



Hagymás és gumós dísznövények Potyvírus fertőzöttségének
felmérése

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Ágoston János
Gödöllő
2021

A doktori iskola

megnevezése:	Kertészettudományi Doktori Iskola
tudományága:	Növénytermesztési és kertészeti tudományok
vezetője:	Zámboriné Dr. Németh Éva, egyetemi tanár, MTA Doktora Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Kertészettudományi Intézet, Gyógy- és Aromanövények Tanszék
Témavezető:	Dr. Palkovics László egyetemi tanár, MTA doktora Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék

A jelölt a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1 A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A hagymás dísznövényeket a légyszárú évelő növények között tárgyalja a szakirodalom. Ezek a növények rendkívül értékes vágott virágot szolgáltatnak, valamint tavasszal hajtattott cserepes szobanövényként kerülnek értékesítésre. Kertépítészeti szempontból pedig parkokban és köztéri kiültetésekben, virágtartókban találkozhatunk velük.

Ezeket a növényeket szabadföldi körülmények között monokultúrában nevelik több éven át, és szinte kizárólag vegetatív úton szaporítják őket, mely kedvez a növényi kórokozók – különösen a vírusok – felszaporodásának.

A növényeket nyugalmi állapotban szállítják, ezért a vírusokra jellemző mozaik, levél- és virágtüneteket csak néhány hónap elteltével lehet megfigyelni, amikor a vektorok már elterjeszthetik a környező haszonnövényeken, vagy gyomokon a kórokozókat. A másik fontos szempont, hogy bizonyos vírusok látenszen vannak jelen a hagymás növényekben, így még nagyobb veszélyt jelentenek, egy esetlegesen új kórokozó behurcolásában.

A Potyvírus nemzetség tagjai a mezőgazdasági termelés minden ágában jelentős károkat okoznak. Az elmúlt években pedig világszerte újabb és újabb fajok kerültek leírásra az új generációs szekvenálási technológiáknak köszönhetően. Dolgozatomban szeretném feltérképezni a magyarországi hagymás növények potyvírus fertőzöttségét, kutatásom témái a következők:

1. Tulipán fajták fertőzöttségének felmérése az ország több pontján kerti és köztéri kiültetésekben. Színtörést okozó vírusfajok azonosítása, a vírus fajok országos eloszlásának és fajtapreferenciájának vizsgálata. Az azonosított izolátumok molekuláris jellemzése, filogenetikai és taxonómiai helyzetének vizsgálata, rekombinációs események keresése, valamint a vírustünetek megfigyelése Darwin-hybrid 'van Eijk' tulipánfajtán. Egyes természetes úton fertőződött növények tüneteinek végig követése a tenyésztésidőszakban.
2. Vágott virág előállítás céljából ültetett színes kálák vírusfertőzöttségének felmérése. A kórokozó izolálása, molekuláris és taxonómiai jellemzése. A fertőzött növények esetében a tünetek végig követése a tenyésztésidőszakban.
3. Hajtattott cserepes nárciszok vírusfertőzöttségének felmérése. A kórokozók izolálása, molekuláris és taxonómiai jellemzése. Egyes fertőzött növények esetében a tünetek végig követése a tenyésztésidőszakban.
4. Gyöngyike szaporítóanyag előállító ültetvény vírusfertőzöttségének felmérése. A kórokozók izolálása, molekuláris és taxonómiai jellemzése. A fertőzött növények esetében a tünetek végig követése a tenyésztésidőszakban.

5. Egyéb hagymás dísznövények vírusfertőzöttségének felmérése. A kórokozók izolálása, molekuláris és taxonómiai jellemzése. Egyes fertőzött növények esetében a tünetek végig követése a tenyészidőszakban.

2 ANYAG ÉS MÓDSZER

A mintavételeket 2014-ben Hollandiában, valamint 2017-2018-ban Magyarországon végeztem munkatársaimmal. A *Sternbergia lutea* (648), *Tulipa* Fringed 'Lambada' (704) és *Tulipa* Fringed 'Crystal Beauty' (705) minták a Budai Arborétumból kerültek begyűjtésre. Minden minta tünetes levélből származott, 1-5 g tömegű volt. A mintavétel után a minta hűtve, vagy fagyasztva (-20 °C) került beszállításra a laboratóriumba, ahol -70 °C-on tároltuk további felhasználásig.

A megszedett mintákat először szerológiai vizsgálatoknak vettem alá. A pozitív mintákat tovább vizsgáltam molekuláris módszerekkel, ezzel párhuzamosan laboratóriumi tesztnövényeket fertőztem, illetve próbáltam végig vinni a Koch posztulátumokat. Egyes minták esetében nukleinsav hibridizációt, vagy elektronmikroszkópos vizsgálatot is végeztünk, végül nukleotid sorrend- és filogenetikai elemzést végeztem, majd rekombinációkat kerestem.

A laboratóriumi tesztnövényeket, valamint a Koch posztulátumokhoz az egészséges növények fertőzését HORVÁTH és GÁBORJÁNYI módszere (1999) alapján végeztük. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat VÁGI PÁL végezte HORVÁTH és GÁBORJÁNYI módszere (1999) alapján. A rekombinációs események vizsgálatához az RDP program 4.97 verzióját használtam (MARTIN és mtsai., 2015, 2017).

2.1.1 Szerológiai vizsgálat

A potyvírus specifikus ELISA kit-et – amely MAb PTY1 monoklonális detektáló antitesten alapul (JORDAN és HAMMOND, 1991) – az Agdia-tól vásároltuk. Az elsődleges antitest egérben előállított anti-PTY1 (potyvírus köpenyfehérje klón) IgG, míg a másodlagos antitest az alkalikus foszfatáz enzimmel (AP) konjugált nyúlból származó egér IgG-t felismerő poliklonális antitest. A pozitív kontrollt az előállító cég biztosította (burgonya Y vírus), a negatív kontroll vektormentes üvegházban nevelt *Chenopodium amaranticolor* magonc növényből származott. A mintákat két ismétlésben vizsgáltam, a gyártó utasításai szerint eljárva. Mindkét antitest 1:100 történő hígításban került felhasználásra. Az abszorbancia értékeket Labsystems Multiskan MS spektrofotométeren detektáltam 405 nm-en az 1 mg/ml 4-nitro-fenil-foszfátot (PNPP) tartalmazó szubsztrát oldat hozzáadása után 15, 30 és 60 perc inkubációs idő elteltével. Az abszorbancia értékeket a csak puffert tartalmazó (blank) minta OD értékével korrigáltam. Pozitív eredménynek a negatív kontrollok OD értékének háromszorosát, illetve az azt meghaladó értéket tekintettem.

2.1.2 Molekuláris azonosítás, össz-nukleinsav kivonás, RT-PCR

Az össz-nukleinsav kivonást WHITE és KAPER módszere alapján végeztem (1989). A kapott nukleinsavakat $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam további felhasználásig.

A cDNS szintézis $10\text{ }\mu\text{l}$ végtérfogaton történt. Első lépésként $2\text{ }\mu\text{l}$ össz-nukleinsavat mértem ki, majd $2\text{ }\mu\text{l}$ steril nukleáz mentes H_2O -t adtam hozzá, végül $1\text{ }\mu\text{l}$ 100 mM poly T_2 reverz primert (5'-CGGGGATCCTCGAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') mértem az oldatba (SALAMON és PALKOVICS, 2005). A keveréket 5 percig $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam, majd 2 percre jégre állítottam. Ez után a következő vegyszereket mértem hozzá: $1\text{ }\mu\text{l}$ 10 mM dNTPs, $1\text{ }\mu\text{l}$ nukleáz mentes steril H_2O , $2\text{ }\mu\text{l}$ $5\times$ RT puffer (250 mM Tris-HCl ($\text{pH } 8,3$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on), 250 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 50 mM DTT) (Thermo Scientific), $0,5\text{ }\mu\text{l}$ RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific), $0,5\text{ }\mu\text{l}$ RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), majd 1 órán át $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam, végül 2 percre jégre helyeztem, hogy a szintézis megálljon. A cDNS-t $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam felhasználásig.

A PCR reakció $50\text{ }\mu\text{l}$ végtérfogaton folyt a következő összetevőkkel: $2\text{ }\mu\text{l}$ cDNS, $5\text{ }\mu\text{l}$ $10\times$ Taq puffer + KCl (100 mM Tris-HCl ($\text{pH } 8,8$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on), 500 mM KCl, $0,8\%$ (v/v) Nonidet P40) (Thermo Scientific), $3\text{ }\mu\text{l}$ 25 mM MgCl_2 , $2\text{ }\mu\text{l}$ 10 mM dNTPs, $1\text{ }\mu\text{l}$ poty7941 forward primer (5'-GGAATTCCC GCGGNAAYAAAYAGYGGNCARCC-3') (SALAMON és PALKOVICS, 2005), $1\text{ }\mu\text{l}$ poly T_2 reverz primer, $1\text{ }\mu\text{l}$ Taq DNA Polymerase (rekombináns) (Thermo Scientific), és $35\text{ }\mu\text{l}$ steril nukleáz mentes H_2O .

A PCR program 3 perc $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os denaturálással kezdődött, majd a ciklus 30 másodperc $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os denaturálással folytatódott, amit 30 másodperc $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os anelláció követett, végül 2 perc $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os polimerizációval folytatódott. A ciklus $40\times$ ismétlődött, amit végül 10 perces $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os végső polimerizáció követett, majd $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtéssel zárult.

A keletkezett specifikus PCR terméket etídium-bromidos 1% -os TBE agaróz gélen tettem láthatóvá.

A fenti primerpár a potyvírus nemzetség tagjainál az RNS függő RNS polimerázának (RdRp, NIb) C-terminális végéből az ultra-konzervatív GNNSGQP motívumtól kezdődően a teljes köpenyfehérje régiót, a teljes 3' nem transzlálódó régiót (3'UTR), valamint a polyA vég első néhány bázisát szaporította fel. Vírusfajtól függően $1400\text{-}1800\text{ bp}$ közötti PCR termék keletkezett. A specifikus PCR terméket a gélből kivágtam, majd High Pure PCR Product Purification Kit-tel (Roche) tisztítottam ki a gyártó utasításait követve.

A molekuláris azonosításnál pozitív kontrollként a burgonya Y vírus O törzsét használtam (BASKY és ALMÁSI, 2005), melyet cecei típusú paprikán (*Capsicum annuum* 'Cecei') tartottunk fenn.

2.1.3 Nukleinsav hibridizáció

Az ún. "dot-blot" hibridizációt NEMES KATALIN az Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézetének Virologiai Laboratóriumában végezte. Teljes nukleinsav kivonásból 100 ng-ot (5 µl) 5 µl denaturáló pufferrel összekevertünk (5 µl formamid, 1 µl 200 mM HEPES, 1 µl 10 mM EDTA, 1,64 µl 35% formaldehid, 0,36 µl H₂O, 1 µl 10× FDE festék), majd 5 percig 65 °C-on denaturáltuk, utána pedig jégre helyeztük. A denaturált mintákat közvetlenül Whatman Nytran N blotting membránra csöpögtettük és beszárítottuk, majd UV fényel keresztkötöttük a membránra. A hibridizációt Northern hibridizációval megegyező módon végeztük (SAMBROOK és RUSSELL, 2001). Próbának és a pozitív kontrollnak a nárcisz késői sárgulás vírusból és lovagcsillag mozaik vírusból származó tisztított PCR termékeket használtuk. A tisztított PCR termékeket Random Primed DNA Labelling Kit (Roche) felhasználásával Digoxigenin-11-dUTP jelenlétében jelöltük a gyártó utasításainak megfelelően. A próba hibridizálása után a membránt mostuk, majd előkészítettük a detektálást. A detektálást Anti-DIG-AP detektáló antitesttel végeztük – juhban előállított alkalikus foszfatázzal jelölt Anti-Digoxigenin IgG – 150 mU/ml detektáló antitest, 100 mM almasav, 150 mM NaCl (pH 7,5) jelenlétében. Az abszorbancia értékeket iBright CL 1000 géppel detektáltuk 405 nm-en az 1 mg/ml 4-nitro-fenil-foszfátot (PNPP) tartalmazó szubsztrát oldat hozzáadása után 15 perc inkubációs idő elteltével.

2.1.4 Ligálás, transzformálás, nukleotid sorrend meghatározás

A tisztított PCR termékek ligálása 10 µl végtérfogaton történt. A keverék a következő összetevőkből állt: 3 µl tisztított PCR termék, 1 µl 10× T4 DNA Ligase puffer (300 mM Tris-HCL (pH 7,8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) (Promega), 0,2 µl pGEM®-T Easy vektor (Promega), 1 µl T4 DNA Ligase (Promega), 4,8 µl nukleáz mentes steril H₂O. A ligálás 4 °C-on, overnight történt.

Másnap reggel 100 µl *Escherichia coli* DH5α (SAMBROOK és RUSSELL, 2001) sejtet 10 percre jégre tettem, hogy kiolvadjon. A teljes ligátumot hozzámértem a kompetens sejtekhez és további 20 percen át jégen tartottam, majd 1 percre 42 °C-on inkubáltam, és 5 percig ismét jégen tartottam. Ez után 400 µl LURIA-BERTANI (LB) táplevest (ATLAS, 2010) mértem hozzá, és 1 órán át 37 °C-on rázatva inkubáltam. 150 µl baktérium szuszpenziót szélesztettem ampicillines (100 mg/l) LB lemezre (1000 ml LB tápleves + 20 g/l bakteriológiai agar) kiegészítve 10 µl IPTG-vel (100 mM/ml), 40 µl X-Gal-al (20 mg/ml). A kolóniákat overnight 37 °C-on növesztettem, majd 1 órára 4 °C-ra helyeztem a kék-fehér szelekció előtt. A fehér kolóniákat 3-5 ml ampicillines (100 mg/l) LB táplevesbe oltottam le, majd overnight 37 °C-on rázattam. A plazmidokat GeneJET Plasmid miniprep kit-tel nyertem ki (Thermo Scientific). Az inzertek nukleotid sorrendjének meghatározását szolgáltató cégek végezték SANGER módszere alapján (SANGER és COULSON,

1975; WALKER és LORSCH, 2013). A nukleotid sorrend meghatározáshoz kezdetben az M13 primereket használtam M13-for (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'), M13-rev (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'), de később áttértem az általam tervezett sqGMTZ-for (5'-GGGCGAATTGGGCCCCGACG-3') és sqGMTZ-rev (5'-CCAACGCGTTGGGAGCTCTCCC-3') primerekre, melyek 75-77 bázissal közelebb helyezkednek el a vektor klónozó helyéhez (Multiple Cloning Site, MCS), így a kromatogramok illesztése jobb volt.

2.1.5 Nukleotid sorrend elemzés

A szolgáltatóktól megkapott kromatogramok nukleotid sorrendjét az NCBI GenBank megaBLAST (MORGULIS és mtsai., 2008) programjával vizsgáltam, a fajmeghatározás végett (ADAMS és mtsai., 2005; WYLIE és mtsai., 2017). Minden vírusfaj esetében – ami az adatbázisban szerepelt – egy referencia szekvencia került kiválasztásra. Ha nem volt 76%-nál nagyobb nukleotid sorrend egyezés az adatbázisban található szekvenciákkal, akkor a kromatogramokat a CLC Sequence Viewer 8.0 verziójába töltöttem be és a „less accurate” opcióval hasonlítottam össze. Ez után a keletkezett összehasonlítás konszenzus szekvenciája lett a referencia. A kromatogramok ez után a megfelelően homológ referenciához lettek illesztve az Unipro Ugene v1.30 (OKONECHNIKOV és mtsai., 2012) programmal. A “trimming quality threshold” 0, a “mapping minimum similarity” 50%-nak állítottam be. Minden egyes illesztést ellenőriztem, a bizonytalan bázisok a kromatogram peak-jei alapján kézzel kijavítottam, a kromatogramok javított konszenzus szekvenciáit GenBank fájlformátumba mentettem el. A szekvenciák annotációja, a kódoló régió, a poliprotein hasító helyek bejelölése, valamint a primerek adapter régióinak (5'-GGAATTCCCG-3' poly7941 esetében, és 5'-CGGGGATCCTCGAGAAGC-3' poly T₂ esetében) eltávolítása után a teljes köpenyfehérje régiót ismételtelen ellenőriztem az adatbázisban megaBLAST programmal. A keletkezett és ellenőrzött nukleotid sorrendek feltöltésre kerültek az adatbázisba.

2.1.6 Filogenetikai elemzés

Filogenetikai elemzéshez minden esetben a MEGA X programcsomagot használtam (KUMAR és mtsai., 2018).

Először ClustalW módszerrel (LARKIN és mtsai., 2007; THOMPSON és mtsai., 1994) összehasonlítást végeztem gazdanövényenként azokkal az adatbázisban szereplő vírusokkal, melyek legnagyobb nukleotid sorrend azonosságot mutattak az általam izolált vírusok teljes köpenyfehérje régiójával. Az összehasonlításnál a program alapbeállításait használtam, egy kivétellel, a súlyozási mátrixnál a ClustalW 1.6 verzióját választottam ki.

Az összehasonlítás után megkerestem a programmal a legjobban illeszkedő DNS nukleotid helyettesítési modellt. Legjobban illeszkedő modellként a legkisebb korrigált Akaike Information Criterion (AICc) értékű modellt választottam ki (NEI és KUMAR, 2000) majd ezzel a

modellel Maximum Likelihood (ML) filogenetikai törzsfát építettem (FELSENSTEIN, 1981; GUINDON és GASCUEL, 2003). A törzsfá megbízhatóságát Bootstrap módszerrel ellenőriztem (FELSENSTEIN, 1985) 1000×-es ismétlésben. Outgroup-nak minden esetben a dohány karcolatós vírust (*Tobacco etch virus*, RefSeq: NC_001555) választottam, a törzsfákat ehhez az izolátumhoz „root”-oltam.

3 EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Szerológiai vizsgálat esetében minden vizsgált minta pozitív lett. A laboratóriumi tesztnövényeken a 6 hetes megfigyelési időszak alatt nem láttunk tüneteket.

A kórokozók molekuláris azonosítása során a megvizsgált 40 mintából 7 ismert, és 1 ismeretlen potyvírus, összesen 42 izolátumát sikerült azonosítanunk. Mintánként csak 1 potyvírus fajt tudtunk azonosítani, viszont előfordult, hogy több variáns is megtalálható volt egy növényben, ami megerősíti, hogy a vírusok kvázi fajok (DOMINGO és mtsai., 2008):

- Tulipán: liliom foltosság vírus (13), Rembrandt tulipán színtörés vírus (4), tulipán színtörés vírus (16)
- Nárcisz: lovagsillag mozaik vírus (2), nárcisz késői sárgulás vírus (2)
- Kála: leopárd kontyvirág mozaik vírus (1)
- Gyöngyike: gyöngyike mozaik vírus (1), ismeretlen potyvírus, melyet gyöngyike klorotikus foltosság vírusnak (2) nevezünk el
- Vetővirág: nárcisz késői sárgulás vírus (1).

A vírus neve után zárójelben az azonosított izolátumok száma került feltüntetésre.

3.1 Tulipán (*Tulipa*)

Kísérő tünetek tekintetében eredményeim jelentős mértékben megegyeztek az irodalmi adatokkal (DE BEST és mtsai., 2000; BLOEMBOLLENKEURINGSDIENST (BKD), 2010, 2019; NÉMETHY, 1990, 1994a, 1994b). Rembrandt tulipán színtörés vírus esetén az 'Absalon' fajta levélfonákán hajszál vékonyságú 1-2 mm hosszú lila vonalas mintázottság volt megfigyelhető, míg az 'Insulinde' fajta esetében a csíkos lilásbordó mozaik nem csak a levél fonáki, hanem színi részén is jelentkezett, ugyanez a lila csíkozottság volt megfigyelhető a virágszáron is a virágzás ideje alatt. A vírus fajta és a fajtákon megfigyelt tünetek között nem volt összefüggés. Egy azon tulipánfajtan azonos vírussal való fertőződés esetén is változatos tünetek jelentkeztek, valamint különböző vírussal azonos fajtan okoztak azonos tüneteket is.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok megerősítik a szerológiai vizsgálatok eredményeit. A 36/3 (liliom foltosság vírus) és A1 (tulipán színtörés vírus) minták esetében a potyvírusokra

jellemző, körülbelül 780 nm hosszú és 14 nm átmérőjű fonál alakú flexibilis vírus partikulumokat azonosítottunk.

Molekuláris vizsgálataim alapján három vírushajt sikerült azonosítanom –tulipán színtörés vírus (TBV), Rembrandt tulipán színtörés vírus (ReTBV), liliom foltosság vírus (LMoV) – ezek közül két faj (tulipán színtörés vírus, liliom foltosság vírus) széleskörűen elterjedt az országban. A populáció vizsgálatok alapján megállapítottam, hogy tulipán színtörés vírus és liliom foltosság vírus egy populáción belül azonos mértékben van jelen, és nincs fajta preferenciájuk. A vírusok országos eloszlása véletlenszerű, gyakoriságuk azonos.

A Koch posztulátumokat végrehajtva eredményeim az irodalmi adatokkal ellentétben állnak (DE BEST és mtsai., 2000; KRABBENDAM és BAARDSE, 1966), a Darwin-hybrid 'van Eijk' fajta fogékony tulipán színtörés vírusra, de nagyon enyhe színtöréses tünetek jelentkeznek a növényeken. Rembrandt tulipán színtörés vírus esetén is sikeres volt a fertőzés, ekkor is enyhe tünetek jelentkeztek, így vizsgálataim alapján elmondható, hogy a Darwin-hybrid tulipánok is fogékonyak a Rembrandt tulipán színtörés vírusra, nem csak a Rembrandt fajtacsoport. Továbbá a vizsgált fajtát sikerült egyszerre megfertőzni mind három vírushajjal, így bizonyítottam, hogy komplex vírushajt is lehetséges.

A filogenetikai elemzések során, mind a törzsfán, mind pedig a törzshálón a három vírushajt jól elkülönült, melyet a magas Bootstrap értékek is igazoltak. Továbbá látható, hogy mindhárom faj egy közös ősrre vezethető vissza. A köpenyfehérjét kódoló régió nukleotid sorrend azonossága is minden faj esetében 76% feletti, így eredményeim alapján a Rembrandt tulipán színtörés vírus faj szintre emelhető.

Vizsgálataim RIVAS és munkatársainak eredményeit támasztják alá (2016), a liliom foltosság vírus esetében, ahol két alcsoportot (I. és II.) sikerült azonosítani, az izolátumok filogenetikai helyzete megegyezik a korábbi eredményekkel.

Rekombinációs vizsgálataim alapján két rekombináns izolátumot sikerült azonosítani liliom foltosság vírusban (JN127341, AJ310203), amelyek közül a JN127341 törzshajt két rekombinációs esemény is történt. Tulipán színtörés vírus esetében három rekombináns izolátumot azonosítottam (X63630, KF442403, KT923168). Mindkét vírus esetében volt olyan rekombináns izolátum, melynek az egyik szülője szintén rekombináns volt. Minden rekombinációs eseményt legalább 3 különböző statisztikai módszerrel vizsgáltam, melyek egyenként is szignifikáns eredményt adtak.

3.2 Nárcisz (*Narcissus*)

Nárcisz esetében két vírushajt azonosítottam (lovagcsillag mozaik vírus és nárcisz késői sárgulás vírus). A lovagcsillag mozaik vírus esetében a nárcisz, mint új gazdanövény került

leírásra. A kísérő tünetek ugyan megegyeztek az irodalmi adatokkal (HANKS és CHASTAGNER, 2018), de ezek a tünetek nem fajspecifikusak, más vírusfajok (*Narcissus mosaic virus*, *Narcissus latent virus*) is képesek ilyen tüneteket okozni, így vizuálisan nem lehetséges a tüneteket okozó vírusfajok identifikálása.

A hibridizációs vizsgálat során a nárcisz késői sárgulás vírus esetében csak a 660 és 661 kódszámú minták adtak pozitív eredményt, a lovagesillag mozaik vírus esetében pedig csak a 644 számú minta adott pozitív eredményt.

Filogenetikai elemzés alapján mind a két vírusfaj külön kládot alkot a törzsfán, melyet magas Bootstrap értékek támasztanak alá.

3.3 Kála (*Zantedeschia*)

A beteg növények az egészségesekhez képest látványos tüneteket mutattak. A növények levelei sárgás, illetve világos zöld színű, hosszanti mozaikkal tarkított, a fehér foltok nem vagy alig vehetők észre, a levél formája keskeny, dárdás, a csúcs hosszan kinyúló. A spátha a torzsa hosszával megegyező, vagy annál sokkal rövidebb, kívül lilás és zöld csíkozottságot mutat, széle hasadt, nem nyílik szét, hanem a torzsára borul. A növény jellemzően törpül, a levelek száma az egészségesnél kevesebb. Az idő előrehaladtával a tünetek maszkírozódnak, ám a levelek széle sárga, klorotikus marad. A beteg növény egy, legfeljebb kettő értéktelen torzsavirágzatot fejleszt.

Filogenetikai vizsgálataim kimutatták – mind a köpenyfehérje gén nukleotid- és aminosav sorrendjének összehasonlítása alapján – hogy a növény leopárd kontyvirág mozaik vírussal fertőzött, legközelebbi rokonságban egy Új-Zélandi (EU544542) szintén káláról származó izolátummal áll.

3.4 Gyöngyike (*Muscari*)

A kísérő tünetek tekintetében eredményeim eltérnek a litván kutatók megfigyeléseitől (NAVALINSKIENĖ és SAMUITIENĖ, 2001), ugyanis nekrózist nem figyeltem meg a növényeken. Ugyanakkor zöldes hosszanti mozaik, valamint a növények leveleinek sárgulása szembetűnő volt. Molekuláris vizsgálataim alapján a gyöngyike mintákat két vírus fertőzte meg, a gyöngyike mozaik vírus (*Muscari mosaic virus*) – amit az ICTV 9. jelentésében feltételesen fogadtak be a *Potyvirus* nemzetségbe – valamint a gyöngyike klorotikus foltosság vírus (*Muscari chlorotic mosaic virus*), mely a tudomány számára új fajként került leírásra.

Filogenetikai vizsgálataim alapján a két vírusfaj külön-külön kládot alkot a törzsfán, – melyet magas Bootstrap értékek támasztanak alá – valamint jól elkülönül más, a köpenyfehérjét kódoló régió bizonyos szakaszaiban magas homológiát mutató vírusoktól.

A magas homológiát mutató vírusfajok és az általam azonosított két vírus köpenyfehérjét kódoló rész páronkénti nukleotid sorrend azonossága, a szerológiai és filogenetikai eredmények alapján javaslom a gyöngyike mozaik vírus és gyöngyike klorotikus foltosság vírus faj szintre emelését.

3.5 Vetővirág (*Sternbergia*)

A beteg vetővirág növények erős kísérő tüneteket mutattak. A növények levelén hosszanti sárgászöld csíkozottság figyelhető meg a levél teljes hosszában, mely tavasszal erősebb, ősszel maszkírozódott. A növény fejlődése az egészségestől elmarad, a virágzás gyér volt, vagy a növény nem virágzott. A visszahúzódas az egészségeshez képest 10-14 nappal korábbra – május közepére – tolódott.

Molekuláris eredményeim alapján a nárcisz késői sárgulás vírus okozta a tüneteket.

További vizsgálataim alapján a vetővirágról származó izolátum filogenetikailag legközelebb a kecskeméti 'Dutch Master' nárciszról származó izolátummal (MK132194), valamint két Japánból származó izolátummal (LC158450, LC158451) mutatott közeli rokonságot. Eredményeim alapján a vetővirág a nárcisz késői sárgulás vírus új gazdanövényeként került leírásra.

4 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Először bizonyítottam, hogy a lovagsillag mozaik vírus (*Hippeastrum mosaic virus*), a gyöngyike mozaik vírus (*Muscari mosaic virus*), a gyöngyike klorotikus foltosság vírus (*Muscari chlorotic mottle virus*) és a Rembrandt tulipán színtörés vírus (*Rembrandt tulip-breaking virus*), kimutatható MAb PTY1 antitest alapú csoport specifikus ELISA kit-tel.
2. Magyarországról elsőként azonosítottam a következő potyvírus fajokat: lovagsillag mozaik vírus (*Hippeastrum mosaic virus*), leopárd kontyvirág mozaik vírus (*Konjac mosaic virus*), gyöngyike mozaik vírus (*Muscari mosaic virus*), gyöngyike klorotikus foltosság vírus (*Muscari chlorotic mottle virus*), nárcisz késői sárgulás vírus (*Narcissus late season yellows virus*), Rembrandt tulipán színtörés vírus (*Rembrandt tulip-breaking virus*).
3. Azonosítottam Magyarországról szerológiai és molekuláris módszerekkel a gyöngyike mozaik vírust (*Muscari mosaic virus*), majd jelenlétét bizonyítottam a Koch posztulátumok felhasználásával.

4. A tudomány számára új vírusfajt írtam le a gyöngyike klorotikus foltosság vírus – *Muscari chlorotic mottle virus* – szerológiai és molekuláris módszerekkel, valamint bizonyítottam a Koch posztulátumok felhasználásával.
5. Nárciszról, mint új gazdanövény fajról azonosítottam a lovagsillag mozaik vírus (*Hippeastrum mosaic virus*).
6. A vetővirágról, mint új gazdanövény fajról azonosítottam a nárcisz késői sárgulás vírus (*Narcissus late season yellows virus*).
7. Elsőként számoltam be a tulipán liliom foltosság vírus (*Lily mottle virus*) fertőzöttségéről Magyarországon.
8. Megállapítottam, hogy tulipán esetében sem a liliom foltosság vírusnak (*Lily mottle virus*) sem pedig a tulipán színtörés vírusnak (*Tulip breaking virus*) nincs fajta, vagy fajtacsoport preferenciája, a vírusok egyazon tulipán populációban azonos gyakorisággal fordulnak elő Magyarországon.
9. Elsőként számoltam be tulipán színtörés vírus (*Tulip breaking virus*) esetében a fajon belüli rekombinációról, valamint liliom foltosság vírus (*Lily mottle virus*) esetében többszörös rekombinációt tártam fel.
10. Rembrandt tulipán színtörés vírus (Rembrandt tulip-breaking virus) esetében javasolom két filogenetikai alcsoport létrehozását, liliom foltosság vírus (*Lily mottle virus*) esetében pedig megerősítettem a két filogenetikai alcsoport létezését (RIVAS és mtsai., 2016).

5 IDÉZETT IRODALMAK

1. ADAMS, M. J., ANTONIW, J. F., FAUQUET, C. M. (2005): Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology* 150, 459–479. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0440-6>
2. ATLAS, R. M. (2010): Handbook of microbiological media, 4. kiad. ASM Press ; CRC Press/Taylor & Francis, Washington, D.C. : Boca Raton, FL.
3. BASKY, Z., ALMÁSI, A. (2005): Differences in aphid transmissibility and translocation between PVY-N and PVY-O isolates. *Journal of Pest Science* 78, 67–75. <https://doi.org/10.1007/s10340-004-0070-5>
4. DE BEST, A. L. I. C., ZWART, M. J., VAN AARTRIJK, J., VAN DEN ENDE, J. E., PEETERS, J. M. M. (2000): Ziekten en afwijkingen bij bolgewassen: *Liliaceae*. Laboratorium voor Bloembollenonderzoek, Lisse.
5. BLOEMBOLLENKEURINGSDIENST (BKD) (2010): Informatie TBV. *BKD - Bloembollenkeuringsdienst*. <https://www.bkd.eu/wp-content/uploads/2019/04/tbv-beelden-tulp.pdf> elérés: 2020.1.5.

6. BLOEMBOLLENKEURINGSDIENST (BKD) (2019): TBV beelden in nabloei - BKD. *BKD - Bloembollenkeuringsdienst*. <http://www.bkd.eu/gewassen/tulp/tbv-beelden-nabloei> elérés: 2019.5.3.
7. DOMINGO, E., PARISH, C. R., HOLLAND, J. J. (Szerk.) (2008): Origin and Evolution of Viruses, 2. kiad. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374153-0.X0001-X>
8. FELSENSTEIN, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17, 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
9. FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
10. GUINDON, S., GASCUEL, O. (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology* 52, 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
11. HANKS, G. R., CHASTAGNER, G. A. (2018): Diseases of Daffodil (Narcissus), In: MCGOVERN, R. J., ELMER, W. H. (Szerk.) *Handbook of Florists' Crops Diseases*. Springer International Publishing, Cham, 1129–1228 p. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5_43
12. HORVÁTH, J., GÁBORJÁNYI, R. (1999): Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
13. JORDAN, R., HAMMOND, J. (1991): Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* 72, 25–36. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-1-25>
14. KRABBENDAM, P., BAARDSE, A. A. (1966): Bloembollenteelt / 2, De tulp., 15. kiad., Leidraad voor het land- en tuinbouwonderwijs. 36. Serie B ; Tjeenk Willink, Zwolle.
15. KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
16. LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., HIGGINS, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
17. MARTIN, D. P., MURRELL, B., GOLDEN, M., KHOOSAL, A., MUHIRE, B. (2015): RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1. <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>
18. MARTIN, D. P., MURRELL, B., KHOOSAL, A., MUHIRE, B. (2017): Detecting and analyzing genetic recombination Using RDP4, In: KEITH, J. M. (Szerk.) *Bioinformatics*. Springer New York, New York, NY, 433–460 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_17
19. MORGULIS, A., COULOURIS, G., RAYTSELIS, Y., MADDEN, T. L., AGARWALA, R., SCHÄFFER, A. A. (2008): Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24, 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>

20. NAVALINSKIENÉ, M., SAMUITIENÉ, M. (2001): Viruses affecting some bulb and corm flower crops. *Biologija* 40–42.
21. NEL, M., KUMAR, S. (2000): Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, Oxford ; New York.
22. NÉMETHY, ZS. (1990): A tulipán színtörés vírus (tulip breaking virus) előfordulása és tünetei tulipánon, In: *Lippay János Tudományos Ülésszak*. Előadás Lippay János Tudományos Ülésszak, Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Budapest, Hungary, 197 p.
23. NÉMETHY, ZS. (1994a): Survey on virus diseases of bulbous flowers in Hungary. *Acta Horticulturae* 377, 267–274. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.377.45>
24. NÉMETHY, ZS. (1994b): Vírusos tulipánok. *Kertészet és Szőlészet* 49, 5–6.
25. OKONECHNIKOV, K., GOLOSOVA, O., FURSOV, M. (2012): Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
26. RIVAS, E. B., DE ALMEIDA BÔDI, E. C., HARAKAVA, R., GREGORI, F., GONÇALVES, M. C. (2016): Occurrence and molecular analysis of quarantine virus in lily cultivation areas in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 51, 615–622. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500023>
27. SALAMON, P., PALKOVICS, L. (2005): Occurrence of Colombian datura virus in *Brugmansia* hybrids, *Physalis peruviana* L. and *Solanum muricatum* Ait. in Hungary. *Acta Virologica* 49, 117–122.
28. SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual, 3. kiad. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
29. SANGER, F., COULSON, A. R. (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94, 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
30. THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
31. WALKER, S. E., LORSCH, J. (2013): Sanger Dideoxy Sequencing of DNA, In: *Methods in Enzymology*. Elsevier, 171–184 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00014-8>
32. WHITE, J. L., KAPER, J. M. (1989): A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *Journal of Virological Methods* 23, 83–93. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(89\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0166-0934(89)90122-5)
33. WYLIE, S. J., ADAMS, M. J., CHALAM, C., KREUZE, J., LÓPEZ-MOYA, J. J., OHSHIMA, K., PRAVEEN, S., RABENSTEIN, F., STENGER, D., WANG, A., ZERBINI, F. M., ICTV REPORT CONSORTIUM (2017): ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae*. *Journal of General Virology* 98, 352–354. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000740>

6 PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témakörében megjelent publikációk jegyzéke

Impakt faktoros folyóiratcikk

Ágoston János, Almási Asztéria, Salánki Katalin, Palkovics László

First report of konjac mosaic virus in Zantedeschia from Hungary

JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY 101:4 p.1217 (2019)

DOI: 10.1007/s42161-019-00279-6 (IF= **0,818**, Q3, 2019)

János Ágoston, Asztéria Almási, Katalin Salánki, László Palkovics

Genetic diversity of potyvirus associated with tulip breaking syndrome

PLANTS 9:12 1807 (1-25 pp.) DOI: 10.3390/plants9121807 (IF= **2,762**, Q1, 2020)

János Ágoston, Asztéria Almási, Katalin Salánki, László Palkovics

Identification and characterization of a new potyvirus infecting Muscari in Hungary

EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY (on-line first) (2020)

DOI: 10.1007/s10658-020-02182-8 (IF= **1,582**, Q1, 2020)

Ágoston János, Almási Asztéria, Nemes Katalin, Salánki Katalin, Palkovics László

First report of hippeastrum mosaic virus, narcissus late season yellow virus, narcissus latent virus and narcissus mosaic virus in daffodils from Hungary

JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY 102:4 pp. 1275-1276 (2020)

DOI: 10.1007/s42161-020-00556-9 (IF= **1,152**, Q3, 2020)

Lektorált folyóiratban megjelent közlemények

Ágoston János, Almási Asztéria, Salánki Katalin, Palkovics László

Leopárd konytvirág mozaik vírus (Konjac mosaic virus, KoMV) izolátumok diverzitása és magyarországi előfordulása Zantedeschia (Kála) növényeken

NÖVÉNYVÉDELEM 81 [56]: 7 pp. 297-304. 8 p. (2020)

Ágoston János, Almási Asztéria, Nemes Katalin, Salánki Katalin, Palkovics László

NÁRCISZOK VÍRUSFERTŐZÖTTségének FELMÉRÉSE MAGYARORSZÁGON

NÖVÉNYVÉDELEM 81 [56]:10 pp. 441-452. 12 p. (2020)

Konferencia összefoglalók (abstract)

Ágoston János, Almási Asztéria, Salánki Katalin, Palkovics László

Leopárd konytvirág mozaik vírus (Konjac mosaic virus) első magyarországi előfordulása színes kálán (Zantedeschia sectio Aestivae)

In: Haltrich, Attila; Varga, Ákos (szerk.) 66. NÖVÉNYVÉDELMI TUDOMÁNYOS NAPOK

Budapest, Magyarország: Magyar Növényvédelmi Társaság, (2020) p. 41

Ágoston János, Almási Asztéria, Pájtli Éva, Vági Pál, Salánki Katalin, Palkovics, László

Magyar és hollandiai tulipánt megbetegítő potyvirus izolátumok jellemzése

In: Haltrich, Attila; Varga, Ákos (szerk.) 64. NÖVÉNYVÉDELMI TUDOMÁNYOS NAPOK

Budapest, Magyarország: Magyar Növényvédelmi Társaság, (2018) p. 46

László Palkovics, Éva Pájtli, Ádám Koczor, Asztéria Almási, István Tóbiás, **János Ágoston**, Pál Vági, János Ádám, Katalin Salánki

Identification and Analysis of New Viruses, Virus recombinants and Resistance Breaking Strains in Hungary

INTERNATIONAL JOURNAL OF LIFE SCIENCE AND PHARMA RESEARCH (IJLPR) Abstract Book p. 12 (2018)

7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, Dr. PALKOVICS LÁSZLÓ professzor úrnak, az MTA doktorának, valamint társszerző kollégáimnak, Dr. SALÁNKI KATALINNAK, az MTA doktorának, Dr. ALMÁSI ASZTÉRIÁNAK, az MTA doktorának és Dr. NEMES KATALINNAK, akik munkámat folyamatosan és önzetlenül segítették. Az ő közreműködésük, sokéves tapasztalatuk, folyamatos útmutatásuk nélkül nem sikerült volna kutatásomat eredményesen befejezni. Megtisztelő, hogy tőlük tanulhattam, és remélem, hogy a jövőben lesz még lehetőségünk együtt dolgozni. Köszönöm Dr. VÁGI PÁLNAK az elektron-mikroszkópos vizsgálatok elvégzését.

Szeretném továbbá megköszönni doktorandusz társaim, SÁRAY RÉKA, PINCZÉS DÓRA, LANTOS ANNA, KONCZ LÁSZLÓ, valamint a Növénykórtani Tanszéknek, az ELKH Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézetének, a Neumann János Egyetem (NJE) Kertészeti és Vidékfejlesztési Karának és az NJE Könyvtár és Információs Központ dolgozóinak türelmét és segítségét.

Szeretném megköszönni P. J. J. APELDOORN-nak, hogy 2014-ben engedélyezte a 'Zomerschoon' Rembrandt tulipán fajtáról a mintavételt a tulipán fajták élő génbankjából.

Szeretném megköszönni JOHAN VAN SCHEEPEN-nek, hogy megengedte, hogy használjam a KAVB könyvtárát, és ott irodalmazhassak a cikkekhez és a disszertációhoz.

Szeretném megköszönni szüleim, testvérem és családom tagjainak a biztatást, és hogy sok évig tartó munkámban végig támogattak és mellettem álltak.

A kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztériuma által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (NKFIH-1159-6/2019) a Szent István Egyetem növénynevelés, növényvédelemmel kapcsolatos kutatások alprogramja keretében támogatta. Köszönettel tartozunk a kutatás támogatásáért, amely az EFOP-3.6.1-16-2016-00006 „A kutatási potenciál fejlesztése és bővítése a Neumann János Egyetemen” pályázat keretében valósult meg. A projekt a Magyar Állam és az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával, a Széchenyi 2020 program keretében valósul meg.