréhagyma minta virológiai vizsgálatát végeztem el RT-PCR módszerrel. A carlavírussal végzett, fajok közötti kevert fertőzés létrehozását célzó provokációs kísérletben további 20 fokhagymamintát vizsgáltam meg, szintén RT-PCR eljárással.

A dolgozatban összesen 81 különböző növény minta virológiai vizsgálatára került sor, mely során a LYSV, GCLV, SLV, GarV-B, GarV-C, GarV-D és GarV-X vírusfajok kimutatására történt meg RT-PCR eljárással, majd ezeket az eredményeket szekvenciaanalízis útján is megerősítettük.

A kutatásban 52 primer felhasználására került sor, melyből 14 szenz és 11 antiszenz primer saját fejlesztésű, 2 szenz primer és 3 antiszenz primer szakirodalmi eredetű, valamint további 10 primerpár szakirodalmi eredetű, de általunk optimalizált.

Eredmények a HaPoty, HaCarla és HaAllexi primerkészlettel

A HaPoty és M4 primerpár felhasználásával kapott géleképek alapján elmondható, hogy a fokhagymát fertőző valamennyi ismert potyvírus fajt sikeresen kimutattuk a vizsgált mintákból, a LYSV vírusfaj jelenlétét szekvenciaadatokkal is megerősítettük. A saját tervezésű HaPoty szenz primer segítségével, az M4 antiszenz primer jelenlétében a fajok jól elkülöníthetők a PCR-termék hossza alapján.

HaCarla és M4 primerpár felhasználásával a *Carlavirus* nemzetség mindkét fokhagymát fertőző fajtát kimutattuk RT-PCR technikát alkalmazva. Az általunk tervezett HaCarla szenz primer az M4 antiszenz primer jelenlétében alkalmasnak bizonyult a két carlavírus faj egyidejű kimutatására és elkülönítésére az eltérő hosszúságú PCR-termékek elvén. Magyarországon a GCLV faj a jellemzőbb, az SLV fajt mindössze egy esetben mutattuk ki

A HaAllexi és M4 primerpár felhasználásával vizsgált 41 minta 93%-ából mutattuk ki az *Allexivirus* nemzetség jelenlétét, összesen három negatív mintát azonosítottunk. Az általunk fejlesztett HaAllexi szenz primer a szakirodalmi eredetű M4 antiszenz primer jelenlétében fajszintű határozást nem tett lehetővé a nemzetségbe tartozó fajok magas száma miatt, így a fajokat szekvenciaanalízissel határoztuk.

Eredmények a Gupta- és Yoshida-féle módosított primerkészlettel

A Gupta-és Yoshida-féle primereket összesen öt PCR protokollal alkalmaztuk. A hagyományos PCR során a primerek egyik része esetében 50 °C-os, míg a másik része esetében 55 °C-os anellációs hőmérsékletet alkalmaztunk. A három, különböző anellációs hőmérsékleti intervallumot alkalmazó protokoll szerinti td-PCR vizsgálatot minden primerpár esetén elvégeztük, a megfelelő hosszúságú PCR-termékeket a 17.-20. ábrákon piros karikával jelöltük. Megfelelő hosszúságú terméknek tekintettük azt, amelyik a megfelelő mérettartományba esett, + / - 200 bp. Ennek oka, hogy a primereket a rendelkezésre álló LYSV teljes genomok szekvenciaadatai alapján terveztük, azonban az általunk vizsgált 23A LYSV izolátum szekvenciaadatairól nem álltak rendelkezésünkre átfogó, előzetes szekvenciaadatok. Az általunk vizsgált LYSV izolátum genomjának esetében, a szakirodalmi adatokhoz képest az esetleges deléciók, vagy inzerciók okozta kísérleti hibák kiszűrése érdekében, az elméletben megállapított megfelelő bp hosszúságú tartományt a gyakorlatban így némi rátartással kezeltük.

Eredmények a saját fejlesztésű LYSV primerekkel

A saját fejlesztésű LYSV primerekkel végzett kísérletek során a különböző anellációs hőmérsékletű PCR és td-PCR protokollokkal nyert termékek között a HC-Pro-P3, a CI és a CP fehérjéket kódoló régiók szekvenciáit sikerült kimutatni az LYSV2 FOR/REV, LYSV4 FOR/REV, és LYSV8 FOR/REV primerpárok segítségével. Ezen primerpárokkal mind hagyományos, mind td-PCR technikával megfelelő méretű PCR-termékeket kaptunk, amelyek a legnagyobb genetikai azonosságot mutatták a KP258216 és HQ918255 azonosítójú LYSV referencia izolátumokkal. Azonban néhány PCR-termék esetében, amelyeket a megfelelő hosszúságú tartományba soroltunk, nem kaptunk értelmezhető szekvenciaadatokat a BLAST analízis során, jelezve, hogy a td-PCR technikával bár több megfelelő hosszúságú DNS szakaszt nyertünk, az aspecifikus termékek száma is nagyobb volt, mint a hagyományos PCR esetében.

Eredmények a fajspecifikus *Allexivirus* primerekkel

A különböző allexivírus fajok kimutatása során több mintát vizsgáltunk különböző primerpárokkal. A GarV-X fertőzöttség kimutatása esetében a saját fejlesztésű és szakirodalmi primerpárokkal végzett PCR sem eredményezett megfelelő hosszúságú PCR-terméket, ami arra utalhat, hogy a használt primerek nem voltak optimálisak. A fajt a HaAllexi sé M4 primerpár segítségével mutattuk ki, szekvenciaanalízis útján. A GarV-C fertőzést a Bereda-féle primerpár segítségével mutattuk ki, amelyet szekvenciaanalízissel is megerősítettünk. A GarV-B fertőzöttséget szintén kimutattuk az általunk tervezett fajspecifikus primerpár használatával, és ezt szekvenciaanalízis is megerősítette. A saját fejlesztésű GarV-D primerpárral szintén több esetben kaptunk vissza megfelelő tartományba eső PCR terméket. A fajok azonosítását szekvenciaanalízissel támasztottuk alá, a filogenetikai elemzés tovább erősítette az eredményeket.

Mesterséges fertőzés eredményei LYSV izolátummal

Az LYSV gazdapreferenciáját vizsgáló mesterséges fertőzési kísérletek során a 23A LYSV izolátum jelentős fertőzőképességet mutatott a 'Makói Tavaszi' fokhagymában, ahol a növények 87,5%-át sikeresen fertőzte meg, ezt a 1000-1200 bp hosszúságú PCR-termékek is igazolták. Ezzel szemben a 'Lincoln' póréhagyma esetében az izolátum csak korlátozott mértékben volt képes fertőzni, a növények mindössze 25%-ánál mutatkozott fertőzés, és itt is alacsonyabb víruskoncentrációt észleltünk. Az eredmények alapján az LYSV izolátumnak erősebb gazdapreferenciája van a fokhagyma iránt, míg a póréhagymában kevésbé hatékonyan szaporodik.

Provokációs fertőzési kísérlet *Carlavirus* izolátummal

A kevert *Carlavirus* fertőzés létrehozására irányuló provokációs kísérlet során a 'Makói Tavaszi' fokhagymamintákban összesen 11 esetben alakult ki fertőzés: 5 esetben GCLV, 6 esetben SLV fertőzés. A GCLV-vel fertőzött minták kb. 800 bp, míg az SLV-vel fertőzött minták kb. 700 bp hosszúságú PCR-termékeket adtak. Azonban a kísérlet során a kevert fertőzés létrehozása nem sikerült, annak ellenére, hogy GCLV-t és SLV-t tartalmazó növényi szövetekkel inokuláltuk a mintákat. A kísérlet tehát azt mutatta, hogy a két *Carlavirus* faj külön-külön sikeresen fertőzött, de kevert fertőzés nem alakult ki.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk tervezett HaPoty szenz primer segítségével sikeresen kimutattunk valamennyi fokhagymát fertőző potyvírus fajt. A kínai és spanyol izolátumok vírusfertőzöttsége aggasztó képet fest a vírusfajok behurcolásáról, ugyanis ez a két ország nemcsak a legnagyobb fokhagyma előállítók közé tartozik világszinten, hanem Kína a világelső, Spanyolország pedig a második legnagyobb mennyiségű fokhagymát exportáló ország volt 2020-ban (FAOSTAT, 2020).

A HaPoty szenz primer felhasználási lehetőségei között azonban érdemes megemlíteni, a potenciálisan univerzális potyvírus primerként való felhasználhatóságát. Ez az indítószekvencia ugyanis a Növénykórtani Tanszéken folyó másik kutatásban, a *Bean yellow mosaic virus* kimutatására is alkalmasnak bizonyult az M4 antiszenz primerrel együtt történő felhasználás során.

A Gupta- és Yoshida-féle primerkészlettel végzett optimalizációs eljárásunk megítélése kettős. Egyfelől a kilenc primerpár közül hárommal sikerült eredményeket elérnünk, ezek közül a két Gupta-féle esett át tényleges optimalizáción. Ilyen értelemben az optimalizáció sikerességének határfoka alacsonynak tekinthető, hiszen csak két esetben kaptunk vele pozitív eredményt.

Másfelől azonban a Gupta- és Yoshida-féle, valamint a saját primerpárok felhasználásának útján szerzett szekvenciaadatok is azt mutatják, hogy az optimalizációs eljárás alap gondolata, miszerint a köpenyfehérje régió alapján legközelebbi rokonsági kapcsolatot mutató teljes genom szerint optimalizáljuk a primereket, helyes elgondolás lehetett..

Az így elkészített kilenc filogenetikai törzsfa mindegyikén megfigyelhetjük, hogy az adott génszakasz minden esetben a KP258216 referencia izolátummal mutatja a legközelebbi rokonsági kapcsolatot. Ez jelentheti azt is, hogy a köpenyfehérje régió alapján a rokonsági viszonyokra adott prognózisunk az egyéb génszakaszok filogenetikai vizsgálata során igazolódott, ám ennek vizsgálata további kutatást és nagyobb mintaelemszámot igényelne.

Ismeretlen nukleotid sorrendű izolátum genomjának feltérképezése esetén a primerek optimalizációja egy szükséges lépés lehet, ugyanis a szakirodalmi primerek működőképessége számos esetben nem igazolható vissza in silico módszerekkel, a rendelkezésre álló referencia izolátumok alapján. Ugyanakkor az optimalizációs módszer még fejlesztésre szorul a határfok növelése érdekében.

Az optimalizáció szükségességét, amennyiben szakirodalmi primereket használunk, az is mutatja, hogy a teljes egészében az NCBI adatbázisban rendelkezésre álló referencia

izolátumok alapján készített saját LYSV primerekkel lényegesen jobb eredményeket értünk el, mint a referencia izolátumokkal kevesebb homológiát mutató, szakirodalmi társaikkal.

A LYSV gazdanövény preferenciájának vizsgálata azt az érdekes eredményt hozta, hogy az általunk azonosított hazai izolátum látszólag nem, vagy csak kis mértékben volt képes fertőzni névadó gazdanövényfaját. A szakirodalom ugyan említést tesz a LYSV fokhagymát fertőző törzséről, a LYSV-G-ről (LOT et al., 1998), azonban az NCBI adatbázis ezen a megkülönböztetett néven nem tartalmaz referencia izolátumokat, így a mi izolátumunk és a LYSV különböző törzsei közötti rokonsági viszonyok feltérképezése egyelőre nem lehetséges.

A carlavírusokkal elért eredményeinkben azt találtuk, hogy a hiányoznak azok a minták, amelyek a nemzetség mindkét fájával fertőztek. Ehhez a megállapításhoz előzetesen ellenőriztük a HaCarla primer megbízhatóságát, illetve a GCLV és SLV vírusok elkülönítésére való alkalmasságát szekvenciaanalízissel és filogenetikai törzsfelállítással is. Ezt követően hajtottuk végre a két vírusfajt együtt tartalmazó inokulumokkal a provokációs fertőzéses tesztet, amely során nem sikerült mesterséges körülmények között kevert fertőzést létrehozni egy növényen belül. A szakirodalomban találhatunk olyan eredményeket is, ahol a két vírus nem volt egyidejűleg jelen (DOVAS és VOVLAS, 2003), de olyan eredmény is létezik, amelyben sikerült a két fajt azonos növényi anyagból kimutatni (PAUZI et al., 2018). A jelenség további vizsgálata lehet szükséges, ugyanis a szakirodalom szerint a nemzetség különböző fajtái nem okozhatnak egymással szembeni keresztvédettséget egy gazdanövényen belül (KING et al., 2011).

A kevert fertőzések hiányának tényét tovább árnyalja, hogy az egyes fajokkal fertőzött minták bizonyos földrajzi mintázatot mutatnak; a francia mintákból csak a GCLV fajt, a kínai és román mintákból csak az SLV fajt tudtuk kimutatni, míg a spanyol mintákból egyiket sem tudtuk kimutatni. Magyarországon belül is a tájegységek közötti különbség látható; a makói minták a GCLV-vel voltak fertőztek, a hajdúnánási minták az SLV-vel, míg pl. a pusztaszentlászlói minták egyik fajt sem tartalmazták. A földrajzi elhelyezkedés és a fertőző faj közötti összefüggés szignifikanciájának megállapításához az általunk használt mintaelemszám ugyan alacsony volt, maga a jelenség a további kutatások során figyelmet érdemelhet.

Az általunk vizsgált SLV izolátumok szekvenciaadatainak BLAST analízisét követően azt az eredményt kaptuk, hogy ezek az izolátumok a GLV fajjal mutatják a legnagyobb genetikai azonosságot. A nomenklatúra és a vírusfajok átnevezéseinek zavarossága miatt felmerülhet, hogy vajon GLV néven hivatkozott vírus izolátumok vajon a GCLV vagy az SLV mintákkal mutatják-e a szorosabb rokonsági kapcsolatokat? A taxonómiai átcsoportosítások során a GLV-t az SLV fokhagymát fertőző törzseként is meghatározták (SLV-G), így az a

kérdés is felmerül, hogy a GLV néven hivatkozott izolátumok az SLV fajon belül valóban önálló vonalat képviselnek-e, vagyis az általunk kimutatott izolátumok valóban a SLV-G törzs tagjai lehetnek-e.

A filogenetikai törzsfá vizsgálatával megállapítható, hogy a GCLV és SLV izolátumok egymástól élesen elkülönülnek, azonban a GLV és SLV izolátumok nem különülnek el egymástól. Ez arra enged következtetni, hogy bár az általunk fejlesztett HaCarla szenz primer segítségével bizonyítottan el tudjuk különíteni a GCLV és SLV fajokat egymástól, a filogenetikai törzsfá vizsgálatával nem erősíthető meg az a BLAST analízis által sugallt tény, miszerint az általunk kimutatott izolátumok valóban egy SLV-G vonalhoz tartoznának.

Az M4 antiszenz primer jelenlétében a HaAllexi szenz primerünk működőképessége többszörösen is megerősítést nyert szekvenciaanalízisek útján, azonban az *Allexivirus* nemzetség magas fajsza ma miatt ezzel a primerpárral a fajspecifikus határozás nem lehetséges. A szakirodalmi eredetű és a saját fajspecifikus primereink működőképességét szintén megerősítettük, azonban a GarV-X fertőzőtséget sem a saját, sem a szakirodalmi eredetű primerpárral nem sikerült kimutatnunk annak ellenére, hogy a kísérlethez használt 49A minta GarV-X fertőzőtséget korábban már bizonyítottuk. Ennek oka ismeretlen.

Az általunk kimutatott *Garlic virus* B, C, D, és X izolátumok elnevezése a jövőben elképzelhető, hogy taxonómiai átrendezések miatt módosulhat. Bizonyos kutatások felvetik, hogy a GarV-B és a GarV-X egy azon vírusfaj két eltérő vonala lehet, ahogy a GarV-A, a GarV-E és a GarV-D fajok is egyesíthetők lehetnek (CELLI et al., 2018).

A fajsza m csökkenése mellett a fajsza m növekedésének esélye miatti átrendeződések esélye is fennáll, ugyanis az általunk kimutatott egyik *Garlic virus* B izolátum egy feltételezett *Garlic virus* G (NCBI, 2019c) izolátummal mutatja a legnagyobb genetikai azonosságot a BLAST analízis alapján. Amennyiben az ICTV hivatalosan elismeri a *Garlic virus* G faj létezését, úgy az általunk a 23A mintából kimutatott GarV-B izolátum státusza a GarV G faj első magyarországi leírásává módosulhat.

További érdekesség az allexivírusok fajspecifikus kimutatásának vonatkozásában, hogy bár a 43A és 43B minták ugyanazon fokhagymafej két különböző gerezdjéről származó vírusizolátumokat jelölnek, az azokat fertőző GarV-D izolátum szekvenciaadatai a BLAST analízis szerint más-más referencia izolátumokkal mutatnak nagyfokú genetikai azonosságot, illetve a filogenetikai törzsfán sem egymás mellett helyezkednek el ezek az izolátumok. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a fokhagyma növényt egy azon vírusfaj eltérő törzsei egyidejűleg fertőzhetik. Ez a nemzetségek közötti komplex fertőzés és a nemzetségen belüli, fajok közötti komplex fertőzés mellett a fertőzési események eddig fokhagymán nem vizsgált

új tengelyét, a fajon belüli, törzsek közötti komplex fertőzés, vagy rekombináció lehetőségét veti fel. Ez új kutatási vonalat nyithat meg a nemzetségek- és fajok közötti szingergista- és antagonista kölcsönhatások, továbbá az ezek által okozott termésveszteség vizsgálatának területén is.

A vizsgálatokat a GarV-A, GarV-E és ShVX fajok irányába lehet érdemes kiterjeszteni a jövőben, ezeket a fajokat ugyanis Lengyelországban már leírták. (CHODORSKA et al., 2014;)

Vizsgálataink során vírusmentes fokhagyma növényt nem azonosítottunk, vagyis az összes általunk vizsgált minta a három nemzetség legalább egy fajával fertőzött volt. Magyarországon a certifikált fokhagyma vetőgerezdeket jellemzően az OYDV potyvírus fajra szűrik (FVM 50/2004. (IV. 22.)), azonban az általunk vizsgált, Magyarországon előállított, certifikált vetőgerezdek szinte minden esetben fertőzöttek voltak carlavírus és allexivírus fajokkal. Ez a termesztési gyakorlatban azt jelentheti, hogy a szabadföldön jó eséllyel bekövetkező potyvírusos fertőződés kialakulása esetén (CONCI et al., 2003) a vírus nem egyedi fertőzésben, hanem rögtön a legkomolyabb gazdasági kárral fenyegető víruskomplex formájában fejti ki negatív hatását (LOT et al., 1998). Amennyiben a termesztő a vetőgerezdet nem vásárolja, hanem az előző évi betakarított terményből telepít vissza, úgy a víruskomplex kialakulásának az esélye és a lehetséges termésveszteség mértéke tovább nő (CONCI et al., 2003). a vegetatív szaporítási technológia miatt nemcsak a certifikált vetőgerezdek, de az étkezési célra értékesített fokhagyma is egyben lehetséges, házikerti szaporítóanyag, ami hosszabb távon a vírusok üzemi felszaporodásának kedvez. Az egyre inkább globalizálódó piacokon fokhagyma behozatal további lehetséges fertőzési forrást jelenthet.

A makói minták fertőzöttsége feltűnő. Ez nemcsak a fokhagymatermesztés, hanem a teljes hagymatermesztési ágazatot is veszélyezteti, hiszen ezeknek a vírusfajoknak egy része az *Allium* nemzetség több tagját is képes fertőzni, emiatt az olyan hagymafajoknál, mint a vöröshagyma, vagy póréhagyma, amelyeknél a generatív szaporítás lehetősége fennáll, a kizárólag vegetatívan szaporított fokhagyma rezervoár növényként viselkedhet. A jövőben javasoljuk a fokhagymatermesztés és a szaporítóanyag előállítás során nemcsak az OYDV-re kiterjedő tesztelését, hanem annak teljes körű virológiai vizsgálatokkal való kiegészítését. Szóba kerülhet még a környező gyomflóra rezervoár szerepének vizsgálata, illetve az állati vektorok mellett a termesztéstechnológiai műveletek vektorszerepe is.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Új, hatékony primerek tervezése a *Potyvirus*, *Carlavirus* és *Allexivirus* nemzetségbe tartozó fokhagymát is fertőző vírusnemzetségek- és fajok kimutatására.
2. *Leek yellow stripe virus*, *Garlic virus B*, *Garlic virus C*, *Garlic virus D*, *Garlic virus X* első hazai kimutatása.
3. A szekvenciaadatok alapján az izolátumok, filogenetikai rokonsági viszonyainak feltárása.
4. A hazai LYSV izolátum gazdanövény specifikus, vírusátviteli tulajdonságainak jellemzése.
5. A fokhagymát fertőző *Carlavirus* fajokok komplex fertőzési tulajdonságainak jellemzése.

7. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

- KSH (2020): A fontosabb zöldségfélék betakarított összes termése. Link: ['www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0024.html'](http://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0024.html), Központi Statisztikai Hivatal
- FAOSTAT (2020): Food and agriculture organisation of the United Nations. Link: ['www.fao.org'](http://www.fao.org), FAOSTAT
- SZIRMAI, J. (1958): Vírusveszély a makói hagymatermesztésben. In: *Növénytermelés*. 1 (7) 63-72 p.
- MELHUS, I. E., REDDY, C. S., HENDERSON, W. J. és VESTAL, E. (1929): A new virus disease epidemic on onions. In: *Phytopathology*. (19) 73-77 p.
- BREMER, H. (1937): Über die bisher fälschlich 'Zwiebelrotz' genannte Gelbstreifigkeit an Zwiebelsamenträgern. In: *Phytopathologische Zeitschrift*. (10) 79-105 p.
- TÓBIÁS, I. (1987): Vírusos betegségek. In: Botos, G., Füstös, Zs. (szerk.). *Hagymafélék termesztése*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 230-233 p.
- REGŐS, A. (1991): Fertőzött fokhagymák. In: *Magyar mezőgazdaság*. 21 (46) 13 p.
- REGŐS, A. (1992): A fokhagymaállományok vírusfertőzöttsége Makó térségében. In: *Kertgazdaság*. 2 (24) 83-87 p.
- BUDAI, C., KISS, F. és REGŐS, A. (1999): A fokhagyma növényvédelme. In: *Növényvédelem*. 4 (35) 153-158 p.
- KOO, B. J. (1999): Atkával terjedő fokhagyma vírust izoláltak termesztett fokhagymáról [cikkismertetés]. In: *Növényvédelem*. 4 (35) 172 p.
- NCBI (2019a): Garlic mite-borne mosaic virus. Link: ['www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&id=39058'](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&id=39058), National Center for Biotechnology Information
- LACZKÓ, T. (2003a): A fokhagyma termesztés helyzete, nagyságrendje és piacossága. In: *Őstermelő: gazdálkodók lapja*. 5 (7) 44-46 p.
- LACZKÓ, T. (2003b): A fokhagyma termesztés helyzete, nagyságrendje és piacossága II. In: *Növényvédelem*. 6 (7) 31-34 p.
- SOMOGYI, N. (2006): Kitörési pont lehet-e a fokhagyma termesztése? In: *Kertészet és szőlészet*. 40 (55.) 6-7 p.

- SZARVAS, A. (2010): Hagymavírusok (IYSV, LYSV, OYDV, GCLV) felderítése a Dél-alföldi régióban. MSc. dolgozat. *Debreceni Egyetem, Mezőgazdaságtudományi Kar*, Debrecen
- GOMBKÖTŐ, C. (2011): Őszi és tavaszi termesztésű fokhagymák értékelő összehasonlítása. PhD. dolgozat. *Nyugat-Magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar Mosonmagyaróvár*
- CHEN, J., CHEN, J. és ADAMS, M. J. (2001): A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. In: *Archives of Virology*. 4 (146) 757-766 p.
- LOT, H., CHOVELON, V., SOUCHE, S. és DELECOLLE, B. (1998): Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. In: *Plant Disease*. 12 (82) 1381-1385 p.
- DOVAS, C. I. és VOVLAS, C. (2003): Viruses infecting *Allium spp.* in southern Italy. In: *Journal of Plant Pathology*. 2 (85) 135 p.
- PAUZI, Y., LESTARI, S. és HIDAYAT, S. (2018): Variations of Garlic Common Latent Virus and Shallot Latent Virus Concentration on Shallot and Garlic. In: (szerk.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 012045 p.
- KING, A. M., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J. és CARSTENS, E. B. (2011): Virus taxonomy: IX report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. S.l.: *Elsevier Academic Press*. 903-907, 924-927, 1072-1079 p.
- CELLI, M. G., PEROTTO, M. C., LUCIANI, C. E., POZZI, E. A. és CONCI, V. C. (2018): Molecular characterization of the *Garlic virus B* genome and evidence of *Allexivirus* recombination. In: *European Journal of Plant Pathology*. (153) 301-310 p.
- CHODORSKA, M., PADUCH-CICHAL, E., KALINOWSKA, E. és SZYNDEL, M. S. (2014): Assessment of allexiviruses infection in garlic plants in Poland. In: *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 2 (13) 179-186 p.
- CONCI, V. C., CANAVELLI, A., LUNELLO, P., DI RIENZO, J., NOME, S. F., ZUMELZU, G. és ITALIA, R. (2003): Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. In: *Plant Disease*. 12 (87) 1411-1415 p.