



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Prunus fajokon végzett *in vitro* vírusmentesítési eljárások
hatékonyságának értékelése

Szabó Luca Krisztina

Budapest

2024

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Kertészeti biológia

vezetője: Zámboriné Dr. Németh Éva
egyetemi tanár, DSc
MATE, Kertészettudományi Intézet
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető: Dr. Hegedűs Attila
egyetemi tanár, DSc
MATE, Genetika és Biotechnológia Intézet
Növénybiotechnológiai Tanszék

Társ témavezető: Dr. Preininger Éva
tudományos főmunkatárs, PhD
MATE, Kertészettudományi Intézet
Gyümölcsstermesztési Kutatóközpont

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
.....
A témavezetők jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	6
2.	Irodalmi áttekintés.....	8
2.1.	A csonthéjas gyümölcsfajokat fertőző vírusok	8
2.1.1.	PPV	12
2.1.2.	CVA.....	12
2.1.3.	LChV-1	13
2.1.4.	PNRSV.....	14
2.2.	A vírusok elleni védekezés lehetőségei	14
2.3.	Vírusmentesítési módszerek fás szárú gyümölcsfajok esetében.....	16
2.3.1.	Hagyományos hőkezelés.....	16
2.3.2.	<i>In vitro</i> technikák	17
2.3.2.1.	Merisztématenyészet és mikrooltás	21
2.3.2.2.	Hőkezelés és hajtáscsúcsstenyésztés	21
2.3.2.3.	Kemoterápia.....	25
2.3.2.4.	Krioterápia	26
2.3.2.5.	Elektroterápia	27
2.3.2.6.	Szomatikus embriogenezis.....	28
2.4.	Vírus detektálási módszerek.....	29
2.4.1.	Bioteszt	29
2.4.2.	ELISA.....	29
2.4.3.	PCR.....	30
2.4.4.	Nagy áteresztőképességű szekvenálás	31
3.	Anyag és módszer	32
3.1.	Növényanyag	32
3.2.	<i>In vitro</i> kultúrák létrehozása és növénynevelési körülmények.....	32
3.3.	<i>In vitro</i> vírusmentesítési kezelések.....	33
3.3.1.	Hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztés	33
3.3.2.	Kemoterápia.....	34
3.3.3.	Hőkezelés és kemoterápia kombinációja	34
3.4.	Vírus diagnosztika	35
4.	Eredmények	37
4.1.	<i>In vitro</i> kultúrák létrehozása vírusfertőzött fákról.....	37
4.2.	CVA fertőzött szilva hajtástenyészeteken végzett <i>in vitro</i> vírusmentesítési kísérletek eredményei	38
4.2.1.	Hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztés eredménye.....	38

4.2.2.	Kemoterápia hatása önmagában vagy hőkezeléssel kombinálva	40
4.3.	A CVA- és LChV-1+PPV-fertőzött kajszi tenyészeteken végzett <i>in vitro</i> vírusmentesítési kísérletek eredményei	41
4.3.1.	Hőkezelést követő hajtáscsúcs-tenyésztés eredményei.....	41
4.3.2.	Kemoterápia hatása önmagában vagy hőkezeléssel kombinálva	42
4.4.	PNRSV fertőzött meggy tenyészeteken végzett <i>in vitro</i> vírusmentesítési kísérletek eredményei.....	44
4.5.	Kemoterápiás kísérletek eredményei összefoglalva	45
4.5.1.	A kemoterápia vírusmentesítő hatása.....	45
4.5.2.	A kemoterápia fitotoxikus hatása.....	46
4.6.	A vírusfertőzött <i>Prunus</i> hajtástenyészeteken végzett vírusmentesítési kísérletek eredményei az idő függvényében	47
4.7.	Új tudományos eredmények	51
5.	Következtetések és javaslatok.....	52
5.1.	CVA-fertőzött szilva hajtástenyészeteken végzett vírusmentesítési kísérletek megvitatása	52
5.1.1.	Hőkezelést követő hajtáscsúcs-tenyésztés eredménye	52
5.1.2.	Kemoterápiás kísérletek	53
5.2.	CVA és LChV-1+PPV fertőzött kajszi tenyészeteken végzett <i>in vitro</i> vírusmentesítési kísérletek megvitatása	54
5.3.	PNRSV fertőzött meggy tenyészeteken végzett <i>in vitro</i> vírusmentesítési kísérletek megvitatása	56
5.4.	A kemoterápia fitotoxikus hatásainak megvitatása	56
5.5.	A vírusfertőzött <i>Prunus</i> hajtástenyészeteken végzett vírusmentesítési kísérletek eredményei az idő függvényében	57
5.6.	Az eredmények gyakorlati alkalmazhatósága	59
6.	Összefoglalás	61
7.	Summary.....	63
8.	Mellékletek.....	65
M1.	Irodalomjegyzék.....	65
9.	Köszönetnyilvánítás	76

Rövidítések jegyzéke

CVA	cseresznye vírus A (Cherry capillovirus A)
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
ESFY	csonthéjasok európai sárgulása (European stone fruit yellows)
HTS	nagy áteresztő képességű szekvenálás (High throughput sequencing)
LChD	cseresznye aprógyümölcsűség (Little cherry disease)
LChV-1	cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (Little cherry virus 1)
PDV	szilva törpülés vírus (Prune dwarf ilarvirus)
PNRSV	<i>Prunus</i> nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (<i>Prunus</i> necrotic ringspot ilarvirus)
PPV	szilvahimlő vírus (Plum pox potyvirus)
RISC	RNS-indukálta géncsendesítés végrehajtó komplex (RNA-induced silencing complex)
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció (Reverse transcription-polymerase chain reaction)
siRNA	kis interferáló RNS (small interfering RNA)

1. Bevezetés

A csonthéjas gyümölcsfák természetes gazdanövényei számos vegetatív úton terjedő kórokozónak. Az ismert vírusos betegségek komoly problémákat okoznak a csonthéjas ültetvényekben. A vírusok jelenléte legyengítheti a fákat, a termésmennyiség csökkenését eredményezheti, végső esetben a fa pusztulásához is vezethet. A vírustünetek gyakran nem csak a levélen, hanem a gyümölcsön is megjelennek, ezzel jelentősen csökkentve a gyümölcsök piacképességét, így jelentős gazdasági kárt okozhatnak. A vírusok rovarvektorokkal és a vegetatív szaporítás során könnyen átjutnak növényről növényre, ellenük a megelőzés a legfontosabb eszköz: elengedhetetlen az egészséges szaporítóanyag használata az ültetvények létrehozásakor és a vektorok elleni folyamatos védekezés a fenntartás során.

Magyarországon a 14/2017. (III. 23.) FM rendelet határozza meg azon károsítókat, amelyek esetében a szaporítási rendszer kiindulási anyagain vizuális ellenőrzést és adott esetben mintavételt és laboratóriumi vizsgálatot (ELISA vagy PCR tesztet) kell végezni. A rendelet 9. melléklete tartalmazza a törzsültetvények fenntartásának növény-egészségügyi követelményeit, amely évenként kötelező víruseszteléseket ír elő sharka-gazda csonthéjasoknál szilvahimlő vírusra (PPV), *Prunus* nekrotikus gyűrűsfoltosság vírusra (PNRSV) és szilva törpülés vírusra (PDV), valamint kajsz (*Prunus armeniaca*) fajtákon évente nested PCR tesztet kell végezni a csonthéjasok európai sárgaság fitoplazma betegségének (ESFY) kimutatása céljából. A tesztelendő kórokozók túl számos vírust, viroidot hordozhatnak a csonthéjasok, egyre több, akár látens módon, tüneteket nem okozva jelenlevő vírust azonosítanak *Prunus* fajokban. A sok újonnan leírt, illetve új gazdanövényben azonosított kórokozó nem csak a vegetatív terjedésnek köszönhető, de nagyban hozzájárul ehhez a detektálási módszerek fejlődése, ami lehetővé teszi az összes növényben található kórokozó feltérképezését genomszekvencia alapján.

Az egészséges gyümölcs szaporítóanyagok fenntartása állami feladat. Hazánkban a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kertészettudományi Intézet Gyümölcsstermesztési Kutatóközpontjában történik a kórokozómentes csonthéjas gyümölcs szaporítóanyagok előállítása és ezek fenntartása izolált központi törzsültetvényekben. Az intézetben osztrák-magyar együttműködés keretében 2002-ben indult el vírusmentesítési program *in vitro* technikák alkalmazásával (Mendonça et al. 2004).

A legrégebben alkalmazott módszer vírusmentes növények előállítására a hőkezelés. A kezelés során a növényeket hőkamrába helyezve tartósan 30 °C fölötti hőmérsékleten tartják, így nagy eséllyel a hajtás csúcsi része vírusmentessé válik. Elsőre ez egyszerűnek hangzik, ám rengeteg tényező befolyásolja a vírusmentesítés sikerét, ezért is fontos új módszerek feltérképezése, a meglévők kombinálása. Nagyon jelentős tényező a genotípus-függés, vagyis a növényfajoknak, fajtáknak különböző a toleranciájuk az alkalmazott kezelésekkel szemben, a csonthéjasok különösen érzékenyek pl. a magas hőmérsékletre, és a merisztémából történő regeneráció hatékonysága is elmarad a lágyszárú vagy például az almatermésű növényekhez képest. A különböző vírusok is eltérően reagálnak a kezelésekre, így előfordulhat, hogy a vírus eliminálásához szükséges erősségű kezelés már a növényi tűréshatáron túllép, és a növény elpusztul a kezelés során. Vírusmentes növények előállítására számos technikát alkalmaznak szerte a világon, a hagyományos cserepes kezeléseket nagyrészt *in vitro* módszerek váltották fel. Általánosan használható, megbízható, gyors megoldás azonban nem áll rendelkezésre csonthéjasok vírusmentesítésére. Ezért tartom fontosnak a témát, a szakirodalom folyamatos követését és az ígéretes eljárások optimalizálását a hazai fajtákra, illetve az aktuálisan problémát okozó vírusokra. A mentesítési eljárás szerves része a tesztelés, vagyis a vírus jelenlétének megbízható, gyors kimutatása, ami nagyban hozzájárul a folyamat sikerességéhez és lerövidítéséhez.

Doktori munkám során célul tűztem ki

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

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A csonthéjas gyümölcsfajokat fertőző vírusok

A *Rosaceae* családba tartozó *Prunus* nemzetség legalább 230 fajt foglal magába, melyek élelmiszerként vagy dísznövényként jelentős értéket képviselnek. A csonthéjasok Ázsiából származnak, de ma már az egész világon sokféle termesztik különböző fajukat, az európai gyümölcsstermesztésben legjelentősebb az őszibarack (*Prunus persica* L.), mandula (*Prunus dulcis* L.), cseresznye (*Prunus avium* L.), meggy (*Prunus cerasus* L.), szilva (*Prunus domestica* L.) és kajszi (*Prunus armeniaca* L.) (Rubio et al. 2017).

A *Prunus* fajokat fertőző vírusok és viroidok komoly gazdasági jelentőséggel bírnak széles elterjedésük és a különböző gazdafajokban okozott kártételük miatt. A tünetek megjelenése és azok súlyossága az érintett gazdafajtól és a vírustól is függ. A termésen jelentkező tünetek csökkentik a gyümölcsök piacképességét, minőségi és mennyiségi romlást eredményeznek, de a vírusok befolyásolhatják a fa életképességét is (Rubio et al. 2017). A csonthéjasokat fertőző vírusok közül a szilvahimlő (sharka) betegséget okozó PPV bír a legnagyobb gazdasági kártétellel (Cambra et al. 2006b). A betegséggel kapcsolatos költségek – becslések szerint 30 év alatt 10 milliárd dollár világszerte – nemcsak a közvetlen veszteségeket foglalják magukban, hanem a megelőző intézkedéseket, ellenőrzéseket és a vírusmentesítési programokat is.

A csonthéjasokat fertőző vírusok elsősorban a növények vegetatív szaporításával és vektorokkal terjednek (Rubio et al. 2017). Pollennel való horizontális és maggal történő vertikális terjedésre is találunk példát PDV és PNRSV esetében (Mink 1993, Card et al. 2007, Amari et al. 2009), és a CVA jelenlétét is igazolták pollenből (Beaver-Kanuya és Harper 2019), ami tovább gyorsítja a vírusok terjedését. A csonthéjasokat érintő vírushelyzetről jelentek meg átfogó tanulmányok (Hadidi et al. 2011, Rubio et al. 2017), de folyamatosan bővül a lista, ahogy újabb és újabb gazdanövényből írnak le ismert vagy addig ismeretlen kórokozókat. Hou et al. (2020) 22 új vírus előfordulását írták le csonthéjas fajokban 2011 és 2020 között, ami potenciális veszélyekre és a probléma kezelésének fontosságára hívja fel a figyelmet. A dolgozat írásáig elérhető irodalmi adatok alapján a *Prunus*okat fertőző vírusokat és viroidokat a 2.1. táblázat foglalja magába.

2.1. táblázat *Prunus* fajokat fertőző vírusok és viroidok

(Rubio et al. (2017) táblázata alapján kiegészítve újabb előfordulásokkal, a kiegészítések publikálva: Szabó et al. 2024)

				mandula	kajszi	mirobalán	őszibarack	szilva	meggy	cseresznye
Luteoviridae	Luteovirus	Nectarine stem pitting-associated virus	NSPaV				x			
		Cherry associated luteovirus	ChALV						x	x
		Peach-associated luteovirus	PaLV				x			
Tymoviridae	Marafivirus	Nectarine marafivirus M	NeVM				x			
		Peach virus D	PeVD				x			
		Peach virus T	PeVT				x			
Tombusviridae	Tombusvirus	Carnation Italian ringspot virus	CIRV						x	x
		Petunia asteroid mosaic virus	PeAMV						x	x
		Tomato bushy stunt virus	TBSV						x	x
Secoviridae	Nepovirus	Cherry leaf roll virus	CLRV						x	x
		Arabidopsis mosaic virus	ArMV				x			x
		Cherry rosette virus	ChRV							x
		Myrobalan latent ringspot virus	MLRSV			x	x			
		Peach rosette mosaic virus	PRMV				x			
		Raspberry ringspot virus	RpRSV					x		x
		Tobacco ringspot virus	TRSV	x			x			x
		Tomato ringspot virus	ToRSV	x			x			
	Cheravirus	Cherry rasp leaf virus	CRLV		x		x			x
		Stocky prune virus	StPV				x	x		
	Fabavirus	Prunus virus F	PrVF							x
		Peach leaf pitting-associated virus	PLPaV				x			

				mandula	kajszi	mirobalán	őszibarack	szilva	meggy	cseresznye
		Cherry virus F	CVF						x	x
	Unassigned	Strawberry latent ringspot virus	SLRSV				x			
Bromoviridae	Ilarvirus	Prune dwarf virus	PDV	x	x		x	x	x	x
		Prunus necrotic ringspot virus	PNRSV	x	x	x	x	x	x	x
		Apple mosaic virus	ApMV	x	x		x	x	x	x
		American plum line pattern virus	APLPV		x		x	x		x
Unassigned	Ourmiavirus	Epirus cherry virus	EpCV						x	x
Closteroviridae	Ampelovirus	Plum bark necrosis stem pitting-associated virus	PBNPaV	x	x		x	x	x	x
		Little cherry virus 2	LChV2						x	x
	Velarivirus	Little cherry virus 1	LChV1	x	x		x	x	x	x
Potyviridae	Potyvirus	Plum pox virus	PPV	x	x	x	x	x	x	x
Betaflexiviridae	Capillovirus	Cherry virus A	CVA		x		x	x		x
		Apple stem grooving virus	ASGV					x		
		Mume virus A	MuVA				x			
	Foveavirus	Apricot latent virus	ApLV		x		x			
		Asian Prunus virus 1	APV1				x			
		Asian Prunus virus 2	APV2				x			
		Asian Prunus virus 3	APV3				x			
		Peach chlorotic mottle virus	PeCMV				x			
		Cherry virus B	ChVB							x
	Robigovirus	Cherry green ring mottle virus	CGRMV	x	x		x	x	x	x
		Cherry necrotic rusty mottle virus	CNRMV		x		x		x	x
		Cherry rusty mottle associated virus	CRMaV		x		x		x	x
		Cherry twisted leaf associated virus	CTLaV							x

				mandula	kajsz	mirobalán	őszibarack	szilva	meggy	cseresznye
		Cherry robigovirus 5	CRV-5							x
		Cherry virus Turkey	CVTR							x
	Trichovirus	Apple chlorotic leaf spot virus	ACLSV	x	x		x	x	x	x
		Apricot pseudo chlorotic leaf spot virus	APCLSV		x		x	x		
		Cherry mottle leaf virus	CMLV	x	x	x	x	x	x	x
		Peach mosaic virus	PcMV	x	x	x	x	x		
		Peach chlorotic leaf spot virus	PCLSV				x			
	Prunevirus	Apricot vein clearing associated virus	AVCaV		x		x	x		
		Caucasus prunus virus	CPV		x					
	Tepovirus	Prunus virus T	PrVT		x			x	x	x
Geminiviridae	Grablovirus	Prunus geminivirus A	PrGVA		x					x
viroids										
Pospiviroidae	Hostuviroid	Hop stunt viroid	HSVd	x	x	x	x	x	x	x
	Apscaviroid	Apple scar skin viroid	ASSVd							x
Avsunviroidae	Pelamoviroid	Peach latent mosaic viroid	PLMVd	x	x	x	x	x	x	x

x: az adott vírus (sor) az adott gazdanövényen (oszlop) előfordul

Nem minden esetben tudunk a vírushoz tüneteket kapcsolni, azonban több vírus együttes jelenléte már okozhat problémát, ezért fontos a látens előforduló vírusok jelenlétét is vizsgálni (pl. CVA látens vírus, ami gyakran van jelen tünettel járó fertőzött gazdanövényekben más vírusokkal egyidejűleg, vagy az őszibarack látens mozaik viroid tesztnövényen nem okoz tünetet, de kártétele miatt vizsgálatköteles), illetve a tünetek időjárástól függő megjelenése miatt a vizsgálat idejét és módját helyesen kell megválasztani.

Az alábbiakban azokat a csonthéjasokat fertőző vírusokat mutatom be röviden, amelyekkel a mentesítési kísérletekben dolgoztam.

2.1.1. PPV

A szilvahimlő vírus (plum pox virus, PPV) a *Potyviridae* családba tartozó Potyvirus nemzetség tagja. Örökítőanyaga pozitív, egyszálú RNS (+ssRNA). Legalább nyolc vírustörzse ismert. A PPV által okozott himlő betegség a legismertebb és legsúlyosabb, csonthéjasokat érintő vírus fertőzés (García et al. 2014). A tünetek nemcsak a levélen mutatkoznak meg, de a gyümölcsök felszínén és magján is gyűrűszerű foltok, gyümölcsdeformitások jelennek meg, csökken a gyümölcsök mérete, cukor:sav aránya, beérés előtti gyümölchullást eredményezhet, ezzel óriási veszteséget okozva elsősorban a szilva, kajszi és őszibarack ültetvényekben. Természetes gazdanövényei közé számos vad és termesztett *Prunus* faj tartozik. A vírus széleskörű elterjedése a nem megfelelően ellenőrzött, fertőzött szaporító anyag használatával, és a vegetatív átvitelén túl levéltetvekkkel és maggal történő terjedéssel magyarázható (Cambra et al. 2006a, Simmons és Munkvold 2014). Az Európai Unióban szigorúan szabályozott, a szaporítási rendszer minden fokozatában ellenőrizendő és kizárando a jelenléte (EU 2019/2072 rendelet, Magyarországon a 14/2017.(III.23) FM rendelet). Rutin vizsgálatára elérhető szabadföldi gyorseszteszt, illetve laboratóriumi vizsgálatokkal (ELISA, PCR), indikátornövényen bioteszttel kimutatható.

2.1.2. CVA

A cseresznye vírus A (cherry virus A, CVA) a *Betaflexiviridae* család Capillovirus nemzetségébe tartozó vírus. Örökítőanyaga pozitív, egyszálú RNS. Először Németországban írták le a jelenlétét cseresznyében (Jelkmann, 1995). Azóta kiderült, hogy világszerte elterjedt vírusról van szó, jelentették több *Prunus*

gazdaszervezetben, nemcsak cseresznyében és meggyben (Grimová et al. 2010, Komorowska és Cieślińska 2004), hanem kajsziban, őszibarackban, szilvában, japán kajsziban (*Prunus mume*) és mirobálnban (*P. cerasifera*) is kimutatták (Barone et al. 2006, Baráth et al. 2018, Marais et al. 2008, Kesanakurti et al. 2017, Ben Mansour et al. 2023, Wani et al. 2024). A CVA gyakran fordul elő más, betegséget okozó vírusokkal, ezért merült fel a lehetséges hozzájárulása ismert cseresznyebetegségekhez, (pl. cseresznye aprógyümölcsűség vagy a cseresznye nekrotikus rozsdaszínű foltosság), de nem sikerült hozzá tünetet kapcsolni, a gazdanövényben látens kórokozóként van jelen, ugyanakkor a tünetegyüttesek felerősítésében szerepe lehet (Jelkmann, 1995, James és Jelkmann, 1997). Széles elterjedése ellenére vektor szervezete nem ismert, terjedése vegetatív szaporítással történik, illetve a pollenből is igazolták jelenlétét (Beaver-Kanuya és Harper 2019). Magyarországon 2018-ban írták le először a jelenlétét kajsziban (Baráth et al. 2018). Kimutatására vírusspecifikus primerekkel végzett PCR módszerrel van lehetőség, látens fertőzése miatt indikátornövényen való bioteszt nem alkalmas rá és ELISA teszt sem érhető el.

2.1.3. LChV-1

A Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (little cherry virus-1, LChV-1) a *Closteroviridae* család *Velarivirus* nemzetségébe tartozik. Örökítőanyaga pozitív, egyszálú RNS. A Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 2 (LChV-2) mellett a LChV-1-et tartják a cseresznye aprógyümölcsűség betegség (LChD) okozójának. A tünetegyüttest mutató cseresznye gyümölcsei kicsik, hegyesek, halvány színűek és íztelenek, a levelek felülete vörösesbarna elszíneződést mutat. A LChD betegséget már 1933-ban leírták Kanadában (Bajet et al. 2008), majd eljutott a világ különböző tájaira (Fry és Wood 1970, Vitushkina et al. 1997, Isogai et al. 2004, Rott & Jelkmann 2001). Magát a kórokozó LChV-1-et jóval később, LChD tüneteit mutató cseresznyéből azonosították Németországban (Keim-Konrad és Jelkmann, 1996). Cseresznyén túl meggyben, szilvában, őszibarackban, mandulában, kajsziban is kimutatták (Matic et al. 2007, Candresse et al. 2013, Baráth et al. 2018). Terjesztő vektora nem ismert. Díszcseresznyén képes tünetmentesen fertőzni (Reeves és Cheney 1963). Indikátornövényen kimutatható, az általa okozott tüneteket Shirofugen ill. Kwanzan szindrómaként említi a szakirodalom (Matic et al. 2009, Candresse et al. 2013). Laboratóriumi kimutatása PCR-rel lehetséges. Az uniós szabályozás alapján cseresznye és meggy gazdanövényen vizsgálatköteles kórokozó, a prebázis

anyanövénynek, prebázis, bázis és certifikált szaporítóanyagnak LChV-1 mentesnek kell lennie.

2.1.4. PNRSV

A *Prunus* nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (*Prunus* necrotic ringspot ilarvirus, PNRSV) a *Bromoviridae* család Ilarvirus nemzetségébe tartozik. Örökítőanyaga pozitív, egyszálú RNS. Először őszibarackon igazolták a jelenlétét (Cochran és Hutchins 1941). Az általa okozott fertőzés lehet látens vagy jellegzetes, szétszórt klorotikus gyűrűk, nekrotikus elváltozások vagy foltok, kisebb levelek formájában jelentkezik (Aparicio et al. 1999). A cseresznyefák esetében különböző izolátumokat írtak le, melyek egyértelműen eltérő kórképet mutatnak, enyhe foltos vagy durva mozaikos tüneteket okoznak (Howell és Mink 1988, Crosslin és Mink 1990). Gyakran fordul elő más csonthéjas vírusokkal együtt komplex fertőzésben (Nemeth 1979). Őszibarackon PNRSV és szilva törpülés vírus (PDV) egyidejű fertőzése a „peach stunt” betegséget okozza, mely jellegzetes tünetei az idő előtti lombhullás, kéreghasadás, csökkent növekedés és terméshozam (Scott et al. 2001). A PNRSV a legtöbb termesztett *Prunus* fajt képes fertőzni. Vegetatív szaporítással átvihető, illetve pollennel és maggal is terjed (George és Davidson 1963, Amari et al. 2009). Az uniós szabályozás alapján mandula, kajszi, cseresznye, meggy, szilva és őszibarack gazdanövényen vizsgálatköteles kórokozó, a prebázis anyanövénynek, prebázis, bázis és certifikált szaporítóanyagnak PNRSV mentesnek kell lennie. Rutin vizsgálatára elérhető szabadföldi gyorsteszt, illetve laboratóriumi vizsgálatokkal (ELISA, PCR), indikátornövényen bioteszttel kimutatható.

2.2. A vírusok elleni védekezés lehetőségei

A vírusok elleni védelemben a megelőzés a legfontosabb eszközünk. Az ellenőrzött, egészséges szaporítóanyag használata és az ültetvények folyamatos ellenőrzése mellett a terjesztő vektorok elleni növényvédelem elengedhetetlen.

A természetben is jelen van több, a vírusokat megfékező folyamat. A hőmérséklet és a virulencia közötti összefüggést szabadföldön már régen megfigyelték. A vírustünetek alacsonyabb hőmérsékleten, jellemzően kora tavasszal jelentkeznek legmarkánsabban. Forró nyáron a tünetek akár el is tűnhetnek, ezt a jelenséget „heat masking”-ként említi a szakirodalom, vagyis magas hőmérséklet hatására a növényekben csökken a vírushozzás mértéke (Kassanis 1952).

Az eukarióta sejtekben konzerváltan működő védekező rendszer, az RNS-csendesítés (RNA silencing) a növények legfőbb vírus elleni védekező mechanizmusa. A gazdasejtbe bejutó RNS vírusok replikációja során intermediér duplaszálú RNS molekulák képződnek. A növény védekezőrendszere az idegen eredetű duplaszálú RNS molekulát felismeri és felhasogatja kisebb darabokra (small interfering RNA, siRNS), majd a hasítás által keletkezett duplaszálú siRNS-ek egyik szála beépül az RNS indukált géncsendesítési komplexbe (RNA-induced silencing complex - RISC), míg a másik szál lebomlik. A RISC komplexbe beépült siRNS-sel komplementer RNS-eket képes a rendszer felismerni és elhasítani, ami a felismert virális RNS degradációjához vezet (Csorba és Burgyán 2016). Az RNS-csendesítés alacsony hőmérsékleten gátolt, ami megmagyarázhatja a vírustünetek alacsony hőmérsékleten való megjelenését és erősödését (Szittyá et al. 2003).

A növényekben az úgynevezett rezisztencia (R) fehérjék képesek a patogének fertőzését követően felszaporodó specifikus virulencia faktorokat felismerni (McDowell és Simon 2006). Az R-fehérje-függő felismerés jellemzően egy gyors, robusztus sejtvédelmi rendszert aktivál, amely gyakran programozott sejthalált, hyperszenzitív reakciót indít el a fertőzés helyén (Soosaar et al. 2005). Az R gének leggyakrabban előforduló osztálya a nukleotidkötő hellyel és leucinban gazdag ismétlődő motívummal rendelkező fehérjéket kódoló NBS-LRR gének, melyek a *Prunus* fajokban is jelen vannak (Gutermuth et al. 2011).

A vírusoknak korlátozott genomméretük miatt szükségük van bizonyos növényi génekre, hogy befejezzék fertőzési ciklusuk lépéseit. Amennyiben a virális RNS replikációjához nélkülözhetetlen növényi fehérje nincs jelen, a vírus RNS-ről nem tud fehérje készülni, ugyanakkor az endogén növényi RNS-ek transzlációja zavartalanul végbemehet másik iniciációs faktoroknak köszönhetően. A recesszív módon öröklődő rezisztencia során egy, a növény szenzitivitását előidéző fehérje funkcióvesztése okozza a védettséget (Truniger és Aranda 2009). Így géntechnológiai módszerrel is állítottak már elő PPV-rezisztens szilvát úgy, hogy az eIF(iso)4E eukarióta transzlációs iniciátor faktort kódoló gént csendesítették (Wang et al. 2013).

Az is régóta ismert, hogy a vírusok szabálytalan eloszlást mutatnak a gazdanövényekben, és a legtöbb vírus nem jut be a merisztéma sejtjeibe (Knapp et al. 1998, Mochizuki és Ohki 2015), azonban a vírus merisztémából való kizárásának molekuláris mechanizmusát csak a közelmúltban vizsgálták. Wu et al. (2020) munkájukban leírták, hogy a WUSCHEL transzkripció faktor expressziója vírus

fertőzés hatására indukálódik a merisztematikus régióban, ami képes megakadályozni a vírusok bejutását a hajtáscsúcsi merisztémába a vírus fehérjék szintézisének gátlásával. Bradamante et al. (2021) átfogó tanulmányukban bemutatták az eddig ismert hajtáscsúcsban jelen lévő morfológiai gátak (pl.: szállítószövet hiánya, plazmodezmák keresztmetszetének csökkentése kallóz berakódással) és molekuláris mechanizmusok jelenlétét. Ugyanitt megemlítenek azonban olyan konkrét példákat is, ahol nepo- és tobravírusok képesek voltak ezeket a védelmi rendszereket kikerülni és megfertőzni a merisztémát.

2.3. Vírusmentesítési módszerek fás szárú gyümölcsfajok esetében

2.3.1. Hagyományos hőkezelés

A legrégebben és általánosan alkalmazott növényi vírusmentesítési módszer a hőkezelés. Hőkezelés során az alkalmazott magas hőmérséklet indukálja a növény saját védekező mechanizmusát, ami beindítja a vírus nukleinsavainak megsemmisítését célzó RNS csendesítési folyamatot. A hagyományos hőkezelést cserepes növényen végzik, hőkamrában, 30°C fölötti hőmérsékleten, több héten keresztül (MiNoiu 1975, Koubouris et al. 2007, Polak és Hauptmanova 2009, Howell et al. 2000). A hőkezelés idejének és hőmérsékletének megválasztásánál figyelembe kell venni a kezelt növény hőtoleranciáját, és ezzel egyidejűleg a vírus ellenállóképességét, hogy a kezelés eredményeként a vírusok inaktiválásával vírusmentes hajtáscsúcsok növekedjenek. A kezelt növény hajtáscsúcsát vírusmentes alanyra oltva kaphatunk vírusmentes növényt.

Kunkel az elsők között alkalmazta a hőkezelést őszibarack vírusos fertőzéseinek gyógyítására, melynek során 34-35°C-os meleg vízfürdőbe helyezett rügyes szár darabokat 4-5 napig, majd a kezelt növények hajtáscsúcsait vírusmentes alanyra oltotta (Kunkel 1936). Ritka eset, hogy hajtáscsúcs izolálás nélkül, a teljes növényből sikerüljön eltávolítani a vírust, de egy PPV mentesítési kísérlet során fiatal konténeres szilva, kajszi és őszibarack fajtákat helyeztek hőkezelő kamrába 37 °C-on 15 ill. 22 napig, és a kezelés után az egész cserepes növényeket megvizsgálva igazolható volt, hogy vírusmentes egyedeket kaptak (Polak és Hauptmanova 2009).

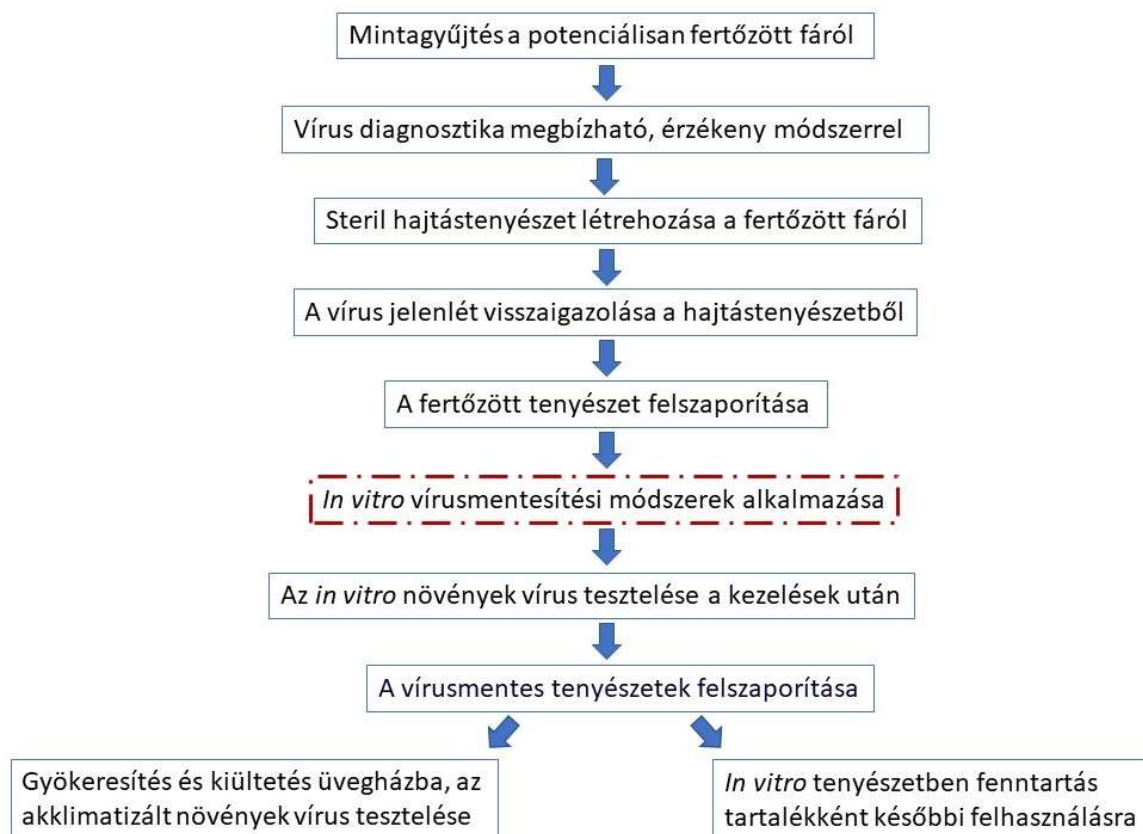
A módszer alkalmazását azonban megnehezíti, hogy a csonthéjasok különösen érzékenyek a magas hőmérsékletre. A hosszú ideig magas hőmérsékleten tartás a növények tűréshatárán gyakran túllép és a kezelés végére még életben maradó néhány

növény hajtáscsúcsai is gyakran vírusfertőzöttek maradnak (Manganaris et al. 2003, Koubouris et al. 2007, Polak és Hauptmanova 2009). A csonthéjasokon belül is az őszibarack és a cseresznye fajtákról mondható el, hogy a legérzékenyebbek a magas hőmérsékletre (Lenz et al. 1983, Polak és Hauptmanova 2009), míg a szilva képes legjobban tolerálni a hosszú időn át tartó magas hőmérsékletet (Dziedzic 2008), akár a 37 napig tartó hőkezelést 38°C fölötti váltakozó (két hétig 38°C, majd három hétig 38/46°C 16/8h, végül három napig napi két órát 50°C) hőmérsékleten, amely elegendőnek bizonyult a PPV inaktiválásához (MiNoiu 1975).

A magas hőmérséklettel szembeni tolerancia növényfajon belül genotípusonként is egészen eltérő lehet (Wahid et al. 2007). A növény genotípusa befolyásolja azt is, hogy egy adott vírus képes-e megfertőzni a hajtásvégek merisztematikus sejtjeit, és a hőkezelést követően milyen eloszlási mintázatot mutat a hajtásvégekben (Zhao et al. 2018). Így belátható, hogy a hőkezelésen alapuló vírusmentesítési módszerek sikeressége erősen genotípus-függő és nem általánosítható (Wang et al. 2018a).

2.3.2. *In vitro* technikák

Az *in vitro* szövettenyésztés előnye, hogy korlátozott helyigény mellett nagy mennyiségű homogén növényanyag áll rendelkezésre, lehetőséget ad steril körülmények között, az időjárástól és külső hatásoktól független kísérletek elvégzésére egész évben. Az *in vitro* kultúrák vírusmentesítési munkákhoz is széleskörűen alkalmazhatók. Kutatások igazolják, hogy a hagyományos hőkezeléshez képest az *in vitro* technikák alkalmazása felgyorsítja a vírusmentesítési folyamatot (Koubouris et al. 2007, Abdullahi és Lawrence 2022), ami azonban így is hosszadalmas, sok lépésből áll és évekbe is telhet, mire kiültethető kórokozómentes növényt kapunk (2.1. ábra).



2.1. ábra Az *in vitro* vírusmentesítés folyamata
(saját ábra, angolul publikálva: Szabó et al. 2024).

Prunus fajok vírusmentesítésében az *in vitro* hajtástenyészetben alapuló módszerek a legelterjedtebbek. Az 1980-as években kezdtek *in vitro* technikákat alkalmazni csonthéjas fajoknál a vírusok hatékonyabb eltávolítására (Deogratias et al. 1989a, 1989b). A publikációk alapján a 2.2. táblázatban foglaltam össze a csonthéjasokon sikeresen alkalmazott vírusmentesítési módszereket.

2.2. táblázat *Prunus* fajokon alkalmazott vírusmentesítési módszerek (angolul publikálva: Szabó et al. 2024)

<i>Prunus</i> faj	fajta	hőkezelést követő hajtásúcstenyésztes	kemoterápia	krio- terápia	elektro- terápia	szomatikus embriogenezis	sikeresen eliminált vírus	hivatkozás
mirobalán		36 °C, 4 hét +	ribavirin 50-100 mg/l +				PNRSV, ACLSV	Cieślińska 2007
európai szilva	‘Magna Glauca’ ‘Cacanska Rana’		ribavirin 40, 50 mg/l				PNRSV, ACLSV	Mazeikiene et al. 2019
	‘Cacanska Lepotica’		ribavirin 40, 60 mg/l				PPV	Paunovic et al. 2007
	‘Empress’	36 °C, 4 hét +	ribavirin 50-100 mg/l +				PNRSV	Cieślińska 2007
	‘Earliblue’	38/36 °C 16/8 h, 10-14 nap, 5 mm					PNRSV	Dziedzic 2008
	‘Crvena Ranka’			1 mm			PPV	Jevremović et al. 2023
japán szilva	‘Shiro’ plum	37°/32 °C, 16/8 h D/N, 0,3-0,4 mm					ACLSV	Abdullahi és Lawrence 2022
őszibarack	‘Redhaven’, ‘Suncrest’		acyclovir, rimantadine 25, 50 mg/l				PDV, PNRSV, PPV	Kudělková et al. 2017
	‘Red Haven’		zidovudin 25, 50 mg/l, ribavirin 20 mg/l				PDV, PNRSV, PPV	Pavelkova et al. 2015
	‘Carson’, ‘Lamone’	37 ± 1 °C 16/8 h, 21, 26, 36 nap, 1-2 mm					PNRSV, ACLSV	Gella és Errea 1998
	‘Hermosa’, ‘Summerset’	38/28 °C 16/8 h, 18, 22 nap, 10 mm					PNRSV	Stein et al. 1991
	‘Red top’, ‘Dixired’	38 °C, 10, 15 nap, 0,5 mm					PPV, PNRSV	Zarghami és Ahmadi 2023
	‘Elberta’, ‘Red Top’, ‘Dixie Red’	25–37 °C, 4 hét					PPV, PNRSV	Hesari et al. 2022
kajszi	‘Qaysi’, ‘Shams’, ‘Ordubad’	38 ± 1 °C 16/8 h D/N, 7 nap, 1-2 mm	ribavirin 25 mg/l	1-2 mm	30–40 mA		ACLSV, ApMV, TRSV	Zare Khafri et al. 2024
	‘Bergeron’, ‘Leskora’, ‘Marlen’	37 °C/ 35 °C 16/8 h D/N, 45 nap, 3 mm					PPV, PDV, PNRSV	Křížan és Ondrušíková 2009

<i>Prunus</i> faj	fajta	hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztes	kemoterápia	krio- terápia	elektro- terápia	szomatikus embriogenezis	sikeresen eliminált vírus	hivatkozás
cseresznye	‘Bülida’	37 ± 1 °C 16/8 h, 16, 18 nap, 1-2 mm					ACLSV	Gella és Errea 1998
	‘Bebeco’	35-37 °C, 20 nap, 5 mm					PPV	Koubouris et al. 2007
	‘Early Rivers’	36 °C, 4 hét +	ribavirin 50-100 mg/l +				PNRSV, ACLSV, PDV	Cieślińska 2007
	‘Noire de Meched’		ribavirin 50-100 mg/l				ACLSV	Deogratias et al. 1989a
	‘Vittoria’		DHT 100, 500 mg/l				PNRSV	Deogratias et al. 1989a
	‘Silvia’, ‘Early Van Compact’, ‘Celeste’	37 ± 1 °C 16/8 h, 21, 24 nap, 1-2 mm					PDV, PNRSV	Gella és Errea 1998
	<i>Prunus mahaleb</i>		ribavirin 50-100 mg/l				PNRSV, PDV, ACLSV	Deogratias et al. 1989a
mandula	‘Shahroodi’, ‘Shokofeh’, ‘Araz’, ‘Scandar’, ‘Nonpareil’, ‘Sahand’	27/38 °C 8/16 h D/N, 18 nap, 0,5 mm +				0,5 mg/l 2,4- D, 1 mg/l TDZ +	ACLSV, ApMV, TRSV	Ebrahimi et al. 2022

A kezelés kombinációk ‘+’ jellel jelölve, mm-ben az alkalmazott hajtáscsúcsok mérete van feltüntetve

2.3.2.1. Merisztématenyészet és mikrooltás

A korábban (2.2. fejezet) említett kizáró mechanizmusok miatt a vírusok koncentrációja a hajtáscsúcsban igen alacsony, a merisztematikus régió nagy valószínűséggel vírusmentes. Ezért a merisztéma steril izolálása utáni szövettenyéssel vírusmentes növények regenerálhatók (Kartha és Gamborg 1975).

A mikrooltás, azaz a hajtáscsúcs vírusmentes alanyokra oltása *in vitro* körülmények között egy nagyon elegáns, de technikailag kihívást jelentő eljárás a vírusmentesítésben (Chilukamarri et al. 2021, Wang et al. 2022a). Ez az eljárás citrusfélékben általánosan elterjedt vírusmentes növények létrehozására (Navarro et al. 1975, Singh et al. 2019). A mikrooltás hatásosnak bizonyult egyes őszibarackfajták esetében (Navarro et al. 1982, Shu és Timon 1993), és a technika egyszerűsítését célzó optimalizálás révén PPV- és PNRSV-mentes mandulákat is állítottak elő (Rizqi et al. 2000). *Prunus* fajok esetében a merisztématenyésztés nehezen kivitelezhető technika, mivel a kipreparált merisztéma regenerációs képessége rendkívül gyenge, a nagyon kisméretű merisztematikus szövetek gyakran életképtelenek, elkalluszosodnak vagy korai regenerációs fázisban megbarnulnak (Stein et al. 1991, Manganaris et al. 2003, Koubouris et al. 2007, Zarghami és Ahmadi 2023).

2.3.2.2. Hőkezelés és hajtáscsúcsstenyésztés

Csonthéjasokban a legelterjedtebb *in vitro* vírusmentesítési módszer a hőkezeléssel kombinált hajtáscsúcs izolálás. A hajtáscsúcs a merisztémán (ami jellemzően 0,2-0,9 mm nagyságú) túl egy-két levél primordiumot is tartalmazó néhány milliméteres szövetdarab. A hajtáscsúcs izolálása önmagában jellemzően nem elégséges vírusmentes növény előállításához, de az azt megelőző hőkezelés hatására beindul az RNS-csendesítés, a vírusok inaktiválódnak a hajtásban, gátlődik a vírusok mozgása a merisztéma felé, ezáltal nagyobb csúcsi rész maradhat vírusmentes (Spiegel et al. 1999, Wang et al. 2018a, Zhao et al. 2018).

Az *in vitro* hőkezelést követő hajtáscsúcs izolálás és abból történő növényregeneráció lehetővé teszi a hőkezelés időtartamának lerövidítését a hagyományos (*in vivo*) hőkezeléshez képest, ami kedvezően hat a hőre érzékeny növények túlélésére (Stein et al. 1991, Koubouris et al. 2007). A hajtáscsúcs regenerációs képessége meghaladja a merisztémáét, ami szintén kulcsfontosságú a

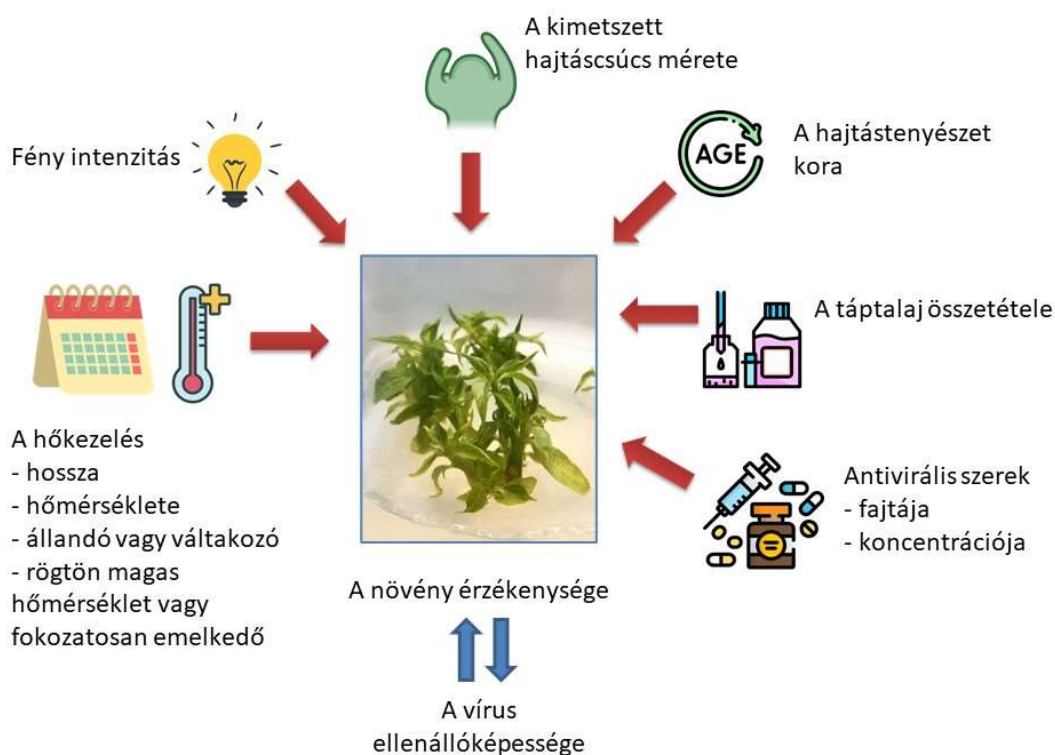
nehezen regenerálódó genotípusoknál, így ez az *in vitro* technika hatékonyabb mentesítési eljárást eredményez. Általánosságban elmondható, hogy minél nagyobb a kimetszett hajtáscsúcs, annál nagyobb a túlélés és a regeneráció aránya, azonban annál valószínűbb benne a vírus jelenléte, vagyis a vírusmentesítés sikerével fordítottan arányos a hajtáscsúcs mérete (Wang et al. 2018a).

Őszibarackon végzett kísérletben az 1 mm nagyságú hajtáscsúcsok regenerációs képessége hőkezelés (15 nap, 38°C) után 65%-os volt, míg a 0,2 mm-s merisztémák 20%-a regenerálódott, azonban a legtöbb vírusmentes növény a köztes nagyságú (0,5 mm) hajtáscsúcsból regenerálódott (Zarghami és Ahmadi 2023). Egy *in vivo* hőkezelést alkalmazó, vírusmentes nektarin növények előállítását célzó kísérletben is vizsgálták a kimetszett hajtáscsúcsok méretének hatását, és megállapították, hogy bár a sikeresen regenerált növények jelentős része vírusmentes volt, a kisméretű (0,8-1,3 mm) hajtáscsúcsok csak nagyon kis arányban (<5%) tudtak regenerálódni, elkalluszosodtak vagy elbarnultak, míg a nagyobb (1,3-2,0 mm) hajtáscsúcsok 38%-a regenerálódott, és nem jelentkezett korai elkalluszosodás (Manganaris et al. 2003). A hőkezelést követő nagyobb (5 mm) hajtáscsúcs kimetszése és regenerációja hatékony módszernek bizonyult PPV-vel fertőzött 'Bebeco' kajszifajta esetében, ahol azt találták, hogy rövidebb idő alatt közel hatszor több vírusmentes kajszit lehetett előállítani *in vitro* módszerrel, mint a hagyományos *in vivo* hőkezeléssel (Koubouris et al. 2007). Őszibarack fajtákon 7-10 mm hosszúságú hajtáscsúcsokból is regeneráltak sikeresen PNRSV-mentes növényeket (Stein et al. 1991).

Az egyes növényfajok és -fajták magas hőmérséklettel szembeni toleranciája nagyon eltérő lehet, és az is változó, hogy az adott vírust mennyire hatékonyan lehet eliminálni a különböző növényekből (Gella és Errea 1998; Cieślińska 2007). Van néhány lehetőség a tolerancia növelésére a hőkezeléssel szemben érzékeny növények esetében is. Lehet változó hőmérsékletet alkalmazni, nappal magasabb, éjszaka alacsonyabb hőmérséklet beállításával, vagy a kezelés kezdetén alacsonyabb hőmérsékletről fokozatosan emelve a kitűzött célhőmérsékletig, ezzel segítve a növényt a magas hőmérséklethez való alkalmazkodásban (Spiegel et al. 1999, Dziedzic 2008, Abdullahi és Lawrence 2022, Hesari et al. 2022). Vannak esetek, amikor kevés a fokozatosság, őszibarackon végzett kísérletben az explantátumok túlélési aránya drasztikusan csökkent a hőkezelés során a fokozatos hőmérséklet emelés ellenére is, 15 nap után a tenyészetek mindössze 1%-a maradt életben 39°C-on

és az abból preparált hajtáscsúcsok regenerációra képtelenek voltak (Zarghami és Ahmadi 2023). Hőre különösen érzékeny cseresznyefajtákon módosított atmoszférájú (emelt CO₂, csökkentett O₂ szint) hőkezelő kamrában ill. hidroponikus tenyésztési rendszerben sikerült hőkezelést alkalmazni, melyekben a növények képesek voltak elviselni a sikeres vírusmentesítéshez szükséges kezelési időt és hőmérsékletet (Lenz et al. 1983, Howell et al. 2000). Dziedzic (2008) vizsgálta a hőkezelés során alkalmazott fényintenzitás hatását a kezelt növények túlélésére és azt állapította meg, hogy erősebb fotonfluxussűrűség (PFD) (54,3 μmol/s/m²) mellett a hajtások túlélési aránya magasabb volt, mint alacsonyabb PFD (17,3 μmol/s/m²) mellett. Különböző hőmérsékleti beállításokat alkalmazva azt találta, hogy az alacsonyabb fényintenzitás mellett a magasabb hőmérséklet (38°C/36°C) a szilvahajtások teljes pusztulását eredményezte, ami arra utal, hogy a hajtáskultúra túléléséhez van egy minimális fényigény. A kísérletek többségében a növény fenntartására, szaporítására alkalmas fajtaspecifikus táptalajon végzik a hőkezelést (Knapp et al. 1998, Cieślińska 2007, Abdullahi és Lawrence 2022), de úgy tűnik, hogy a tápközeg is befolyásolja a hajtástenyészetek túlélését a hőkezelés során (Stein et al. 1991, Spiegel et al. 1995, Dziedzic 2008). Dziedzic (2008) különböző táptalajok vizsgálata során megfigyelte, hogy az ásványianyagokban szegény és növényi növekedésszabályozókat nem tartalmazó táptalajokon kezelt szilvahajtások túlélése volt a legmagasabb a hőkezelés során és az ezeken nevelt hajtástenyészetek hosszabb hőkezelési időt is elviseltek. Stein et al. (1991) azt találták, hogy a táptalajban lévő 6-benzilamino-purin (BA) koncentrációjának 6 mg/l-ről 0,2 mg/l-re való csökkentése 0%-ról több mint 90%-ra javítja a túlélési arányt a hőkezelés során. Azt is megfigyelték, hogy a növények magas hőmérséklettel szembeni toleranciáját a hajtástenyészetek kora is befolyásolta, kísérletükben az őszibarack hajtástenyészetek optimális életkora 18 ill. 15 nap volt, amikor hőkezelő kamrába helyezték azokat.

Több burgonya fajtán végzett kutatás szerint a szalicilsav táptalajhoz adva kettős pozitív hatással bír a vírusmentesítés során: fokozza a növények hőkezeléssel szembeni toleranciáját és növeli a vírusmentesítés hatékonyságát (López-Delgado et al. 2004, Fang et al. 2005, Aguilar-Camacho et al. 2016). Csonthéjasokon végzett szalicilsav-kezelés hatása eddig nem ismert.



2.2. ábra Az *in vitro* hőkezelésen alapuló vírusmentesítési technikák hatékonyságát befolyásoló tényezők. A különböző faktorok nemcsak a vírus ellenálló képességére hatnak, nagyban befolyásolják a növények túlélését a kezeléseket során (saját ábra, angolul publikálva: Szabó et al. 2024).

A hőkezelés során tehát optimalizálni kell a hőmérsékletet és annak beállításait, a fényintenzitást, a tenyészetet megfelelő stádiumban kell kezelés alá vetni, és érdemes a táptalaj-összetételre is külön gondot fordítani, mert ezek mind befolyásolják a növények túlélését a vírusmentesítési kezeléseket során. Az *in vitro* hőkezelésen alapuló technikák hatékonyságát befolyásoló tényezőket a 2.2. ábra foglalja össze.

2.3.2.3. Kemoterápia

A sikeresség növelése érdekében kemoterápiát is alkalmaznak növények vírusmentesítésére. A humán gyógyászatból ismert antivirális szerek táptalajhoz adásával a növényt fertőző vírusok replikációja gátolható. A módszer hátránya a kezelt növényekre kifejtett toxikus hatás, amely több tünetben is megnyilvánulhat. Leggyakrabban csökkent túlélési és regenerációs rátáról számoltak be, gátolt hajtásnövekedésről, valamint vitrifikáció, nekrozis, klorózis, a levelek elszíneződése, valamint törpülés is megfigyelhető (Magyar-Tábori et al. 2021). Az okozott fitotoxikus hatások enyhítésére kemoterápiát követően az *in vitro* tenyészeteket vírusellenes vegyszerek nélküli táptalajra helyezve lehet elősegíteni a regenerációt.

A növényi vírusmentesítésben leggyakrabban használt vírusellenes szer a ribavirin (Virazol), mely egy szintetikus guanozin analóg, és az RNS-be beépülve képes gátolni a vírus RNS szintézisét a gazdanövényben (Thomas et al. 2012). Nagy valószínűséggel a ribavirin nem egy univerzális mechanizmuson keresztül hat, hanem eltérő módokon gátolja a különböző vírusokat (Lerch 1987, Parker 2005).

Ribavirin kezelést sikeresen alkalmaztak cseresznye, mirobáln, szilva, kajszi, körte és alma fajtákon a leggyakrabban előforduló csonthéjasokat fertőző vírusok eltávolítására (Deogratias et al. 1989a, Cieślińska 2007, Hauptmanová és Polák 2011, Hu et al. 2012, 2015, Şekerz et al. 2015, Mazeikiene et al. 2019, Zare Khafri et al. 2024). Cseresznyefajták esetében a ribavirin kis koncentrációban alkalmazva teljesen hatástalan volt, míg 50 mg/l felett egyre több vírusmentes növényt eredményezett, de erősen gátolta az *in vitro* növények fejlődését, 80 mg/l feletti koncentrációban már hajtásvégnekrozist okozott (Deogratias et al. 1989a). A ribavirin kezelés hatékonyságát négy különböző koncentrációban alkalmazva PNRSV-vel és ACLSV-vel egyidejűleg fertőzött mirobáln növényeken tesztelték (Cieślińska 2007). A kezelés hatástalan volt a PNRSV-vel szemben, míg a ribavirin koncentrációjának növelésével az ACLSV-mentes növények száma nőtt, ami jól mutatja, hogy a kemoterápia hatékonysága függ az adott vírustól. 'Blufree' és 'Hanita' szilva esetében a ribavirin már kis koncentrációban (10 mg/l) alkalmazva is hatékony volt a PPV eliminálásához (Polak és Hauptmanova 2009). Szilva hajtástenyészetek ribavirines kezelése során a kis koncentráció (10, 30 mg/l) hatástalan volt az ACLSV és a PNRSV eliminációjában, de nagyobb (40, 50 mg/l) koncentrációknál mindkét kórokozót sikeresen eliminálta a kéthetes kemoterápiát követő merisztémakultúra (Mazeikiene et al. 2019). Jelentősebb ribavirin koncentrációknál azonban a fitotoxicitás jelei

mutatkoztak a mikrohajtásokon, továbbá a növényi genom stabilitása megkérdőjeleződött, DNS polimorfizmusok indukálódtak a kezelt növényekben, amit RFLP-markerezéssel támasztottak alá. Vannak tanulmányok, amelyekben az alkalmazott kemoterápia önmagában teljesen hatástalan volt, vagy nem volt hatékony a vírusok eliminálásában, de előzetes hőkezelés után a vírusmentes növények száma jelentősen megnövekedett (Spiegel et al. 1999; Cieślińska 2007; Hu et al. 2012, 2015). A hagyományos *in vivo* hőkezeléshez képest az *in vitro* hőkezelés, merisztématenyésztés és a ribavirin hármas kombinációja hatékonyabbnak bizonyult a PPV eliminálásában a szilva növények regenerációs képességének csökkenése ellenére is (Jakab-Ilyefalvi és Pamfil 2012). Kajszi fajtákon végzett kísérlet során a ribavirin 25 mg/l koncentrációban volt a leghatékonyabb, 75-100%-ban vírusmentes növényeket eredményezett, a növény fajtájától ill. a fertőző vírustól függően (Zare Khafri et al. 2024). Az alkalmazott koncentráción túl a kezelési idő is fontos tényező, a hosszabb ideig tartó kezelés kisebb koncentrációban is hatékony vírusmentesítést eredményezhet (Hauptmanová és Polák 2011).

Egy másik kemoterápiás szer, a zidovudin (azidotimidin) kutatások szerint a ribavirinnél kíméletesebb és hatékonyabb antivirális szernek bizonyul a növényekben. Timidin analóghént a zidovudin gátolja a reverz transzkriptáz enzimet, és megakadályozza a retrovírusok szaporodását a gazdaszervezetben (Veal és Back 1995). Őszibarack vírusmentesítési kísérletben fitotoxikus hatás nélkül 100% PPV-, PDV-, PNRSV- mentes növényeket eredményezett a zidovudin kezelés 25 és 50 mg/l koncentrációban egyaránt (Pavelkova et al. 2015). A zidovudin fitotoxikus hatása nem jelentkezett az alma kultúrák hajtásnövekedésében még 1280 mg/l koncentrációban sem (Sedlák et al. 2023).

Megemlíthető még az aciklovir, egy aciklikus purin-nukleozid analóg és a rimantadin (a-metil-1-adamantán-metil-amin-hidroklorid), egy amantadin analóg lehetséges alkalmazása csonthéjasoknál, melyek alkalmasak voltak a PDV, PNRSV és PPV eltávolítására ‘Redhaven’ és ‘Suncrest’ őszibarack vírusmentesítése során (Pavelkova et al. 2015).

2.3.2.4. *Krioterápia*

A fagyasztás a hosszú távú tárolás (krioprezerváció) mellett vírusmentesítési módszerként is alkalmazható (Wang et al. 2022b). Wang et al. (2006) vezették be a

krioterápia kifejezést a kórokozók kiirtására szolgáló fagyasztásos eljárások alkalmazására. Krioterápia során a fertőzött növényi hajtáscsúcsot folyékony nitrogénben ultraalacsony hőmérsékletnek teszik ki (-196 °C). Mivel a merisztéma apikális kupolájának sejtei és a legfiatalabb levélprimordiumok sejtei kis méretűek és erősen citoplazmatikusak, általában nagyobb arányban élnek túl az ultraalacsony hőmérsékletű kezeléseket, mint a differenciált, nagyobb és vakuolizáltabb, magas víztartalmú sejtek, így a túlélő merisztematikus sejtekből regenerált növények jó eséllyel vírusmentesek lesznek (Magyar-Tábori et al. 2021; Wang et al. 2022b).

Brison et al. (1997) először vizsgálták a fagyasztás hatását csonthéjas gyümölcsfajok vírusmentes egyedeinek előállítására. PPV-vel fertőzött interspecifikus *Prunus* alany krioterápiás kezelése során megállapították, hogy míg a kisebb méretű (0,3-0,5 mm) hajtáscsúcsok fagyasztás utáni regenerációja csekély (11%) volt, a nagyobb méretű (0,5-2,0 mm) hajtáscsúcsok 50% felett regenerálódtak, és a kimetszett hajtáscsúcs mérete nem bizonyult kulcsfontosságúnak a vírus eliminálása szempontjából. Összességében a krioterápia kétszer annyi vírusmentes növényt eredményezett, mint a hajtáscsúcsok fagyasztás nélküli regenerációja. Şekerz et al. (2015) PPV fertőzött kajsziából állítottak elő vírusmentes növényeket Brison et al. (1997) krioterápiás módszerével, azonban a minták többsége nem élte túl a kezelést, ezért a protokoll optimalizálására volt szükség. Azóta a krioterápiát számos növényfajban alkalmazzák a vírusok kiirtására (Wang et al. 2022b). Egyes esetekben szükséges a krioterápiát más technikákkal kombinálni a hatékony vírusmentesítés érdekében, különösen azon kórokozók esetében, amelyek képesek megfertőzni a merisztematikus sejteket (Wang et al. 2018b). Hőkezeléssel vagy kemoterápiával kombinálva a krioterápia vírusmentes alma (Bettoni et al. 2022a), málna (Mathew et al. 2021), fokhagyma (Vieira et al. 2015) és burgonya (Kushnarenko et al. 2017; Bettoni et al. 2022b) növényeket eredményezett. A fenti példák alapján csonthéjasokban is van létjogosultsága a krioterápiának, a módszer optimalizálásával az azt követő sikeres növényregeneráció érdekében, esetleg más technikákkal kombinálva.

2.3.2.5. Elektroterápia

Bár a pontos mechanizmus még nem ismert, az elektroterápia során egyenáramot vezetnek a fertőzött növényi szövetekre, ennek eredményeként a vírus nukleoproteinjei koagulálódnak, ami a virulencia megszűnéséhez vezet (González et

al. 2006; Mahmoud et al. 2009). Elektroterápia bármilyen növényi explantátumon (szárszegmens, hajtáscsúcs, gumó, stb.) alkalmazható, jellemzően az elektromosan kezelt explantátumból indítanak *in vitro* tenyészetet hajtáscsúcs preparálással kombinálva a vírus nagy hatékonyságú eliminációja érdekében (Adil et al. 2022). A folyamat nagyon egyszerű és olcsó, nem igényel speciális felszerelést, és mindössze néhány percet vesz igénybe (Magyar-Tábori et al. 2021). Az elektroterápia nem elterjedt módszer a *Prunus* fajok vírusmentesítésére, de *in vivo* mandulanövényeken Quacquarelli et al. (1979) sikeresen alkalmazták a módszert, mely során 500 V elektromos áramot vezettek a manduladugványokra 5-10 percig, majd a kezelt dugványok rügyeit egészséges mandulapalántákra oltották és 90%-ban mandula mozaik vírustól mentes hajtásokat kaptak. Zare Khafri et al. (2024) több kajszi fajtán végzett sikeres elektroterápiát, mely során a fiatal hajtásokat 1 náduszos darabokra vágva helyezték nátrium-klorid oldatot tartalmazó tartályba, melyre különböző áramerősségű elektromos áramot engedtek 15 percen át. Az elektromosan kezelt hajtásokból felszíni sterilizálás után *in vitro* tenyészetet hoztak létre, amiből hajtáscsúcsot preparáltak. A 30–40 mA áramerősségű előkezelést követően a regenerálódott növények 40-60%-a vírusmentes lett, az eredmény kajszi fajtánként és a vírustól függően mutatott eltérést.

2.3.2.6. Szomatikus embriogenezis

Meg kell említeni a szomatikus embriogenezist, mint hatékony *in vitro* vírusmentesítési módszert, bár csonthéjasoknál nem jellemző. Egy mandulafajtán végzett sikeres kísérletről számoltak be, ahol 3 vírust elimináltak hőkezelés, merisztématenyésztés és szomatikus embriogenezis kombinációjával (Ebrahimi et al. 2022). Szomatikus embriogenezis során az embrió fejlődése egyetlen testi sejtől indul el, így az embrió nem áll kapcsolatban az anyanövényben található szállítónyalábokkal. Mivel a vírusok nagy része a szállítónyalábban van jelen, ezzel a módszerrel kizárható a vírusok jelenléte a regenerált növényből, bár a mechanizmus pontosan nem ismert (Panattoni et al. 2013). Az eddigi kutatások azonban egyértelműen igazolják, hogy pl. szőlő esetében alkalmas arra, hogy használatával vírusoktól, viroidoktól mentes növényt lehessen regenerálni (Goussard et al. 1991; Gambino et al. 2006; Olah et al. 2022; Turcsan et al. 2020).

2.4. Vírus detektálási módszerek

A vírusok koncentrációja a gazdanövényben vírusspecifikus tulajdonság, egy vírus előfordulása lehet erősen lokalizált vagy szabálytalan eloszlású a gazdanövényekben. A vírus lokalizációja befolyásolhatja az elimináció vagy kimutatás sikerét (Knapp et al. 1995b; Laimer 2002).

A vírusmentes szaporítóanyag előállítása specifikus, érzékeny és gyors kimutatási módszereket igényel az előállítási folyamat (1. ábra) során keletkező növényanyagok víruseszteléséhez. A megfelelő detektálási módszer elengedhetetlen a megbízhatóan kórokozómentes státusz megállapításához és a mentesítési idő lerövidítéséhez. Az alábbiakban a csonthéjasok vírusmentesítési folyamata során leggyakrabban használt diagnosztikai módszereket mutatom be.

2.4.1. Bioteszt

A hatósági vizsgálatok során biotesztet végeznek a növényegészségügyi szakemberek. Ez a módszer több év során megfigyelt vizuális tünetek alapján képes meghatározni a növény vírushertőzöttségét, egészséges indikátornövényekre oltás, szemzés után. A fás szárú bioteszttel (főteszt) a vizsgálatköteles, gazdasági károkat okozó vírusokat megbízhatóan lehet azonosítani, azonban hosszadalmas, költséges folyamat, és a látens fertőzéseket nem képes kimutatni. Ezt a tesztelési módszert a vírusmentesítési folyamat végén, már a szaporítási rendszerbe vonásnál alkalmazzák a törzsültetvények létrehozásánál. A meglévő anyafák vírusesztelése során PPV fertőzést mutató egyedek vizsgálatához szabadföldi vagy üvegházi gyorsesztt végzendő, mely gyors válaszreakciót mutató indikátornövényeken történik. A törzsültetvények fenntartásának növényegészségügyi követelményeit, és a törzsültetvények kötelező víruseszteléseit a 2014/98/EU direktíva alapján a 14/2017. (III. 23.) FM rendelet írja elő.

2.4.2. ELISA

A szerológiai módszerek közé tartozó ELISA (enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat) a legelterjedtebb a növényi vírusok rutinvizsgálatában (Clark & Adams 1977, Boonham et al. 2014). A DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) módszer során a műanyag hordozó felületére kötött antitesthez kötődik a növényi mintában található vírus antigén, amihez egy másik, enzimmel jelölt antitest kapcsolódik. A detektáláshoz kromogén vagy

fluorogén szubsztrátot adnak, amely enzimreakció során mérhető színváltozást eredményez.

A legtöbb vizsgálatköteles csonthéjast fertőző vírusra elérhető ELISA teszt, így gyorsan, nagy mintaszámot lehet egyszerre vizsgálni. A rendszeres hatósági vizsgálatok során a vírusmentes státusz fenntartását ellenőrizendő alkalmaznak ELISA teszteket. Hátránya, hogy a vírusok variabilitása miatt nehéz a különböző vírustörzsekre specifikus antiszérumok előállítása, így nem képes minden törzset kimutatni (Dovas et al. 2001, Boonham et al. 2014) illetve nem is elérhető minden ismert vírusra. Szabadföldi növényeknél rutin vizsgálatokhoz alkalmazható, azonban tanulmányok igazolják, hogy az ELISA nem elég érzékeny az *in vitro* szövetekben kis koncentrációban előforduló vírusok kimutatására, és a vírustiter gyakran a kimutatási küszöb alá esik (Candresse et al. 1994; Manganaris et al. 2003, Dovas et al. 2001, Sanchez-Navarro et al. 2005).

2.4.3. PCR

A nukleinsav alapú kimutatási módszerek nagy érzékenységgűek, a reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) már kis koncentrációban jelen lévő vírusok detektálását is lehetővé teszi, viszont a nagy érzékenysége miatt érzékeny a kontaminációra (Boonham et al., 2014). PNRSV detektálása során például 625-ször érzékenyebbnek bizonyult a DAS-ELISA-nál a kimutathatósági határ alapján (Sanchez-Navarro et al. 1998). A PCR reakcióhoz a növényből először RNS-t kell kivonni, majd cDNS szintézis után vírusspecifikus primerekkel amplifikálható a mintában jelenlevő vírus nukleinsav részlete. Detektálása többnyire gélelektroforézissel történik, ahol méret alapján elválasztható a felszaporított DNS-szakasz. A módszerhez szükséges a keresendő vírus genomjának egy specifikus, konzervált darabjára tervezett primerpár, így csak ismert vírusokat lehet vele kimutatni. Több vírus egyidejű kimutatására a multiplex PCR ad lehetőséget, mellyel lecsökkenthető a labormunka és felgyorsítható a folyamat (Matic et al. 2010). A RT-PCR a vírusmentesítési eljárás minden lépésében nagy biztonsággal alkalmazható szabadföldi, *in vitro* és üvegházi növényekben a vírusmentesség igazolására (Vescan et al. 2011, Paunovic et al. 2007, Polak és Hauptmanova 2009).

2.4.4. Nagy áteresztőképességű szekvenálás

A nagy áteresztő képességű szekvenáláson (High throughput sequencing, HTS) alapuló technikák megjelenése nagy ugrást eredményezett a növényi vírus diagnosztikában. A HTS alapú vizsgálatok a növényből kivont RNS minták szekvencia meghatározása után bioinformatikai módszerek segítségével a gazdanövényben jelenlevő összes kórokozó meghatározását teszik lehetővé, ismert célszekvenciák alkalmazása nélkül. Használatával számos új vírus leírása történt meg, vagy addig ismeretlen gazdanövényben igazolták korábban leírt vírus jelenlétét (Hou et al. 2020). A növények védekező mechanizmusa során keletkező kis RNS-ek szekvenálása hatékony vírus és viroid kimutatást tesz lehetővé csonthéjasokban (Baráth et al. 2018). A módszer hátránya, hogy komoly molekuláris labormunkát, szekvenálást és bioinformatikai jártasságot és munkálatokat igényel, rutin diagnosztikában és hatósági ellenőrzés során nem alkalmazzák.

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

A MATE Gyümölcsstermesztési Kutatóközpont Érd-Elvira telephelyén lévő Prebázis és Bázis törzsültetvényeiből 2017 nyarán történt mintagyűjtés *in vitro* kultúrák létrehozásához. Kutatócsoportunk kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálásával (HTS) Magyarországon elsőként azonosított a korábban csak cseresznye és meggy gazdanövényekből ismert cseresznye vírusokat (CVA, LChV-1) szilva és kajszi fajtákban (Baráth et al. 2018.), ezért ezekkel az új gazdanövényen előforduló vírusokkal fertőzött fák vizsgálatába kezdtünk. Az alábbi RT-PCR-rel is megerősített vírusos növényanyaggal dolgoztunk:

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

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

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

3.2. *In vitro* kultúrák létrehozása és növénynevelési körülmények

A friss hajtásokról a leveleket eltávolítottuk és 1-2 rügyes darabokra vágtuk, amit steril lamináris boxban először 70%-os etanolban 3 percig áztattunk, majd HgCl₂-oldatban (0,4%, 6 perc) végzett felületi sterilizálás után, steril desztillált vízben háromszor leöblítettünk. Ezt követően kerültek a hajtásdarabok a növényfaj-specifikus táptalajra (3.1. táblázat). Az *in vitro* hajtástenyészeteket növénynevelő szobában tartottuk 24±1 °C-on 16 órás megvilágítás mellett, 60 µmol/s/m² fényintenzitással, melyet meleg és hideg fehér fluoreszcens fénycsövek biztosítottak. A növények négyhetente kerültek friss táptalajra. A sikeres tenyészet indítást követően RT-PCR-rel visszaigazoltuk a vírus jelenlétét az *in vitro* növényekből, majd az igazoltan vírusfertőzött vonalakat továbbszaporítottuk a tervezett kísérletekhez. A doktori

munka személyes okok miatti szüneteltetése a hajtástenyészetek hosszú távú hűtőben tárolását tette szükségessé. A tenyészeteket a fajspecifikus szaporító táptalajaikon hűtőkamrába helyeztük (5,5°C, teljes sötét) 1,5, majd újabb kísérletek után további 1 évre. A hűtés folyamán 4-6 havonta friss táptalajra passzálás történt, amit 1-2 hét fényszobában tartás követett és a tenyészetek visszakerültek a hűtőbe, majd ahogy lehetőség nyílt rá, folytatódtak a kísérletek a fent ismertetett nevelési körülmények mellett.

3.3. *In vitro* vírusmentesítési kezelések

3.3.1. Hőkezelést követő hajtáscsúcsenyésztés

Hőkezeléshez a kéthetes hajtástenyészeteket (átrakástól számított két hét elteltével) hőkezelő kamrába (Panasonic MLR-352, 3.1. ábra) helyeztem nappalra 38, éjszakára 36°C-ra 12 órás megvilágítás mellett ($160 \mu\text{mol/s/m}^2$). ‘Besztercei Bt.2’ szilvából 14, 15, 17, 18, 23 nap elteltével (Eredmények fejezet 4.2. táblázat), ‘Pannónia’ kajsziból 14, 15, 16, CVA-s ‘Magyar kajsziból’ 13, 16, PPV- és LChV-1 fertőzött ‘Magyar kajsziból’ 15, 16, 20, 24 nap (Eredmények fejezet 4.3. táblázat) hőkezelés után a hőkezelést toleráló, élő hajtásokból steril körülmények között sztereomikroszkóp alatt 1-2 mm hosszú, 2-4 levélprimordiumot tartalmazó hajtáscsúcsokat metszettem ki és helyeztem táptalajra Petri-csészébe. A regenerálódó hajtáscsúcsokat 4 hetente helyeztem friss táptalajra, majd a sikeresen regenerált hajtástenyészeteket fenntartottam vírus tesztelésig.



3.1. ábra *In vitro* hőkezelés

3.3.2. Kemoterápia

Autoklávozás után ribavirint (Duchefa, Hollandia) vagy zidovudint (Sigma-Aldrich, USA) adtam a táptalajhoz steril szűrőn át (Millipore, 0,22 μm , PES membrán) 25 ill. 50 mg/l koncentrációban. Üvegenként 3 darab 1 cm hosszúságú *in vitro* hajtás (5 üvegben, összesen 15 db kezelésként) nevelkedett az antivirális szert tartalmazó szaporító táptalajon nyolc héten keresztül (4 hét után friss táptalajra kerültek), majd antivirális szert nem tartalmazó táptalajon tartottam őket vírusesztelésig. A kontroll csoportban azonos korú, 1 cm hosszú hajtások kerültek 8 hétig vírusellenes szer nélküli szaporító táptalajra. Minden kezelési csoport 15 hajtásból indult.

3.3.3. Hőkezelés és kemoterápia kombinációja

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

3.4. Vírus diagnosztika

A bazális kallusz nélküli teljes mikroszaporított növényeket használtuk fel a vírusjelenlét meghatározására. Az *in vitro* növényi mintákból CTAB módszerrel (Gambino et al. 2008) történt az RNS-kivonás. A kivont RNS-ből cDNS szintézist végeztünk RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével, random primerek felhasználásával a gyártó utasításai szerint. A vírus kimutatására RT-PCR módszert alkalmaztunk, mely során a DNS amplifikációt Phire Hot Start II DNS-polimeráz (Thermo Fisher Scientific) enzimmel végeztük. Az alkalmazott vírusspecifikus primereket a 3.2. táblázat foglalja magába. A reakcióhoz 9,4 µl MQ vizet, 3 µl 5x Phire puffert, 0,75 µl - 0,75 µl forward és reverse primert (10 pmol/ µl), 0,3 µl dNTP-t (10mM), 0,3 µl (0,6 U) Phire polimerázt és 0,5 µl cDNS-t adtunk, így 15 µl végtérfogattal dolgoztunk.

A PCR reakciót a következő beállításokkal végeztük:

98°C - 30 másodperc

98°C - 10 másodperc

* °C - 10 másodperc

72°C - 20 másodperc

40x

72°C - 1 perc

*Az alkalmazott primerre jellemző tapadási (anellációs) hőmérséklet

A kapott PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el.

3.1. táblázat A hajtástenyészetekhez használt szaporító táptalajok összetétele

Összetevők (mg/l)	kajszi	szilva	meggy
NH ₄ NO ₃	400	1650	1650
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	300	-	-
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	220	440	440
KNO ₃	800	1900	1900
K ₂ SO ₄	400	-	-
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	370	370
KH ₂ PO ₄	500	170	170
NaFe-EDTA	30	20	20
ZnSO ₄ x 4 H ₂ O	4	4	4

Összetevők (mg/l)	kajszi	szilva	meggy
H ₃ BO ₃	3	3	3
MnSO ₄ x H ₂ O	8,3	8,3	8,3
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,03	0,03	0,03
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,3	0,3	0,3
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,03	0,03	0,03
KI	0,3	0,3	0,3
Myo-inozitol	500	500	500
Nikotinsav	1	1	1
Tiamin-HCl	1	1	1
Glicin	2	-	-
Ka- pantoténsav	0,5	0,5	0,5
Biotin	0,1	0,1	0,1
Riboflavin	0,1	0,1	0,1
para-aminobenzoészav	1	1	1
Folsav	0,01	0,01	0,01
IBA	-	0,1	0,1
BA	-	0,25	1
BAP-ribózid	0,75	-	-
GA3	-	0,3	0,1
Phloroglucinol	-	0,1	-
Szacharóz	13000	30000	30000
Szorbit	11000	-	-
Agar	6000	6000	6000
pH	5,2	5,2	5,2

3.2. táblázat Az alkalmazott vírusspecifikus primerek: a CVA, PPV, LChV-1 és PNRSV kimutatására kajszi-, szilva- és meggy mintákból.

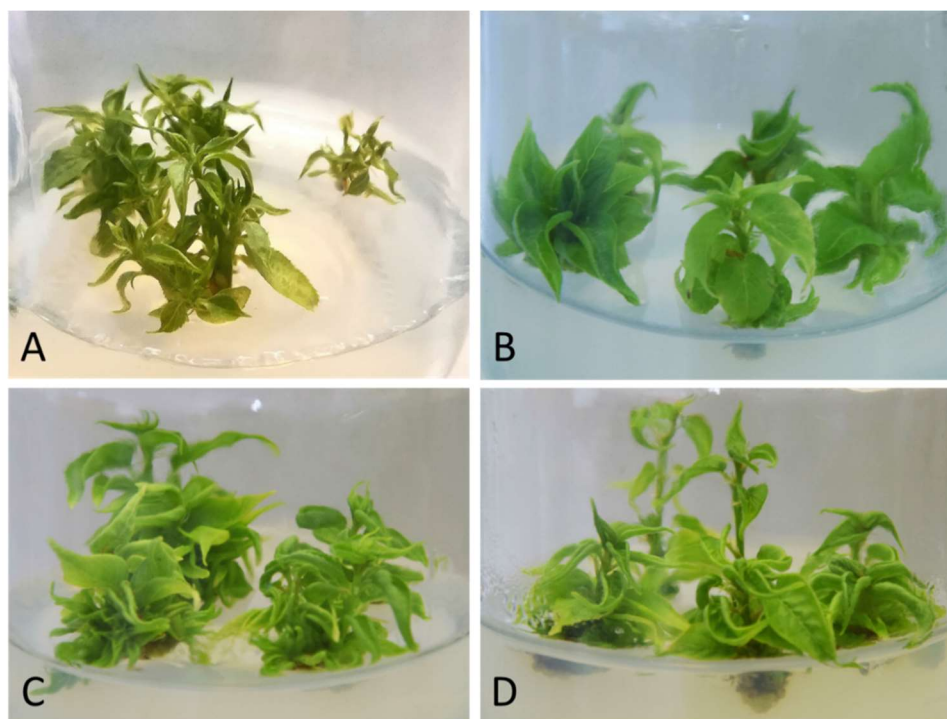
vírus	primer	primerszekvencia	anellációs hőmérséklet	hivatkozás
CVA	CVAm _p _Fm	ATGTCGATCATACCAGTYAAG	62°C	Baráth et al. 2018
	CVAm _p _Rm	TTACTTCTCGCAACYAC		
PPV	PPV_P2(9292)f	CAGACTACAGCCTCGCCAGA	62°C	Wetzel et al., 1991
	PPV_P1(9534)r	ACCGAGACCACTACACTCCC		
LChV-1	LChV1_12165F	GCAAAAAGTCAGATGTTGGTG	51°C	Baráth et al. 2018
	LChV1_13261R	GACGTGGTCCTAATACTTGCG		
	LChV1_9493F	GTTGTTAGATTCCGTCATTAR	51°C	Baráth et al. 2018
	LChV1_10288R	CAGTCGAACTACCAAGCGTTC		
PNRSV	PNcpinF	GAGTATTGACTTCACGACCAC	56°C	Jarosova és Kundu 2010
	PNcpR	CTTTCCATTTCGAGAAATTCTG		

4. Eredmények

A könnyebb áttekinthetőség érdekében a munkáimat rész témákra bontottam, így a szorosan kapcsolódó eredmények átláthatóbbak. Külön tárgyalom először a CVA-s 'Besztercei Bt.2' szilván végzett *in vitro* kezeléseket, ezen a fajtán sikerült a legtöbb kísérletet elvégezni, illetve értékelhető adatot kapni. Ezt követően a CVA ill. PPV+LChV-1-gyel komplexen fertőzött kajszifajtákon végzett kísérleteket majd a PNRSV-s meggy kísérlet eredményeit mutatom be. Az összehasonlítható eredményeket és az előre nem várt jelenséget a fejezet végén ismertetem.

4.1. *In vitro* kultúrák létrehozása vírusfertőzött fákról

A felszíni sterilizálást követően a kontaminációt nem mutató üvegekben az alvórügyek kihajtása után a friss hajtásokat a szárról lemetszve és fajspecifikus szaporító táptalajra helyezve megindult a steril hajtástenyészetek felszaporítása. Minden indított növény fajtáról sikerült *in vitro* kultúrát létrehozni (4. 1. ábra) és azokat a kísérletek teljes ideje alatt fenntartani, kísérleti anyagot biztosítani.



4.1. ábra Vírusfertőzött szilva és kajszifajta *in vitro* hajtástenyészetek. A: CVA-s 'Besztercei Bt.2' szilva, B: CVA-s 'Pannónia' kajszifajta, C: LChV-1+PPV-s 'Magyar kajszifajta', D: CVA-s 'Magyar kajszifajta'. A képen a később indított, PNRSV-vel fertőzött 'Éva' meggy tenyészet nem szerepel.

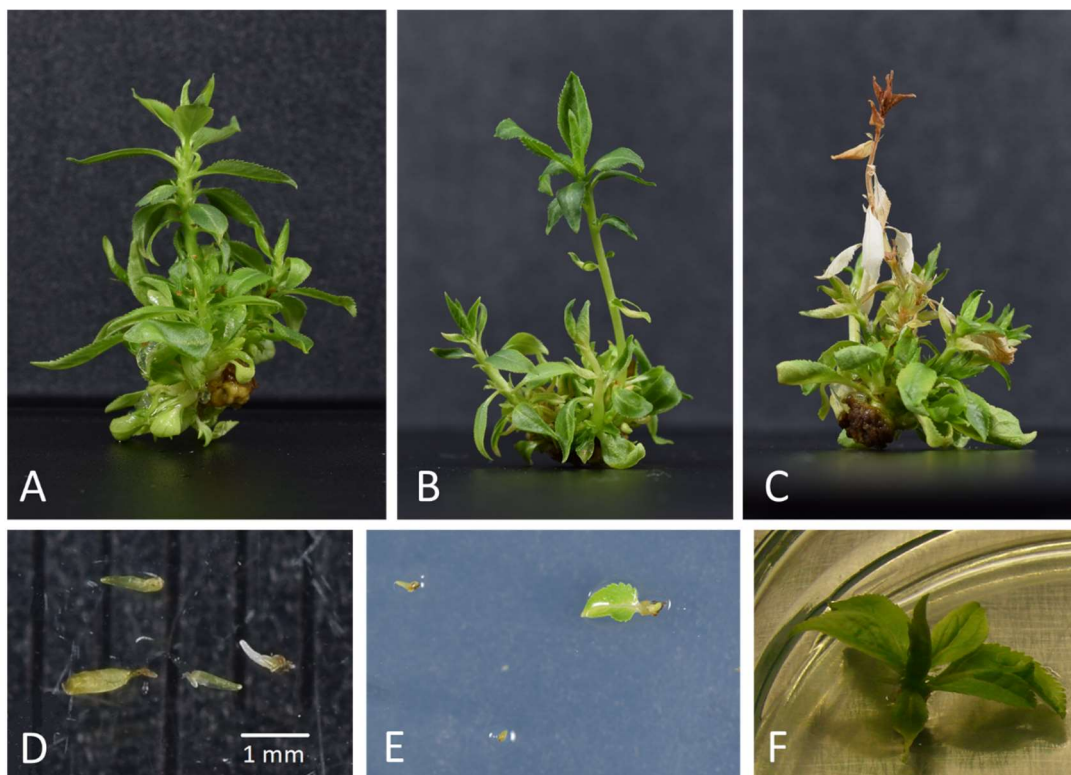
4.2. CVA fertőzött szilva hajtástenyészeteken végzett *in vitro* vírusmentesítési kísérletek eredményei

4.2.1. Hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztés eredménye

A hőkezelés kezdetétől 14-23 nap elteltével összesen 49 db 1-2 mm hosszú hajtáscsúcsot metszettem ki és helyeztem táptalajra a még életképes hajtástenyészetekről (4.2D. ábra), amiből 19 db (39%) korán elpusztult (elbarnult vagy elkalluszosodott és nem volt képes regenerálódni).

A hőkezelési időtartam hatását vizsgálva azt találtuk, hogy a szilva tenyészeteken a 3 hetet meghaladó 38/36°C-os kezelés elteltével már láthatóvá váltak a hosszú távú hőkezelés káros következményei, a növények jelentősen legyengültek, sárgultak, csúcsuk elhalt (4.2C. ábra). A legtovább, 23 napig hőkezelt növényről szedett hajtáscsúcsok a táptalajra kerülés után hamar elpusztultak, így nem voltak képesek regenerálódni. A növények jól tolerálták a 14-18 napig tartó hőkezelést, a hajtások zöldek és erőteljesek maradtak, hajtáscsúcsaik épek és preparálásra alkalmasak voltak (4.2B. ábra). A kimetszett hajtáscsúcsok néhány hónap elteltével (4.2E-F. ábra) nagy arányban (64%) regenerálódtak felszaporításra alkalmas növénykékké. Legkisebb arányban (43%) 17 nap hőkezelés után, legnagyobb arányban (69%) 15 nap után regenerálódtak a növények.

Több hónapos mikroszaporítás után a sikeresen regenerált hajtásokból mintát szedtünk a vírusdiagnosztika elvégzéséhez. Összesen 20, hajtáscsúcsból regenerált *in vitro* növényt teszteltünk RT-PCR-rel CVA jelenlétére. Tizenöt növény (75%) vált CVA-mentessé, míg 25% fertőzött maradt. A 14-18 napos hőkezelési időintervallumon belül nem mutatkozott nagy különbség a vírusmentes rátát tekintve: a legalacsonyabb 67%-ot 17 nap után, a legmagasabb, 78%-ot 15 nap után kaptuk, míg a 14 és 18 napig kezelt növények egyaránt 75%-ban lettek vírusmentesek. A CVA fertőzött *in vitro* szilva hajtástenyészeteken végzett hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztés eredményeit a 4.1. táblázat tartalmazza.



4.2. ábra Az *in vitro* hőkezelést követő merisztématenyésztés folyamata CVA-fertőzött ‘Besztercei Bt.2’ szilván. A: hajtástenyészeti hőkezelés előtt, B: 2 hetes hőkezelés utáni hajtástenyészet, C: 4 hetes hőkezelés utáni hajtástenyészet, D: kipreparált hajtáscsúcsok, E-F: regenerálódó hajtáscsúcsok korai és késői stádiumban (saját fényképek).

4.1. táblázat CVA-fertőzött ‘Besztercei Bt.2’ szilva hajtástenyészetén végzett hőkezelést követő hajtáscsúcsenyésztés eredményei

hőkezelés hossza (napok száma)	hajtáscsúcs db (túlélt/összes)	hajtáscsúcs regeneráció	vírusmentes db (mentes/összes tesztelt)	vírusmentesség
14	4/6	67%	3/4	75%
15	18/26	69%	7/9	78%
17	3/7	43%	2/3	67%
18	5/8	63%	3/4	75%
23	0/2	0%	-	-

4.2.2. Kemoterápia hatása önmagában vagy hőkezeléssel kombinálva

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

A zidovudin önmagában egyik koncentrációban (25 és 50 mg/l) sem volt képes hatékonyan eliminálni a CVA-t (20%), hőkezelést követően azonban a zidovudin (25 mg/l) kezelés 7%-ról 40%-ra növelte a CVA-mentes növények számát. A kisebb koncentrációban (25 mg/l) alkalmazott ribavirin nagyon hatékony volt, a vizsgált növényekben nem volt kimutatható a CVA. Magasabb ribavirin koncentrációt alkalmazva (50 mg/l) a kezelt növények 40%-a lett vírusmentes. Meglepő módon néhány kontrollnövény (7-25%) CVA-negatívnak bizonyult a tesztelések során. A szilva hajtástenyészetén végzett kemoterápiás kezelések eredményeit a 4.2. táblázat mutatja be.

4.2. táblázat Kemoterápia hatása CVA-fertőzött ‘Besztercei Bt. 2’ szilva hajtástenyészetén. HK: hőkezelés, Z: zidovudin, R: ribavirin, 25, 50: 25 ill. 50 mg/l

	kezelés	növények túlélése	túlélési ráta	vírusmentesség
zidovudin	kontroll	15/15	100%	7%
	Z 25	15/15	100%	20%
	Z 50	15/15	100%	20%
hőkezelés + zidovudin	HK kontroll	15/15	100%	7%
	HK + Z 25	15/15	100%	40%
	HK + Z 50	15/15	100%	20%
ribavirin	kontroll	12/12	100%	25%
	R 25	15/15	100%	100%
	R 50	15/15	100%	40%

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

4.3.1. Hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztés eredményei

Kajszi fajtákból a hőkezelés kezdetétől 13-24 nap elteltével összesen 74 db 1_2 mm hosszú hajtáscsúcsot metszettem ki és helyeztem táptalajra a még életképes hajtástenyészetekről. A hajtáscsúcsok közül mindössze 6 db (8%) indult regenerációnak, a maradék (92%) korán elpusztult (elbarnult vagy elkalluszosodott és nem volt képes regenerálódni). A kajszi fajták bár tolerálták a 2-3 hetes *in vitro* hőkezelést, a kipreparált hajtáscsúcsok nagy része regenerációra alkalmatlan volt. A ‘Pannónia’ regenerációs képessége (26,3%) meghaladta a ‘Magyar kajsziét’ (1,8%). Egy darab ‘Magyar kajszi’ (20 napig hőkezelt) hajtáscsúcsból regenerált növényt tudtunk tesztelni, ez PPV-re és LChV-1-re is negatív lett. A kajszi tenyészeteken végzett hőkezelést követő hajtáscsúcs-izolálás eredményeit az 4.3. táblázat mutatja be.

4.3. táblázat Vírusfertőzött kajszi *in vitro* hőkezelést követő hajtáscsúcs-tenyésztésének eredménye

kezelt növény	hőkezelés hossza (napok száma)	hajtáscsúcs db (túlélt/összes)	hajtáscsúcs regeneráció
Pannónia (CVA)	14	1/4	26,3%
	15	4/7	
	16	0/8	
Magyar kajszi (CVA)	13	0/8	0%
	16	0/4	
Magyar kajszi (PPV, LChV-1)	15	0/12	2,3%
	16	0/5	
	20	1/16	
	24	0/10	

4.3.2. Kemoterápia hatása önmagában vagy hőkezeléssel kombinálva

A kajszi hajtástenyészetek kemoterápiás kezelése során a zidovudinos táptalajon nevelt növények túlélése az esetek többségében 100% volt, egyedül az 50 mg/l koncentrációban kezelt CVA-s ‘Magyar kajszi’ esetében csökkent 87%-ra. Hasonló eredményt kaptunk, amikor a zidovudin kezelést hőkezelés is megelőzte, a túlélés szintén csak a CVA-s ‘Magyar kajszi’ 50 mg/l koncentrációban kezelt csoportban csökkent, ekkor 80%-ra (4.4. táblázat).

4.4. táblázat Kemoterápia hatása CVA-fertőzött ‘Magyar kajszi’ és ‘Pannónia’ kajszi hajtástenyészeteken. Ahol 15-nél kevesebb a kiindulási növényszám, ott a kezeléstől független, fertőzés miatti pusztulás történt. HK: hőkezelés, Z: zidovudin, R: ribavirin, 25, 50: 25 ill. 50 mg/l

		Magyar kajszi (CVA)			Pannónia (CVA)		
	kezelés	növények túlélése	túlélési ráta	vírus-mentesség	növények túlélése	túlélési ráta	vírus-mentesség
zidovudin	kontroll	9/9	100%	11%	15/15	100%	0%
	Z 25	15/15	100%	13%	14/14	100%	0%
	Z 50	13/15	87%	8%	13/13	100%	0%
hőkezelés+zidovudin	HK kontroll	15/15	100%	20%	15/15	100%	33%
	HK+Z 25	15/15	100%	80%	14/15	93%	27%
	HK+Z 50	12/15	80%	50%	11/15	73%	20%
ribavirin	kontroll	-	-	-	15/15	100%	100%
	R 25	-	-	-	15/15	100%	93%
	R 50	-	-	-	14/15	93%	93%

Ribavirin esetében 0-93% közötti túlélési eredményeket kaptunk a kajszi tenyészeteken. A ribavirinnel (25 ill. 50 mg/l) kezelt ‘Pannónia’ tenyészetek 100 ill. 93%-ban élték túl a kezelést. A LChV-1+PPV fertőzött ‘Magyar kajszi’ hajtástenyészetén végzett ribavirin kezelés gyenge túlélési eredményei miatt a kezelést megismételtük, ezt jelzi a 7. táblázatban az I-es és II-es ribavirin kezelés. Az ismételt

kezelés nagyobb mértékű túlélést eredményezett a kontroll csoportban és megnőtt a ribavirin 25 mg/l kezelést túlélő növények száma is (27%-ról 93%-ra), azonban a magasabb koncentrációban (50 mg/l) kezelt növények 40%-os túlélése 0%-ra csökkent. A CVA-fertőzött ‘Magyar kajszi’ ribavirin kezelésére és a LChV-1+PPV-fertőzött ‘Magyar kajszi’ hőkezeléssel kombinált zidovudin kezelésére nem került sor.

A CVA-fertőzött kajszi tenyészeteken végzett zidovudin kezelés 0-13% közötti vírusmentességet eredményezett (4.4. táblázat). ‘Pannónia’ tenyészetekből nem kaptunk CVA-negatív eredményt, csak megelőző hőkezeléssel kombinálva, ekkor 20 ill. 27%-ban lettek vírusmentesek a növények a zidovudint 50 ill 25 mg/l koncentrációban alkalmazva. ‘Magyar kajszi’ esetében is megnövelte a vírusmentesítés hatékonyságát a megelőző hőkezelés 25 mg/l zidovudin esetén 13%-ról 80%-ra, és 50 mg/l-nél 8%-ról 50%-ra.

A 2 különböző vírussal fertőzött ‘Magyar kajszi’ tenyészetek a zidovudin kezelés (25 ill. 50 mg/l) hatására LChV-1-től 40 ill. 37%-ban, míg PPV-től 87 ill. 67%-ban mentesek lettek (4.5. táblázat).

4.5. táblázat Kemoterápia hatása LChV-1+PPV-fertőzött ‘Magyar kajszi’ hajtástenyészetben. HK: hőkezelés, Z: zidovudin, R: ribavirin, 25, 50: 25 ill. 50 mg/l

	kezelés	növények túlélése	túlélési ráta	vírusmentesség	
				LChV-1	PPV
zidovudin	kontroll	15/15	100%	80%	93%
	Z 25	15/15	100%	40%	87%
	Z 50	15/15	100%	37%	67%
I. ribavirin kezelés	kontroll	6/15	40%	0%	0%
	R 25	4/15	27%	0%	0%
	R 50	6/15	40%	0%	0%
II. ribavirin kezelés	kontroll	15/15	100%	60%	20%
	R 25	14/15	93%	20%	100%
	R 50	0/15	0%	-	-

A ribavirin kezelés eredményeként a ‘Pannónia’ növények 93%-a vírusmentes lett, azonban ezzel a kezeléssel egyidejűleg fenntartott kontroll növényekben sem volt kimutatható a vírus (4.4. táblázat). A 2 különböző vírussal fertőzött ‘Magyar kajszi’ tenyészetekből nem sikerült vírusmentes növényt létrehozni az I. ribavirin kezeléssel, azonban a II. kezelés eredményeként a kisebb koncentrációjú ribavirin hatására a növények 20%-a LChV-1- és 100%-a PPV-mentes lett (4.5. táblázat). Mindkét vírustól a zidovudin 25 mg/l kezelés eredményezett legnagyobb mértékű, 40%-os mentességet, a ribavirin (25 mg/l) mindössze 20%-ban. A kajszi hajtástenyészeteken végzett kemoterápiás kezelések eredményeit a 4.4. és 4.5. táblázat foglalja magába.

4.4. PNRSV fertőzött meggy tenyészetén végzett *in vitro* vírusmentesítési kísérletek eredményei

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

4.6. táblázat PNRSV-fertőzött ‘Éva’ meggyen végzett kemoterápia hatása. HK: hőkezelés, Z: zidovudin, R: ribavirin, 25, 50: 25 ill. 50 mg/l

	kezelés	növények túlélése	túlélési ráta	vírusmentesség
zidovudin	kontroll	15/15	100%	86%
	Z 25	12/15	80%	83%
	Z 50	14/15	93%	86%
hőkezelés+ zidovudin	HK kontroll	12/15	80%	75%
	HK + Z 25	15/15	100%	73%
	HK + Z 50	15/15	100%	93%
ribavirin	kontroll	15/15	100%	93%
	R 25	15/15	100%	93%
	R 50	15/15	100%	93%

A kemoterápián átesett meggytenyészetek 73-93%-a lett vírusmentes. A zidovudin (25 ill. 50 mg/l) 83 ill. 86%-ban PNRSV-mentes növényt eredményezett és hőkezeléssel kombinálva is nagy arányban (73 ill 93%) mentes növényeket kaptunk. A ribavirin mindkét koncentrációban 93% vírusmentes növényt eredményezett. Meg kell jegyezni, hogy a meggyen végzett kezelések minden kontroll csoportjában nagy volt a vírusmentes növények száma. A PNRSV-fertőzött 'Éva' meggy kemoterápiás eredményeit a 4.6. táblázat foglalja magába.

4.5. Kemoterápiás kísérletek eredményei összefoglalva

4.5.1. A kemoterápia vírusmentesítő hatása

A kemoterápia vírusmentesítő hatását vizsgálva jól látható a különbség a fertőző vírusok eliminációjában. A CVA-val fertőzött két kajszi fajta és a szilva növények eredményeit vizsgálva, a zidovudin önmagában a CVA-t nem, vagy csak kis arányban tudta eltávolítani a vizsgált mintákból (0-20%), előzetes hőkezeléssel kombinálva azonban megnőtt a hatékonysága (20-80%). Ezzel szemben a ribavirin 25 mg/l-es koncentrációban a kezelt növények 93-100%-ából eltávolította a CVA-t. Legnehezebb a LChV-1 eliminációja volt, zidovudin hatására 37-40%, ribavirin hatására 0-20% volt a vírusmentes kajszi aránya. PPV-től mentes kajszi növényeket zidovudinnal 67-87% között kaptunk, míg ribavirinnel 25 mg/l koncentrációban 100%-ban sikerült a PPV-t eltávolítani. A PNRSV-t könnyen eltávolította az alkalmazott kemoterápia, mindkét kemoterápiás szer 73% vagy afölötti vírusmentességet eredményezett a meggy hajtástenyészeteken.

A hőkezeléssel kombinált zidovudin kezelésekhöz használt kontroll növényeket 2 hétig hőkezelttem, majd ezek antivirális szert nem tartalmazó táptalajon nevelkedtek tovább. Ezeket a hőkezelt növényeket vizsgálva állapítható meg, hogy a hőkezelésnek önmagában van-e vírusmentesítő hatása. CVA eliminációjában szilva növényen nem volt különbség a kezeletlen és a hőkezelt kontroll között, 'Magyar kajszi' 11%-ról 20% lett, ami szintén nem egyértelmű különbség, 'Pannónia' kajszi azonban 0%-ról 33%, vagyis 0 helyett 5 vírusmentes növényt eredményezett. A meggy hajtástenyészetén nem látszott a hőkezelés hatása.

4.5.2. A kemoterápia fitotoxikus hatása

A vizsgált növények különböző mértékű toleranciát mutattak az alkalmazott kemoterápiás kezelésekkel szemben. A szilvatenyészet volt a legellenállóbb, a rajta végzett kemoterápiás kezelések nem okoztak növénypusztulást. A kajszi és meggy tenyészetek már érzékenyebbek voltak, ezekben előfordult növénypusztulás. A zidovudin igen nagy (80-100%) túlélési rátát eredményezett minden hajtástenyészetben. Legérzékenyebben a komplex vírusfertőzött ‘Magyar kajszi’ tenyészet reagált a ribavirin kezelésekre, itt az 50 mg/l koncentráció teljes növénypusztulást eredményezett. A többi fajtán a ribavirin sem okozott komoly pusztulást (0-7%). A zidovudinos kemoterápia során az említett növénypusztulásnál enyhébb, de fitotoxikus hatásként megemlítendő, hogy egyes üvegekben megjelent a vitrifikáció vagy hiperhidratáció, a hajtástenyészetek túlzott vizesedése. Ez a jelenség az életképességet nem befolyásolta, a növények zöldek, többnyire szaporodóképesek maradtak, azonban sérülékenyebbek, nehezebben kezelhetők, ami a későbbi munkákat, gyökeresítést, üvegházi akklimatizációt megnehezíti, ráadásul az érintett hajtások tekintetében visszafordíthatatlan a jelenség, ezért nem kívánatos az *in vitro* rendszerekben.

A vitrifikációval érintett növényekből is el lehetett végezni a vírusdiagnosztikai munkákat (RNS-kivonás, PCR teszt), ezért nem vontuk ki a kísérletből és nem kezeltük külön ezeket. Ribavirin kezelésnél vitrifikációt nem figyeltünk meg. A 4.3. ábrán néhány jellegzetes vitrifikálódott növény látható, érdekesség, hogy egy üvegen belül nem feltétlen érint minden növényt a vizesedés.

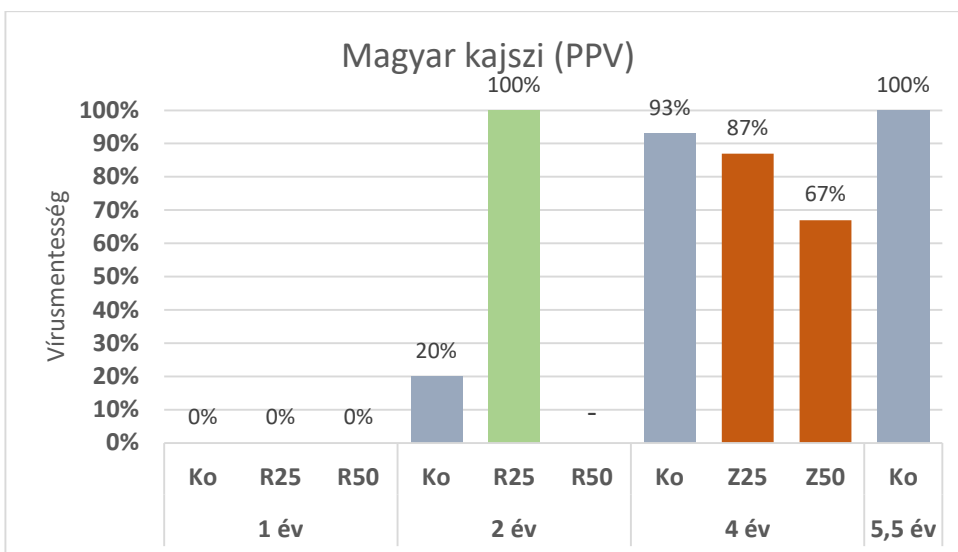
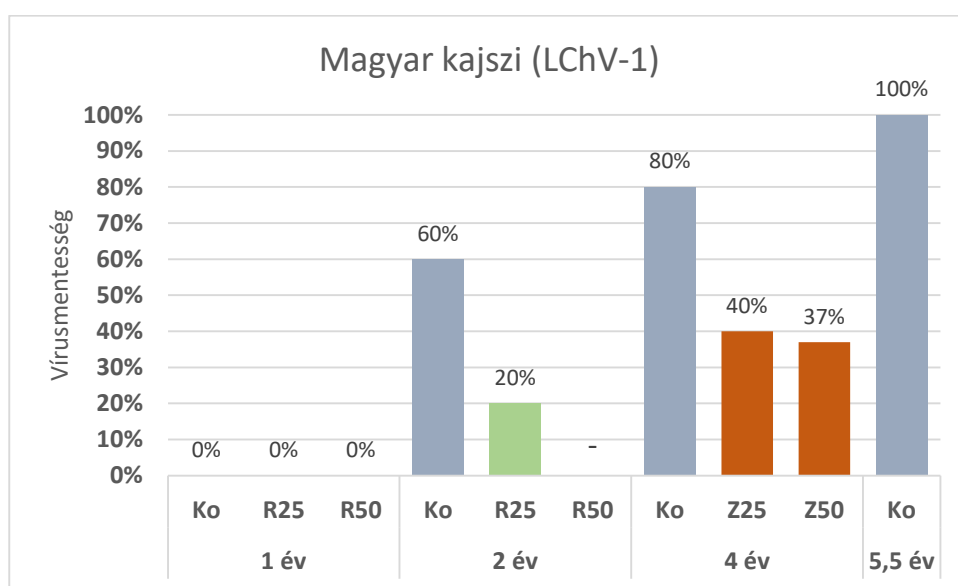
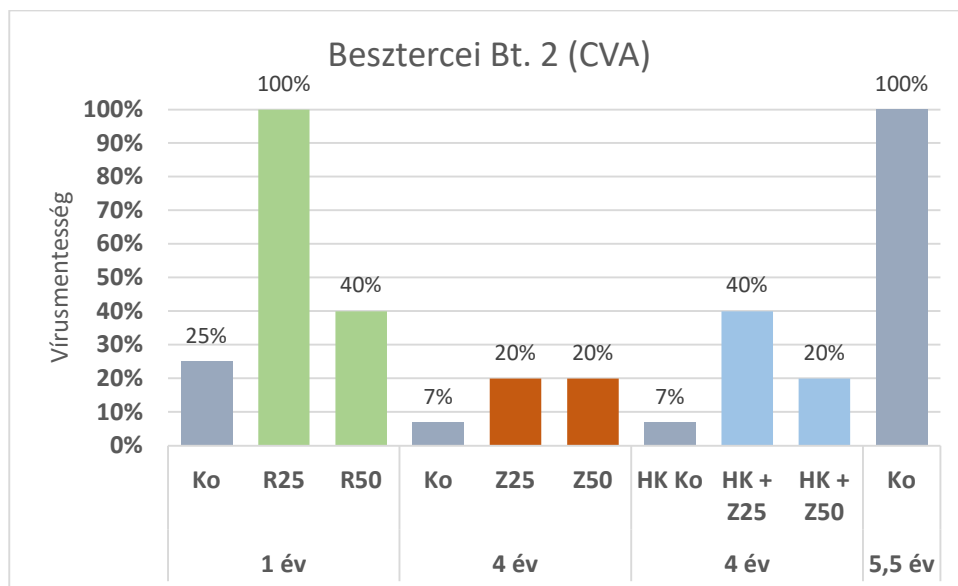


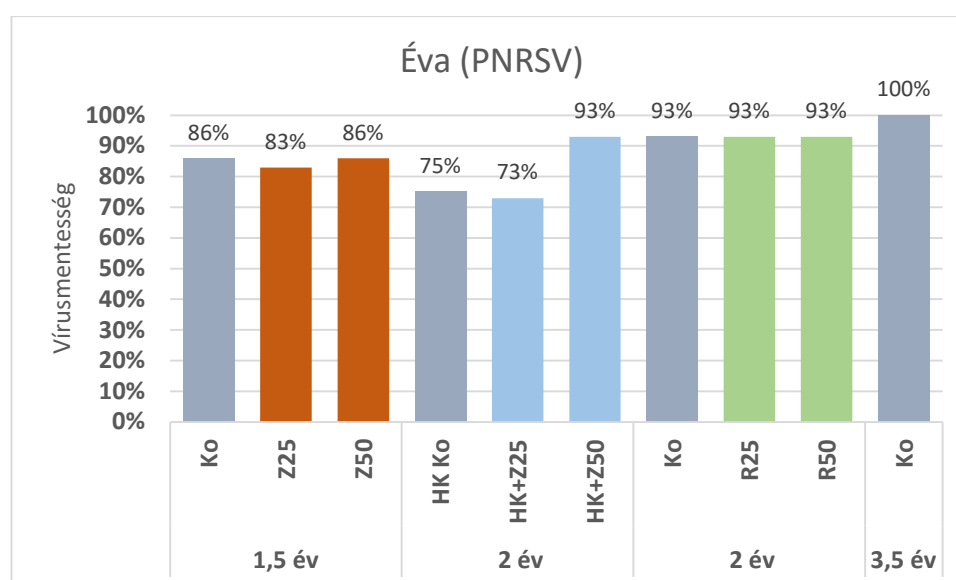
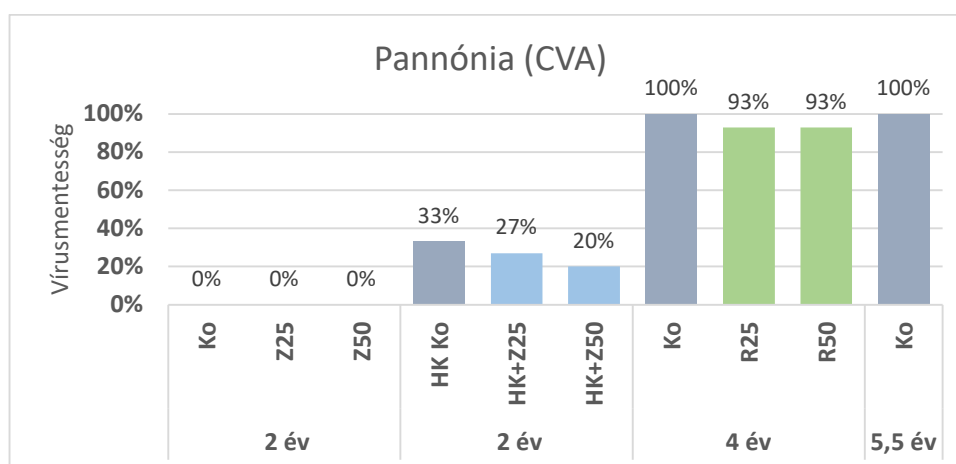
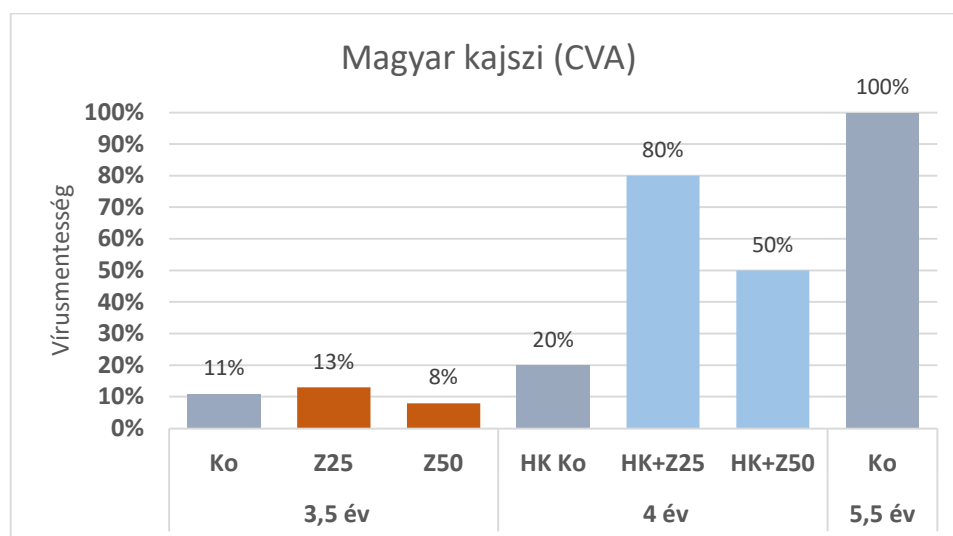
4.3. ábra Zidovudin kezelés során jelentkező vitrifikáció. A: szilva hajtástenyészet 50 mg/l zidovudinos táptalajon, B: ‘Magyar kajszi’ hajtástenyészet hőkezelést követő 25 mg/l zidovudinos táptalajon, C: meggy hajtástenyészet 50 mg/l zidovudinos táptalajon

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

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

A különböző növényeken végzett kísérletek nem párhuzamosan történtek. Az eltérő tenyészet indítási időpontok és a mikroszaporítás sajátosságai, a növények eltérő szaporodási üteme, fellépő kontaminációk miatt, amint létrejött megfelelő mennyiségű kísérleti anyag, úgy indítottuk az adott kísérleteket. A CVA-s 'Magyar kajszli' hajtástenyészetben bakteriális fertőzés következett be, ami jelentősen visszavetette a növények szaporodását és a kísérletre bocsátható növényanyagot csak hosszadalmas labormunka eredményeként kaptuk meg, ami szintén kitolta a kemoterápiás kísérletek idejét. A hajtástenyészeteket hónapokig hűtőben, fény nélkül is tároltuk, ahogy azt az Anyag és módszer fejezetben részleteztem. Az elvégzett kísérletek között a fent említett okok miatt igen nagy időbeli eltérések lettek. A 4.4. ábrán a kemoterápia eredményei mellett a kísérletek, illetve az utolsó kezeletlen kontroll növények tesztelésének időpontját is feltüntettem, az évek a tenyészetek indításától eltelt időt (a mikroszaporított növények korát) jelentik.





4.4. ábra A kemoterápia vírusmentesítési eredményei a kísérletek, illetve a kezeletlen kontroll növények utolsó tesztelésének időpontjának feltüntetésével. Az évek a tenyészetek indításától eltelt időt jelentik. Ko: kontroll, HK: hőkezelés, Z: zidovudin, R: ribavirin, 25, 50: 25 ill. 50 mg/l

A kezeletlen kontroll 'Besztercei Bt. 2' szilva vírusmentességét vizsgálva az látszik, hogy a kezdeti CVA fertőzés nem csökken 4 év elteltével, az első évben vizsgált hajtástenyészetek 25%, 4 év után 7%-a volt CVA-mentes. A Besztercein végzett vírusmentesítési kísérletek ezért összevethetők, és megerősíthető a ribavirin nagyobb hatékonysága a zidovudinnal szemben. A hőkezelésnek önmagában (hőkezelt kontroll csoport) nem volt vírusmentesítő hatása, zidovudinnal (25 mg/l) kombinálva 2x-esére nőtt a vírusmentes növények aránya (20-ról 40%-ra) a zidovudin kezeléshez képest. 5,5 év elteltével azonban mind a 10 tesztelt kontroll növény negatív lett.

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

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

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

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

4.7. Új tudományos eredmények

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

5. Következtetések és javaslatok

5.1. CVA-fertőzött szilva hajtástenyészeteken végzett vírusmentesítési kísérletek megvitatása

5.1.1. Hőkezelést követő hajtáscsúcs-tenyésztés eredménye

A 'Besztercei Bt. 2' szilvafajta esetében az *in vitro* hőkezelést követő hajtáscsúcs-izolálás megfelelő módszernek bizonyult a CVA eliminálására. A kimetszett hajtáscsúcs mérete kulcstényező a mentesítési eljárás során (Wang et al. 2018a). Munkámban igyekeztem a lehető legkisebb, technikailag is kivitelezhető méretet elérni, amely még túlélésre és regenerációra alkalmas lehet, de mentes a vírustól, így 1-2 mm hosszú hajtáscsúcsokat izoláltam. Még ezeket a viszonylag nagy hajtáscsúcsokat használva is, amelyek nem csak a merisztematikus régióra korlátozódnak, a hajtáscsúcsok 39%-a korán elbarnult vagy elkalluszosodott és nem volt képes regenerációra. Zarghami és Ahmadi (2023) tanulmányában arról számolt be, hogy az őszibarackfajták túlélési aránya 65%-ról 20%-ra csökkent a kimetszett merisztéma méretének csökkenésével (1,0 mm-ről 0,2 mm-re). Hőkezeléssel kombinálva a nagyobb méretű (1-2 mm) hajtáscsúcs alkalmazása hatékonyan eltávolította a PPV és PNRSV vírusokat kajsziából és nektarinból (Koubouris et al. 2007, Manganaris et al. 2003).

A szilva hajtástenyészetek 38/36°C-on 15 napig tartó hőkezelése ideális időtartamnak és hőmérsékleti beállításnak bizonyult, mivel a növények a kezelés leteltével is zöldek és vigorózusak maradtak, hajtáscsúcsaik épek és kimetszésre alkalmasak voltak. A 15 napos hőkezelés után kimetszett és táptalajon tovább nevelt hajtáscsúcsok 69%-a regenerálódott mikroszaporítható növényekké, és a tesztelt, regenerált növények 78%-a CVA-mentesnek bizonyult. A vizsgált időintervallumban (14-18 nap) a hőkezelés hossza nem befolyásolta a vírusmentesítés hatékonyságát, a kezelt növények átlagosan 74%-ban lettek vírusmentesek. Abdullahi és Lawrence (2022) szerint a merisztéma preparálását megelőző 7 napos 37/32°C-os hőkezelés elegendő volt az ACLSV eltávolításához 'Shiro' szilvából, míg Koubouris et al. (2007) 20 napig alkalmaztak 35-37°C-on hőkezelést, hogy a 'Bebeco' kajsziájából eltávolítsák a PPV-t. Hesari et al. (2022) 4 hétig tartó 37°C-os hőkezelést végeztek, és ennek eredményeként 100%-ban PPV- és PNRSV-mentes őszibarack-növényeket hoztak létre. Kajsziájából a 45 napos, 37/35°C-os hőkezelés volt alkalmas a PPV, PNRSV és PDV eliminálására *in vitro* tenyészetekből (Křižan és Ondrušiková 2008).

Az említett vizsgálatokban alkalmazott különböző beállítások és kezelési időtartamok jól érzékeltetik, hogy az egyes növényfajok, fajták milyen eltérő toleranciával bírnak, ill., hogy az elimináció sikeressége a fertőző vírus típusától is függ (Wang et al. 2018a).

5.1.2. Kemoterápiás kísérletek

A 'Besztercei Bt. 2' szilvafajta toleránsnak bizonyult az alkalmazott kemoterápiás kezelésekkel szemben, jelentős fitotoxikus hatás vagy növénypusztulás még az antivirális szerek nagy (50 mg/l) koncentrációban történő alkalmazása mellett sem fordultak elő. Érdekes módon a ribavirin és a zidovudin kezelés is kisebb koncentrációt alkalmazva (25 mg/l) eredményezett több vírusmentes növényt, ami eltér a korábbi publikációk alapján várható eredményektől (Deogratias et al. 1989a, Cieślińska 2007, Paunovic et al. 2007). Találhatunk azonban hasonló esetet, például Cieślińska (2007) több ACLSV-mentes növényt kapott 50 mg/l koncentrációjú ribavirint használva, mint 100 mg/l koncentrációban. Hauptmanová és Polák (2011) is kapott olyan eredményeket, ahol 5 mg/l ribavirin eltávolította a PPV-t a kajsziból (57%), míg a 10 mg/l ribavirin kezelés mellett minden kezelt hajtás fertőzött maradt 9 hét kemoterápia után, végül arra a következtetésre jutottak, hogy a kezelési időszakot 12 hétre kell meghosszabbítani a hatékony víruseltávolítás érdekében. Cieślińska (2007) kimutatta, hogy a ribavirin 10, 25, 50 és 100 mg/l koncentrációban táptalajhoz adva hatékonyan eltávolította az ACLSV-t a mirobálán tenyészetek 37-85%-ából és a PNRSV-t az 'Empress' szilvafajta egyedeinek 38-100%-ából, de a mirobálában jelenlevő PNRSV és az 'Early Rivers' cseresznyében lévő PDV eliminálása csak akkor volt sikeres, ha a kemoterápiát hőkezeléssel kombinálták. A ribavirin kezelés (25 mg/l) hőkezeléssel kombinálva hatékonynak bizonyult a PPV szilvából való eltávolításában is (Jakab-Ilyefalvi és Pamfil 2012). Ribavirin (20 mg/l, 4 hétig) kezelés után a hajtás apikális részének (kb. 3 mm) regenerálása alkalmas volt a PDV-mentes 'Tamara' és 'Amid' cseresznyefajták előállítására (Paprstein et al. 2016). A ribavirin nagyobb koncentrációban (50-100 mg/l) gyakran fitotoxikus a kezelt tenyészetekre (Deogratias et al. 1989a, Cieslinska 2000, Cieślińska 2007, Vescan et al. 2011, Sedlák et al. 2023). Hauptmanová és Polák (2011) sikeresen eliminálták a PPV-t szilva és kajszinövényekből hosszú távú, kisebb koncentrációjú (5 vagy 10 mg/l) ribavirin kezeléssel. Kajszin végzett kísérlet alapján már nagyon kis koncentráció (1 mg/l) és rövid kezelési idő (4 hét) is eredményezhet PPV-mentes növényeket (Şekerz et al. 2015). Zare Khafri

et al. (2024) a munkánkhoz hasonló eredményekről számoltak be kajszifajtákon végzett kísérletükben, ahol a hőkezelés utáni 1-2 mm nagyságú hajtáscsúcsstenyésztes eredményezte a legnagyobb vírusmentesítési rátát (90-100%), de a regenerációs ráta (60-80%) alul maradt a kemoterápiához képest, így a ribavirin (25 mg/l) alkalmazásával összességében több vírusmentes növényt sikerült létrehozni.

A 14-18 napig tartó 38/36°C-on végzett hőkezelés 1-2 mm nagyságú hajtáscsúcsstenyészteszel kombinálva nagy arányban eredményezett CVA-mentes szilva *in vitro* növényeket, a módszer azonban jelentős növénypusztulással járt. A kemoterápia (25 mg/l ribavirin) teljesen kiirtotta a vírust a kezelt szilvahajtásokból anélkül, hogy növénypusztulást okozott volna. Eredményeink alapján elmondható, hogy a kemoterápia hatékonyan képes eliminálni a CVA-t 'Besztercei Bt. 2' szilvából, jó túlélési arány mellett és rövidebb idő alatt, mint a hőkezeléssel kombinált hajtáscsúcsstenyészteszel.

5.2. CVA és LChV-1+PPV fertőzött kajszii tenyészeteken végzett *in vitro* vírusmentesítési kísérletek megvitatása

A kajszii hajtástenyészetekből hőkezelés után kimetszett hajtáscsúcsok gyenge regenerációs képessége alapján a hajtáscsúcsstenyésztes ebben a formában nem alkalmas a kísérletbe vont kajszifajták vírusmentesítésére. A kajszikról ismert, hogy toleranciájuk elmarad a szilvától, mikroszaporítás során is érzékenyek, gyengébben szaporodnak, regenerációs képességük is gyengébb (Marino et al. 1993, Perez-Tornero et al. 2000). Mivel az egyetlen tesztelt növény negatív lett és a hőkezelést a tenyészetek elviselték 2-3 hétig is, érdemes lenne nagyobb hajtáscsúcs izolálást végezni esetükben, amely elősegítheti a regenerációt, 3 hetes hőkezeléssel kombinálva, így remélhető a hatékonyabb vírusmentesítés *in vitro* hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztes módszerrel. A korábban említett tanulmányokban kimutatták a nagyobb hajtáscsúcs alkalmazásának előnyeit a merisztémához képest (Manganaris et al. 2003, Koubouris et al. 2007), de érzékeny növényeknél ez az 1-2 mm-es méret is limitáló lehet, ezért érdemes lenne tovább növelni a kimetszett hajtáscsúcs méretét, ahogy Koubouris et al. (2007) 5 mm-es csúcsokat használtak kajszii *in vitro* hőkezelésénél vagy Stein et al. (1991) a hőkezelés körülményeit optimalizálva őszibarackfajtákon 7-10 mm hosszúságú hajtáscsúcsokból regeneráltak sikeresen PNRSV-mentes növényeket.

A hőkezelt kontroll növények tesztelése alapján ‘Pannónia’ kajszin önmagában a teljes hajtástenyészet hőkezelése is vírusmentesítő hatású volt, 5 CVA-mentes növényt eredményezett, ami megerősíti a hőkezelés létjogosultságát a mentesítési folyamatban.

A kajszai hajtástenyészetek zidovudinos táptalajon történő nevelése során megfigyelt nagy túlélési ráta (80-100%) alapján elmondható, hogy a vizsgált kajszifajtákon a zidovudin kezelés nem okozott jelentős növénypusztulást. ‘Pannónia’ esetében 100% túlélést, míg az 50 mg/l koncentrációban zidovudinnal kezelt CVA-s ‘Magyar kajszai’ esetében 87%, illetve a nagy koncentrációt hőkezeléssel kombinálva 80%-os túlélést kaptunk. Eredményeink alátámasztják a korábban publikált megfigyeléseket, miszerint a zidovudin kíméletes kemoterápiás szer, a növényekre gyakorolt negatív hatása elenyésző (Pavelkova et al. 2015, Sedlák et al. 2023).

A ribavirinnel (25 ill. 50 mg/l) kezelt ‘Pannónia’ tenyészetek 100 ill. 93%-os túlélése alapján elmondható, hogy ez a fajta toleráns a ribavirinre az alkalmazott koncentrációkban. A LChV-1+PPV-fertőzött ‘Magyar kajszai’ hajtástenyészeteken végzett ribavirin kezelések során már jelentősen csökkent a kezelést túlélő növények száma. Az ismételt kísérlet hatására ugyan megnőtt a ribavirinnel (25 mg/l) kezelt növények túlélése (27%-ról 93%-ra), azonban a nagyobb koncentrációval (50 mg/l) kezelt csoportban nem maradt tesztelhető, túlélő növény. A kapott eredmények alapján megmutatkozik a ribavirin fitotoxikus hatása az érzékenyebb ‘Magyar kajszai’ esetében, főként magasabb koncentrációban alkalmazva.

Az eredményeinket támasztják alá azok a munkák, amelyben a ribavirin bár hatékonyan eliminálta a különböző növényi vírusokat, a hajtástenyészeteken erős fitotoxikus hatást és jelentős növénypusztulást eredményezett (Deogratias et al. 1989a, Cieslinska 2000, Cieślińska 2007, Sedlák et al. 2023).

A kemoterápiás eredményeink igazolják azt a korábbi megállapítást, miszerint a vírusok eliminációja erősen függ a gazdanövény és a vírus genetikai háttérétől (Wang et al. 2018a). A zidovudin önmagában a CVA-t nem, vagy csak csekély mértékben távolította el a vizsgált növényekből (0-20%), előzetes hőkezeléssel kombinálva azonban szilván 20-ról 40%, ‘Magyar kajszin’ 13-ról 80%, ‘Pannónia’ kajszin 0-ról 27% lett a vírusmentes növények aránya. A zidovudin kezelés a LChV-1-et és PPV-t hatékonyan (40, ill. 86%) távolította el ‘Magyar kajsziból’. A ribavirin kezelések nagy

arányú CVA-mentes növényt eredményeztek (93-100%), míg LChV-1 eltávolításában alul maradt a zidovudinhoz képest a 'Magyar kajszi' kísérletekben.

Eredményeink alapján a kemoterápia alkalmas módszer a CVA, LChV-1 és PPV vírusok eltávolítására zidovudin és ribavirin használatával. A hőkezeléssel való kombinálás képes növelni a kezelés hatékonyságát, ahogy azt más kutatócsoportok is leírták (Spiegel et al. 1999; Cieślińska 2007; Hu et al. 2012, 2015).

5.3. PNRSV fertőzött meggy tenyészeteken végzett *in vitro* vírusmentesítési kísérletek megvitatása

A PNRSV-vel fertőzött 'Éva' meggy hajtástenyészetek zidovudinnal és ribavirinnel történő kezelése során kapott 80-100% közötti túlélési eredmények alapján elmondható, hogy a kezelt meggyfajta toleráns az alkalmazott kemoterápiás kezelésekre. A kapott nagy arányú vírusmentes növény alapján (73-93%) a zidovudin és a ribavirin is alkalmas az 'Éva' meggy *in vitro* vírusmentesítésére. Előzetes hőkezelés nem indokolt, mivel nem befolyásolta jelentősen a hatékonyságot zidovudin kezelésnél.

A PNRSV-ről leírták, hogy hőkezelést követő hajtáscsúcsizolálással eltávolítható őszibarackból és cseresznyéből (Snir és Stein 1985, Stein et al. 1991, Spiegel et al. 1995, Gella és Errea 1998), ribavirinnel cseresznyéből, sajmeggyből és szilvából (Deogratias et al 1989a, Cieślińska 2007) is sikeresen eliminálták. A PNRSV szilvatenyészetből már kis koncentrációjú ribavirin kezeléssel is eltávolítható, hőkezeléssel kombinálva 10 mg/l koncentrációban 100%-ban mentes növények érhetők el (Cieślińska 2007). Tanulmányok alapján, amennyiben a PNRSV más vírussal együtt komplex fertőzésben van jelen, már nehezen eliminálható, szilva tenyészetből csak nagy koncentrációjú (40, 50 mg/l) ribavirin kezeléssel, míg mirobálnból nem sikerült ribavirinnel eltávolítani (Cieślińska 2007, Mazeikienė et al. 2019).

5.4. A kemoterápia fitotoxikus hatásainak megvitatása

Ahogy láthattuk a ribavirin az arra érzékeny genotípusoknak, a mi esetünkben a komplex vírusfertőzött 'Magyar kajszinak' jelentősen befolyásolta az életképességét, a nagyobb koncentrációban (50 mg/l) kezelt csoportban nem maradt tesztelhető, túlélő növény, de már 25 mg/l koncentrációban is jelentős pusztulást képes okozni. A

zidovudinos kemoterápia a ribavirinnél kíméletesebb volt a kezelt növények esetében, ahogy azt a korábbi kutatások alapján vártuk (Pavelkova et al. 2015, Sedlák et al. 2023), azonban az egyes üvegekben jelentkező vitrifikáció bár nem volt általános és nem okozott pusztulást, nem kívánatos az *in vitro* rendszerekben és fitotoxikus hatásként megemlítendő (Magyar-Tábori et al. 2021).

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

A 4.4. ábrán bemutatott, kezeletlen kontroll minták vírusmentességét vizsgálva megállapítottuk, hogy a szilva hajtástenyészetben a kezdeti CVA-fertőzés nem csökken 4 év elteltével, az első évben vizsgált hajtástenyészetek 25%-a, 4 év után 7%-a volt CVA-mentes. A CVA-fertőzés mértéke ‘Magyar kajszipan’ sem csökken jelentősen az idő előrehaladtával, 3,5 év elteltével 11% volt a vírusmentesség aránya, a 4 év után végzett kísérletben a hőkezelt kontrollok 20%-a volt vírusmentes. Öt és fél év elteltével azonban ezek a növények is negatívak lettek a víruseszten.

‘Pannónia’ kajszipan már a kezeléseik során kimutatható volt a CVA jelenlét csökkenése, míg a 2 év után végzett kísérlet kontroll növényei 100%-ban fertőzöttek voltak, 4 év elteltével a kontroll csoportban már nem lehetett kimutatni a CVA-t. A két vírussal komplexen fertőzött ‘Magyar kajszipan’ is igazolható a kezdeti vírusfertőzöttség csökkenése az idő előrehaladtával. LChV-1 esetében 1 év után 0%, 2 év után 60%, 4 év után 80%, míg PPV esetében 1 év után 0%, 2 év után 20%, 4 év után 93% a vírusmentesség aránya. A PNRSV-fertőzött ‘Éva’ meggy hajtástenyészeiben már 1,5 év után is kicsi volt a vírusfertőzöttség mértéke, amiből arra következtethetünk, hogy a PNRSV könnyen eliminálható vírus, spontán, már a mikroszaporításban tartás következtében is képes eltűnni a növényből.

A szakirodalomban találunk néhány példát a kezdeti vírusfertőzöttség megszűnésére az *in vitro* rendszerben tartás és mikroszaporítás következtében: a szamóca száradásos kipusztulását okozó Tobacco streak virus-tól mentes szamóca (Spiegel et al. 1994), burgonya különböző vírusaitól (X, Y, M) mentes burgonya (Cassells és Long 1982), banana bunchy top virus-tól mentes banán (Thomas et al. 1995), ACLSV-mentes alma (Hansen és Lane 1985), ApMV-mentes alma (Knapp et al. 1995a), PPV-mentes szilva (Vescan et al. 2011), illetve PNRSV-, PDV-, ACLSV-

mentes cseresznye (Deogratias et al 1989b) növények előfordulásáról számoltak be vírusmentesítési kísérletek során a kezeletlen csoportokban.

A vírusok spontán eltűnését vagy mennyiségük jelentős lecsökkenését magyarázhatja, hogy az *in vitro* rendszerekben hormonok hatására indukálódik a növényi hajtásproliferáció, a sejtek szaporodása meghaladja a vírus szaporodási ütemét, megnő a vírusmentes sejtek száma és létrejöhet a növények „kigyógyulása” a vírusfertőzésből (Deogratias et al 1989b). A szakirodalom „recovery”-ként említi a vírustünetektől mentes, friss hajtás megjelenését a vírusfertőzött és tünetes növényen, ami háttérben a növények RNS csendesítésen alapuló antivirális védekező mechanizmusa áll (Ghoshal és Sanfaçon 2015, Bradamante et al. 2021, Malavika et al. 2023). Mivel ez a védekezési mechanizmus alacsony hőmérsékleten gátolt, ezért a mi esetünkben a korábban említett kényszerű hűtött tárolás során ez nem működhetett. A mikroszaporított növények hosszú távú hűtésének esetleges vírusmentesítő hatását szakirodalomban kerestük. A viroidoktól való mentesítésre alkalmaznak hideg terápiát (4-6 °C-on tartás néhány hónapig) *in vitro* növényeken (Barba et al. 2017), de a hűtőben tárolás vírusmentesítő hatása eddig nem ismert, ezért ezt a kiváltó okot elvetettük. Vélhetően a hűtőbe helyezés előtti és az azt követő normál nevelési körülmények közötti mikroszaporítás eredményezte a vírusmentes mintákat.

A hajtástenyészetek friss táptalajra passzálásainak száma és a táptalaj növekedésszabályozóinak összetétele lényeges szerepet játszik a vírusmentesítésben, ezen tényezők manipulálásával az *in vitro* növények vírustartalmának csökkenése érhető el (Deogratias et al 1989b, Nacheva et al. 2002, Vescan et al. 2011). Szilvafajtákat vizsgálva, merisztémából indított mikroszaporítással a harmadik átrakás után a minták 17,5%-a, a hatodik átrakás után pedig 31%-a PPV-mentes lett (Vescan et al. 2011). Szintén szilvákon végzett kísérletben nagyobb méretű (3 mm) hajtáscsúcs mikroszaporítása során a 4. átrakás után a növények 33-35%-a, míg 8 átrakás után 88-100%-uk lett PPV-mentes (Nacheva et al. 2002). Citokininekben gazdag táptalaj használatával az intenzív mikroszaporítás hatására 8-9 passzálás után nem lehetett kimutatni a kezdeti PNRSV, PDV és ACLSV jelenlétet cseresznye növényekben (Deogratias et al 1989b).

A vírusok génmegőrzési vagy kísérleti célú *in vitro* fenntartására irányuló kutatások során is megfigyelték a vírusok fertőző képességének vagy mennyiségének csökkenését a gazdanövény kallusztenyésztésében (Chen et al. 2003). Itt is jelentős különbségek lehetnek a gazda és a fertőző vírus genotípusától függően, egyes

rendszerekben stabilan fenntartható a vírus, más esetben pedig teljesen el is tűnhet, vagy legalábbis a kimutathatósági küszöb alá csökken a mennyisége az átrakások során (Durna-Vila et al. 1989, Pelah et al. 1994).

A vírusjelenlét spontán eltűnésének jelenségére Spiegel (2004) a detektálási nehézségek kapcsán hívja fel a figyelmet. A korábbi kutatásokban jellemzően ELISA-t használtak a vírusjelenlét kimutatására (Lerch 1987, Deogratias et al 1989b, Gella és Errea 1998, Dziedzic 2008), de az összehasonlító kísérletek során jelentős, nagyságrendekkel kisebb kimutathatósági küszöböt értek el PCR vizsgálattal (Candresse et al. 1994, Sanchez-Navarro et al. 1998, Moury et al. 2000, Dovas et al. 2001, Beaver-Kanuya és Harper 2019), így mára már a PCR számít elfogadott kimutatási módszernek *in vitro* növények vírusdiagnosztikai vizsgálatához. A különböző PCR-alapú technikák között is jelentős érzékenységbeli különbségek lehetnek (Boonham et al. 2014, Beaver-Kanuya és Harper 2019). A diagnosztikai eredmény megbízhatóságát javíthatja, ha az *in vitro* növényeket gyökeresítés után üvegházban újra teszteljük, így az esetlegesen kimutathatóság alá eső kis koncentrációban jelenlevő vírus képes felszaporodni a kiültetett növényben vagy ténylegesen vírusmentessé nyilvánítható a növény a dupla negatív teszt alapján (Deogratias et al 1989b, Gella és Errea 1998, Jevremović et al. 2023, Zare Khafri et al. 2024).

A kutatásaim során vizsgált növényeket több éven (>5) keresztül tartottam fenn mikroszaporításban, amilyen hosszú időtartam vizsgálata igen ritka (Knapp et al. 1995a), ezért a mi hosszú távú fenntartásunk és annak egyöntetű negatív diagnosztikai eredménye meglehetősen egyedi eset és hasznos információ lehet az érzékenységük miatt nehezen vírusmentesíthető növények ill. a nehezen eltávolítható vírusok esetében. A vírusmentes státusz megerősítésére a későbbiekben ajánlott a mentes vonalakból gyökeresíteni és akklimatizáció után üvegházi körülmények között újratesztelni az *in vivo* növényeket, erre azonban a doktori munka keretében nem jutott lehetőség.

5.6. Az eredmények gyakorlati alkalmazhatósága

A gyakorlat szempontjából egy kórokozómentesítési program célja az egészséges, kezdeti vírusjelenléttől mentes *in vitro* növény létrehozása, amiből már mikroszaporítással fel lehet szaporítani olyan növényanyagot, amelyből gyökeresítés

után üvegházba kiültethető, majd akklimatizált *in vivo* növény állítható elő. Minden fázisban (*in vitro* szaporítás, gyökeresítés, akklimatizáció) ráhagyással kell számolni, mert nem várható 100%-os túlélés. Már egyetlen igazoltan vírusmentes hajtáscsokor is elegendő lehet, hogy az adott növényfajta a certifikációs rendszeren való átfutása után a központi törzsültetvénybe be lehessen vonni az előírt ismétlésszámmal (ált. 4 egyed/fajta) és fenn lehessen tartani egészséges szaporítóanyag-előállítás alapjául.

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

Munkám alapján a kemoterápia alkalmas módszernek bizonyul csonthéjas gyümölcsfajok vírusmentesítésére. A zidovudin és a ribavirin is kisebb (25 mg/l) koncentrációban javasolt a tapasztalt nagyobb arányú mentesség és az esetleges fitotoxikus hatások minimalizálása érdekében. Előzetes hőkezeléssel kombinálva növelhető a mentesítési hatékonyság, így kevesebb kiindulási anyagból, kevesebb teszteléssel, rövidebb idő alatt juthatunk vírusmentes növényhez. Szilva esetében antivirális gyógyszer használata nélkül, hőkezelést követő hajtáscsúcs-tenyésztéssel is nagy arányú vírusmentes növény érhető el. Itt azonban sok a veszteség, nagymértékű a pusztulás, gyenge és lassú a regeneráció, de nem elhanyagolható a kemoterápiás szerek egészségre gyakorolt kockázata sem. Kajszi tenyészetén is érdemes lehet ezért a korábban említett nagyobb hajtáscsúcs és hosszabb hőkezelési idő eredményes kombinációját kidolgozni. Fontosnak tartom a hosszú távú fenntartás során kapott vírusmentes diagnosztikai eredményeket megemlíteni. A több éves mikroszaporítás mint vírusmentesítő módszer elsőre nem tűnik gyakorlatias lehetőségnek, azonban előfordulnak hőre, hajtáscsúcsból történő regenerációra, valamint antivirális vegyszerekre érzékeny növények, amelyek kezelése nem kivitelezhető, így igaz, hogy sok évbe beletelhet, de mégis eredményes lehet ilyen esetekben is a mentesítési eljárás.

6. Összefoglalás

A csonthéjas gyümölcsfák számos vírusfertőzésnek vannak kitéve szerte a világon. A vírusok rovar vektorokkal és vegetatív szaporítással könnyen átjutnak növényről növényre, így az általuk okozott betegségek teljes ültetvényeket képesek veszélyeztetni. A hatóság által kötelezően tesztelendő kórokozók túl számos vírussal, viroiddal fertőzöttek a csonthéjasok, és egyre több látens jelenlevő vírust is azonosítanak *Prunus* fajokban, melyek egyelőre ismeretlen kockázatot jelentenek a növényekre. A vírusok ellen a megelőzés a legfontosabb eszköz: elengedhetetlen az egészséges szaporítóanyag használata az ültetvények létrehozásakor és a vektorok elleni folyamatos védekezés a fenntartás során. Vírusmentes növények előállítására különböző technikákat alkalmaznak, a hagyományos cserepes hőkezeléseket *in vitro* módszerek váltották fel. Általánosan használható, megbízható, gyors megoldás azonban nem áll rendelkezésre csonthéjasok vírusmentesítésére. Nagyon jelentős a genotípus-függés, vagyis egyrészt a növényfajoknak, fajtáknak különböző a toleranciája az alkalmazott kezelésekkel szemben, másrészt a különböző vírusok is eltérően reagálnak, így előfordul, hogy a vírus eliminálásához szükséges erősségű kezelés már a növényi tűréshatáron túllép, és a növény elpusztul a kezelés során.

Munkám során a CVA, LChV-1, PPV és PNRSV vírusokkal fertőzött különböző csonthéjas növényekből *in vitro* hajtástenyészeteket hoztam létre és a fertőzött tenyészeteken *in vitro* vírusmentesítési technikákat (hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztés, kemoterápia önmagában vagy hőkezeléssel kombinálva) alkalmaztam. Megfigyeltem és összehasonlítottam a mentesítési módszerek növényekre gyakorolt hatását és vírusmentesítési hatékonyságát.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a 'Besztercei Bt. 2' szilvából a CVA eltávolítható *in vitro* hőkezelést követő hajtáscsúcsstenyésztéssel és kemoterápiával is. A vizsgált kajszfajták esetében a hajtáscsúcsból történő gyenge regenerációs képességük miatt a hajtáscsúcsstenyésztés csak a módszer optimalizálásával lehetne alkalmazható (hosszabb hőkezelés után nagyobb méretű hajtáscsúcs kimetszésével), a kemoterápia azonban javasolható vírusmentesítésre, a ribavirin 25 mg/l koncentrációban optimális eredményt adott CVA-, LChV-1- és PPV-mentesítésre. A vizsgált meggyfajta alacsony vírusfertőzöttsége miatt nehéz a módszereket összehasonlítani, de megállapítható, hogy a PNRSV mennyisége idővel lecsökken és 3,5 év elteltével nem mutatható ki a hajtástenyészetekből.

A szakirodalom alapján munkánk során mi számoltunk be először a CVA és LChV-1 eliminációjáról *in vitro* *Prunus* hajtástenyészetekből. Bár a CVA-fertőzést nem hozták összefüggésbe konkrét betegséggel, figyelembe kell venni annak lehetőségét, hogy befolyásolhatja a tünetek súlyosságát komplex fertőzések esetén, ezért a vírusmentesítési tanulmányunk hasznos lehet a jövőben.

A hosszú távú (meggy esetében 3,5, szilva és kajszi esetében 5,5 év) mikroszaporításban tartás eredményeként 100% vírusmentes mintákat kaptunk RT-PCR módszerrel minden kísérletbe vont hajtástenyészetből. A több éves mikroszaporítás mint vírusmentesítő módszer elsőre nem tűnik gyakorlatias megoldásnak, azonban előfordulnak hőre, hajtáscsúcsból történő regenerációra, valamint antivirális vegyszerekre érzékeny növények, amelyek kezelése nem kivitelezhető, így igaz, hogy sok évbe beletelhet, de mégis eredményes lehet ilyen problémás esetekben is a mentesítési eljárás.

7. Summary

Stone fruit trees are affected by many virus infections around the world. Viruses are easily transmitted from plant to plant by insect vectors and vegetative propagation, so the diseases they cause can endanger entire plantations. In addition to the pathogens that must be tested by the authorities, stone fruits are infected with many other viruses and viroids, and an increasing number of latently present viruses are also being identified in *Prunus* species, which pose an unknown risk to the plants. Prevention is the most important tool against viruses: it is essential to use healthy propagating material when creating plantations and to continuously protect against vectors during maintenance. Different techniques are used to produce virus-free plants, traditional heat treatments of potted plants have been replaced by *in vitro* methods. However, there is no universally usable, reliable, fast solution for eliminate viruses from stone fruits. Genotype dependence is very significant, i.e. plant species and varieties have different tolerances to the applied treatments, and on the other hand, different viruses also react differently, so it happens that the strength of the treatment required to eliminate the virus already exceeds the plant's tolerance limit, and the plant dies during the treatment.

In the course of my work, I established *in vitro* shoot cultures from different *Prunus* cultivars infected with CVA, LChV-1, PPV and PNRSV viruses and applied *in vitro* virus elimination methods (shoot tip culture after heat treatment, chemotherapy alone or in combination with heat treatment) on the infected shoot cultures. I observed and compared the effect of the elimination methods on the plants and the effectiveness of virus eradication.

Based on the results, CVA can be removed from the plum cultivar 'Besztercei Bt. 2' by *in vitro* heat treatment followed by shoot tip culture and chemotherapy. In the case of the examined apricot cultivars, due to their poor ability to regenerate from the shoot tip, shoot tip cultivation could only be used by optimizing the method (by excision of a larger shoot tip after longer heat treatment). However, chemotherapy can be recommended for virus eradication, ribavirin at a

concentration of 25 mg/l gave optimal results for CVA, LChV-1 and PPV eradication. It is difficult to compare the methods due to the low virus infection of the studied cherry variety, but it can be concluded that the amount of PNRSV decreases over time and cannot be detected in the shoot cultures after 3 years.

Based on the literature, we reported for the first time the elimination of CVA and LChV-1 from *in vitro Prunus* shoot cultures. Although CVA infection has not been associated with a specific disease, the possibility that it may influence the severity of symptoms in complex infections should be considered, and therefore our virus elimination study may be useful in the future.

As a result of long-term micropropagation, 100% virus-free samples were obtained from all shoot cultures included in the experiment using the RT-PCR method. At first glance, multi-year micropropagation as a virus elimination method does not seem like a practical solution, however, there are plants that are sensitive to heat, regeneration from the shoot tip, and antiviral chemicals, which cannot be treated. Thus, it is true that it may take many years, but the virus elimination procedure can still be effective even in such problematic cases.

8. Mellékletek

M1. Irodalomjegyzék

1. Abdullahi, I., & Lawrence, T. (2022). Accelerated in vitro thermotherapy and indexing against apple chlorotic leaf spot virus in Shiro plum. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 44(1), 136-146.
2. Adil, S., Singh, V., Anjum, A., & Quraishi, A. (2022). A mini-review on electrotherapeutic strategy for the plant viral elimination. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(1), 41-55.
3. Aguilar-Camacho, M., Mora-Herrera, M. E., & López-Delgado, H. A. (2016). Potato virus X (PVX) elimination as short and long term effects of hydrogen peroxide and salicylic acid is differentially mediated by oxidative stress in synergism with thermotherapy. *American Journal of Potato Research*, 93, 360-367.
4. Amari, K., Burgos, L., Pallas, V., & Sánchez-Pina, M. A. (2009). Vertical transmission of Prunus necrotic ringspot virus: hitch-hiking from gametes to seedling. *Journal of General Virology*, 90(7), 1767-1774.
5. Aparicio, F., Myrta, A., Di Terlizzi, B., & Pallás, V. (1999). Molecular variability among isolates of Prunus necrotic ringspot virus from different *Prunus* spp. *Phytopathology*, 89(11), 991-999.
6. Baráth, D., Jaksa-Czotter, N., Molnár, J., Varga, T., Balássy, J., Szabó, L. K., ... & Várallyay, É. (2018). Small RNA NGS revealed the presence of Cherry virus A and Little cherry virus 1 on apricots in Hungary. *Viruses*, 10(6), 318.
7. Barba, M., Hosakawa, M., Wang, Q. C., Taglienti, A., & Zhang, Z. (2017). Viroid elimination by thermotherapy, cold therapy, tissue culture, in vitro micrografting, or cryotherapy. In *Viroids and Satellites* (pp. 425-435). Academic Press.
8. Barone, M., Alioto, D., Marais, A., Candresse, T., & Ragozzino, A. (2006). First report and high prevalence in noncherry host of Cherry virus A in Italy. *Plant Disease*, 90(11), 1459-1459.
9. Bajet, N. B., Unruh, T. R., Druffel, K. L., & Eastwell, K. C. (2008). Occurrence of two little cherry viruses in sweet cherry in Washington State. *Plant Disease*, 92(2), 234-238.
10. Beaver-Kanuya, E., & Harper, S. J. (2019). Detection and quantification of four viruses in *Prunus* pollen: Implications for biosecurity. *Journal of Virological Methods*, 271, 113673.
11. Ben Mansour, K., Komínek, P., Komínková, M., & Brožová, J. (2023). Characterization of Prunus Necrotic Ringspot Virus and Cherry Virus A Infecting Myrobalan Rootstock. *Viruses*, 15(8), 1723.
12. Bettoni, J. C., Fazio, G., Carvalho Costa, L., Hurtado-Gonzales, O. P., Rwahnihi, M. A., Nedrow, A., & Volk, G. M. (2022a). Thermotherapy followed by shoot tip cryotherapy eradicates latent viruses and apple hammerhead viroid from in vitro apple rootstocks. *Plants*, 11(5), 582.

13. Bettoni, J. C., Mathew, L., Pathirana, R., Wiedow, C., Hunter, D. A., McLachlan, A., ... & Nadarajan, J. (2022b). Eradication of Potato Virus S, Potato Virus A, and Potato Virus M from infected in vitro-grown potato shoots using in vitro therapies. *Frontiers in Plant Science*, 13, 878733.
14. Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20-31.
15. Bradamante, G., Mittelsten Scheid, O., & Incarbone, M. (2021). Under siege: virus control in plant meristems and progeny. *The Plant Cell*, 33(8), 2523-2537.
16. Brison, M., de Boucaud, M. T., Pierronnet, A., & Dosba, F. (1997). Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Science*, 123(1-2), 189-196.
17. Cambra, M., Capote, N., Cambra, M. A., Llácer, G., Botella, P., & López-Quílez, A. (2006a). Epidemiology of sharka disease in Spain. *EPPO Bulletin*, 36(2), 271-275.
18. Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., & Llácer, G. (2006b). Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO bulletin*, 36(2), 202-204.
19. Candresse, T., Macquaire, G., Lanneau, M., Bousalem, M., Wetze, T., Quiot-Douine, L., ... & Dunez, J. (1994). Detection of plum pox potyvirus and analysis of its molecular variability using immunocapture-PCR 1. *EPPO Bulletin*, 24(3), 585-594.
20. Candresse, T., Marais, A., Faure, C., & Gentit, P. (2013). Association of Little cherry virus 1 (LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology*, 103(3), 293-298.
21. Card, S. D., Pearson, M. N., & Clover, G. R. G. (2007). Plant pathogens transmitted by pollen. *Australasian Plant Pathology*, 36, 455-461.
22. Cassells, A. C., & Long, R. D. (1982). The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of Virazole. *Potato Research*, 25, 165-173.
23. Chilukamarri, L., Ashrafzadeh, S., & Leung, D. W. (2021). In-vitro grafting—Current applications and future prospects. *Scientia Horticulturae*, 280, 109899.
24. Cieslinska, M. (2000). Elimination of Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) from pear by in vitro thermotherapy and chemotherapy. In *VIII International Symposium on Pear* 596 (pp. 481-484).
25. Cieślińska, M. (2007). Application of thermo-and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses. *J Fruit Ornament Plant Res* 15:117–124
26. Clark, M. F., & Adams, A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34(3), 475-483.
27. Cochran, L. C., & Hutchins, L. M. (1941). A severe ring spot virosis on peach. *Phytopathology*, 31.
28. Crosslin, J. M., & Mink, G. I. (1990). Biophysical differences among Prunus necrotic ringspot ilarviruses. Washington State University.

29. Csorba, T., & Burgyán, J. (2016). Antiviral silencing and suppression of gene silencing in plants. *Current Research Topics in Plant Virology*, 1-33.
30. Deogratias, J. M., Dosba, F., & Lutz, A. (1989a). Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus, and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy, and in vitro culture. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11(4), 337-342.
31. Deogratias, J. M., Dosba, F., & Lutz, A. (1989b). Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus, and apple chlorotic leaf spot virus in tissue cultured sweet cherry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11(4), 332-336.
32. Dovas, C. I., Hatziloukas, E., Salomon, R., Barg, E., Shibolet, Y., & Katis, N. I. (2001). Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp. *Journal of Phytopathology*, 149(11-12), 731-737.
33. Durna-Vila, N., Cambra, M., Medina, V., Ortega, C., & Navarro, L. (1989). Growth and morphogenesis of citrus tissue cultures infected with citrus tristeza virus and citrus infectious variegation virus. *Phytopathology*, 79(8), 820-826.
34. Dziedzic, E. (2008). Elimination of Prunus necrotic ring spot virus (PNRSV) from plum 'Earliblue' shoots through thermotherapy in vitro. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16, 101-109.
35. Ebrahimi, M., Habashi, A. A., Emadpour, M., & Kazemi, N. (2022). Recovery of virus-free Almond (*Prunus dulcis*) cultivars by somatic embryogenesis from meristem undergone thermotherapy. *Scientific Reports*, 12(1), 14948.
36. Fang, Y. L., Dhital, S. P., Li, K. H., Khu, D. M., Kim, H. Y., Song, Y. S., & Lim, H. T. (2005). Utilization of single nodal cuttings and therapies for eradicating double-infected potato virus (PLRV, PVY) from in vitro plantlets of potato (*Solanum tuberosum*). *Horticulture Environment and Biotechnology*, 46(2), 119-125.
37. Fry, P. R., & Wood, G. A. (1970). Little cherry virus in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 13(1), 111-118.
38. Gambino, G., Bondaz, J., & Gribaudo, I. (2006). Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 397-404.
39. Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520-525.
40. García, J. A., Glasa, M., Cambra, M., & Candresse, T. (2014). Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15(3), 226-241.
41. Gella, R., & Errea, P. (1998). Application of in vitro therapy for ilarvirus elimination in three *Prunus* species. *Journal of Phytopathology*, 146(8-9), 445-449.
42. George, J. A., & Davidson, T. R. (1963). Pollen transmission of necrotic ring spot and sour cherry yellows viruses from tree to tree. *Canadian Journal of Plant Science*, 43(3), 276-288.

43. Ghoshal, B., & Sanfaçon, H. (2015). Symptom recovery in virus-infected plants: revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, 479, 167-179.
44. González, J. E., Sánchez, R., & Sánchez, A. (2006). Biophysical analysis of electric current mediated nucleoprotein inactivation process. *arXiv preprint q-bio/0601014*.
45. Goussard, P. G., Wiid, J., & Kasdorf, G. G. F. (1991). The effectiveness of in vitro somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 12(2):77-81, doi:10.21548/12-2-2214.
46. Grimová, L., Zouhar, M., Ryšánek, P., Drabešová, J., Mazáková, J., & Paprštejn, F. (2010). First occurrence of Cherry virus a (cva) in the Czech Republic. *Julius-Kühn-Archiv*, (427), 275.
47. Gutermuth, A., György, Z., Hegedűs, A., & Pedryc, A. (2011). Non-TIR-NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Acta Biologica Hungarica*, 62, 171-181.
48. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., & Jelkmann, W. (Eds.). (2011). *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. St. Paul, MN, USA: APS Press/American Phytopathological Society.
49. Hansen, A. J., & Lane, W. D. (1985). Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Disease*, 69(2), 134-135.
50. Hauptmanová, A., & Polák, J. (2011). The elimination of Plum pox virus in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of in vitro cultures. *Horticultural Science*, 38(2), 49-53.
51. Hesari, N., Haji Mohammadi, A., Zarghami, R., Fakheri, B., Kiss-Bába, E., Szegő, A., ... & Mirmazloum, I. (2022). Eradication of PPV and PNRSV viruses from three Peach cultivars using Thermotherapy in Vitro, including optimization of Microshoots' multiplication and rooting medium. *Horticulturae*, 8(10), 929.
52. Hou, W., Li, S., & Massart, S. (2020). Is there a “biological desert” with the discovery of new plant viruses? A retrospective analysis for new fruit tree viruses. *Frontiers in Microbiology*, 11, 592816.
53. Howell, W. E., Eastwell, K. C., & Li, T. S. C. (2000). Heat treatment, chemotherapy and hydroponic culture for obtaining virus-free trees of sweet cherry. In XVIII International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Top Fruit Diseases 550 (pp. 455-458).
54. Howell, W. E., & Mink, G. I. (1988). Natural spread of cherry rugose mosaic disease and two *Prunus* necrotic ringspot virus biotypes in a Central Washington sweet cherry orchard. *Plant Disease*, Vol. 72, No. 7, 636-640
55. Hu, G. J., Hong, N., Wang, L. P., Hu, H. J., & Wang, G. P. (2012). Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. *Crop Protection*, 37, 20-25.
56. Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F., & Zhou, J. (2015). Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121, 435-443.

57. Isogai, M., Aoyagi, J., Nakagawa, M., Kubodera, Y., Satoh, K., Katoh, T., ... & Yoshikawa, N. (2004). Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 70, 288-291.
58. Jakab-Ilyefalvi, Z., Pamfil, D., Clapa, D., & Fira, A. (2012). The effect of heat treatment and 'in vitro' chemotherapy mediated by 2-thiouracil on plum pox virus (ppv) content in meristem regenerated plum plants. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 17(1).
59. James, D., & Jelkmann, W. (1997, June). Detection of Cherry virus A in Canada and Germany. In XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops 472 (pp. 299-304).
60. Jarošová, J., & Kundu, J. K. (2010). Simultaneous detection of stone fruit tree viruses by one-step multiplex RT-PCR. *Scientia Horticulturae*, 125(1), 68-72.
61. Jelkmann, W. (1995). Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *Journal of General Virology*, 76(8), 2015-2024.
62. Jevremović, D., Vasiljević, B., Anđelić, T., & Vujović, T. (2023). Effect of D and V cryo-plate methods for plum pox virus eradication from two plum cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 152(3), 529-538.
63. Kassanis, B. (1952). Some effects of high temperature on the susceptibility of plants to infection with viruses. *Annals of Applied Biology*, 39(3), 358-369.
64. Keim-Konrad, R., & Jelkmann, W. (1996). Genome analysis of the 3'-terminal part of the little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite clostero-like virus. *Archives of Virology*, 141, 1437-1451.
65. Kesanakurti, P., Belton, M., Saeed, H., Rast, H., Boyes, I., & Rott, M. (2017). Comparative analysis of cherry virus A genome sequences assembled from deep sequencing data. *Archives of Virology*, 162, 2821-2828.
66. Knapp, E., Hanzer, V., Weiss H, H., da Câmara Machado, A., Weiss, B., Wang, Q., ... & Laimer da Câmara Machado, M. (1995a). New aspects of virus elimination in fruit trees. In XVI International Symposium on Fruit Tree Virus diseases 386 (pp. 409-418).
67. Knapp, E., da Câmara Machado, A., Pühringer, H., Wang, Q., Hanzer, V., Weiss, H., ... & da Câmara Machado, M. L. (1995b). Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. *Journal of Virological Methods*, 55(2), 157-173.
68. Knapp, E., Hanzer, V., Mendonca, D., da Câmara Machado, A., Katinger, H., & de Câmara Machado, M. L. (1998). Improved virus detection in rosaceous fruit trees in vitro. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 52(1-2), 3-6.
69. Komorowska, B., & Cieślińska, M. (2004). First report of Cherry virus A and Little cherry virus-1 in Poland. *Plant Disease*, 88(8), 909-909.
70. Koubouris, G. C., Maliogka, V. I., Efthimiou, K., Katis, N. I., & Vasilakakis, M. D. (2007). Elimination of Plum pox virus through in vitro thermotherapy and shoot tip culture compared to conventional heat treatment in apricot cultivar Bebecou. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 370-373.

71. Křižan, B., & OndrušikovĀ, E. (2008). Thermotherapy of apricot cultivars. In I International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: Biotechfruit2008 839 (pp. 269-274).
72. Kunkel, L. O. (1936). Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of Peach. *Phytopathology*, 26(9).
73. Kushnarenko, S., Romadanova, N., Aralbayeva, M., Zholamanova, S., Alexandrova, A., & Karpova, O. (2017). Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(4), 425-432.
74. Laimer, M. (2002). Detection and elimination of viruses and phytoplasmas from pome and stone fruit trees. *Horticultural Reviews-Westport then New York-*, 28, 187-236.
75. Lenz, F., Baumann, G., & Kornkamhaeng, P. (1983). High temperature treatment of *Prunus avium* L.“F12/1” for virus elimination. *Journal of Phytopathology*, 106(4), 373-375.
76. Lerch, B. (1987). On the inhibition of plant virus multiplication by ribavirin. *Antiviral Research*, 7(5), 257-270.
77. López-Delgado, H., Mora-Herrera, M. E., Zavaleta-Mancera, H. A., Cadena-Hinojosa, M., & Scott, I. M. (2004). Salicylic acid enhances heat tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *American Journal of Potato Research*, 81, 171-176.
78. Magyar-Tábori, K., Mendler-Drienyovszki, N., Hanász, A., Zsombik, L., & Dobránszki, J. (2021). Phytotoxicity and other adverse effects on the in vitro shoot cultures caused by virus elimination treatments: Reasons and solutions. *Plants*, 10(4), 670.
79. Mahmoud, S. Y., Hosseiny, M. H., & Abdel-Ghaffar, M. H. (2009). Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. *International Journal of Virology*, 5(2), 64-76.
80. Malavika, M., Prakash, V., & Chakraborty, S. (2023). Recovery from virus infection: plant’s armory in action. *Planta*, 257(6), 103.
81. Manganaris, G. A., Economou, A. S., Boubourakas, I. N., & Katis, N. I. (2003). Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports*, 22, 195-200.
82. Marais, A., Faure, C., Svanella-Dumas, L., & Candresse, T. (2008). First Report of Cherry virus A in *Prunus mume* in China. *Plant Disease*, 92(11), 1589-1589.
83. Marino, G., Bertazza, G., Magnanini, E., & Altan, A. D. (1993). Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34, 235-244.
84. Mathew, L., Tiffin, H., Erridge, Z., McLachlan, A., Hunter, D., & Pathirana, R. (2021). Efficiency of eradication of Raspberry bushy dwarf virus from infected raspberry (*Rubus idaeus*) by in vitro chemotherapy, thermotherapy

- and cryotherapy and their combinations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144(1), 133-141.
85. Matic, S., Myrta, A., & Minafra, A. (2007). First report of little cherry virus 1 in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89(Suppl. 3).
 86. Matic, S., Minafra, A., Sánchez-Navarro, J. A., Pallás, V., Myrta, A., & Martelli, G. P. (2009). 'Kwanzan Stunting'syndrome: Detection and molecular characterization of an Italian isolate of Little cherry virus 1. *Virus research*, 143(1), 61-67.
 87. Matic, S., Myrta, A., & Minafra, A. (2010). Detection of three closteroviruses in stone fruit trees by multiplex assays. *Journal of Plant Pathology*, 57-63.
 88. Mazeikiene, I., Kviklys, D., Siksnišienė, J. B., Zinkus, D., & Stanys, V. (2019). Influence of Ribavirin on L. Regeneration, Genome Stability and Virus Eradication. In *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences. (Vol. 73, No. 3, pp. 238-243).*
 89. McDowell, J. M., & Simon, S. A. (2006). Recent insights into R gene evolution. *Molecular Plant Pathology*, 7(5), 437-448.
 90. Mendonça, D., Kriston, E., Toth, E. K., Kirilla, Z., Balla, I., Laimer, M., & Hanzer, V. (2004). Elimination and Detection of Pathogens from Tissue Cultures of *Prunus* sp. In *V International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding* 725 (pp. 319-324).
 91. Mink, G. I. (1993). Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), 375-402.
 92. MiNoiu, N. (1975). New investigations on plum pox virus. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 11(6), 389-397.
 93. Mochizuki, T., & Ohki, S. T. (2015). Detection of plant virus in meristem by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Plant Virology Protocols: New Approaches to Detect Viruses and Host Responses*, 275-287.
 94. Moury, B., Cardin, L., Onesto, J. P., Candresse, T., & Poupet, A. (2000). Enzyme-linked immunosorbent assay testing of shoots grown in vitro and the use of immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction improve the detection of *Prunus* necrotic ringspot virus in rose. *Phytopathology*, 90(5), 522-528.
 95. Navarro, L., Llácer, G., Cambra, M., Arregui, J. M., & Juárez, J. (1982). Shoot-tip grafting in vitro for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* batsch). In *XII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases* 130 (pp. 185-192).
 96. Navarro, L., Roistacher, C. N., & Murashige, T. (1975). Improvement of Shoot-tip Grafting in vitro for Virus-free Citrus1. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 100(5), 471-479.
 97. Nemeth, M. (1979). Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees (pp. 630-pp).
 98. Olah, R., Turcsan, M., Olah, K., Farkas, E., Deak, T., Jahnke, G., & Sardy, D. A. N. (2022). Somatic Embryogenesis: A Tool for Fast and Reliable Virus and

- Viroid Elimination for Grapevine and other Plant Species. *Horticulturae*, 8(6), 508.
99. Panattoni, A., Luvisi, A., & Triolo, E. (2013). Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(1), 173-188.
 100. Paprstein, F., Sedlak, J., Polak, J., & Kumari, S. (2016). Elimination of PDV from sweet cherry cultivars by in vitro chemotherapy. In III International Symposium on Horticulture in Europe-SHE2016 1242 (pp. 31-34).
 101. Parker, W. B. (2005). Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Research*, 107(2), 165-171.
 102. Paunovic, S., Ruzic, D., Vujovic, T., Milenkovic, S., & Jevremovic, D. (2007). In vitro production of Plum pox virus-free plums by chemotherapy with ribavirin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21(4), 417-421.
 103. Pavelkova, R., Kudelkova, M., Ondrusikova, E., & Eichmeier, A. (2015). Virus elimination in peach cv. 'Red Haven' by chemotherapy.
 104. Pelah, D., Altman, A., & Czosnek, H. (1994). Tomato yellow leaf curl virus DNA in callus cultures derived from infected tomato leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 37-42.
 105. Perez-Tornero, O., Lopez, J. M., Egea, J., & Burgos, L. (2000). Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(3), 283-286.
 106. Polak, J., & Hauptmanova, A. (2009). Preliminary results of in vivo chemotherapy of plum, apricot and peach cultivars artificially infected with PPV-M and PPV-D strains of Plum pox virus. *Horticultural Science*, 36(3), 92-96.
 107. Quacquarelli, A., Gallitelli, D., Savino, V., & Piazzolla, P. (1979). The use of electric current (RACE)* for obtaining mosaic-free almonds. In XI International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases 94 (pp. 251-256).
 108. Reeves, E. L., & Cheney, P. W. (1963). Flowering cherries as symptomless hosts of little cherry virus. *Phytopathologia Mediterranea*, 184-190.
 109. Rizqi, A., Zemzami, M., & Spiegel, S. (2000). Recovery of virus-free almond plants by improved in vitro shoot-tip grafting. In XVIII International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Top Fruit Diseases 550 (pp. 447-454).
 110. Rott, M. E., & Jelkmann, W. (2001). Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with little cherry disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology*, 91(3), 261-267.
 111. Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Marais, A., Sánchez-Navarro, J. A., Pallás, V., & Candresse, T. (2017). Recent advances and prospects in *Prunus* virology. *Annals of Applied Biology*, 171(2), 125-138.
 112. Sanchez-Navarro, Aparicio, Rowhani, and Pallás, (1998). Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus in herbaceous and *Prunus* hosts. *Plant Pathology*, 47: 780-786.

113. Sanchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Herranz, M. C., Minafra, A., Myrta, A., & Pallas, V. (2005). Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 111, 77-84.
114. Scott, S. W., Zimmerman, M. T., Yilmaz, S., Zehr, E. I., & Bachman, E. (2001). The interaction between *Prunus* necrotic ringspot virus and prune dwarf virus in peach stunt disease. *Acta Horticulturae*, (550 (Vol. 1)), 229-236.
115. Sedlák, J., Přibyllová, J., Koloňuk, I., Špak, J., Lenz, O., & Semerák, M. (2023). Elimination of *Solanum nigrum* ilarvirus 1 and Apple hammerhead viroid from apple cultivars using antivirals ribavirin, rimantadine, and zidovudine. *Viruses*, 15(8), 1684.
116. Şekerz, M. G., Süzerer, V., Elibuyuk, I. O., & Çiftçi, Y. Ö. (2015). In vitro elimination of PPV from infected apricot shoot tips via chemotherapy and cryotherapy. *International Journal of Agriculture & Biology*, 17(5).
117. Shu, W., & Timon, B. (1993). Preliminary study on the methods of getting virus-free peach plantlets in vitro. In III International Peach Symposium 374 (pp. 191-194).
118. Simmons, H. E., & Munkvold, G. P. (2014). Seed transmission in the Potyviridae. *Global Perspectives on the Health of Seeds and Plant Propagation Material*, 3-15.
119. Singh, A. K., Meetei, N. T., Kundu, S., Salma, U., & Mandal, N. (2019). In vitro micrografting using three diverse indigenous rootstocks for the production of Citrus tristeza virus-free plants of Khasi mandarin. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 180-189.
120. Snir, I., & Stein, A. (1985). In vitro detection and elimination of prunus necrotic ring spot virus in sweet cherry (*Prunus avium*). *Rivista di Ortoflorofrutticoltura Italiana*, 191-194.
121. Soosaar, J. L., Burch-Smith, T. M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 789-798.
122. Spiegel, S. (2004). Problems associated with in vitro culture propagation and virus detection. In XI International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants 722 (pp. 79-82).
123. Spiegel, S., Tam, Y., Martin, R. R., & Ter Borg, M. (1994). Uneven distribution of tobacco streak virus in strawberry plantlets grown in vitro. In VII International Symposium on Small Fruit Virus Diseases 385 (pp. 122-125).
124. Spiegel S., Stein A., Tam Y. 1995. In vitro thermotherapy of rosaceous fruit trees. *Acta Hort.* 386: 419.
125. Spiegel, S., Tam, Y., Rosner, A., Brison, M., Helliot, B., Pierronnet, A., ... & de Boucaud, M. T. (1999). In vitro elimination of *Prunus* necrotic ringspot virus in a plum cultivar. In *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century: Proceedings of the IX th International Congress of the International Association of Plant Tissue Culture and Biotechnology Jerusalem, Israel, 14–19 June 1998* (pp. 545-547). Springer Netherlands.

126. Stein, A., Spiegel, S., Faingersh, G., & Levy, S. (1991). Responses of micropropagated peach cultivars to thermotherapy for the elimination of Prunus necrotic ringspot virus. *Annals of Applied Biology*, 119(2), 265-271.
127. Szabó, L. K., Desiderio, F., Kirilla, Z., Hegedűs, A., Várallyay, É., & Preininger, É. (2024). A mini-review on in vitro methods for virus elimination from Prunus sp. fruit trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 156(2), 42.
128. Szittya, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, Á., Lakatos, L., ... & Burgyán, J. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO Journal*, 22(3), 633-640.
129. Thomas, E., Ghany, M. G., & Liang, T. J. (2012). The application and mechanism of action of ribavirin in therapy of hepatitis C. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 23(1), 1-12.
130. Thomas, J. E., Smith, M. K., Kessling, A. F., & Hamill, S. D. (1995). Inconsistent transmission of banana bunchy top virus in micropropagated bananas and its implication for germplasm screening. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46(3), 663-671.
131. Turcsan, M., Demian, E., Varga, T., Jaksa-Czotter, N., Szegedi, E., Olah, R., & Varallyay, E. (2020). Hts-based monitoring of the efficiency of somatic embryogenesis and meristem cultures used for virus elimination in grapevine. *Plants*, 9(12), 1782.
132. Truniger, V., & Aranda, M. A. (2009). Chapter 4-Recessive Resistance to Plant Viruses. *Advances in Virus Research*, 75(119-159), 231
133. Veal, G. J., & Back, D. J. (1995). Metabolism of zidovudine. *General pharmacology: The Vascular System*, 26(7), 1469-1475.
134. Vescan, L. A., Pamfil, D., Zagrai, I., Ioana, V. B., Clapa, D., Ciuzan, O., & Iulia, F. (2011). In vitro techniques for Plum Pox Virus elimination from two infected Romanian plum cultivars. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 68, 1-2.
135. Vieira, R. L., da Silva, A. L., Zaffari, G. R., Steinmacher, D. A., de Freitas Fraga, H. P., & Guerra, M. P. (2015). Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-11.
136. Vitushkina, M., Fechtner, B., Agranovsky, A., & Jelkmann, W. (1997). Development of an RT-PCR for the detection of little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 803-808.
137. Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199-223.
138. Wang, Q., Liu, Y., Xie, Y., & You, M. (2006). Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY). *Potato Research*, 49, 119-129.
139. Wang, X., Kohalmi, S. E., Svircev, A., Wang, A., Sanfaçon, H., & Tian, L. (2013). Silencing of the host factor eIF (iso) 4E gene confers plum pox virus resistance in plum. *PLoS One*, 8(1), e50627.

140. Wang, M. R., Cui, Z. H., Li, J. W., Hao, X. Y., Zhao, L., & Wang, Q. C. (2018a). In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*, 14(1), 1-18.
141. Wang, M. R., Yang, W., Zhao, L., Li, J. W., Liu, K., Yu, J. W., ... & Wang, Q. C. (2018b). Cryopreservation of virus: a novel biotechnology for long-term preservation of virus in shoot tips. *Plant Methods*, 14, 1-10.
142. Wang, M. R., Bettoni, J. C., Zhang, A. L., Lu, X., Zhang, D., & Wang, Q. C. (2022a). In vitro micrografting of horticultural plants: Method development and the use for micropropagation. *Horticulturae*, 8(7), 576.
143. Wang, M. R., Bi, W. L., Bettoni, J. C., Zhang, D., Volk, G. M., & Wang, Q. C. (2022b). Shoot tip cryotherapy for plant pathogen eradication. *Plant Pathology*, 71(6), 1241-1254.
144. Wani, S., Shah, M. D., Padder, B. A., Nabi, S. U., Hamid, A., Mir, M. M., & Ara, S. (2024). Occurrence of Cherry Virus A (CVA) infecting stone fruits in Kashmir province of Northwestern Himalayan Region of India. *Indian Phytopathology*, 1-7.
145. Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., & Dunez, J. (1991). A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33(3), 355-365.
146. Wu, H., Qu, X., Dong, Z., Luo, L., Shao, C., Forner, J., ... & Zhao, Z. (2020). WUSCHEL triggers innate antiviral immunity in plant stem cells. *Science*, 370(6513), 227-231.
147. Zare Khafri, A., jakab, R., Naderpour, M., Ahmadi, B., & Mirzaei, L. (2024). Assessment of virus eradication methods from infected in vitro-grown apricot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 156(2), 1-13.
148. Zarghami, R., & Ahmadi, B. (2023). Production of Plum Pox Virus-Free and Prunus Necrotic Ringspot Virus-Free Regenerants Using Thermotherapy and Meristem-Tip Culture in *Prunus persica* L. *Erwerbs-Obstbau*, 65(4), 719-727.
149. Zhao, L., Wang, M. R., Cui, Z. H., Chen, L., Volk, G. M., & Wang, Q. C. (2018). Combining thermotherapy with cryotherapy for efficient eradication of Apple stem grooving virus from infected in-vitro-cultured apple shoots. *Plant Disease*, 102(8), 1574-1580.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Lakatos Tamásnak, aki a PhD munkám megkezdésekor a NAIK Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet Intézetigazgatójaként lehetővé tette a PhD kutatásaim elvégzését az intézetben.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, dr. Preininger Évának és dr. Hegedűs Attilának a doktori munkám során nyújtott szakmai vezetésükért, tanácsaikért, biztatásukért.

Külön köszönet dr. Várallyay Évának, aki az egész doktori munkát végig kísérte, szakmai tudásával és a laboratóriumával való együttműködés lehetőségével a vírusdiagnosztikai munkákban nyújtott nagy segítséget.

Köszönettel tartozom a MATE KERTI Mikroszaporító Laboratórium és a MATE Növényvédelmi Intézet Genomikai Kutatócsoport dolgozóinak sok munkáját, amik nélkülözhetetlenek voltak a kísérleteim elvégzéséhez.

Hálás vagyok a férjemnek, aki mindig támogatott és hasznos szakmai tanácsokkal és növényfotózással is hozzájárult a dolgozat elkészítéséhez.

Végül, de mindenek felett köszönöm a Jóistennek, hogy mindig adott újabb erőt és lendületet, hogy végig tudjam csinálni.