

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

PRIBÉK DALMA

**VESZPRÉMI EGYETEM
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
KESZTHELY**

2001

VESZPRÉMI EGYETEM
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
KESZTHELY
Növényvédelmi Intézet
Növénykórtani és Növényvirológiai Tanszék

Programvezető:
Dr. Horváth József
az MTA levelező tagja

Témavezető:
Dr. Gáborjányi Richard
az MTA doktora

**A SZILVAHIMLŐ VÍRUS (PLUM POX *POTYVIRUS*)
TERJEDÉSÉNEK ÉS IZOLÁTUMAINAK
VIZSGÁLATA, LEHETŐSÉGEK AZ INTEGRÁLT
VÉDEKEZÉS MEGVALÓSÍTÁSÁRA**

Készítette:
PRIBÉK DALMA

KESZTHELY
2001

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	6
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1	A szilvahimlő vírus világméretű elterjedése	9
2.1.1	Természetes gazdanövények	13
2.1.2	Indikátor növényeken okozott tünetek	14
2.1.3	Tünetek főbb gazdanövényeken	17
2.1.4	Törzsek elkülönítése	30
2.2	A szilvahimlő vírus természetes terjedési módjai	36
2.2.1	Vírusátvitel levéltetvekkel.....	36
2.2.1.1	A vírusátvitel formái, mechanizmusa	37
2.2.1.2	A vírusátvitel molekuláris alapjai	38
2.2.1.3	A vírust terjesztő korábban ismert levéltetű vektorok	41
2.2.2	Vírusátvitel egyéb módon	43
2.3	A Potyviridae család molekuláris felépítése	44
2.3.1	A vírus RNS 5' és 3' végeinek nem kódoló szakaszai.....	46
2.3.2	A vírus genom által kódolt fehérjék kifejeződése	48
2.3.2.1	Az első fehérje.....	48
2.3.2.2	A segítő fehérje és proteáz	49
2.3.2.3	A harmadik fehérje.....	50
2.3.2.4	Az első és a második 6 kD-os fehérje.....	51
2.3.2.5	A henger alakú zárványfehérje	51
2.3.2.6	A kis sejtmag zárványfehérje és a genomhoz kötött protein.....	52
2.3.2.7	A nagy sejtmag zárványfehérje.....	53
2.3.2.8	A köpenyfehérje	54
2.4	A szilvahimlő vírus elleni védekezés lehetőségei	55
2.4.1	A rezisztenciára nemesítés hagyományos módszerei	55

2.4.2	A genetikailag módosított növények	57
2.4.3	Agrotechnikai védekezés.....	61
2.4.4	Kémiai védekezés.....	63
2.4.5	Integrált védekezési módszerek.....	65
3	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	69
3.1	A levéltetvek rajzásának megfigyelési lehetőségei	69
3.1.1	A szívócsapda módszer	69
3.1.2	A sárgatál módszer	71
3.2	A természetes fertőződés tesztelése indikátor növényekkel.....	71
3.3	Vírusátvitel levéltetvekkel	73
3.4	Vírusfenntartás.....	77
3.5	Biotesztek	78
3.6	Szerológiai vizsgálatok.....	80
3.6.1	DAS-ELISA	80
3.6.2	IDAS-ELISA.....	81
3.7	Molekuláris virológiai vizsgálatok	82
3.7.1	Vírustisztítás.....	84
3.7.2	Össz-nukleinsav kivonás	85
3.7.3	DNS másolat (cDNS) készítése.....	85
3.7.4	Polimeráz láncreakció (PCR).....	85
3.7.5	A DNS hasítása restrikciós endonukleázokkal.....	86
3.7.6	Agarózgél-elektroforézis.....	86
3.7.7	Southern-blot hibridizáció.....	87
3.7.8	A köpenyfehérje gén izolálása	87
3.7.9	A plazmid és a genomról készült cDNS összekapcsolódása	88
3.7.10	A rekombináns plazmid beépítése baktérium sejtbe	88
3.7.11	A plazmid felszaporítása, klónozás	89
3.7.12	A plazmid tisztítása	89

3.7.13	A köpenyfehérje-gén nukleotid sorrendjének meghatározása	90
4	EREDMÉNYEK	92
4.1	A vírusterjesztő levéltetvek rajzása	92
4.1.1	Rajzásdinamikai vizsgálatok a szívócsapdás módszerrel	92
4.1.2	Rajzásdinamikai vizsgálatok a sárga tálcscapdás módszerrel	98
4.2	A természetes fertőződés idejének megállapítása	101
4.3	Új vektor fajok, és aktivitásuk meghatározása.....	106
4.4	A PPV törzsek elkülönítése tesztnövény módszerrel.....	114
4.5	A hazai PPV izolátumok szerológiai sokszínűsége.....	118
4.6	A szerológiai heterogenitás bizonyítása nukleinsav vizsgálatokkal.....	121
4.6.1	A PCR termékek összehasonlító vizsgálata.....	121
4.6.2	Pa1 izolátum nukleotid sorrendjének meghatározása.....	127
5	KÖVETKEZTETÉSEK	132
6	ÖSSZEFOGLALÁS	148
7	SUMMARY	153
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	158
9	IRODALOMJEGYZÉK	160
10	AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBŐL KÉSZÜLT KÖZLEMÉNYEK HIBA! A KÖNYVJELZŐ NEM LÉTEZIK.	
11	AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK HIBA! A KÖNYVJELZŐ NEM LÉTEZIK.	

1 BEVEZETÉS

"A vírusbetegségek a gazdasági növényeink legalattomosabb kórokozói közé tartoznak. Kezdetben alig észrevehető jelekkel, de később fokozott minőségi romlással és termés csökkenéssel terjednek a legkülönbözőbb hasznosítású növényeink között. Mindez annak tulajdonítható, hogy a kórokozó igazi természete még nem teljesen tisztázott, így felismerése és a védekezés ellene bizonytalan." (Szirmai, 1948a)

Szirmai János a hazai növényvirologia megteremtője akkor írta e sorokat, amikor először tapasztalta, hogy a vírusbetegségek már gyümölcsfáinkon is megjelentek. A kajszibarack fákat megbetegítő kórokozót egyszerű laboratóriumi eszközökkel még nem tudták meghatározni, mint az lehetséges volt a baktériumok vagy a gombák esetében. A vírusokról mindössze annyit tudtak, hogy egy rendkívül fertőző természetű nukleoproteid-szerű anyag, melynek jelenlétéről biztosan csak a gazdanövénybe való átoltással győződhetnek meg. Ez a kimutatási módszer a fás szárú növényeknél hosszú időt vett igénybe, mert az átoltásnak csak egy vagy több év múlva lett látható eredménye. Ma már a legtöbb vírus fizikai és biokémiai jellemzőit ismerjük.

A századfordulón figyeltek fel először a csonthéjas gyümölcsök vírusos megbetegedéseire. Ezek közül a legnagyobb jelentőségű a szilvahimlő vírus (plum pox *potyvirus*, PPV), amely súlyos

termésveszteségeket idéz elő elsősorban a szilva-, a kajszii- és az őszibarack ültetvényekben (Németh, 1986; Lecoq et al., 1988). A fertőzött fák gyümölcse külseje miatt elveszíti piaci értékét, azonkívül ipari felhasználhatósága is nagymértékben csökken a megváltozott cukor : sav arány következtében. Nagy károkat idéz elő azáltal, hogy a gyümölcsök súlya 20-30 %-al is csökkenhet (Jordović és Janda, 1963), és a gyümölcsök még beérés előtt lehullanak a fáról. A gyümölcshullás mértéke 30-60 %, de egyes fajtáknál elérheti a 95-100 %-ot is (Trifonov, 1974). A kár mértékét fokozza, hogy Közép-Európában a vírusra igen érzékeny Besztercei szilva fajtakör termesztése a legelterjedtebb, melynek beltartalmi értéke a fertőzés hatására erősen csökken (György, 1976).

A PPV gyors elterjedésének oka sokféle terjedési módjában keresendő. A vírus levéltetvekkal nagyon könnyen, nem-perzisztens módon terjed, de ismert a pollen- (Trifonov, 1965) és magátvitel is (Németh és Kölber, 1983). Gyors terjedése és az ültetvényekben okozott károk miatt a szilvahimlő vírus a gyümölcstermesztők figyelmének középpontjába került. Magyarországon már 1960 óta folyik a csonthéjas termésű fák tesztelése. A növényegészségügyi vizsgálatok eredményeinek köszönhetően több ezer szilvafát kellett kivágni. A központi törzsültetvényi rendszer létrehozása megteremtette a vírusmentes szaporítóanyag ellátás alapjait. A vírusmentes szaporítóanyag előállításánál alapvető követelmény, hogy mind a nemes, mind az alany mentes legyen a kórokozótól. A PPV egyetlen fertőzése miatt azonban nagyon nehéz a

törzsültetvényekből a vírust kiiktatni. A korábban fertőződött növényekben a kórokozó akár három évig is lappanghat (Németh, 1992).

Napjainkban a PPV már tömegesen fordul elő az ország minden területén. Ismeretlen volt azonban, hogy az egyes vidékeken milyen patotípusok vagy ökotípusok találhatók, ezek milyen szerológiai rokonságban állnak egymással és más, Európában előforduló törzsekkel. Hiányosak voltak a kórokozó terjedésével kapcsolatos ismereteink is, egyes vektorfajok vírusvektor jellege vitatott volt. Ezért célul tűztük ki a hazai PPV izolátumok levéltetű átviteli viszonyainak vizsgálatát, az izolátumok előfordulásának és törzsi hovatartozásának tisztázását; a hazai és a külföldi izolátumok, törzsek szerológiai rokonsági viszonyainak és osztályozhatóságának megállapítását. Ezen alapkutatási eredmények összességével szeretnénk hozzájárulni e gazdaságilag is igen jelentős kórokozó elleni okszerű, integrált védekezési módszerek kidolgozásához.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A szilvahimlő vírus világméretű elterjedése

A kórokozó Bulgáriából, szilvafákról származik, az általa okozott himlő alakú foltok alapján kapta a ma is használatos "sarka" (himlő) elnevezést. A szilvatermesztők 1915 táján figyeltek fel először a betegségre, mégis az első tudományos közlemény csak 1932-ben jelent meg (Atanasoff, 1932). A kórokozó első hazai leírása Szirmai (1948a, b) nevéhez fűződik, mint a kajszai faiskolák "csillagfoltosság betegsége"(1. ábra). Később Husz és Klement (1950) a szilva, Németh (1963) az őszibarack fertőzöttségéről számoltak be. A PPV nagyfokú életképességét bizonyítja, hogy Moldáviában és Bulgáriában már meggyről (Kalashyan és Bilkely, 1989), Olaszországban pedig cseresznyéről (Crescenzi et al., 1994) izolálták. Újabb adatok szerint már dión (Baumgartnerova, 1996), valamint kökényen is megjelent (Salamon és Palkovics, 1997). Korábban Van Oosten (1975) a mandula 28 fajtáját ellenállónak találta a fertőzéssel szemben.

A szaporítóanyagok nemzetközi kereskedelme révén a betegség gyorsan terjedt (Matthews, 1991), és most már egész Európában megtalálható (1. táblázat). Az utóbbi 10 évben leírták Egyiptomban (Wetzel et al., 1991a), Chilében (Acuña, 1993), és az Indiai szubkontinensen (Thakur et al., 1994). Újabb az Amerikai

1. ábra. A kajszibarack "csillagfoltosság betegsége"

Egyesült Államokban (Milius, 1999) számoltak be megjelenéséről, így Ausztráliát kivéve már valamennyi földrészen jelen van.

2.2 A szilvahimlő vírus gazdanövényköre

2.2.1 Természetes gazdanövények

A szilvahimlő vírus természetes gazdanövényei közé nemcsak fás szárú *Prunus* fajok tartoznak, hanem lágyszárú növények is. A leggyakrabban előforduló, fogékony fajok a következők:

Capsella bursa-pastoris, *Celosia argentea*, *Chenopodium ambrosioides*, *C. capitatum*, *C. foetidum*, *C. foliosum*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Emilia sagittata*, *Gomphrena globosa*, *Humulus lupulus*, *Hyoscyamus niger*, *Lupinus albus*, *Lycopersicon esculentum*, *Melilotus albus*, *M. officinalis*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana acuminata*, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. clevelandii*, *N. debneyi*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *Petunia hybrida*, *Physalis floridana*, *P. peruviana*, *Pisum sativum*, *Prunus armeniaca*, *P. cerasifera*, *P. domestica*, *P. glandulosa*, *P. insititia*, *P. japonica*, *P. mahaleb*, *P. maritima*, *P. persica*, *P. salicina*, *P. sibirica*, *P. spinosa*, *P. tomentosa*, *Ranunculus arvensis*, *R. sardous*, *Senecio vulgaris*, *Sesbania exaltata*, *Sorbus domestica*, *Stellaria media*, *Trifolium pratense*, *T. repens*, *Vicia sativa*, *V. villosa*, *Zinnia elegans*.

A teljes fajlistát Németh (1986), valamint Edwardson és Christie (1991) munkái tartalmazzák.

2.2.2 Indikátor növényeken okozott tünetek

Chenopodium foetidum: A tesztnövényen megjelenő klorotikus és nekrotikus léziók segítségével egyszerűen kimutatható a PPV jelenléte. A kialakuló léziók alapján, ezt az indikátor növényt a kórokozó törzsi elkülönítésére is használták (lásd később).

GF 31 myrabolan hibrid: Az egyéves hajtások alsó része rozsdabarnán parásodik, majd a kéreg felhasad. Néhány izolátumon törpülés is megfigyelhető. A növény hosszútávon nagy pontossággal használható a kórokozó kimutatására (Németh és Kölber, 1980).

GF 305 (*Prunus persica* cv. Elberta): A levélszövet kivilágosodik a másodlagos erek mentén, a fiatal hajtások torzulnak. Üvegházi körülmények között a tünetek 6-48 nap múlva jelentkeznek.

Nicandra physaloides: A levélen feketés-barna lokális nekrotikus léziók keletkeznek (2. ábra).

Nicotiana clevelandii: A *C. foetidum* tesztnövényhez hasonlóan, a tünetek alapján a PPV három törzsét különböztetjük meg: sárga, intermedier és nekrotikus törzs. A sárga törzs tünetei kis klorotikus foltok, de gyakran a növény tünetmentes marad, vagy nem fertőződik (3. ábra). Az intermedier törzs tünetei hasonlóak az előzőhöz, az inokulált leveleken gyakran nem alakulnak ki tünetek, míg a

2. ábra. A szilvahimlő vírus nekrotikus tünetei *Nicandra physaloides*
tesztnövényen

3. ábra. A szilvahimlő vírus sárga törzsének klorotikus tünetei
Nicotiana clevelandii tesztnövényen

szisztémikus fertőzésű leveleken elszórtan foltok keletkeznek. A nekrotikus törzs az inokulált leveleken klorotikus-nekrotikus foltokat és törpülést okoz.

Pisum sativus: Egyes fajtákon (pl. *P. sativus* cv. Gloria) világoszöld mozaik alakul ki a levelek erein és azok környezetében. A fajták nagy része immunis.

Prunus domestica: cv. Olasz szilva és a Pozegača fajta: A leveleken klorotikus foltok, gyűrűk, szalagok láthatók.

P. japonica: A növény legtöbbször tünetmentes marad, de elszórtan klorotikus foltok fejlődhetnek ki a leveleken.

P. maritima: A kialakuló tünetek klorotikus foltok, érnekrozis formájában mutatkoznak meg.

P. sibirica: Zöld foltok és halvány mintázat látható a levélen.

P. tomentosa: Az első levelek torzultak. Később klorotikus foltok fejlődnek ki, melyek a nyár közepére nekrotizálódnak. Ez a növény különösen alkalmas üvegházi tesztelésre.

Sorbus domestica: Sárga foltok, klorotikus levéltünetek utalnak a fertőzésre (Brunt et al., 1996).

2.2.3 Tünetek főbb gazdanövényeken

A kórokozó fő gazdanövénye a szilva, az őszi-, és a kajszi-barack. A vírusfertőzés tünetei a szilvafákon korán, már májusban megjelennek (4-6. ábra). A hajtás csúcsán lévő fejletlen leveleken nem, de az alatta levő kifejlett leveleken megfigyelhetők a jellemző kisebb-nagyobb

4. ábra. A szilvahimlő vírus sárga, mozaikos típusú tünetei szilvalevélen

5. ábra. A szilvahimlő vírus gyűrűsfoltosság típusú tünetei szilvalevélen

6. ábra. A szilvahimlő vírus tarka, mozaikos és gyűrűs típusú tünetei szilvalevélen

gyűrű alakú vagy szabálytalan, világosabb sárgászöld színű foltok, esetleg szalagok. A jellegzetes tüneteket mutató levelek legnagyobb arányban júniusban és júliusban fordulnak elő. A tünetek erőssége a nyár második felében csökken. Megfigyelések szerint, a Stanley és Bluefre fajtáknál a gyűrűket rozsdaszínű szegély veszi körül (Szabó et al., 1991). A vizsgált szilvafajták közül a Tuleu Timpuriu fajtánál figyeltek meg legkevesebb tünetes levelet. A tünetek sok levélen és nagy felületen jelentkeztek az Early Italian, a Stanley és a Czar fajtáknál. A japán szilvafajták levelein a tünetek elmosódottak, nehezen észrevehetőek voltak. Az ebbe a csoportba tartozó fajok közül az Elephant Heart, a Duarte és a Methley levelein figyeltek meg foltokat. A vírustünetek időbeli megjelenése és erőssége egyrészt környezeti tényezőkre (pl. csapadékhiány), másrészt a fák termésberakódottságára (nagy termésberakódást követően gyengébb kondíció) vezethető vissza. A különböző szilvafajták gyümölcsein a PPV által okozott kár az Albatros, a Besztercei szilva klónok, a Čačanska Lepotica, a Debreceni Muskotály, az Olasz Kék változatok és a Pescarus fajták esetében a legszembetűnőbb (Szabó et al., 1991). A gyümölcsfelületen kialakuló foltok színe az érett gyümölcshöz hasonlít, csak korábban, még az érés előtt jelentkeznek. Az éréskor kialakuló szín és a viaszréteg ezeket a foltokat már alig észrevehetővé teszi. A fajták többségénél a kezdeti felületi foltok a gyümölcsbe süppednek (7. ábra), a húst szivacsossá, barnulttá teszik. A gyümölcs húsa a mag körül, illetve a mag felszíne is barnás-pirosra színeződik (8. 9. ábra). A gyümölcsök húsa ízetlen és rostos, ezáltal közvetlen

7. ábra. A szilvahimlő vírus bemélyedő foltosság típusú tünetei a gyümölcsön

8. ábra. A szilvahimlő vírus tünetei ringlón

9. ábra. A vírusfertőzés hatására kialakult barnás foltok kajszi magokon

fogyasztásra és ipari feldolgozásra alkalmatlanná válik. A gyümölcsök sokszor még beérés előtt lehullanak a fáról (Németh, 1986). A gyümölchullás mértéke a Besztercei Bb. 416-os klónokon elérheti a 100 %-ot (Szabó et al., 1991). A japán szilvafák egyre hosszabb időszakra kiterjedő érése is a PPV fertőzésével magyarázható. A betegség kárt okoz a fás részekben: a fiatal myrobalan hajtások kérge megreped és nekrotizálódik (10. ábra); a floém, később a xylém szövetek színe rozsdabarnává válik (Németh, 1986).

A vírusfertőzés hatására az őszibarack levelén érkielégosodás, klorotikus mintázottság látható, amely a levél deformációjával is társulhat (11. ábra). A tünetek időjárástól függően április, május, június hónapokban a legszembetűnőbbek. Később a tünetek maszkírozódnak, majd eltűnnek. A termésen gyűrűk és rajzolatok képződnek (12. ábra), melyek néha bemélyednek és a termés deformálódását is okozhatják. A gyümölcs piaci értéke a rossz szállíthatóság következtében csökken. Az őszibarackfajták kórokozóval szembeni ellenállósága eltérő. A betegség megjelenését befolyásolják a termesztési körülmények, a telepítés ideje és a fajta fogékonysága. A hazai ültetvényekben az Incrocio Pieri, a Kínai-8, a Mayfire, a Michellini és a 98/68 fajták mutattak bizonyos fokú toleranciát (Tóbiás, 1992; Tóbiás et al., 1992). A vizsgálatok azt mutatták, hogy sokszor a leveleken lévő tünetek erőssége nincs összefüggésben a víruskoncentrációval.

Kajsziabaracknál a PPV-re érzékenyebb fiatal fák fejlődésükben visszamaradnak vagy kipusztulnak (Szirmai, 1961), a gyümölcsök

romlandók. Az őszibarackhoz hasonlóan a rossz szállíthatóság

10. ábra. A szilvahimlő vírus rákos tünetei myrabolan hajtásokon

11. ábra. A szilvahimlő vírus tünetei az őszibarack levelén

12. ábra. A szilvahimlő vírus tünetei az őszibarack gyümölcsökön

következtében piaci értékük csökken (Németh, 1992). Erdős et al. (1995) felmérései szerint a Magyar kajszai C 235 és a Ceglédi bíborkajszai C244 fajták toleránsak.

Van Oosten (1975) feljegyzéseitől eltérően, a kórokozó a mandulát is fertőzi, de a növényen nem alakulnak ki tünetek (Pribék és Gáborjányi, 1997).

2.3 Törzsek elkülönítése

A kórokozó változékonysága igen nagy. Törzseinek elkülönítése tesztnövények segítségével, szerológiai tulajdonságok, illetve nukleinsav homológia alapján történik.

A *C. foetidum* tesztnövényen okozott tünetek alapján három törzset különböztethetünk meg (Šutić et al., 1971). A sárga vagy klorotikus törzs 8-11 nap elteltével 2-3 mm-es sárga klorotikus léziókat; az átmeneti (intermedier) törzs 6-10 nap múlva hasonló tüneteket okoz, de a nekrotikus léziókat klorotikus udvar veszi körül (13. ábra). A nekrotikus törzs tünetei 4-6 napon belül jelentkeznek, a barna nekrotikus foltok kifejlődése után a levél hamarosan elsárgul és lehullik. Roy és Smith (1994) megfigyelései szerint Magyarországon csak az ún. sárga törzs fordul elő, ennek saját vizsgálataink ellentmondanak (Pribék és Gáborjányi, 1997).

Az eltérő tünettani sajátosságokkal rendelkező törzseket szerológiai tulajdonságaik alapján négy csoportba soroljuk: PPV-D, PPV-M, PPV-El Ammar, és PPV-SoC törzsek. A felosztást Kerlan és Dunez

(1979)

13. A szilvahimlő vírus intermedier típusú tünetei *Chenopodium foetidum* tesztnövényen

szserológiai vizsgálatai alapozták meg, amelyekben agargél-diffúziós tesztekkel két fő csoportot az ún. M és a D szerotípust különböztettek meg. Későbbi molekuláris virológiai és szerológiai vizsgálatok megerősítették az alapvető típusok meglétét és tisztázták a PPV törzsek rokonsági viszonyait (Wetzel et al., 1991b, Wetzel et al., 1992; Cervera et al., 1993; Adamolle et al., 1994b; Bousalem et al., 1994a, b; Cambra et al., 1994; Candresse et al., 1994; López-Moya et al., 1994a, b; Asensio et al., 1995; Deborré et al., 1995; López-Moya et al., 1997; Candresse et al., 1998). A PPV-M törzs egy Görögországból származó Marcus nevű izolátumról kapta a nevét, amely izolátum súlyos termésveszteségeket okozott őszibarackon. A PPV-D törzset egy Dideron nevű izolátumról nevezték el, amelyet Franciaországból izoláltak, és amely izolátum enyhe tüneteket okozott kajszin. A PPV-D törzs előfordulása a mai napig Nyugat-Európában általános, levéltetvekkel történő terjedése kisebb hatékonyságú, mint a Marcus törzsé (Adamolle et al., 1994a). Az agresszívebb PPV-M törzs inkább Kelet-Európában és a Balkánon elterjedt, levéltetvekkel könnyen átvihető. Később még két törzset különítettek el a két fő (D és M) törzstől, amelyek nukleinsav homológiája jelentősen eltért a D és az M törzset képviselő izolátumoktól, és amelyeket napjainkban is csak egy-egy jellemző izolátum képvisel. Az egyik az Egyiptomból, kajsziról származó PPV-El Amar törzs, amely inkább a PPV-M törzshöz áll közel (Wetzel et al., 1991a). A másik a Moldovából, meggyről gyűjtött PPV-SoC törzs, amely egy dél-olaszországi, különleges cseresznye izolátumhoz hasonlít (Nemtchinov et al., 1996). Újabb adatok szerint,

a PPV-M törzs két alcsoportra osztható (Myrta et al., 2000). Az első alcsoportot a közép-európai (magyar) izolátumok képviselik, ettől kissé eltérnek a nyugat-európai (mediterrán) izolátumok.

A szilvahimlő vírus izolátumok közül az „EMBL/Genbank/DDBJ” adatbázisból ötnek ismerjük a teljes nukleinsav sorrendjét (D00424, D13751, M92280, X16415, X81083). Magyarországon eddig csak az SK68 jelű, Dr. Németh Mária által gyűjtött izolátumot (adatbanki száma: M92280) jellemezték (Palkovics et al., 1993). Ez az izolátum a Kelet-Európára jellemző M szerotípust képviseli. A négy törzset és a két alcsoportot a hozzájuk tartozó izolátumokkal ma már PCR technikával, enzimatikus úton, restrikciós endonukleázokkal is meg tudjuk különböztetni. Az elmúlt tíz évben a legtöbb európai országban nagy hangsúlyt fektettek az ott előforduló PPV izolátumok szerológiai és molekuláris virológiai módszerekkel történő jellemzésére. Ennek köszönhetően megismerhettük a jellemző izolátumok közötti genetikai hasonlóság mértékét (14. ábra). Magyarországon az SK68 jelű izolátum meghatározása után (Palkovics et al., 1993) az a tévhit uralkodott, hogy hazánkban csak az M törzs van jelen. Az általunk gyűjtött izolátumok sokszínűsége azt sugallta, hogy az itthoni PPV populáció korántsem ilyen egységes. Ismeretlen volt, hogy a hazai gyümölcsösökben milyen törzsek fordulnak elő, és ezek az országon vagy esetleg egy ültetvényen belül milyen arányban oszlanak meg.

14. ábra. A PPV izolátumok közötti rokonsági fokok megállapítása a köpenyfehérje gén nukleotid sorrendje alapján (Candresse et al., 1995 után módosítva). Az izolátumok meghatározása: PPV-o6 (Cervera et al., 1993); PPV-Bulgária (Maiss et al., 1995); PPV-PS (Cervera et al., 1993); PPV-SK68 (Palkovics et al., 1993); PPV-El Amar (Wetzel et al., 1991a); PPV-Dideron (Teycheney et al., 1989); PPV-Ranković (Lain et al., 1989); PPV-AT (Timpe et al., 1992); PPV-NAT (Maiss et al., 1989). Ezen a törzsfán még nem szerepel a 4. törzscsoportba tartozó PPV-SoC izolátum (Maiss et al., 1995).

2.4 A szilvahimlő vírus természetes terjedési módjai

A szilvahimlő vírus terjedése levéltetű vektorokkal, mechanikai úton, oltással, a fertőzött növény magjával, virágporával, vagy víz közvetítésével valósulhat meg. A PPV epidemiológiájában a legfontosabb szerepet a levéltetvek játsszák (Krczal és Kuncze, 1972; Leclant, 1973; Jenser et al., 1980; Labonne et al., 1995; Basky et al., 1997).

2.4.1 Vírusátvitel levéltetvekkel

Már korábban megállapították, hogy magyarországi körülmények között a vírus igen gyorsan terjed a szilva-, a kajszli-, és az őszibarack ültetvényekben. A vírusmentesen kiültetett állományok - a környezeti viszonyoktól függően - előbb vagy utóbb fertőződtek. Ennek oka abban keresendő, hogy a PPV vektoraként számításba vehető levéltetű fajok a kórokozót a tápnövény keresése közben végzett próbaszívásokkal igen rövid idő alatt képesek felvenni, és a virionokat inkubációs idő nélkül azonnal képesek leadni. Az irodalmi adatok több vírusvektort is meghatároztak, amelyek köre egyre bővül. Nem ismerték azonban az egyes fajok vírusátviteli képességét és azt, hogy ezek az újonnan megismert fajok milyen szerepet játszanak a betegség terjesztésében. Ahhoz, hogy a vektorok vírus-epidémiában betöltött szerepét tanulmányozhassuk, ismernünk kell az adott kórokozó terjedésének mechanizmusát.

2.4.1.1 A vírusátvitel formái, mechanizmusa

A természetben a levéltetvekkel történő vírusátvitelnek négy speciális formáját ismerjük: nem-perzisztens, perzisztens vagy cirkulatív, szemiperzisztens és propagatív átvitel. A szilvahimlő vírus a nem-perzisztens (stylet-borne) vírusok közé tartozik. A fertőzött növény szövetnedvével való táplálkozás közben vírusrészecskék tapadnak a levéltetvek szipókájára (*styletum*). Ennél az átviteli módnál - a cirkulatív móddal ellentétben - a rovar egészséges növényre kerülve azonnal fertőzőképes lesz, nincs szükség lappangási időre. A vektorok azonban hamar, egy-két szívás után elveszítik vírusátviteli képességüket. A PPV a többi stylet-borne vírushoz hasonlóan a levélparenchimában lokalizálódik, ami hozzájárul könnyű felvételéhez.

A vírus és a vektor alapvető tulajdonságai a következőkben foglalhatók össze: a felvételi szívás után a rovar azonnal fertőzőképes lesz, inkubációs idő nincs; a forrásnövényen való táplálkozás idejének növekedésével a vektor fertőzőképessége csökken; a vírusátviteli képesség a felvételi szívást megelőző éheztetéssel növelhető; a vektorok egészséges növényen való szívogatás közben fertőzőképességüket hamar elveszítik; a vírusok a vektor szipókájának csúcsi barázdáiban helyezkednek el; a vírus felvételét követő vedlés a fertőzőképességet nagymértékben csökkenti; a vektor testüregébe mesterségesen bejuttatott vírussal a rovar nem lehet fertőzővé tenni; a vírusok a rovar hemolimfájából nem nyerhetők vissza (Horváth, 1972).

2.4.1.2 A vírusátvitel molekuláris alapjai

A nem-perzisztens potyvírusok levéltetűvel történő átvitelében két funkcionális géntermék játssza a legjelentősebb szerepet: a segítő fehérje és a vírus köpenyfehérjéje (lásd még A segítőfehérje és proteáz, ill. A köpenyfehérje c. fejezeteket). E két termék együtt határozza meg a vírusátvitel sikerességét.

A köpenyfehérje három részre tagolódik: az N-terminális, a C-terminális és a központi régióra. Az N- és a C-vég a molekula felszínén helyezkednek el, ezért könnyen kapcsolatba léphetnek más komponensekkel (Shukla et al., 1994), így befolyásolva a vírus kötődését és megtartását a rovar szájszervén (Pirone, 1991). A levéltetűvel átvihető dohány karcotatos vírus (tobacco etch *potyvirus*, TEV) izolátumokban az N-terminális részen három aminosav szekvencia mutatkozott konzervatívnak: aszparaginsav-alanin-glicin (Asp-Ala-Gly vagy DAG). Más potyvírusok esetében a triplet 2. ill. 3. helye gyakran változik, a PPV tripletje pl. aszparaginsav-alanin-leucin (Asp-Ala-Leu vagy DAL). Atreya et al. (1990) pontmutációkkal vizsgálták a DAG szekvencia és a vírusátvitel közötti összefüggéseket. Ha a triplet első aminosavját aszparaginsavról aszparaginra (Asn, N) változtatták, a mutáció az átvitelre nem volt hatással. A második aminosavban történt változtatás [alaninról treoninra (Thr, T)] már drasztikusan érintette az átvitel eredményességét. A harmadik aminosav helyettesítése glicinről glutaminsavra (Glu, E), ill. a DAG

triplet teljes hiánya, kimaradása az átviteli képesség megszűnésével járt. Gal-On et al. (1992) szerint a DAG motívum olyan kötőhelyeket tartalmaz, amelyek segítségével a köpenyfehérje kapcsolódni képes a segítő komponenshez vagy a levéltetű szájszervéhez. Ezzel ellentétben, újabb vizsgálatok azt mutatták, hogy az alkalmazott monoklón antitestek nem egy szekvenciális epitópot, hanem egy meghatározott konformációt ismernek fel. Úgy tűnik, hogy a DAG triplet strukturális szerepet játszik, meghatározza a köpenyfehérje (és a segítő fehérje) másodlagos szerkezetét, és így befolyásolja az átvihetőséget (Blanc et al., 1997; Jayaram, et al., 1998). López-Moya et al. (1999) szerint a triplet pusztán jelenléte nem garantálja az átvivőképességet. A folyamatban más, ehhez hasonló aminosav szekvenciák is részt vesznek.

A segítő komponens ugyanolyan - a levéltetűvel történő átvitel szempontjából lényeges - konzervatív aminosav szekvenciákat tartalmaz, mint a köpenyfehérje. A KITC (lizin-izoleucin-treonin-cisztein, Lys-Ile-Thr-Cys) és a PTK (prolin-treonin-lizin, Pro-Thr-Lys) motívumok a segítő fehérje N-végén helyezkednek el (Thornbury et al., 1990; Huet et al., 1994). A KITC motívumban okozott mutációk azt sugallják, hogy az N végén lévő domain a segítő komponens és a szipóka összekapcsolódásához szükséges (Blanc et al., 1998). Sasaya et al. (2000) szerint a motívumból csak a lizin (K) szükséges a levéltetűvel történő átvitelhez.

Az átvitel mechanizmusára több elméletet is kidolgoztak. Az első az ún. „híd hipotézis”. Govier és Kassanis (1974) szerint a segítő fehérje

hídként köti össze a köpenyfehérjét a *styletum*mal, így teszi lehetővé, hogy a vírus a segítő fehérjén keresztül a levéltetű szájszervéhez kapcsolódjon. A két fehérje közötti kötés létrejöttéhez hét aminosav szükséges, amelyek az N-terminális vég 2.-8. aminosavai, és amelyek a DAG motívumot is magukba foglalják (Blanc et al., 1997). A DAG tripletben okozott mutációk, valószínűleg a virion és a segítő fehérje összekapcsolódását befolyásolják (Pirone és Blanc, 1996). Wang et al. (1996) etetéses kamrákban tápláltak mesterségesen, membránhártyákon keresztül *Myzus persicae* levéltetveket. A rovarok táplálékába vírusátvitelt segítő ill. vírusátvitelt gátló komponenseket keverték. A virionok szipókában való jelenlétét többféleképpen mutatták ki. A sertékből immunogold jelölésű ultravékony metszeteket készítettek, amelyeket elektronmikroszkóp alatt figyeltek meg. A ¹²⁵I-izotóppal jelölt virionokat tartalmazó növényi szövetnedv maradványokat autoradiográfias módszerrel vizsgálták az etetéses kísérletekben. Az átvitelt segítő táplálék (a virion DAG és KITC domaint is tartalmazott) fogyasztása esetében a rovarok felvették és megőrizték a vírust. A vírusátvitelt gátló táplálék (a virion DAG és EITC domaint vagy mutáns DAG motívumot és KITC domaint tartalmazott) fogyasztása esetén a virionok nem vagy nagyon ritkán voltak kimutathatóak a rovarok szájszervében. Ezek az eredmények összeegyeztethetőek a Govier és Kassanis-féle „híd hipotézissel”.

Más feltevések szerint a segítő fehérje módosítja a köpenyfehérje N-terminális végét, így közvetlen kapcsolat alakul ki a virion és a szipóka között (Salomon és Bernardi, 1995). Egy harmadik elmélet

szerint a fehérje „járulékos” funkcióival stabilizáló hatást fejt ki (Berger és Pirone, 1986). Egyrészt védi a virionokat az inaktiválódástól, másrészt szerepet játszik a fertőzési folyamatban (Pirone, 1977).

2.4.1.3 A vírust terjesztő korábban ismert levéltetű vektorok

A szilvahimlő vírust terjesztő korábban ismert levéltetű vektorokat a 2. táblázatban foglaltuk össze:

2. táblázat. A szilvahimlő vírust terjesztő ismert levéltetű vektorok

Levéltetű faj	Fő tápnövény	<i>Prunus</i> spp.	Irodalom
<i>Aphis arbuti</i> Ferrari	<i>Arbutus unedo</i>	-	Labonne et al. (1995)
<i>Aphis craccivora</i> Koch	polifág	néha	Leclant (1973) Massonie (1976)
<i>Aphis fabae</i> Scopoli	polifág	néha	Avinent et al. (1993)
<i>Aphis gossypii</i> Glover	polifág	néha	Avinent et al. (1993)
<i>Aphis hederæ</i> Kalt.	<i>Hedera helix</i>	-	Labonne et al. (1995)
<i>Aphis spiraeicola</i> Patch	polifág	néha	Atanasoff (1935) Leclant (1973) Massonie (1976)
<i>Brachycaudus carduinus</i> Linnaeus	<i>Prunus domestica</i>	+	Kuncze és Krczal (1968) Krczal és Kuncze (1972) Šutić et al. (1976)
<i>Brachycaudus helichrysi</i> Kalt.	<i>Prunus persica</i> <i>Prunus spinosa</i> <i>Prunus cerasifera</i>	+	Atanasoff (1934) Christoff (1947) Vaclav (1966)

2. táblázat folytatása

Levéltetű faj	Fő tápnövény	<i>Prunus</i> spp.	Irodalom
<i>Dysaphis plantaginea</i>	<i>Malus</i> spp.	-	Labonne et al. (1995)
Pass.	<i>Plantago</i> spp.		
<i>Dysaphis pyri</i> B. d. F.	<i>Pyrus</i> spp.	-	Labonne et al. (1995)
	<i>Galium</i> spp.		
<i>Macrosiphum rosae</i> L.	<i>Rosa</i> spp.	-	Labonne et al. (1995)
	Dipsacaceae		
<i>Megoura viciae</i> Buckton	Leguminosae	-	Labonne et al. (1995)
<i>Myzus persicae</i> Sulz.	<i>Prunus persica</i>	+	Kassanis és Šutić (1965) Kuncze és Krczal (1968) Šutić et al. (1976)
<i>Myzus varians</i>	<i>Prunus persica</i>	+	Leclant (1973)
Davidson			Massonie (1976)
<i>Hyalopterus pruni</i>	<i>Prunus persica</i>	+	Minoiu (1979)
Geoffroy	<i>Prunus spinosa</i>		
<i>Phorodon humuli</i>	<i>Prunus persica</i>	+	Kegler (1962)
Schrank	<i>Prunus spinosa</i>		Vaclav (1966) Krczal és Kuncze (1972)
<i>Rophalosiphum padi</i> L.	<i>Prunus padus</i>	*	Labonne et al. (1995)
	Gramineae		
<i>Sitobium fragariae</i>	<i>Rubus</i> spp.	-	Labonne et al. (1995)
Walker	Gramineae		
<i>Uroleuchon sonchi</i> L.	<i>Sonchus</i> spp.	-	Labonne et al. (1995)
	<i>Lactuca</i> spp.		

Jelmagyarázat: +: táplálkozik; -: nem táplálkozik; *: csak ősszel tartózkodik *Prunus* fajokon.

2.4.2 Vírusátvitel egyéb módon

A PPV természetes terjedési módjaihoz tartozik a mechanikai úton, az oltással és a maggal- illetve pollennel történő vírusátvitel. A szomszédos fák leveleinek érintkezésével történő mechanikai fertőződésnek viszonylag kicsi a jelentősége e kórokozónál. Annál nagyobb viszont a faiskolákban az oltással, szemzéssel történő átvitelnek. Akár az alany, akár az oltóvessző fertőzött, a betegség az egész növényre átterjed. Hazánkban a PPV gyors elterjedését a fajtaelőállítók okozták. Napjainkban az Európai Közösség előírásainak megfelelő vírusmentesítési programmal igyekeznek a kórokozó pusztítását fékezni, és a továbbterjedését megakadályozni. Ha a gyümölcsfa már megfertőződött, a növény virágpora is veszélyforrást jelent. A pollennel történő átvitel jelentőségét a PPV esetében Trifonov (1965) írta le először, aki hangsúlyozta a méhek fontos szerepét is. A magátvitel lehetőségét Szirmai (1961) vetette fel elsőként kajszibarackon, később Németh és Kölber (1983) szerológiai (ELISA) vizsgálatai bizonyították hogy a kórokozó valóban jelen van a magban, és ezáltal belőle beteg növény fejlődik ki. Vizsgálatainkban a fertőzött mandulafáról származó magokból kikelő magoncokból a PPV-t nem tudtuk kimutatni. Régóta ismert, hogy a tavakból, vízfolyásokból számtalan vírus - így a PPV is – diagnosztizálható (Pocsai és Horváth, 1997; Pocsai et al., 1998). Feltételezhető ezért,

hogy stabil vírusok az öntözővízbe kerülve szerepet játszhatnak a növények megbetegítésében (Meyer-Kahsnitz, 1993).

2.5 A *Potyviridae* család molekuláris felépítése

A *Potyviridae* vírus családba 184 vírusfaj tartozik, amelyből 85 vírusfaj állandó, 99 vírusfaj feltételezett tag (Shukla et al., 1994; Brunt et al., 1996; Revers et al., 1999; Horváth, 1999). A családon belül 5 nemzetséget különítünk el egymástól. A *Potyvirus* nemzetség tagjai nem-perzisztens módon levéltetvekké, a *Rymovirus* nemzetség fajai levélatkákkal, a *Bymovirus* nemzetség tagjai gombákkal terjednek. A feltételezett nemzetségek közül az *Ipomovirus* nemzetség fajai fehérlegyekkel, míg a *Macluravirus* nemzetség tagjai nem-perzisztens módon levéltetvekké terjedhetnek. A *Potyviridae* családba tartozó vírusok mechanikailag könnyen átvihetők, sőt egyes fajok maggal is fertőzhetnek. A *Potyviridae* családra jellemző, hogy a növényekben intracelluláris forgó kerékszerű (pinwheel) zárványokat képeznek. Ez az elektronmikroszkópos tünet diagnosztikai értékű. A virionok hajlékony fonál alakúak, amelyek átmérője és hosszúsága nemzetségenként eltérő (11-15 nm, 650-900 nm); általában kb. 5% nukleinsavat és 95% fehérjét tartalmaznak. A vírusgenom pozitív, azaz messenger tulajdonságú egyszálú RNS, ez alól csak a *Bymovirus* nemzetség kivétel, amelynek osztott genomja két egyszálú RNS-ből áll. A mintegy 150 nukleotidból álló, nem kódoló régiót, a 350-360 kD tömegű, kb. 10000 bázis hosszúságú leolvasási szakasz követi. A vírus

RNS 5' végéhez kovalens kötással a genomhoz kötött protein (VPg), 3' végéhez poliadenilsav láncból álló poly(A) farok kapcsolódik. Ez a poliadenilált szakasz mintegy 3000-3300 aminosavat kódol. Az ún. nyitott leolvasási keretben (ORF, *open reading frame*) a genomról egy kezdő szignál és egy stop kodon segítségével először egy poliprotein íródik át. Riechmann et al. (1991) pontosan meghatározták, hogy a PPV esetében a transzláció a második start kodonnál kezdődik. A hosszú prekursor fehérjét a transzláció után a vírusgenom által kódolt proteinázok hasítják különböző géntermékekre, azaz funkcionális fehérjékre (15. ábra). A keletkezett géntermékek az amino (N-terminális) végtől a karboxi (C-terminális) vég felé haladva a következők: első fehérje (P1 protein), segítő fehérje és proteáz (*helper component protease*, HC-Pro), második fehérje (P3 protein), első 6 kD-os fehérje (6K1), henger alakú zárványfehérje (*cylindrical inclusion body*, CI), második 6kD-os fehérje (6K2), kis sejtmag zárványfehérje (*nuclear inclusion body*, NIa, amely tartalmazza a VPg-t), nagy sejtmag zárványfehérje (*nuclear inclusion body*, NIb), köpenyfehérje (*capsid protein*, CP) (Shukla et al., 1994).

A potyvírusok replikációja rendkívül gazdaságtalan, hiszen ahhoz, hogy egyetlen köpenyfehérje kialakuljon, az egész nukleinsavnak újra át kell íródnia. Ennek az a következménye, hogy egyrészt a feleslegesen keletkezett termékek zárványok formájában halmozódnak fel, másrészt kevés számú virion található meg a növényi szövetekben.

2.5.1 A vírus RNS 5' és 3' végeinek nem kódoló szakaszai

A PPV genom 5' és 3' végéről nem íródnak át funkcionális fehérjék. A nem kódoló szakaszok közül az 5' vég sokkal konzervatívabb, mint a 3' vég. A *Potyvirus* nemzetség tagjai és az egyes vírusok izolátumai

15. ábra. A PPV genomszerveződése (magyarázat a szövegben)

között nagy különbségek vannak a 3' vég méretében és szekvenciájában (Lain et al., 1988; Dolja és Carrington, 1992). A 3' vég bázis-sorrendje alapján különböztethetjük meg az egyes víruscsaládokat egymástól (Atreya, 1992). Az 5' szakasz két konzervatív szekvencia motívumot tartalmaz, amelyeket "a" ill. "b" szakasznak nevezünk (Lain et al., 1989). Ezek a konzervatív szekvenciák határozzák meg az RNS másodlagos szerkezetét, így jelentőségük a vírus replikációjában, a transzlációban és az enkapszidációban van (Carrington és Freed, 1990; Riechmann et al., 1992). Több adat is bizonyítja, hogy az 5' nem transzlálódó szakasz közreműködik a patogenezisben, és meghatározott nukleotidjai a tünetek kialakításában játszanak szerepet (Simón-Buela et al., 1997; Palkovics et al., 1998). A 3' végnek is meghatározó szerepe van a másodlagos szerkezet kialakításában, és a replikációban is (Jacobson et al., 1993; Haldeman-Cahill et al., 1998). A 3' véghez kapcsolódó poly(A) farok hosszától függ többek között a vírus fertőzőképessége (Riechmann et al., 1990).

2.5.2 A vírus genom által kódolt fehérjék kifejeződése

2.5.2.1 *Az első fehérje*

Az N-végtől a C-vég felé haladva, az első géntermék egy 35 kD-os P1 fehérje (P1 protein), amelynek szerepe még nem teljesen tisztázott. Hosszúságát és aminosav sorrendjét tekintve a P1 protein N-vége a legváltakozékonyabb szakasz a potyvírusok között. Bizonyították a

fehérje proteolitikus tulajdonságát, amelyért a C-terminális rész a felelős. Szerepe van a fertőzések kialakításában és a replikációban (Verhot és Carrington, 1995a, b; Pruss et al., 1997). A P1 proteinnek ismert nukleinsavkötő tulajdonsága is (Maiss et al., 1995). A fehérje zárványok formájában halmozódik fel az epidermisz sejtekben (Wisler et al., 1995).

2.5.2.2 *A segítő fehérje és proteáz*

Az 52 kD-os segítő fehérje proteáz (*helper component protease*, HC-Pro) multifunkcionális fehérje (Maia et al., 1996). Tulajdonságai közül a legfontosabb, hogy a levéltetűvel történő vírusátvitelben nélkülözhetetlen szerepet játszik (Shukla et al., 1994; López-Moya et al., 1995; Pirone és Blanc, 1996; Blanc et al., 1998; Sasaya et al., 2000). Az átvitel során a HC-Pro kölcsönhatásba lép a köpenyfehérjével (Blanc et al., 1997). Atreya és Pirone, (1993) szerint a fehérje N-terminális részei azok, amelyek a vírusátvitelben kulcsszerepet játszanak. A fehérje felszínén olyan konzervatív aminosav szekvenciákat (KITC, PTK motívumok) találtak, amelyek alapvetően meghatározzák a HC-Pro tulajdonságait (Thornbury et al., 1990; Huet et al., 1994; Peng et al., 1998; Sasaya et al., 2000). A KITC szakasz a HC-Pro N-végének 50-54. aminosavától, a PTK szakasz a HC-Pro N-végének 307-311. aminosavától kezdődik. Ha a szakaszban az alapvető aminosavakat másokkal helyettesítjük, az a

legtöbb esetben a virulencia csökkenését vonja maga után (Atreya et al., 1992; Atreya és Pirone, 1993).

Az N-terminális rész a betegség tünetek kialakulásáért felelős (Atreya et al. 1992; Dolja et al., 1993; Klein et al., 1994; Gal-On, 2000), Guo et al. (1998) szerint nélkülözhetetlen a vírus életképességének megőrzésében, azonkívül Kasschau és Carrington (1995) szerint részt vesz a vírus nukleinsav sokszorosításában. Később bizonyították az N-vég közepső domain-jének szerepét a sejtről-sejtre történő mozgásban (Cronin et al., 1995; Kasschau et al., 1997; Rojas et al., 1997). A HC-Pro a köpenyfehérjével együtt koordinálja a vírus felhalmozódását és mozgását a növényben (Andrejeva et al., 1999). A HC-Pro közepső szakaszán két, egymástól független RNS-kötő domain is kimutattak (Urcuqui-Inchima et al., 2000). A fehérje proteolitikus tulajdonsága a C-terminális részhez köthető, amely a HC-Pro fehérjét és a P3 fehérjét vágja el egymástól (Carrington et al., 1989). A HC-Pro a citoplazmában zárványok formájában halmozódik fel, de megtalálhatók más géntermékekkel együtt a kloroplastokhoz kötődve (Gunashinge és Berger, 1991). Kasschau és Carrington (1998) kimutatták, hogy elnyomja a posztranszkripcionális gén lecsendesítést is.

2.5.2.3 *A harmadik fehérje*

Az 50 kD-os P3 fehérje (P3 protein) funkciójáról és működéséről keveset tudunk. Feltételezik, hogy a poliprotein feldarabolását és a

replikációt szabályozza (Rodríguez-Cerezo és Shaw, 1991; Riechmann et al., 1992). A P3 fehérje aminosav sorrendje rendkívül változékony, csak az N-terminális végen található viszonylag konzervatív rész (Shukla et al., 1994). A P3 fehérje a fertőzött sejtekben a henger alakú zárványfehérjéhez kapcsolódik (Rodríguez et al., 1993; Langenberg és Zhang, 1997). Paprikában kimutatták, hogy befolyásolja a hervadásos tünetek kialakulását (Chu et al., 1997). Sáenz et al. (2000) szerint a komplex tünetekért felelős gének a PPV genom középső részén, pontosan meghatározható helyen helyezkednek el, a P3 és a 6K1 fehérjék karboxi (C) végén.

2.5.2.4 Az első és a második 6 kD-os fehérje

Az első és a második 6 kD-os fehérjék (6K1 és 6K2) részt vesznek a replikációban (Riechmann et al., 1992; Schaad et al., 1997a), de szerepüket még teljesen nem azonosították. A 6K1 fehérje a P3 fehérjével együtt befolyásolja a tünetek kifejlődését (Riechmann et al., 1995; Sáenz et al., 2000).

2.5.2.5 A henger alakú zárványfehérje

A 71 kD-os henger alakú zárványfehérje (*cylindrical inclusion body*, CI) a poliproteinről lehasadó legnagyobb termék. Ezek a fehérjék alkotják azokat a potyvírusokra jellemző túkerék zárványokat, amelyek a plazmalemma közelében képződnek, központi részük a

plazmodezmában található (Lawson és Hearon, 1971; Restrepo et al., 1990; Martín et al., 1992); később eltávolodva a plazmalemmától a citoplazmában szabadon gyűlnek össze vagy az endoplazmatikus retikulumhoz kapcsolódnak. Ezért valószínű, hogy elősegítik a virionok sejtről-sejtre való terjedését (Calder és Ingerfeld, 1990; Carrington et al., 1998). A zárványokhoz virionok és köpenyfehérje is kapcsolódhat (Ammar et al., 1994). Az N-terminális rész helikáz aktivitást mutat (Lain et al., 1990; Rodriguez-Cerezo et al., 1997), vagyis Mg^{2+} ion jelenlétében, ATP felhasználásával képes az RNS szál másodlagos szerkezetét fellazítani. Egyes aminosav szakaszai a helikáz-aktivitáshoz nélkülözhetetlen nukleotidkötő képességgel rendelkeznek. A henger alakú zárványfehérjének a szilvahimlő vírus esetében is NTPáz, RNS-kötő és RNS helikáz aktivitása van (Fernández et al., 1995).

2.5.2.6 *A kis sejtmag zárványfehérje és a genomhoz kötött protein*

A kis sejtmag zárványfehérje (*nuclear inclusion body*, NIa), amelynek N-terminális része tartalmazza a genomhoz kötött proteint (VPg) összesen 49 kD nagyságú. A transzláció folyamán kialakuló fehérjék zárványok formájában halmozódnak fel a sejtmagban és a citoplazmában (Dougherty és Hiebert, 1980; Martín et al., 1992). A fehérje C-terminális része olyan vágási helyeket ismer fel, amelyek konzervatív aminosavakból épülnek fel (Dougherty és Parks, 1989). Az N-vég proteináz tulajdonságú, és a poliprotein nagyrészét ez

hasítja (García et al., 1989a, b, c, 1992). A poliprotein proteolízise folyamán először a 49 kD-os termék keletkezik, amely a sejtmagban halmozódik fel, majd később a 27 kD-os proteinázra és a 21 kD-os VPg-re hasad. A hasítás után a VPg a sejtmagban marad, míg a 27 kD-os proteináz a citoplazmába kerül, és ott a hasításokat végzi (Schaad et al., 1996). A hasítások elvégzése után a VPg kovalensen a vírus RNS 5' végéhez kötődik. A VPg befolyásolja a vírus hosszútávú mozgását (Schaad et al., 1997b). Újabb adatok szerint az RNS szintézis alatt indító szekvencia szerepét tölti be (Paul et al., 1998; Simón-Buela et al., 2000).

2.5.2.7 A nagy sejtmag zárványfehérje

Az 58 kD-os nagy sejtmag zárványfehérje (*nuclear inclusion body*, NIb) a kis sejtmag zárványfehérjével együtt előkristály formában található a sejtmagban, de kisebb mennyiségben a citoplazmában is jelen van (Martín et al., 1992; Shukla et al., 1994). A fehérje a glicin-aszparaginsav-aszparaginsav (Gly-Asp-Asp, GDD) aminosav szekvencia alapján a vírus replikációs komplexének alkotóeleme (Riechmann et al., 1992; Shukla et al., 1994). A replikáció a citoplazmában membránhoz kötött komplexként megy végbe (Martín és García, 1991; Martín et al., 1995). A fehérjék között kialakított kölcsönhatásokon túl, a sejtmagban történő lokalizációért is felelős (Li et al., 1997).

2.5.2.8 A köpenyfehérje

A 30 kD-os köpenyfehérje (capsid protein, CP) egy erősen konzervált központi magból, illetve az N-, és a C-végek változékonyabb, felszínen elhelyezkedő, meghatározó csoportjaiból (domain) áll. A CP legfontosabb funkciói közé - a virion burkolásán túl - a levéltetvekkal történő terjedés (Pirone, 1991; Salomon and Bernardi, 1995), a tünetek kialakítása, és a sejtről-sejtre való mozgás tartozik (Dolja et al., 1995; López-Moya és Pirone, 1998; Varrelmann és Maiss, 2000). Mahajan et al. (1996) kimutatta a CP replikációban betöltött szerepét. A fehérje N-terminális vége rendkívül változékony. Olyan epitópotokat tartalmaz, amelyek alkalmasak a különböző törzscsoportok elkülönítésére (Shukla et al., 1988). A CP a levéltetvekkal történő átvitel során kapcsolatba lép a segítő komponenssel, amely Pirone és Blanc (1996) feltevése szerint a levéltetvek szájszervéhez kapcsolódik. A levéltetűvel történő átvitel bizonyos konzervatív aminosav szekvenciákhoz (PPV esetében aszparaginsav-alanin-leucin, Asp-Ala-Leu, DAL) köthető, amelyek az N-terminális rész legelején találhatóak (Atreya et al., 1991, 1995; Blanc et al., 1997; López-Moya és Pirone, 1998). Jayaram et al. (1998) vizsgálatai szerint a DAG motívum szerkezete befolyásolja az átvihetőséget. Az N-véggel ellentétben, a CP középső része viszonylag konzervatív szekvenciákat tartalmaz. A CP C-terminális vége az N-terminális véghez hasonlóan a külső részen helyezkedik el. A CP-nek ezek a részei nem feltétlenül szükségesek az enkapszidációhoz, eltávolításuk nem befolyásolja a vírus fertőzőképességét (Shukla et al., 1994).

2.6 A szilvahimlő vírus elleni védekezés lehetőségei

A Föld népességének robbanásszerű növekedése miatt az egyik legfontosabb feladattá vált az élelmiszerek elegendő mennyiségének és megfelelő minőségének biztosítása. Korábban ezt a kémiai növényvédőszeres túlzott használatával igyekeztek elérni, ami miatt a növényvédelmet sokszor érte jogos panasz (Gáborjányi et al., 1995). Napjainkban egyre inkább olyan irányzatok kerülnek előtérbe, amelyek szem előtt tartják a környezet kímélését. Ezért érdekünk az, hogy a növény genetikai adottságait minél jobban kihasználjuk. A növénytermesztés szempontjából a rezisztens fajták telepítése a leggazdaságosabb. A többi védekezési módszer (agrotechnikai, kémiai) csak ezután következik. A kórokozók elleni integrált védekezés új, molekuláris technikákkal, és környezetbarát technológiákkal bővült. A módszer alkalmazása garantálja a magas terméshozamokat, és a minőséget.

2.6.1 A rezisztenciára nemesítés hagyományos módszerei

A nemesítés célja mindig a piacképesség, a termőképesség és az ellenálló képesség fokozása. A hagyományos nemesítés során vagy a megfelelő szülőpárokat keresztezik egymással, vagy különböző szempontok szerint szelektálják a növényeket. Az ellenálló képességet a szerint csoportosítjuk, hogy a kórokozó megtelepedése, vagy a

betegség kialakulása ellen hat. A horizontális rezisztencia nem specifikus, egy adott kórokozó minden törzse ellen védettséget nyújt. A vertikális rezisztencia specifikus, csak bizonyos törzsekkel szemben érvényesül. A minőségi lokalizált rezisztenciát monogének vagy poligének szabályozzák. A mennyiségi, nem lokalizálódó rezisztencia poligének által szabályozott. A fertőzéssel szembeni ellenállóságot leggyakrabban vad fajokban található gének felhasználásával alakítják ki. A keresztezés során olyan tulajdonságok jelennek meg (vastag kutikula, szőrözöttség), amelyek megakadályozzák a vektorok tevékenységét, vagy a vírus bejutását a növénybe. A túlérzékenységre irányuló nemesítés a növényekben kialakítható hiperszenzitív reakción (HR) alapszik. A HR nyomán a növény helyi nekrozisokkal lokalizálja a fertőzést. A folyamat gyakran a fertőzött levelek lehullásával, amputációjával zárul. Ez a nemesítési irányvonal jellegét tekintve minőségi, és általában egy gén által szabályozott. Eredményességét környezeti tényezők is befolyásolják. Az ellenálló képességnek ezt a típusát gyakran új patotípusok vagy vírustörzsek törik át. A betegséggel szembeni rezisztencia kialakításakor teljes és tartós ellenálló képesség alakul ki a kórokozó valamennyi törzsével szemben. Ez extrém rezisztencia formájában fejeződik ki. Kialakulása a vírus replikációjától és transzlokációjától függ. Általában kevés gén szabályozza. A hiperszenzitivitásra irányuló nemesítés hiányában a toleranciára nemesítés, azaz olyan fajták előállítása kerül előtérbe, amelyek fogékonyak ugyan, de a fertőzésre gyengébb tünetekkel vagy kisebb termésveszteséggel reagálnak. A toleráns fajokban azonban a

kórokozónak lehetősége nyílik a túlélésre, ami egy másodlagos fertőzés forrása lehet (Gáborjányi et al., 1999).

A PPV rezisztens fajták előállítására már régóta nagy erőfeszítéseket tesznek. A kialakított rezisztencia azonban mindig relatív, hiszen a tolerancia és a vírus ellenállóság foka legalább annyira függ a környezeti tényezőktől, mint a vírus állapotától. A vírustüneteket mutató fák aránya évről-évre nő, ezért egyre sürgetőbbé válik az ellenálló változatok felkutatása. Dr. Surányi Dezsővel a ceglédi törzsültetvényben végzett szerológiai levél-, és rügyvizsgálatok alapján (Surányi et al., 1996), gyakran a tünetmentes fák is vírushordozók voltak. Legfogékonyabbnak a Korai Besztercei és a Pozegača fajták mutatkoztak, amelyeknek már rügyeiből is kimutattuk a kórokozót. Az eddig igen ellenállónak tartott Stanley fajta a vizsgálatban fogékony volt. A Bt 1, Bt 2, Monfort és Sermina fajtákon toleranciát figyeltünk meg a fertőzéssel szemben. A vírust tartalmazó levelek ugyanis teljesen tünetmentesek maradtak. Rezisztensnek találtuk az Olaszkek K108 és a Ruth Gestetter fajtákat. További vizsgálatok erősíthetnék csak meg e fajták vírusellenállóságát és a nemesítésben történő felhasználhatóságát.

2.6.2 A genetikailag módosított növények

Több mint tizenöt év telt el azóta, hogy géntechnológiai módszerekkel valamilyen élő szervezetből tetszőlegesen kiválasztott tulajdonságokat hordozó géneket lehet izolálni, amelyeket tetszés szerint lehet egy

másik szervezetbe beépíteni úgy, hogy abban a kívánt tulajdonság megnyilvánuljon és öröklődjön (Balázs és Gáborjányi, 1984). Az ilyen, biotechnológiai módszerekkel létrehozott transzgénikus növények (pl. toleráns vagy rezisztens fajták) előállítása olcsóbb, és kevesebb időt vesz igénybe, mint a hagyományos eljárásokkal nemesített fajtáké (Tepfer és Balázs, 1997). A kórokozók újonnan megjelenő törzsei, biotípusai vagy rasszai azonban így is mindig új kihívást jelentenek a növénynemesítők számára. A genetikailag módosított növények termesztésbe történő bevonása nagy ökológiai kockázattal jár, ezért az összes géntechnológiai tevékenységet, beleértve a fajták engedélyezését törvényekkel kell szabályozni (Balázs, 1997).

A génszabó kutatások fő célja, hogy növényi rezisztenciagéneket építsenek be fogékony fajokba. A szomatikus hibridizáció lehetővé teszi, hogy olyan fajokat keresztezzünk egymással, amelyek ivaros úton nem hibridizálhatók. A hibridizáció során protoplasztokat fuzionálnak egymással, majd az újonnan keletkezett növényeket regenerálják és szelektálják. Általában termesztett növények vad rokonait vagy ezek származékait használják fel. A módszer hátránya, hogy a sejtek egyesítésekor (fúzió) több gén is átkerül a vad fajtából a termesztett növénybe, közöttük gyakran olyanok is, amelyek nem kívánatos tulajdonságokat határoznak meg. Molekuláris genetikai módszerekkel olyan tulajdonságok váltak örökíthetővé, amelyekért egy gén (vagy géncsoport) felelős, így kizárható a kedvezőtlen tulajdonságok bekerülése a termesztett fajtába. A vírusok elleni

védekezés történhet növényi eredetű-, vírus eredetű-, vagy egyéb vírus ellenállóság gének bevitelével. A növényi eredetű rezisztencia gének azonosítását vagy transzpozon mutagenézissel, vagy a gének feltérképezésével végzik. A transzpozonok olyan genetikai elemek, amelyek bizonyos időközönként megváltoztatják helyüket a genomban. Az integrálódott transzpozon hatására a gén elveszíti működőképességét. Az ugráló elemek segítségével mutánsokat állítanak elő, majd a rezisztens növényeket szelektálják. Ezek az elemek véletlenszerűen épülnek be a genomba, és inaktíválják az általunk keresett gént. A térképezésen alapuló génizolálás sokkal gyorsabb módszer. A molekuláris térképeken jellemző DNS szekvenciákat (markerek) tüntetnek fel, és a rezisztencia gének helyét ezekhez a markerekhez viszonyítva határozzák meg. A patogéntől származtatott rezisztencia kialakításakor alkalmazott vírusedetű gének köre napjainkban már rendkívül széles, de alapvetően fehérje, illetve nukleinsav által kiváltott védekezést különböztetünk meg. Az előbbi általában többféle vírus ellen hat, de gyengébb hatékonyságú, utóbbi szűkebb hatásspektrumú, de nagy inokulum tömeg ellen is hatásos (Szilassy et al., 1999). Az előbbi csoportba tartozik a köpenyfehérje génnel indukált vírusrezisztencia. Az első sikeres kísérlet, a dohány mozaik vírus (tobacco mosaic *tobamovirus*, TMV) köpenyfehérje génjének dohánynövényekbe történő beültetése Powel-Abel et al. (1986) nevéhez fűződik. A PPV köpenyfehérje gén beültetésével a PPV-NAT izolátummal szemben Regner et al. (1992), a PPV-D izolátummal szemben Ravelonandro et al. (1993), a PPV-SK68

izolátummal szemben Palkovics et al. (1995) váltott ki először mesterséges rezisztenciát dohánynövényekben (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. tabacum* cv. Xanthi). A növényeknek csak egy része mutatott teljes rezisztenciát. Scorza et al. (1994) a PPV köpenyfehérje génjével szilva szikleveleket transzformált és sikeresen regenerált transzgenikus növényeket. A C-5 vonalat képviselő szilvafa sem vírushordozó levéltetvekkel, sem oltással nem volt fertőzhető (Ravelonandro et al., 1997). Megállapították, hogy ez a transzgen keresztezéssel az utódokba is átvihető (Levy et al. 1998). Wittner et al. (1998) izolálták a PPV-SK68 törzs helikáz génjét, majd az enzim nukleotid-kötő szekvenciáiban mutációt hoztak létre. A mutáns fehérjét kódoló szakaszt növényi expressziós vektorba építették, és ezekkel a génkonstrukciókkal *Nicotiana benthamiana* növényeket transzformáltak. Először indukáltak ilyen módon rezisztenciát egy potyvírus helikáz gén beépítésével. A replikáz génnel létrehozott rezisztenciában nemcsak a replikáz fehérjének, hanem a fehérjét kódoló gén szekvenciáinak is szerepe lehet (Mueller et al., 1995). Guo és García (1997) a PPV vad típusú és mutáns replikáz génjét építette be *N. benthamiana* dohánynövényekbe. A vad típusú gént hordozó növények ellenállóak voltak, azonban magas koncentrációjú inokulummal a rezisztencia könnyen áttörhető volt. A kísérletben használt növényi vonalakat tovább vizsgálták és megállapították, hogy a bennük kialakított rezisztencia mitotikusan stabil a növények oltással vagy *in vitro* regenerációval történő szaporítása után. A vírussal szembeni fogékonyság összefüggött a transzgen lecsendesítésével és a

DNS metilációjával (Guo et al., 1999). A mozgásfehérje génnel indukált rezisztencia során a fertőzés tünetei később, és enyhébb formában jelennek meg. Ezt az ellenállóságot a mozgásfehérjét kódoló gén mutációjával érik el (Malysenko et al., 1993).

A szatellit RNS által közvetített rezisztencia kialakításakor is a tünetek enyhülése következik be. Ezekben az RNS-ekben gyakran történik mutáció, ezért fennáll a veszélye annak, hogy a transzgenikus növényben új, fertőzőbb törzs keletkezik (Harrison, 1992). A defektív interferáló RNS-ek által közvetített rezisztenciát olyan deléciós vírusmutánsok váltják ki, amelyekből a replikációhoz szükséges szekvenciák hiányoznak. Ezek a mutánsok gátolják az ép vírusok replikációját. E génszabási eljárásokat a PPV-ellenállóság molekuláris kialakítására még nem alkalmazták.

A vírusok elleni védekezésben egyéb, vírusokból származó rezisztencia gének is felhasználhatók, többek között értelmetlen (antiszensz) nukleinsavak, antitesteket, vagy ribozimokat kódoló gének.

2.6.3 Agrotechnikai védekezés

A növényvédelem leggazdaságosabb és környezetvédelmi szempontból legmegfelelőbb módja a rezisztens növények termesztése. Az agrotechnikai védekezés csak ezután történik. A gyümölcstermesztés során először figyelembe kell venni a természeti adottságokat. A harmonikus víz-, és tápanyagellátással fokozhatjuk a

növények természetes ellenálló képességét, a növényhigiéné pontos betartásával pedig magasabb terméshozamokat érhetünk el (Gáborjányi, 1998).

A kiskertek, a kereskedelmi ültetvények és a szaporítóanyagot szállító ültetvények fájainak egyre fokozódó fertőzöttsége szükségessé tette a vírusmentes szaporítóanyag ellátás és vírusmentesítési program létrehozását. A vírusmentes szaporítóanyag ellátás egyik feltétele a rendszeres növény-egészségügyi ellenőrzés (különös tekintettel a vírusokra). A törzsfák szabad szemmel végzett vizsgálatát megnehezíti, hogy az őszibarackon a tünetek gyakran alig észrevehetőek, míg a mandula teljesen tünetmentes marad. Gondot jelent az is, hogy a fertőző, eltávolított tövek szomszédságában lévő fák - amelyek még kivágás előtt fertőződtek meg - sokszor csak évekkel később mutatják a betegség jellemző tüneteit (Németh, 1992). Ezeket az egyszerű vizsgálatokat kiegészítik más ellenőrzési módszerekkel is, pl. a PPV-re fogékony csonthéjas gyümölcsfák évente végzett tesztelésével (szabadföldi gyorsteszt).

A stilet-borne (nem-perzisztens) vírusoknál - így a PPV-nél is - nagy hangsúlyt kell fektetni a betegséget terjesztő vektorok rajzásának vagy nagy tömegben történő berepülésének megakadályozására. A vektor populáció egyedszámának szabályozására hasznos parazita- vagy predátorszervezeteket is alkalmazhatunk. Az ültetvények telepítésekor a lehetőségek szerint be kell tartani az izolációs távolságot a vektorok betelepítése miatt. A repülési távolságokhoz képest viszonylag hosszú vírusmegőrzési idő (legalább 60 perc) miatt azonban az

izolációs távolság növelése (1000 m) sem jelenthet teljes biztonságot. A nem-perzisztens vírusok esetében a fertőződés inkább inkompatibilis növényekkel borított környezetben akadályozható meg (Jenser, 1989). Ha a megóvni kívánt csemetéket más kultúrába ültetjük (elbújtatjuk), viszonylag hosszú ideig megőrizhetjük a fák vírusmentességét. A levéltetvek ellen hatásosnak bizonyultak még a tükröző felülettel rendelkező, különböző színű fóliacsíkok. A sorok közé helyezett gyűrődésmentes műanyag fóliacsíkok riasztó (repellens) hatásúak (Basky, 1983). A reflektív felületek repellens hatásán alapuló vírushatás csökkentés – az eljárás költségessége miatt – csak olyan kultúrákban indokolt, ahol a vektortevékenység az egész vegetációs idő alatt intenzív.

2.6.4 Kémiai védekezés

A vírusok azon természetéből adódóan, hogy a kórokozó és az általa megfertőzött sejt biológiai egységet alkot, a már kialakult betegséget jelenlegi ismereteink szerint gyógyítani nem tudjuk. A gombás és baktériumos betegségek ezzel szemben kémiai úton elvileg leküzdhetők. A természetben azonban vannak olyan vegyületek, amelyek a növény felszínén módosítják a vírushatás hatékonyságát, vagy a növény belsejében a vírus *in vivo* szintézisét befolyásolják. A vírushatás *in vitro* gátló anyagai közé olyan inhibitorok tartoznak, amelyek irreverzibilis inaktiválással vagy denaturálással gátolják a fertőzési folyamatot. Ezek fenol, fitoalexin, és különböző

enzimcsoportok vegyületei. Az *in vivo* inhibitorok a fertőzési folyamatot reverzibilisen befolyásolják anélkül, hogy a vírust elpusztítanák. Ilyenek a juvenilitás és a szenescencia hormonjai. A vírus bioszintézisét *in vivo* gátló anyagok közvetlenül, irreverzibilisen blokkolják a replikációt. E csoportba többek között nukleinsav analógok, aminosavak, fajlagos fehérjék, antibiotikumok tartoznak. Hatásuk a fertőzés folyamatát nem érinti (Gáborjányi és Tóbiás, 1986a). A vírusbetegségek kémiai anyagokkal történő leküzdése természetes és mesterséges úton valósulhat meg. Ismertek olyan indukált antivirális vegyületek, amelyek a vírusfertőzés vagy más stressz hatására fejlődnek ki a növényben. Ezek a természetes anyagok a rezisztencia előfaktorainak tekinthetők: a vírusreplikációt aktívan gátolják („b”-protein), illetve a növény betegség ellenállóságát fokozzák (poliakrilsav, szalicilsav, benzoésav). Az alkalmazott antivirális anyagok a vírusreplikációt aktív módon visszaszorító mesterséges vegyületek, amelyek megakadályozzák a vírusok elterjedését a növényben, gátolják a vírustünetek megjelenését, és a termés kiesést megszüntetik a gazdanövény jelentősebb károsodása nélkül. Ezek a kemoterápiás szerek főleg nukleinsav származékok, tiokarbamidok, ureák, guanidinek és glicero-foszfokolinok (Gáborjányi és Tóbiás, 1986b). Számos olyan természetes, majd mesterséges kémiai anyag hatását vizsgálták, amelyek a növényeket ért első fertőzés következményeként kialakult szisztémikus szerzett rezisztencia (SAR) elindítói lehetnek. A szintetikus vegyületek közül fontos a szalicilsavhoz hasonló szerkezetű és hatású, 1,2,3-

benzotiadiazol-7-trikarboxi-S-metilészter (BTH) hatóanyagú BionTM. A szalicilsavhoz hasonlóan a BionTM-t is eredményesen alkalmazták egyes vírusok, baktériumok, illetve gombák elleni kémiai növényvédelemben (Kálmán és Gáborjányi, 1998).

A gyakorlatban a szilvahimlő vírus elleni vegyszeres védekezés leginkább a vírusterjesztő levéltetvek számának csökkentésére korlátozódik, mert a fa éveken keresztül áll ugyanazon a helyen, a levéltetvek mozgásától függően szinte egész évben fertőződhet. Az infekciós nyomás rendkívül nagy, hiszen alig találni olyan ültetvényt, amelyben, vagy amelynek közelében ne lenne PPV-vel fertőzött fás-, vagy lágyszárú növény. A levéltetvek ellen alkalmazott szerves foszforsavészter vagy foszfamidon hatóanyagú inszekticidek a hozzájuk fűzött reményeket nem váltották be (Jenser, 1989). A nyári olajok alkalmasnak bizonyultak ugyan csonthéjas ültetvényekben, valamint *Prunus* faiskolákban a fertőzés visszaszorítására, de annak biztonságos megakadályozására nem voltak elegendőek (Jenser, 1989; Migliori et al., 1998). Az olajos kezelések hatására 67-83 %-kal csökkenhet a vírushatásos fertőzöttség százaléka zöltség kultúrában (Basky, 1984b).

2.6.5 Integrált védekezési módszerek

A gyakorlatban a rezisztenciára nemesítést, az agrotechnikai, a biológiai és a kémiai védekezést soha sem önmagukban alkalmazzuk (Gáborjányi, 1986), hanem ezek okszerű kombinációja, az integrált

védekezés valósul meg. Az integrált védekezési technológia mindig szem előtt tartja a környezet megóvását. A szilvahimlő vírus esetében is az a legfontosabb, hogy a növény genetikai állományában rejlő adottságokat kihasználjuk. Az országban kiváló húsa és zamata miatt a vírusra legérzékenyebb Besztercei szilva fajtakör a legelterjedtebb. A gyümölcshullás mértéke azonban egyes helyeken eléri a 100 %-ot (Szabó et al., 1991). Ez indokoltá tette, hogy a nemesítésbe és a termesztésbe más, kevésbé fogékony, ugyanakkor kevésbé ízletes fajtákat (pl. Stanley) is bevonjanak. Már léteznek génszűréses úton előállított PPV rezisztens szilva klónok, ezek azonban még nincsenek kereskedelmi forgalomban. A transzformált növényekbe a vírus köpenyfehérje génjét (Regner et al., 1992; Ravelonandro et al., 1993; Scorza et al., 1994; Palkovics et al., 1995; Ravelonandro et al., 1997), vagy helikáz génjét (Wittner et al., 1998) ültették be. Ha a vírusellenálló fajták ültetésével a betegséget megelőzni nem tudjuk, meg kell akadályoznunk a vírus továbbterjedését. Ezt elsősorban agrotechnikai eszközökkel tesszük. Ha vírusmentes szaporítóanyagból indulunk ki, és az állományt rendszeresen ellenőrizzük, a fertőzött töveket eltávolítjuk, akkor már „csak” a vírusterjesztő levéltetvek betelepítését kell meggátolnunk. A megvédeni kívánt növényeket olyan környezetbe helyezzük, ahol a rovarok nehezen találják meg (eltakarjuk, izoláljuk), vagy elriasztjuk a levéltetveket a növények közeléből (fóliacsíkok, olajos lemosás). Az integrált védekezésnél a kémiai szerek alkalmazása, vagyis a vektorok elpusztítása elkerülhetetlen. Ügyelni kell a készítmények helyes megválasztására,

és a megfelelő időben történő kijuttatásra, ezzel is csökkentve a környezet terhelését.

Munkánkkal a kórokozó leküzdéséhez, a vírus elleni okszerű, környezetkímélő védekezés kidolgozásához kívántunk hozzájárulni, speciális feladatok megoldásával.

A cél érdekében a következő feladatokat tűztük ki:

1. Különböző csapdázási módszerekkel befogjuk és jellemezzük a Magyarországon előforduló leggyakoribb levéltetű fajokat. A rovarok befogására többféle földrajzi területet választunk, hogy az országban belüli éghajlati eltérések ne befolyásolják az eredményeket. Megállapítjuk a különböző csapdázási módszerek gyakorlati alkalmazhatóságát.
2. Több éven keresztül áprilistól októberig figyelemmel kísérjük a leggyakoribb fajok egyedszám változásait. A rajzásdinamikai felmérésekkel egyidőben vizsgáljuk a természetes fertőződés idejét fogónövények kihelyezésével. Meghatározzuk mely levéltetű fajok játszhatnak fontos szerepet a PPV terjesztésében. Az egyes vektor fajok átviteli képességét, aktivitását, az átviteli százalékok alapján, pontosan meghatározzuk. Az egyedszám és az átviteli százalékok ismeretében megállapítjuk a fajok vektor-tevékenységének hatékonyságát.
3. Izolátumokat gyűjtünk az ország valamennyi földrajzi tájegységéről. A begyűjtött izolátumok segítségével áttekintjük a vírus gazdanövénykörét. Megvizsgáljuk, hogy az Európában előforduló törzsek közül melyek találhatók meg hazánkban.

Biotesztekkel megkíséreljük az irodalomból ismert törzsek elkülönítését.

4. A hazánkban előforduló törzsek jelenlétét szerológiai módszerekkel is kimutatjuk. A szerológiai vizsgálatokba molekuláris módszereket is bevonunk. Tisztázzuk a hazai és a külföldi izolátumok, törzsek rokonsági viszonyait. Megállapítjuk a vírus izolátumok osztályozhatóságának mértékét.
5. Lehetőség szerint szabadföldön teszteljük a külföldön molekuláris géntechnológiával előállított transzformált szilva növények vírusellenállóságát.

3 ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 A levéltetvek rajzásának megfigyelési lehetőségei

A levéltetvek száma, a vektortevékenység intenzitása, és a növények vírusfertőzöttsége közötti összefüggéseket a szilvahimlő vírus esetében már korábban is vizsgálták (Basky és Gáborjányi, 1994; Migliori et al., 1998). Saját vizsgálatainkat a vírusterjesztő levéltetvek rajzó egyedszámának felméréseivel kezdtük különböző ökológiai adottságú területeken Rothamsted típusú szívócsapda, valamint Moericke-féle sárgatálás adatok alapján.

3.1.1 A szívócsapda módszer

A szárnyas levéltetvek rajzását Rothamsted típusú szívócsapdával követtük nyomon Szolnokon (16. ábra), 1993 és 1996 között, a májustól szeptemberig terjedő időszakban. Magyarországon ebben az időben csak a Szolnoki Talajvédelmi és Növényegészségügyi Állomás rendelkezett ilyen készülékkel. Ez a csapda típus óránként 3000 m^3 levegőt szív be, 12,2 m magasságból. Ez az a magasság, amelyen a távolsági repülés során a levéltetvek nagyobb hányada repül. A szívócsapda által gyűjtött rovarokat naponta ürítettük, jól zárható üvegekben 75%-os alkoholban tároltuk, és a fajokat sztereomikroszkóp alatt Taylor et al. (1969), Taylor (1974, 1980), és Basky (1993) határozókulcsai segítségével meghatároztuk.

16. ábra. A szolnoki szívócsapda

3.1.2 A sárgatál módszer

A Moericke-féle (Moericke, 1955) sárgatálás módszer egyszerűsége miatt még ma is széles körben elterjedt. A sárga szín nem egyforma intenzitással vonzza a különböző fajokat. A fogási eredmények sokkal inkább a fajok sárga színre adott reakcióit tükrözik (Basky és Benyák, 1993). A sárgatálakat 1995-ben helyeztük ki Keszthelyen a Kertészeti Tanszék gyümölcsösében és Kabán egy burgonyatábla mellé. Keszthely klímája csapadékos, az éves hőmérséklet ingadozás kisebb, mint az alföldi (Kaba) száraz területeken. A két különböző kultúrában elhelyezett tálcspadákkal átfogóbb képet kaphattunk a májustól októberig tartó rajzási viszonyokról. A csapdákat hetente kétszer ürítettük, a szárnyas levéltetű egyedeket kiválogattuk, 75 %-os alkoholban konzerváltuk, és Basky (1984a, 1993) határozókulcsai segítségével meghatároztuk.

3.2 A természetes fertőződés tesztelése indikátor növényekkel

A természetes fertőződés időtartamának megállapítását a szívócsapdás és a sárgatálás vizsgálatokkal egyidőben végeztük. A szárnyas levéltetvek rajzási görbéit a kihelyezett fogónövények vírusfertőződésével vetettük össze. Ezáltal megállapíthattuk, mely levéltetű fajoknak van szerepe a vírus terjedésében. 1993 és 1996 között, májustól augusztus végéig Karcagon, egy elhagyott, myrobalan alanyon álló, PPV-vel erősen fertőzött Besztercei szilva ültetvényben

17. ábra. *Prunus persica* cv. GF 305 (őszibarack) és *Nicotiana clevelandii* (dohány) fogónövények (Foto: Basky Zsuzsa)

kezdetben 25 db *Nicotiana clevelandii* dohánynövényt, később 25 db *Prunus persica* cv. GF 305 (őszibarack) magoncot és 10 db *Nicotiana clevelandii* dohánynövényt helyeztünk ki egyhetes időtartamra (17. ábra). A fogó- és indikátor növényeket egy hétig tartottuk természetes környezetben (expozíció), azután vektormentes üvegházba kerültek. Két-három hónap múlva, a vírustünetek megjelenésekor DAS-ELISA szerológiai vizsgálattal mutattuk ki az indikátor növények fertőzöttségét.

3.3 Vírusátvitel levéltetvekkel

Az egyes levéltetű fajok vírusátviteli képességéről konkrét vizsgálatokban kell meggyőződnünk. Ezek a felmérések alkalmasak az átvitel aktivitásának megállapítására, a vírusátviteli képesség pontos, százalékban kifejezett meghatározására. A nem-perzisztens vírusok átvitele levéltetvekkel viszonylag egyszerű, mert 2-3 perces próbaszívás elegendő ahhoz, hogy a parenchimában lévő vírus a rovar szipókáján megtapadjon. Először 100 db levéltetvet Petri-csészébe gyűjtöttünk. Két óras éheztetés után a rovarok 5 percig táplálkozhattak a forrásnövényen. Forrásként mindig egy PPV-vel fertőzött lágyszárú vagy fás szárú növény levelét vagy hajtását használtuk. Ezután a szárnyatlan, még szárnykezdeménnyel sem rendelkező egyedeket ecsettel áthelyeztük a fogadó (akceptor) növényekre. Az akceptor növény minden esetben 10 db *Prunus persica* cv. GF 305 magonc volt. A próbaszívás alatt szipókába került virionok tették lehetővé,

hogy olyan vektor fajokat is tesztelhessünk, amelyeknek egyébként nem tápnövénye a dohány, vagy a csonthéjas gyümölcsfa levele (3. táblázat). Két nap elteltével a megmaradt példányokat pirimikarb hatóanyagú Pirimor 50D-vel permeteztük, és az akceptor növényeket üvegházba szállítottuk. Az átvitel eredményességét a 2-3 hónapos inkubációs idő letelte után DAS-ELISA szerológiai módszerrel teszteltük. A vizsgált levéltetű faj átviteli aktivitása attól függött, hogy a 10 db magoncból hány fertőződött.

3.4 Vírusfenntartás

A vírus-vektor kapcsolatok tanulmányozása szempontjából lényeges, hogy ne csak a vektor (tápnövénykör, rajzásdinamika, átvivő képesség), hanem a vírus tulajdonságait is (gazdanövénykör, átvihetőség, patológiai, szerológiai különbözőség) megismerjük. Az alapos vizsgálatok feltétele, hogy a kórokozót vektormentes környezetben, üvegházi körülmények között, az egyes izolátumokat egymástól elkülönítve, az erre alkalmas tesztnövényeken fenntartsuk. Kísérleteinkben csonthéjas gyümölcsfákról (*Prunus domestica*, *P. cerasifera*, *P. persica*, *P. amygdalus*) származó fertőzött ágreszeket, lágyszárú gyomok (pl. *Datura stramonium*), illetve egy félcserje (*Lycium halimifolium*) tünetes leveleit gyűjtöttük. Az izolátumok (közel 100 db) az ország legkülönbözőbb pontjairól származtak. A beteg növények présnedvével *Nicotiana benthamiana* dohánynövényeket fertőztünk. A lágyszárú növényekről történő inokulálásnál 67 mM-os Sørensen-féle foszfátpuffert (pH 7,0) használtunk. A fás szárú növényekről történő mechanikai átviteleknél az inhibitorok jelenléte miatt a 67 mM-os foszfátpufferbe (pH 7,0) aktív szenet (1 mg/ml) és 3% PEG 6000 oldatot kevertünk. A sikeresen inokulált dohánylevelek szövetnedvével, *Chenopodium foetidum* tesztnövényeken, egyléziós kultúrákat hoztunk létre. Erre azért volt szükség, mert a gyűjtött növények más vírusokkal, vagy ugyanazon vírus eltérő törzseivel is fertőzöttek lehetnek. Ha egyetlen lézióból indulunk ki, biztosan egységes, biológiailag tiszta vírus

populációt kapunk. Ezzel további munkánkat könnyítjük meg. Az egy lézióból elindított törzsizolátumokat *N. benthamiana* és *N. clevelandii* tesztnövényeken tartottuk fenn.

3.5 Biotesztek

A hazai izolátumok tünettani és patológiai rendkívül változatos képet mutattak, ezért szükségesnek láttuk az izolátumok tesztnövényeken történő vizsgálatát. A nagyfokú változatosság miatt feltételeztük, hogy Magyarországon a már korábban leírt M törzsön (SK68 jelű magyar izolátum) kívül más törzsek is jelen vannak. A begyűjtött, közel 100 db PPV izolátumból üvegházi körülmények között törzsizolátumokat hoztunk létre. A törzsizolátumok segítségével a kórokozó gazdanövénykörét, a hazánkban megtalálható törzseket, és a törzsek előfordulásának gyakoriságát kívántuk elsősorban meghatározni. Kerlan és Dunez (1979) agargél-diffúziós vizsgálatai alapján az izolátumok közül 15 jellemzőt választottunk ki (4. táblázat).

Az izolátumok jellemzéséhez a következő, a PPV indikátor növényekét számontartott fajokat használtuk: *Ammi majus* L. (AMIMA), *Chenopodium amaranthicolor* Coste et Reyn. (CHEAM), *C. foetidum* Schrad. (CHEFO), *C. murale* L. (CHEMU), *C. quinoa* Willd. (CHEQ), *Nicandra physaloides* Domin (NICPH), *Nicotiana benthamiana* Gray (NIOBE), *N. clevelandii* Gray (NIOCL). A lágyszárúakra vonatkozó, későbbiekben is használt rövidítések

Horváth (1993a, b) munkájából származnak. Az indikátor növényeket üvegházi körülmények között, mechanikai inokulációval fertőztük meg. A növényi mintákat 1:2,5 arányban hígítottuk Sørensen-féle foszfát pufferben (67mM, pH 7,0). A tünetmentes növényeket DAS-ELISA rendszerben ellenőriztük.

4. táblázat. A szilvahimlő vírus izolátumok eredete

Jelölés	Gyűjtés helye	Gazdanövény
Lh1	Nagymaros	<i>Lycium halimifolium</i> Mill.
Pa1	Becehegy	<i>Prunus amygdalus</i> Batch.
Pc12	Keszthely	<i>Prunus cerasifera</i> Ehr.
Pc13	Budapest	<i>Prunus cerasifera</i> Ehr.
Pd3	Fehérgyarmat	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd4	Fehérgyarmat	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd7	Fehérgyarmat	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd9	Újfehértó	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd11	Budapest	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd 14	Becehegy	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd15	Borsod	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd16	Borsod	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd17	Kisar	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd20	Karcag	<i>Prunus domestica</i> L.
Ra*	Čačac	<i>Prunus domestica</i> L.

* Ranković izolátum (D szerotípus), összehasonlító homológ antitest.

3.6 Szerológiai vizsgálatok

A biotesztek sokkal érzékenyebbek a szerológiai eljárásoknál, mégsem elegendő, ha ezeket a tesztek csak önmagukban alkalmazzuk. A tesztnövényes vizsgálatokat mindig ki kell egészíteni egyéb, megbízható módszerekkel. Az ország különböző helyeiről begyűjtött, csonthéjas gyümölcsfákról, valamint lágyszárú gyomnövényekről származó izolátumok szerológiai hovatartozását először agargél-diffúziós módszerrel állapítottuk meg (Kerlan és Dunez, 1979). Az agarózgél diffúziós vizsgálatban D típusú poliklón antiszérumot használtunk, amely alapján ki tudtuk választani azokat az izolátumokat, amelyek hűen reprezentálják a magyarországi viszonyokat. A kezdeti (tájékozódás jellegű) felméréseket az ELISA vizsgálatok követték, amelynek két változatát alkalmaztuk. Először a „dupla antitest szendvics” (DAS-ELISA) módszerrel kimutattuk a vírus jelenlétét az izolátumokból, majd ennek az eljárásnak az indirekt formájával (IDAS-ELISA) elkülönítettük a különböző típusokat.

3.6.1 DAS-ELISA

A kiválasztott PPV izolátumok ELISA vizsgálata poliklón antiszérummal kezdődött, kettős rendszerben (*double antibody sandwich - enzyme linked immunosorbent assay*, DAS-ELISA), Clark és Adams (1977) leírása alapján. A poliklón antiszérumot Tóbiás és Papp (1991) állították elő Ranković D típusú összehasonlító

izolátumával szemben. A vizsgálatokhoz torna peroxidázt használtunk, a színreakciókat 492 nm hullámhosszon értékeltük Labsystems Multiskan RC fotométeren. Pozitív reakciónak tekintettük azokat az extinció értékeket, amelyek meghaladták a negatív kontroll (egészséges növény) értékeinek háromszorosát.

3.6.2 IDAS-ELISA

A monoklon ellenanyagokat indirekt ELISA rendszerben (*indirect double antibody sandwich - enzyme linked immunosorbent assay*, IDAS-ELISA) használtuk fel Converse és Martin (1993) szerint *Streptococcus aureus* Protein A konjugátummal. A monoklon antiszérumok a PPV 5.15 számú, D típusú, Spanyol izolátummal szemben készültek López-Moya és López-Abella szívessége folytán, a köpenyfehérje belső (3C6 1,5 mg/ml), középső (4DG11 1,3 mg/ml) és külső (1EB6 1,3 mg/ml) szekvenciáinak megfelelően (López-Moya et al., 1994a, b). Az eredmények értékelése hasonló volt a DAS-ELISA módszernél leírtakkal.

3.7 Molekuláris virológiai vizsgálatok

A napjainkban alkalmazott molekuláris technikák lehetővé teszik, hogy az eltérő izolátumokat egymástól törzsi szinten is elkülönítsük. Ha összevetjük az enzimátikus hasítások és a szerológiai reakciók eredményeit, nagy biztonsággal csoportosíthatjuk szerotípusuk alapján az izolátumokat. A molekuláris eljárások alkalmasak a genom jellemző szakaszainak részletes, nukleinsav szintű elemzésére is.

A 15 kiválasztott PPV izolátumot továbbiakkal egészítettük ki (5. táblázat), így még gazdagabb és még reprezentatívabb lett a jellemezni kívánt izolátumok köre. A Dr. Németh Mária által gyűjtött, valamint Palkovics et al. (1993) által molekulárisan jellemzett SK68 jelű izolátumot azért vontuk be a molekuláris virológiai vizsgálatokba, hogy az atipikus vagy meg nem határozott izolátumokkal összehasonlíthassuk.

5. táblázat. A molekuláris virológiai vizsgálatokban használt szilvahimlő vírus izolátumok eredete

Jelölés	Gyűjtés helye	Gazdanövény
Ds1	Cegléd	<i>Datura stramonium</i> L.
Lh1	Nagymaros	<i>Lycium halimifolium</i> Mill.
Pa1	Becehegy	<i>Prunus amygdalus</i> Batch.
Pc12	Keszthely	<i>Prunus cerasifera</i> Ehr.
Pc13	Budapest	<i>Prunus cerasifera</i> Ehr.
Pd3	Fehérgyarmat	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd4	Fehérgyarmat	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd7	Fehérgyarmat	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd9	Újfehértó	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd11	Budapest	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd 14	Becehegy	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd15	Borsod	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd16	Borsod	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd17	Kisar	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd20	Karcag	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd30	Nagymaros	<i>Prunus domestica</i> L.
Pd31	Nagymaros	<i>Prunus domestica</i> L.
Ra*	Čačac	<i>Prunus domestica</i> L.
SK68**	Érd	<i>Prunus domestica</i> L.

* Ranković izolátum (D szerotípus), összehasonlító homológ antitest.

** M szerotípusba tartozó izolátum, összehasonlító homológ antitest.

3.7.1 Vírustisztítás

A különféle tisztítási eljárásokkal nagy mennyiségű, biológiailag tiszta anyagot lehet előállítani. A virionokat Lain et al. (1988) módszerével különítettük el a többi növényi sejtalkotótól. A műveletet a vírus fogékony növényben történő felszaporításával kezdtük. Erre a célra olyan gazdanövényt választottunk (*Nicotiana clevelandii*), amelyben a lehető legnagyobb víruskoncentráció érhető el. Két héttel a mechanikai inokulációt követően kezdtük el a feltárást, amelyet az oxidációs folyamatok visszaszorítása érdekében mindig alacsony hőmérsékleten végzünk. A virionok növényi szövetből történő kivonására citromsavas foszfátpuffert (0,18 M) és kloroformot használtunk. A feltárt virionokat alacsony fordulatszámú centrifugálással választottuk el más sejtalkotóelemektől. A szennyeződésektől mentesített szövetnedv nagy hígításban tartalmazta a virionokat. Ezután többszöri ultracentrifugálással és visszaoldással tisztítottuk a csapadékot, a virionokat a növényi fehérjéktől elkülönítettük, végül 28 %-os cukorsűrűség-grádiensre rétegeztük. Ez a sűrű oldat Na-borát puffert és cukrot tartalmaz. A kilendülőfejes centrifugában a nukleinsavak ülepedési állandójuknak megfelelően, azonos magasságban helyezkednek el. A kívánt réteget eltávolítottuk, majd a tömény cukoroldatból újbóli ultracentrifugálással ülepitettük a virionokat.

3.7.2 Össz-nukleinsav kivonás

A gazdanövény sejtjeinek roncsolását, és belőlük a nukleinsavak kivonását White és Kaper (1989) szerint is végezhetjük. Az RNS vírusok sérülékenysége miatt hűtött eszközöket használtunk. A beteg dohánynövények (*Nicotiana benthamiana*) sejtalkotóit fenolos kicsapással, majd a szennyezőanyagokat kloroformmal távolítottuk el. Utolsó lépésként a növényben található összes nukleinsavat abszolút alkohollal kivontuk.

3.7.3 DNS másolat (cDNS) készítése

A fertőzött növényekből kivont össz-nukleinsavból vagy a tisztított vírus szuszpenzióból kiindulva, a megfelelő indító szekvenciákkal olyan DNS másolatokat hoztunk létre, amelyek egyik szála komplementer a vírus nukleinsav nukleotidjaival. A cDNS-eket Amersham cDNS kit felhasználásával, a gyártó utasításait követve készítettük. A kit tartalmazta a reverz transzkripcióhoz szükséges nukleotidokat, enzimeket, és reverz-transzkriptáz puffert.

3.7.4 Polimeráz láncreakció (PCR)

A vírus-köpenyfehérjén található az az aminosav szakaszok (epitópok), amelyek a vírus szerológiai tulajdonságaiért felelősek. A szerotípusok elkülönítéséhez ezért azokat a DNS másolatokat

szaporítottuk fel, amelyek a köpenyfehérjét kódolják. A polimeráz láncreakció (*polymerase chain reaction*, PCR) „Perkin Elmer” készüléken történt. A reakcióelegy tartalmazta a cDNS-t, a plazmidot (Bluescript[®] II SK+), a köpenyfehérje-gén kiemeléséhez szükséges foszforilált oligo-nukleotidokat (unipoty, PPV-CP4), a gyártó (Promega) által összeállított puffert és a hőstabil Taq polimeráz enzimet. A kívánt DNS szakasz sokszorosítása három fázisban zajlott: a DNS denaturálását (a másodlagos szerkezet fellazítását) 94 C°-on 15 másodpercig, a két szál szétválasztását (anellálás) 55 C°-on 30 másodpercig, a sokszorosítást (polimerizáció) 72 C°-on 2 percig végeztük. Ezt a műveletsort 35-ször ismételtük. A PCR termékeket fenol-kloroformmal extraháltuk, majd a DNS-t etanollal kicsaptuk.

3.7.5 A DNS hasítása restrikciós endonukleázokkal

A polimerizációval felszaporított nukleinsavakat olyan restrikciós endonukleázokkal [AluI (Promega), DraI (Appligene), RsaI (Promega), Csp45I (SfuI)(Promega)] hasítottuk, amelyek csak a D-szerotípusba tartozó specifikus szakaszokat ismerik fel (Wetzel et al., 1991b). Az enzimek működéséhez a 20-22 C° volt a legkedvezőbb.

3.7.6 Agarózgél-elektroforézis

A hasítás után keletkezett DNS-fragmentumokat 1 %-os agarózgélen elektroforézissel (*restriction fragment length polymorphisms*, RFLP)

választottuk el. A gélben a molekulák mozgásának irányát (negatívától a pozitív felé) az elektromos tér töltése, gyorsaságát pedig a molekula mérete határozta meg. Az egyes fragmentek fluoreszcens festék (etidium-bromid) hatására, UV fényben láthatóvá váltak.

3.7.7 Southern-blot hibridizáció

Az RFLP-vel elválasztott PCR termékeket Amersham Hybon-nylon membránra rögzítettük, majd UV fényel irreverzibilisen a membránhoz kötöttük. A Southern hibridizációhoz szükséges próba a T7 quick prime QP (Pharmacia Biotech) kit felhasználásával készült. A ^{32}P izotóppal jelölt próba hibridizálását a membránhoz kötött nukleinsavval Sambrook et al. (1989) szerint végeztük. Az inkubáció alatt az izotóppal jelölt specifikus DNS-próba a komplementer nukleinsavrészekhez kapcsolódik. A nukleinsavrészek közötti specifikus kötések létrejöttét röntgenfilmen tettük láthatóvá.

3.7.8 A köpenyfehérje gén izolálása

A köpenyfehérje-gén nukleinsav szintű elemzéséhez (szekvenálásához) nagy mennyiségű PCR-termékre (cDNS-re) volt szükség. A köpenyfehérje-gént agarózgélből izoláltuk úgy, hogy a megfelelő PCR fragmentumot (insert) az agarózgélből „Whatman DE81” papírlapba futtattuk, majd abból pufferrel [20 mM Tris, 1 mM EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), 5 M NaCl] kimostuk. Az így

kapott tiszta insertet baktérium sejtéből származó, ampicillin rezisztencia gént hordozó [Bluescript[®] II SK+: *Amp^r* (Stratagene Inc.)] plazmidba kapsoltuk.

3.7.9 A plazmid és a genomról készült cDNS összekapcsolódása

A DNS szakasz plazmidba kapcsolásához (ligálás) szükség volt az inserten kívül egy defoszforilált Bluescript II SK+ plazmidra, melyet az EcoRV helyen hasítottunk (pBSK+/EcoRV). A defoszforiláció miatt a plazmid nem tudott visszazáródni. A plazmid és a vírusgenomról készült cDNS összekapcsolódása T4 DNS ligázzal (Promega) történt, a gyártó utasításait követve.

3.7.10 A rekombináns plazmid beépítése baktérium sejtbe

A ligálás után a genetikailag megváltoztatott (rekombináns) plazmidot *Escherichia coli* DH5 α (Stratagene Inc.) plazmidmentes baktérium sejtekbe juttattuk. A kompetens sejtek előállítását és a hősokkos transzformálást Sambrook et al. (1989) szerint végeztük. A baktérium sejteket antibiotikumot tartalmazó LB táptalajon növesztettük. Az antibiotikummal kezelt táptalajon csak azok a baktériumok voltak képesek felszaporodni, amelyek ampicillin rezisztencia gént hordoztak. A lemezeket az ún. „blue-white” szelekció segítségével elemeztük. Azok a telepek amelyekben az insert nem épült be a plazmidba, kék színűek. Ezek a telepek számunkra értéktelenek. Azok a telepek,

amelyekben az insert beépülése következtében a plazmidban lévő enzim működésképtelenné válik, fehér színűek. A továbbiakban ezeket a fehér színű telepeket használtuk fel.

3.7.11 A plazmid felszaporítása, klónozás

Az insertet tartalmazó fehér telepeket Sambrook et al. (1989) szerint folyékony LB táptalajba oltottuk. Az *E. coli* baktériumokat 37 C°-os rázógépben rázattuk, így számukra elegendő levegőt biztosítottunk. Egy éjszaka alatt a táptalajban oly mértékben képes a baktérium felszaporodni (klónozás), hogy a bennük lévő vektor plazmidok mennyisége elegendő a további munkához (pl. szekvencia analízis).

3.7.12 A plazmid tisztítása

A vírus-nukleinsavról készült DNS másolatot tartalmazó plazmidot először meg kell szabadítani a táptalajtól és a baktérium sejttől. A vektorok feltárása kétféle módszerrel, hőhatással vagy alkalikus lízissel történhet Sambrook et al. (1989) szerint. A szekvencia analízishez a plazmidot alkalikus lízissel tisztítottuk. A táptalajt alacsony fordulátú centrifugálással távolítottuk el, majd a baktérium sejtfalát lizozimmal roncsoltuk. A szuszpenziót ezután lúgos [0,2 N NaOH és 1 % Na-dodecil-szulfát (SDS)], majd savas (5 M K-acetát és ecetsav) közegbe helyeztük. Ezzel a nemkívánatos sejtalkotókat csaptuk ki az oldatból, majd a maradványokat centrifugálással

eltávolítottuk. A nagyobb tisztaság elérése érdekében az oldott állapotban lévő DNS-eket kétszer koaguláltuk: először abszolút alkohollal, majd 20 %-os PEG 6000 és 2,5 M NaCl elegyével. A polietilén-glikolos (PEG) oldatot előntöttük, végül a megmaradt, nagy tisztaságú üledéket visszaoldottuk. A genomi RNS-ről ártírt DNS-eket ezután már felhasználhattuk a nukleinsav analízishez.

3.7.13 A köpenyfehérje-gén nukleotid sorrendjének meghatározása

A köpenyfehérje gén nukleotid sorrendjét Sambrook et al. (1989) szerint, „Amersham T7 Sequenase version II” szekvenáló kit felhasználásával határoztuk meg, a gyártó utasításait követve. Az analízis során, először a láncterminációs módszerrel elkészült cDNS-t egyszálúvá tettük. Az egyszálú DNS kiegészítő (komplementer) szálának elkészítéséhez a következő oligonukleotid indító szekvenciákat használtuk (Palkovics et al., 1993):

unipoty (szensz): 5'-ggaattccccgcgaa-3'

PPV-CP1 (szensz): 5'-ggctgatgaagaggaagacga-3'

PPV-CP2 (szensz): 5'-ggccaaaccggtcttttgag-3'

PPV-CP3 (szensz): 5'-cgagctccacaatctgttc-3'

PPV-CP4 (antiszensz): 5'-ctacatcagatacaagggcctgtg-3'

PPV-CP5 (antiszensz): 5'-cactacactcccctcacaccgagg-3'

PPV-CP6 (antiszensz): 5'-tgtcaggttgcgctgaattcc-3'

PPV 9347 (szensz): 5'-cctcgccagatacgctttg-3'

PPV 9642 (szensz): 5'-gcatcctttctccgc-3'

A szintézisnél kulcsfontosságú a DNS-polimeráz enzim jelenléte. A ³⁵S-ATP izotóppal jelölt nukleotidokat tartalmazó DNS fragmenteket nagy felbontóképességű, 6 %-os poliakrilamid gélen, LKB 2010 Macrophor Pharmacia szekvenáló berendezésen futtattuk meg, és választottuk el. A szekvencia adatokat „Wisconsin Package Version 9.1 GCG” számítógépes programcsomag segítségével dolgoztuk fel.

4 EREDMÉNYEK

4.1 A vírusterjesztő levéltetvek rajzása

A Magyarországon előforduló levéltetű fajok rajzási viszonyait az országon belüli éghajlati eltérések miatt több helyen, kétféle csapdázási módszerrel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a kétféle gyűjtési módszer között jelentős különbség van. Ez a különbség legszembetűnőbben a levéltetvek számában mutatkozott meg. A szívócsapda által beszívott levegő több ezer rovar befogását tette lehetővé naponta; míg a sárgatálakba csak azok az egyedek kerültek, amelyek véletlenszerűen a csapda felé repültek és érvényesülhetett a sárga szín vonzó hatása. A fontosabb vektor fajokat mindkét csapda típusban felleltük.

4.1.1 Rajzásdinamikai vizsgálatok a szívócsapda módszerrel

A PPV vektoraként számontartott levéltetvek rajzását 1993 és 1996 között, májustól októberig, szívócsapda módszerrel követtük nyomon. 1993-ban a szolnoki csapda legnagyobb egyedszámban a *Hyalopterus pruni* levéltetű fajt fogta (összesen 2668 egyed), rajzáscúcsa június első hetére esett. Egyedszámban ezt az *Aphis craccivora* követte (összesen 1315 egyed), majd a *Brachycaudus helichrysi* (összesen 746 egyed). A *Phorodon humuli*, a *Myzus persicae*, az *Aphis fabae* és a

Brachycaudus cardui fajok egyedszáma a vizsgált hónapokban alacsony maradt (18. ábra).

1994-ben a vektor levéltetvek rajzása már április végén elkezdődött (19. ábra). A szívócsapda ebben az évben a *B. helichrysi* fajt nagyon magas egyedszámban fogta (összesen 3498 egyed), rajzása május második hetében tetőzött (2247 egyed). A *H. pruni* is korábban, május utolsó hetében érte el rajzásának maximumát (414 egyed). A többi vektorfaj egyedszáma ehhez képest jelentéktelen volt. A levéltetvek rajzása korán – a *M. persicae* fajt kivéve -, már júliusban befejeződött, így az általában jellemző második tetőzés elmaradt.

1995-ben a *H. pruni* és az *A. craccivora* fajok egyedeiből határoztunk meg a legtöbbet (összesen 1661 és 892 egyed). A rajzás csúcsa mindkét fajnál június harmadik hetére esett (521 és 462 egyed). Jelentős volt még az *A. fabae* és a *B. helichrysi* előfordulása (összesen 488 és 611 egyed). A rovarok repülése szeptember végéig tartott, de az első tömeges repülést nagyon gyenge második csúcs követte (20. ábra).

1996-ban a szolnoki szívócsapda szerint (21. ábra), az *A. craccivora* 1682 egyedszámával megelőzte a *H. pruni* fajt (1346). Tömeges megjelenésük június utolsó heteiben következett be. A többi faj repülése egészen október elejéig elhúzódott, de egyedszámuk mindvégig 100 alatt maradt.

4.1.2 Rajzásdinamikai vizsgálatok a sárga tálcspadás módszerrel

A vizsgálatok harmadik és negyedik évében a szívócsapdás gyűjtéseket a sárgatálás módszerrel egészítettük ki. Mindkét évben Keszthelyen és Kabán helyeztünk el sárgatálakat. A két területen eltérőek voltak a természeti viszonyok (domborzat, csapadék, hőmérséklet), valamint a tálakat más-más növénykultúrában helyeztük el. Keszthelyen a Kertészeti Tanszék gyümölcsösébe, Kabán egy burgonyatábla mellé tettük a sárgatálakat.

1995-ben Keszthelyen a színes csapdák fajonként kevés egyedet fogtak (22. ábra). A felmérés szerint az *Aphis* fajok aránya volt a legnagyobb (összesen 446 egyed), de a *H. pruni*, a *B. helichrysi* és a *B. cardui* fajok is jelen voltak. Az *Aphis* spp. közül a legjelentősebbek az *A. fabae* (összesen 37 egyed), az *A. craccivora* (összesen 38 egyed), az *A. idaei* (összesen 16 egyed), és az *A. sambuci* (összesen 8 egyed).

Ugyanebben az évben Kabán azt tapasztaltuk, hogy itt a *M. persicae* faj egyedei repültek a legnagyobb számban (23. ábra). Maximális egyedszámát (168 egyed) június legvégén érte el. A többi faj (*B. helichrysi*, *H. pruni*, *A. craccivora*, *A. fabae*, *B. cardui*, *P. humuli*) egyedszáma jóval ez alatt maradt. 1996-ban Keszthelyen is és Kabán is a kihelyezett sárgatálak nagyon kevés levéltetvet fogtak, ami nemcsak a meteorológiai tényezőkre, hanem a módszer hiányosságaira is visszavezethető. A fajok kis egyedszáma miatt, ezeket az adatokat nem ábrázoltuk grafikonon.

4.2 A természetes fertőződés idejének megállapítása

A rajzó egyedek egyedszámának felmérésével egyidőben vizsgáltuk a természetes fertőződés időtartamát fogónövények kihelyezésével. A levéltetű vektorok tevékenységének intenzitását dohánynövényekkel (*Nicotiana clevelandii*), valamint *Prunus persica* cv. GF 305 (őszibarack) magoncokkal teszteltük. Kezdetben 25 db *Nicotiana clevelandii* növényt helyeztünk ki, de ezek sérülékenységük miatt nem bizonyultak megfelelő indikátor növényeknek. Kiszáradtak, elpusztultak az expozíciós idő vége előtt; ha túléltek az egyhetes időtartamot az üvegházban korán előregedtek, és bennük a víruskoncentráció visszaesett. Később 10 darabra csökkentettük a *N. clevelandii* teszt növények számát, de a dohánynövényekkel egyidőben 25 db *Prunus persica* cv. GF 305 (őszibarack) magoncot is kihelyeztünk. Az őszibarack olyan jó jelző növénynek bizonyult, hogy a későbbiekben teljesen elhagytuk a dohánynövények alkalmazását.

1993-ban a vektortevékenység május második hetétől június végéig tartott (24. ábra). A legintenzívebb (20 %) június első hetében volt, ami egybeesik a *H. pruni* rajzásával.

1994-ben a fogónövények fertőzöttségi százaléka hasonló volt az 1993-as évihez, ami azt mutatja, hogy a *H. pruni* fajnak valóban fontos szerepe van a vírus terjedésében.

1995-ben a fogónövények májustól augusztusig fertőződtek (25. ábra). Az infekciós nyomás június végén, július elején érte el maximumát (35 %). Ezt a csúcsot az *A. craccivora* és a *H. pruni* rajzása mindössze

egy héttel előzte meg Szolnokon. A júniusi hirtelen visszaesés azzal magyarázható, hogy a nyári forró, eső nélküli heteket csapadékos napok váltották fel, ami megakadályozta a levéltetvek repülését.

1996-ban a természetes fertőződés időtartama rendkívül rövid volt (26. ábra). Május elején a fogónövények 45 majd 55 %-os fertőzöttségi százalékát követően a vektortevékenység nem volt számottevő.

4.3 Új vektor fajok, és aktivitásuk meghatározása

Következő lépésként meg kellett állapítanunk, mely levéltetű fajok alkalmasak a vírus átvitelére, ezáltal mely fajok játszhatnak fontos szerepet a PPV terjesztésében. Az egyes vektor fajok átviteli aktivitását az átviteli százalékok alapján, pontosan megadtuk. Az egyedszám és az átviteli százalékok ismeretében meghatároztuk a fajok vektor-tevékenységének hatékonyságát. A rajzásdinamikai felmérések adatai és a természetes fertőződés idejének összevetésekor megállapítottuk, hogy 1995-ben július és augusztus hónapokban, valamint 1996 májusában akkor is magas volt a fogónövények fertőzöttségi százaléka, amikor a korábban ismert PPV levéltetű vektorok nem repültek. Ennek alapján feltételeztük, hogy eddig nem vizsgált fajok is szerepet játszhatnak a vírus epidémia kialakításában; átvihetik a kórokozót, és így potenciális vektorok lehetnek. Ezért olyan fajokat is bevontunk a vizsgálatba, amelyek a csonthéjas ültetvényekben előforduló gyomnövényeken, illetve nagy területeken termesztett kultúrnövényeken képeznek népes kolóniákat. 33 különböző levéltetű faj vírusátviteli képességét teszteltük. Az átviteli aktivitását százalékban fejeztük ki (6. 7. táblázat).

6. táblázat. A vektorfajok átviteli aktivitása

Levéltetű fajok	Vírus forrás	Átviteli százalék
<i>Aphis idaei</i> *	<i>Prunus persica</i> cv. GF 305	10
<i>Aphis nasturtii</i> *	<i>Prunus domestica</i>	83
<i>Aphis sambuci</i> *	<i>Nicotiana clevelandii</i>	22
<i>Aphis spiraeophaga</i> *	<i>Prunus persica</i> cv. GF 305	10
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	<i>Prunus domestica</i>	7
<i>Hyalopterus amygdali</i> *	<i>Prunus persica</i>	7
<i>Hyalopterus pruni</i>	<i>Prunus domestica</i>	13
<i>Myzus cerasi</i> *	<i>Prunus domestica</i>	16
<i>Phorodon humuli</i>	<i>Prunus domestica</i>	23
<i>Rhopalosiphum padi</i>	<i>Prunus cerasifera</i>	10
<i>Sitobion avenae</i> *	<i>Prunus cerasifera</i>	10
<i>Sitobion avenae</i> *	<i>Prunus domestica</i>	10
<i>Uroleucon achilleae</i> *	<i>Prunus domestica</i>	83

A *-gal jelölt fajok eddig nem tartoztak a PPV korábban ismert vektorai közé.

7. táblázat. A PPV vektorának nem bizonyuló fajok

Levéltetű fajok	Vírus forrás	Átviteli százalék
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Aphis cirsi-<i>acanthoides</i></i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Aphis craccivora</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i>	0
<i>Aphis cytisorum</i>	<i>Prunus persica</i>	0
<i>Aphis cytisorum</i>	<i>Prunus cerasifera</i>	0
<i>Aphis gossypii</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Aphis nasturtii</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i>	0
<i>Aphis pomi</i>	<i>Prunus cerasifera</i>	0
<i>Aphis pomi</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Aphis rumicis</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Aphis spiraephaga</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i>	0
<i>Callipterinella tuberculata</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Capitophorus elaeagni</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Cavariella theobaldi</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Chaitophorus salicti</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Cryptomyzus ribis</i>	<i>Prunus persica</i>	0
<i>Dysaphis devecta</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Hyperomyzus pallidus</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Macrosiphoniella oblonga</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Macrosiphum rosae</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Myzus cerasi</i> ssp. <i>pruniavium</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Schizaphis graminum</i>	<i>Prunus cerasifera</i>	0
<i>Schizaphis graminum</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Uroleucon cichorii</i>	<i>Prunus domestica</i>	0
<i>Uroleucon sonchi</i>	<i>Prunus domestica</i>	0

A 6. táblázatban csilaggal emeltük ki azokat a fajokat, amelyek újak az eddigi világirodalomban. Az *Aphis idaei*, az *A. nasturtii*, az *A. sambuci*, az *A. spiraephaga*, a *Hyalopterus amygdali*, a *Myzus cerasi*, a *Sitobion avenae*, és az *Uroleucon achilleae* fajokról elsőként állapítottuk meg, hogy szipókájukon hordozva alkalmasak a sarka vírus átvitelére, illetve terjesztésére.

Eredményeink szerint nagyon lényeges a forrásnövény kiválasztása. Különösen igaz ez a *N. clevelandii* tesztnövényekre. Az *Aphis* fajok közül az *A. craccivora* és az *A. spiraephaga* nem vitték át a PPV-t erről a forrásnövényről. Az *A. spiraephaga* újonnan vizsgált faj, a *Prunus persica* cv. GF 305 (őszibarack) magoncok 10 %-áról mutatott átvitelt, míg a *N. clevelandii* növényekről egyáltalán nem. Az *A. craccivora* ismert PPV vektor faj, dohánynövényekről mégsem mutatott átviteli hajlandóságot. Az *A. gossypii* is a PPV vektoraként számoltartott faj, ennek ellenére *P. domestica*-ról mégis 0 %-os átviteli aktivitást ért el. Ebben az esetben a felvételi táplálkozás, vagy a próbaszívás lehetett sikertelen a szilván, vagy a vírus replikációjához nem voltak megfelelőek a körülmények az inkubációs idő alatt az üvegházban. Egy fajon belül tehát változhat az átvitel sikeressége attól függően, milyen forrásnövényre kerültek a levéltetvek.

Az évek során megállapítottuk, hogy a hazai faunában a PPV vektorai közül az *A. craccivora*, a *Brachycaudus helichrysi* és a *Hyalopterus pruni* a leggyakrabban előforduló fajok. A természetes környezetben lévő fogónövények legerősebb fertőződése a fajok közül – az 1996-os évet kivéve – a *H. pruni* rajzáscsúcsával hozható összefüggésbe. A *B.*

helichrysi és a *H. pruni* szilván és más *Prunus* fajokon, míg az *A. craccivora* főképpen pillangósvirágú tápnövényeken képez kolóniákat (Szalay-Marzsó, 1969). A *H. pruni* telepek nyáron elnéptelenednek, a szárnyas nemzedékek ugyanis nádra vándorolnak át (27. 28. ábra). Az *A. craccivora* nem gazdanövényváltós faj, ennek ellenére jelen van a csonthéjas gyümölcsösökben, amit a keszthelyi sárgatálakból is kimutattunk. Ezeknek a jellemzően gyakori fajoknak mindössze 7-10 %-os az átviteli aktivitása az ültetvényekben ritkán előforduló 83 %-os aktivitást mutató *Aphis nasturtii* és *Uroleucon achilleae* fajokhoz képest. Ezért meg kell különböztetnünk minden levéltetű esetében az átvitel aktivitását a vektortevékenység hatékonyságától. Ha a vektorhatékonyságot az egy év alatt szívócsapdába repült, azonos levéltetű egyedek száma, valamint a fajhoz tartozó átviteli százalék szorzatának tekintjük, akkor ezzel az egyszerű elméleti modellel könnyen szemléltethetjük, mekkora jelentősége van egy vektor fajon belül az egyedszámnak. A *B. helichrysi* fajból a szívócsapda 1993-ban összesen 746 egyedet fogott, a faj átviteli aktivitása 7 %-os volt. A *B. helichrysi* vektorhatékonysága az elképzelt modell szerint: $746 \cdot 0,07 = 52,2$ (52%). A vektorhatékonyság szorzata a *P. humuli* és a *H. pruni* vektorok esetében a következőképpen alakul: $291 \cdot 0,23 = 66,9$ (*P. humuli* 67 %), $2668 \cdot 0,13 = 346,8$ (*H. pruni* 347 %). A *H. pruni* faj példája jól mintázza, hogy egy 13 %-os átviteli aktivitást mutató vektor jelentőségét mennyire megnöveli az adott faj tömeges jelenléte. Az *A. nasturtii* és az *U. achilleae* hiába rendelkezik kiváló átviteli adottságokkal (83 %), a vírus terjesztésében mégis sokkal

27. ábra. A *Hyalopterus pruni* tömeges megjelenése szilván

28. ábra. A *Hyalopterus pruni* nyári nemzedéke nádton

eredményesebben, hatékonyabban fognak részt venni az alacsonyabb aktivitással rendelkező, de igen népes fajok.

A vektorológiai vizsgálatok eredményeit röviden áttekintve elmondhatjuk, hogy meghatároztuk a levéltetvek populációinak egyedsűrűségét, megfigyeltük a jellemző fajok (*Aphis fabae*, *A. craccivora*, *Brachycaudus cardui*, *B. helichrysi*, *Hyalopterus pruni*, *Myzus persicae*, *Phorodon humuli*) rajzási viszonyait. Megállapítottuk, hogy hazánkban, a korábban PPV vektorának tartott fajok közül az *A. craccivora*, a *B. helichrysi* és a *H. pruni* a leggyakoribbak. Az átviteli százalékok alapján a legnagyobb vektor aktivitással az *A. nasturtii* és az *U. achilleae* fajok rendelkeznek. Az átviteli aktivitás, valamint az egyedszám változás adatait összevetettük a természetes fertőződés idejével. Az eredmények azt mutatták, hogy azoknak a fajoknak a legnagyobb a vektorhatékonysága, amelyeknek kicsi ugyan a vírusátviteli aktivitása, de folyamatosan és nagyszámban jelen vannak (pl. *H. pruni*). Az okszerű és környezetkímélő növényvédelmi technológiák megválasztásakor ezek az adatok nélkülözhetetlenek. A vegyszeres védekezés tervezését mindig az ültetvény fáin élő, vagy az oda berepülő vektor fajok létszámától kell függővé tenni, de csak abban az esetben kell alkalmazni, amikor a veszélyes fajok migrálnak. Ismernünk kell ehhez a vektorok életmódját, vírusátviteli képességeit, valamint mintavételezésekkel szemmel kell tartanunk a népesség nagyságát és mozgását.

4.4 A PPV törzsek elkülönítése tesztnövény módszerrel

A PPV terjedését nemcsak a vírus és a vektor kapcsolata befolyásolja, hanem a kórokozó fiziko-kémiai és biológiai jellemzői is. A kórokozó tulajdonságait az ország különböző területeiről gyűjtött, jellegzetes tüneteket mutató csonthéjas gyümölcsfákról, illetve vadon termő fás- és lágyszárú növényekről származó izolátumokon tanulmányoztuk.

Korábban már végeztek olyan vizsgálatokat, amelyekben az egyes PPV izolátumokat a vírus kimutatására alkalmas indikátor növényekkel különítették el egymástól (Kerlan és Dunez, 1979). A módszert a szerológiai (agargél-diffúziós) eljárások kiegészítésére használták, mert a növényeken kialakuló tünetek nem adtak módot minden esetben az egyértelmű csoportosíthatóságra. A biotesztek nagyfokú érzékenysége miatt az általunk gyűjtött izolátumok jellemzését olyan tesztnövényekkel kezdtük, amelyeket alkalmasnak gondoltunk az egyes törzsek tünettani elkülönítésére.

A vizsgálatokban használt indikátor növények nagy tüneti változatosságot mutattak (8. táblázat). Az *Ammi majus* (AMIMA) növények a D típusú izolátumokra háromféleképpen reagáltak. Az izolátumok egy részén (Pd3, Pd4, Pd9, Pd17) lokális klorózis alakult ki, másokon (Pa1, Ra) a fertőzés szisztemizálódott (29. ábra), a harmadik csoport az M típusú izolátumokhoz hasonlóan nem fertőzte a növényt. A *Chenopodium quinoa* (CHEQ) tesztnövényeken szisztemikus és lokális tünetek is kialakultak a szerotípustól függetlenül. A *C. foetidum* (CHEFO) növényeket három esetben nem

sikerült fertőzni. Egy esetben (Pd11 izolátum) a sárga törzsre jellemző lokális klorózis, két esetben (Pa1, Ra izolátumok) az intermedier törzsre jellemző tünetek (a klorotikus foltok közepe elhalt) alakultak ki. Ezek az eredmények nem támasztják alá Roy és Smith (1994) vizsgálatait, miszerint Magyarországon csak az ún. sárga törzs fordul elő. A *C. amaranthicolor* (CHEAM) és a *C. murale* (CHEMU) növényeket egyik izolátum sem fertőzte meg. A *Nicandra physaloides* (NICPH) teszt növényeken lokális léziók alakultak ki, egy izolátumnál (Lh1) azonban csak tűszúrásnyi léziókat figyelhettünk meg. A *Nicotiana benthamiana* (NIOBE) és a *N. clevelandii* (NIOCL) az M és a D szerotípusra adott reakciói igen változatosak voltak, de sem jellegükben, sem a tünetek erősségében nem mutattak összefüggést a szerológiai csoportosíthatóságot illetően.

A biotesztek alapján azt tapasztaltuk, hogy a felhasznált teszt növények nem alkalmasak arra, hogy a fertőzés hatására kialakuló tünetek szerint az eltérő szerológiai csoportokat megkülönböztessük egymástól. A Šutić et al. (1971) által bevezetett tünettani csoportosítás (*Chenopodium foetidum* teszt növényen okozott klorotikus, nekrotikus, átmeneti tünetek) nem vezetett el a típusok elkülönítéséhez. Az izolátumok törzsi hovatartozásának vizsgálatát ezért a PPV jellemzésére alkalmasabb ELISA szerológiai tesztekkel, enzimatikus hasításokkal, majd nukleinsav analízissel folytattuk.

8. táblázat. A szilvahimlő vírus izolátumok tünetei tesztnövényeken

Izolátumok	Tesztnövények*					
	AMIMA	CHEFO	CHEQ	NICPH	NIOBE	NIOCL
Lh1	-	-	LCh	PPLL	Df	S,Dw
Pa1	LCh/S	LCh,LL	S	LL	Ch	S
Pc12	-	LL	S	LL	Ch,Df	S
Pc13	-	-	S	LL	Vb	S
Pd3	LCh	LL	LCh	LL	Ch,Df	S
Pd4	LCh	LL	LCh	LL	Vb	-
Pd7	+	LL	S	LL	Ch,Df	S
Pd9	LCh	LL	S	LL	Vb	S
Pd11	-	LCh	S	LL(?)	Vb	S
Pd14	-	LL	LCh	LL	Ch,Df	-
Pd15	-	LL	LCh	LL	?	S
Pd16	-	-	LCh	LL	?	S
Pd17	LCh	LL/S	LCh/S	LL	Vb,Df	S
Pd20	-	LL	LCh	LL	Vb	S
Ra	S	LCh,LL	S(?)	LL	Vb	S

*A tesztnövények rövidítésének magyarázata a szövegben található.

Jelmagyarázat: /: lokális/szisztemikus tünetek; -: tünetmentes, szerológiailag negatív; +: tünetmentes, szerológiailag pozitív (látens); S: szisztemikusan fogékony, mozaikfoltosság (*systemic mosaic*); LL: lokális nekrotikus lézió (*local lesions*); LCh: lokális klorotikus tünetek, lokális klorózis (*local chlorosis*); PP: lokális túszerű pontok (*pinpoint*); Vb: szisztemikus érmelletti mozaik (*vein banding*); Df: torzulás (*deformation*); Dw: törpülés (*dwarfing*); ?: .a tünetek nem kifejezettek.

29. ábra. Az *Ammi majus* tesztnövényen kialakuló szisztémikus tünetek

4.5 A hazai PPV izolátumok szerológiai sokszínűsége

A kiválasztott PPV izolátumok nagy tüneti változatosságot mutattak mind természetes gazdanövényeiken, mind a lágyszárú indikátor növényeken. A sokszínűség alapján feltételeztük, hogy a hazai izolátumok nemcsak patogenitásukban, hanem szerológiailag sem egységesek. A vizsgálatokat DAS-ELISA rendszerben folytattuk, amelyben a Ranković-féle D típusú összehasonlító izolátummal szemben készült poliklón antitesteket használtuk. A poliklón szérum felismerte mindkét szerotípust, a különbségek csak a reakció erősségében mutatkoztak meg (9. táblázat). Az izolátumok csoportosítását a vírus köpenyfehérje különböző epitópjairól készített monoklón antitestek tették lehetővé. A szérumok egy D típusú (5.15 jelű) izolátummal szemben készültek a köpenyfehérje különböző (belső, középső, külső) szakaszainak megfelelően. A köpenyfehérje belső, legkonzervatívabb epitópjaival szemben készített monoklón antitestek az izolátumokkal eltérő érzékenységgel reagáltak. Egy izolátumot (Pd20) nem ismertek fel, ami azt jelenti, hogy ez az izolátum állt szerológiailag a legtávolabbi rokonságban az eredeti D izolátummal. A köpenyfehérje középső szakaszán levő epitópokkal szemben készített monoklón antitestek sem az említett Pd20, sem az Lh1 izolátummal nem adtak értékelhető reakciót. Feltehetően ez a két izolátum az M szerotípust képviseli. A köpenyfehérje külső, legfajlagosabb régióival szemben készített monoklón antitestekkel

kapott eredmények megerősítik a korábbi különbségeket (Pd20, Lh1), ugyanakkor más különbségekre (Pc13, Pd17) is rámutatnak.

Megállapítottuk, hogy a Magyarországon jelenlévő izolátumok szerológiaiailag valóban nem egységesek. Monoklón antitestekkel először sikerült kimutatni, hogy a hazai izolátumok egyik része az M (Marcus), másik része a D (Dideron) törzsbe tartozik. A szerológiai tesztekkel nem tudtuk valamennyi izolátumot egyértelműen csoportosítani, ezért a Pd4, Pd7, Pd14, Pd15 és Pd16 izolátumokat egy átmeneti típusba soroltuk. Az IDAS-ELISA módszer önmagában nem elégséges a szerocsoportok meghatározására.

9. táblázat. A PPV izolátumok szerológiai reakciói

Izolátumok	Antiszérumok			Szerotípus
	Poliklón (PPV-D)	belső (3C6)	Monoklón (PPV 5.15) középső (4DG11) külső (1EB6 1,3)	
Lh1	+	+++	-	M
Pa1	++	+++	+++	D
Pc12	++	++	++	D
Pc13	+	+++	+	M
Pd3	++	+	+++	D
Pd4	+	++	++	?
Pd7	++	+++	+	?
Pd9	+++	+++	+++	D
P11	++	+	+++	D
Pd14	++	++	++	?
Pd15	+++	+++	+++	?
Pd16	++	++	+	?
Pd17	+	+++	+	M
Pd20	+	-	-	M
Ra	+	+	++	D

Poliklón antiszérum extinkciós értékei:

- = 0,000 – 0,024 (a negatív kontroll 3x értéke)

+ = 0,025 – 0,100

++ = 0,101 – 0,150

+++ = 0,151 –

Monoklón antiszérum extinkciós értékei (a köpenyfehérje belső szekvenciáiról):

- = 0,000 – 0,025 (a negatív kontroll 3x értéke)

+ = 0,026 – 0,040

++ = 0,041 – 0,050

+++ = 0,051 –

Monoklón antiszérum extinkciós értékei (a köpenyfehérje középső szekvenciáiról):
- = 0,000 – 0,025 (a negatív kontroll 3x értéke)
+ = 0,026 – 0,040
++ = 0,041 – 0,050
+++ = 0,051 –

Monoklón antiszérum extinkciós értékei (a köpenyfehérje külső szekvenciáiról):
- = 0,000 – 0,024 (a negatív kontroll 3x értéke)
+ = 0,025 – 0,100
++ = 0,101 – 0,150
+++ = 0,151 -

4.6 A szerológiai heterogenitás bizonyítása nukleinsav vizsgálatokkal

A hazai PPV izolátumok szerológiai csoportosítását a köpenyfehérje gén molekuláris vizsgálata alapján pontosítottuk. A PPV izolátumok nukleinsav szintű elemzésével tisztáztuk a kiválasztott sarka izolátumok szerológiai hovatartozását, valamint feltártuk a hazai és az európai izolátumok közötti genetikai azonosságokat és eltéréseket. A Franciaországból érkező, Michael Ravelonandro és munkatársai (INRA) által előállított, transzformált szilva növényeket a karantén hatóságok érthetetlen okokra hivatkozva visszaküldték, ezért a molekuláris géntechnológiával átalakított magoncok vírusellenállóságát nem tudtuk szabadföldön tesztelni.

4.6.1 A PCR termékek összehasonlító vizsgálata

A jellemző izolátumok (5. táblázat) köpenyfehérje génjét kétlépcsős RT-PCR technikával szaporítottuk fel, majd olyan restriktációs

endonukleázokkal hasítottuk, amelyek csak a D szerotípusba tartozó nukleinsavakat ismerik fel. Az izolátumok köpenyfehérje génjének DraI enzimmel történő hasítását a 30. ábra mutatja. Ott, ahol a hasítás megtörtént két fragmentum (hasítási termék) látható (Pd3, Pc12). Ezek az izolátumok a D szerocsoportba tartoznak. A Pd4, Pd7, Pd14 és Pd20 izolátumoknál nem történt hasítás, a PCR termékek egészben maradtak. Ezek a fragmentumok a hasított termékekhez képest több nukleotidot tartalmazó DNS láncból állnak, hosszúságuk miatt nehezebben jutnak át az agarózgél térhálós szerkezetén. Lassú mozgásuk következtében az elektroforézis befejezése után közelebb helyezkednek el a felvitel helyéhez (a képen feljebb), mint a kétfelé hasadó, rövid fragmentumok. A Pd4, Pd7, Pd14 és Pd20 izolátumok az M típusba sorolhatók. Az enzimátikus vizsgálatok lehetővé tették az ELISA tesztekkel kapott eredmények pontosítását (10. táblázat). Nukleinsav szinten is megerősítettük azt a megállapításunkat, hogy a PPV-M típus mellett (Pd4, Pd7, Pd14, Pd20, Pd30, Pd31, SK68), a PPV-D típus (Pa1, Pc12, Pd3, Pd9, Pd11, Pd15, Pd17, Ra) jelenléte is gyakori Magyarországon.

Négy izolátumnál (Ds1, Lh1, Pc13, Pd16), a láncreakció során a DNS nem sokszorozódott meg olyan mértékben, hogy az UV fényben látható lett volna. A PCR termékek (vagyis a köpenyfehérje gének) eredetét azonban radioaktívan jelölt PPV köpenyfehérje specifikus próbával sikerrel azonosítottuk. Southern-blot hibridizálással kimutattuk, hogy a köpenyfehérje génnek megfelelő nukleinsav szakaszok ezen izolátumok esetében is felszaporodtak, de csak kis

Pd3 Pd4 Pd7 Pc12 Pd14 Pd20

30. ábra. Néhány szilvahimlő vírus izolátum köpenyfehérje génjének
DraI enzimmel történő endonukleázos hasítása

10. táblázat. A restriktációs endonukleázokkal történt hasítások eredményei

Izolátumok	Indító szekvenciák	Restriktációs endonukleázok				Szerotípus
		DraI	SfuI	RsaI	AluI	
Dsl	CP1-CP4	-?	o	o	o	
	unipotý-CP4	-	kevés PCR termék		-	?
Lh1	CP1-CP4	-	o	o	o	
	unipotý-CP4	o	o	o	A	M?
Pa1	CP1-CP4	+	+	+	o	
	CP3-CP4	o	o	o	+	D
Pc12	CP1-CP4	+	+	+	+	D
Pc13	CP1-CP4	-?	o	o	o	
	unipotý-CP4	-	A	A	A	?
Pd3	CP1-CP4	+	o	o	o	
	unipotý-CP4	o	+	+	+	D
Pd4	CP1-CP4	-	-	-	-	M
Pd7	CP1-CP4	-	-	-	-	M
Pd9	CP1-CP4	+	o	o	o	
	unipotý-CP4	o	+	+	+	D
Pd11	CP1-CP4	-	o	o	o	
	unipotý-CP4	A	+	+	+	D
Pd14	CP1-CP4	-	-	-	-	M
Pd15	CP1-CP4	+	o	o	o	
	unipotý-CP4	o	+	+	+	D
Pd16	CP1-CP4	kevés PCR termék		o	o	
	unipotý-CP4	o	o	o	A	?
Pd17	unipotý-CP4	+*	+*	+*	+	D

10. táblázat folytatása

Izolátumok	Indító szekvenciák	Restrikciós endonukleázok				Szerotípus
		DraI	SfuI	RsaI	AluI	
Pd20	CP1-CP4	-	-	-	-	M
Pd30	CP1-CP4	-	o	o	o	M
Pd31	CP1-CP4	-	o	o	o	M
Ra	CP1-CP4	+	+	+	o	
	CP3-CP4	o	o	o	+	D
SK68	CP1-CP4	-	-	-	-	
	unipotý-CP4	-	-	-	-	M

Ra: összehasonlító izolátum, D szerotípus; SK68: összehasonlító izolátum, M szerotípus. Jelmagyarázat: A: aspecifikus reakciók; ?: átmeneti (?) típus; *: hasítja, de más, kisebb fragmentek is keletkeztek; o: nem vizsgáltuk.

mennyiségben (31. ábra). Mennél nagyobb a homológia foka a Hybonnylon membránra rögzített PPV minta és a PPV specifikus próba között, annál több kötés alakul ki közöttük a komplementaritás szabályai szerint. A radioaktívan jelölt próba annál erősebb jelet (nagyobb foltot) hagy a röntgenfilmen, minél több minta és próba tud egymáshoz kapcsolódni. A Ds1, Lh1, Pc13, Pd16 izolátumokat - PPV eredetük bizonyítása után-, különleges viselkedésük alapján egy átmeneti csoportba soroltuk. Ezek az izolátumok feltételezésünk szerint a két fő típus (M és D) rekombinációjából jöttek létre. Az RT-PCR és a Southern-blot hibridizációs technika segítségével a *Datura stramonium* és a *Lycium halimifolium* növényekből elsőként mutattuk ki a sarka vírust.

4.6.2 Pa1 izolátum nukleotid sorrendjének meghatározása

Magyarországon eddig csak a Dr. Németh Mária által gyűjtött, SK68 jelű, érdi szilvafáról származó izolátumot jellemezték molekuláris módszerekkel, meghatározva annak teljes nukleinsav sorrendjét (Palkovics et al., 1993). Ez az izolátum az általában Kelet-Európában elterjedt PPV-M típust képviselte. A Balaton-felvidéken általunk gyűjtött, manduláról származó, Pa1 jelű izolátum mind az ELISA szerológiai, mind az enzimátikus vizsgálatok szerint a PPV-D törzsbe tartozott. A szerológiai tulajdonságokért felelős köpenyfehérje gén nukleotid sorrendjének meghatározásával lehetővé vált a magyarországi PPV-M és a PPV-D típusok molekuláris szintű összehasonlítása. A Pa1 izolátum köpenyfehérje génje 87 %-os azonosságot mutatott az SK68 izolátummal, és 98,8 %-os homológiát az Ra (Ranković) izolátummal. A köpenyfehérje aminosav sorrendben a hasonlóság 92 %, illetve 98 % volt.

A Pa1 izolátum szekvenciájának ismeretében (32. ábra), a saját és az irodalmi adatok felhasználásával felrajzoltuk az eddig megismert PPV izolátumok genetikai törzsfáját (33. 34. ábra).

32. ábra. A szilvahimlő vírus manduláról származó, Pa1 izolátum
köpenyfehérje génjének nukleotid és aminosav sorrendje

33. ábra. Az ismert PPV izolátumok filogenetikai törzsfája a köpenyfehérje gén nukleotid sorrendje alapján

34. ábra. Az ismert PPV izolátumok filogenetikai törzsfája a köpenyfehérje aminosav sorrendje alapján

A tesztnövényeken végzett, a kétféle ELISA (DAS-ELISA, IDAS-ELISA), valamint a molekuláris virológiai (RT-PCR, nukleinsav analízis) vizsgálatok eredményeinek rövid áttekintésekor több megállapítást is tehetünk:

A tesztnövényeken (*Ammi majus*, *Chenopodium amaranthicolor*, *C. foetidum*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*) változatos makrotünetek alakultak ki a PPV fertőzés hatására, de a tünetek nem voltak alkalmasak a törzsek elkülönítésére. A szerológiai (ELISA) tesztek fő vonalaiban lehetővé tették a legfontosabb szerocsoportok elválasztását, de a vizsgálat elvégzése után maradtak nyitott kérdések. Néhány izolátumot sem a D, sem az M típusba nem tudtunk besorolni, ezeket egy átmeneti csoportba osztottuk. Molekuláris virológiai módszerekkel pontosítottuk a szerológiai vizsgálatok eredményeit. Négy rendkívüli tulajdonsággal rendelkező izolátumot találtunk, amelyek jelenléte kevert típusok előfordulására utalt. ELISA szerológiai, és molekuláris RT-PCR technikával először mutattuk ki, hogy a D (Dideron) törzs megtalálható Magyarországon. A manduláról származó, D típusú, Pa1 izolátum köpenyfehérje génjének nukleinsav és aminosav sorrendjét meghatároztuk, majd a szekvencia adatok alapján megállapítottuk a rokonság mértékét más, ismert izolátumokkal.

5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- ❖ A szívócsapda és a sárga tálcapda fogási eredményei eltértek egymástól, de mindkét csapda típus egyértelműen jelezte a *Hyalopterus pruni*, az *Aphis craccivora*, valamint a *Brachycaudus helichrysi* fajok gyakoriságát.

- ❖ A szilvahimlő vírus átvitelét 12 levéltetű fajjal bizonyítottuk, amelyek közül 8 fajt elsőként írtunk le. Az átviteli százalékok alapján a legnagyobb vektor aktivitással (83 %) az *Aphis nasturtii* és az *Uroleucon achilleae* fajok rendelkeznek. Megállapítottuk, hogy az átvitel sikeressége egy adott fajon belül is változhat a forrásnövény fajtától függően.

- ❖ Egy általunk kidolgozott módszerrel kiszámítottuk a vektor-tevékenység hatékonyságát. A modell arra hívta fel a figyelmet, hogy a levéltetvek egyedszámának nagyobb a jelentősége a vírus terjesztésében, mint az átviteli aktivitásnak.

- ❖ A *Datura stramonium*, a *Lycium halimifolium* és a *Prunus amygdalus* fajokról először igazoltuk, hogy a PPV új, természetes gazdái.

- ❖ Többféle módszerrel (poliklón, monoklón antitestekkel, a köpenyfehérje molekuláris virológiai vizsgálatával) bizonyítottuk a hazai szilvahimlő vírus izolátumok szerológiai heterogenitását. Elsőként mutattuk ki Magyarországon a D szerotípus, és az ún. átmeneti szerotípusok jelenlétét.

- ❖ Meghatároztuk a D szerotípusba tartozó Pa1 izolátum nukleotid sorrendjét, és a szekvencia adatokat a nemzetközi génbankkal is közöltük.

- ❖ A nukleinsav és az aminosav szekvencia homológia alapján megállapítottuk a rokonság fokát a Pa1 izolátum, az egyetlen magyar, molekulárisan jellemzett SK68 izolátum, valamint az Európában előforduló, korábban ismert PPV izolátumok között. Az azonosság mértéke alapján megrajzoltuk az izolátumok törzsfelődésének evolúciós fáját.

6 KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során a csonthéjas ültetvényekben súlyos termésveszteségeket előidéző szilvahimlő vírus (PPV) és vektorainak tanulmányozását, valamint a vírus elleni integrált védekezés lehetőségeinek feltárását tűztük ki célul.

A PPV Európából (Bulgária) indult el, az első feljegyzések 1915-ből valók. A kórokozó ma már Ázsiában, Afrikában, sőt az amerikai kontinensen is jelen van, ezért fontos, hogy a betegség terjedését minél előbb megállítsuk. A megelőzéshez, a hatékony védekezési módszerek kidolgozásához ismernünk kell a PPV tulajdonságait: a genom felépítését, működését, a vírus patológiáját, szerológiai csoportosíthatóságát, átviteli lehetőségeit.

A kórokozó epidemiológiájának megismerését a vírus és a vektor kapcsolat feltárásával kezdtük, majd hazai izolátumokon tanulmányoztuk a kórokozó patológiai és szerológiai jellemvonásait, végül molekuláris szinten elemeztük és osztályoztuk az egyes típusokat.

A szárnyas levéltetvek egyedszám változásainak tanulmányozását két különböző módszerrel, sárgatálak kihelyezésével és szívócsapdával végeztük. A rovarok befogásakor más-más eredményt kaptunk attól függően, hogy melyik eljárást alkalmaztuk. A szívócsapdával fogott egyedek és fajok száma jóval meghaladta a sárgatálakkal fogottakét. A Rothamsted típusú szívócsapda nagy mennyiségű levegőt szív be, így naponta több ezer levéltetű befogását tette lehetővé. Nyílása olyan

magasságban található, amelyen vándorláskor tartózkodik a rovarok nagy hányada. Az egyes fajokon belül az egyedszám változásokról, a populáció rajzásáról általánosságban tájékozódunk, ha a szívócsapda adatait figyeltük. Egy adott gyümölcsösben azonban sokkal pontosabb képet kaptunk a vektorok mozgásáról, ha a sárgatálak adatait vettük figyelembe. Ezek az eredmények inkább a helyi viszonyok felmérésére alkalmasak. Ha a sárgatálás módszert kiegészítjük a gyümölcsfákon, illetve a gyökérsarjakon élő levéltetvek számlálásával (gondosan elkülönítve egymástól az eltérő fajokat, valamint a szárnyas és szárnyatlan egyedeket), akkor az ültetvények fái kolóniákat képező, a leveleken szívogató fajok migrációjának kezdetét, valamint a betelepülő fajok érkezését napra pontosan nyomon követhetjük, ami lényeges szempont a vektorok elleni kémiai védekezés megkezdésének eldöntésében.

A kolóniákban kialakult szárnyas alakoknak - amelyek áttelepülve újabb kolóniákat alapozhatnak meg - epidemiológiailag nincs akkora jelentősége, mint azoknak a fajoknak, amelyek a tápnövény keresése közben nagy távolságokat tesznek meg. A nem-perzisztens módon átvihető vírusok járványtanában fontos szerepet játszanak azok a vektorfajok is, amelyeknek ugyan nem tápnövényei a csonthéjasok, mégis a táplálék kiválasztása érdekében végzett próbaszívások közben fertőzhetik az egészséges fákat. A négy év alatt a szolnoki szívócsapdában a PPV korábban ismert vektorai közül az *Aphis craccivora*, a *Brachycaudus helichrysi* és a *Hyalopterus pruni* fajok voltak a leggyakoribbak. Ezen a három fajon kívül a kabai

burgonyatábla mellett a *Myzus persicae*, a keszthelyi kertészetben *Aphis* fajok (*A. fabae*, *A. gossypii*, *A. idaei*, *A. sambuci*) voltak uralkodók.

A vírusterjesztő rovarok repülését összevettük a természetes fertőződés idejével. A szilva ültetvénybe kihelyezett fogónövények május közepétől július végéig folyamatosan fertőződtek, de az infekciós nyomás több évben is a *H. pruni* rajzásakor tetőzött. A vírus természetes terjedésében így e fajnak biztosan jelentős szerep jut.

Az indikátor növények folyamatos fertőződése ugyanakkor azt sugallta, hogy a természetes PPV fertőzésben nem egyetlen fajnak van döntő szerepe, hanem egyidejűleg több faj vesz részt az epidémia kialakításában. Eredményes átvitelekkel bizonyítottuk, hogy az ismert levéltetű vektorokon kívül más fajok is alkalmasak a PPV átvitelére és terjesztésére. A vektorok között 8 új, a világirodalomban eddig nem közölt fajt találtunk.

A vizsgálatok azt mutatták, hogy nagyon fontos a forrásnövény kiválasztása. Több sikertelen kísérlet is bizonyította, hogy a lágyszárú *Nicotiana clevelandii* a PPV esetében rossz forrásnövény (pl. *Aphis craccivora*, *A. spiraephaga* 0 %-os átvitel), ellentétben a *Prunus domestica* vagy a *P. persica* növényekkel. Az *A. spiraephaga* ideális esetben - vagyis őszibarackról őszibarackra történő átvitelkor - 10 %-os aktivitást ért el, míg az *A. craccivora* ismert PPV vektor faj. Az átviteli százalékok meghatározásakor a leghatékonyabbnak a nyári hónapokban burgonyán élő *Aphis nasturtii* (83 %) és a cickafarkról gyűjtött *Uromelan achilleae* (83 %) fajok bizonyultak. Ezek azonban

ritkán előforduló vektorok, ezért nem alakítanak ki a gyümölcsfákon tömegesen betegségeket, és nem okoznak járványokat. A *H. pruni* átviteli képessége az *A. nasturtii* és az *U. achilleae* fajokhoz képest „csak” 13%, de olyan nagy tömegben van jelen, hogy jelentős vektornak tekinthető.

Egy egyszerű elméleti modell felállításával, amelyben a vektorhatékonyságot az egy év alatt szívócsapdába repült, azonos levéltetű egyedek száma, valamint a fajhoz tartozó átviteli százalék szorzatának tekintettük, súlyoztuk a különböző vektorok sarka vírus terjesztésében játszott szerepét. A szorzattal kimutattuk, milyen óriási jelentősége van egy vektor fajon belül az egyedszámnak. A vektorhatékonyság számszerű kifejezésével megállapítottuk, hogy a vírus epidémiájában azok a levéltetű fajok (*H. pruni*) közreműködnek a leghatékonyabban, amelyeknek alacsony a vírusátviteli aktivitása (13 %), ugyanakkor egyedszámuk rendkívül magas (több ezer) minden évben. A védekezést ezeknek a vektoroknak a megjelenéséhez kell igazítani.

A *B. helichrysi* (sárga szilva-levéltetű) és a *H. pruni* (hamvas szilva-levéltetű) fő gazdanövénye a szilva és más rokon *Prunus* fajok (Szalay-Marzsó, 1969). A csonthéjas gyümölcsösöket az *A. craccivora* vektor is szívesen látogatja, amint azt a keszthelyi kertészetben kihelyezett sárgatálak is jelezték. Az *Aphis* fajok dominanciája a kertészeti kultúrákban szintén nyugtalanító, figyelembe véve, hogy az átviteli vizsgálatokban jó átviteli képességükről tettek tanúbizonyságot. A sárga szilva-levéltetű természetes tápnövénye a

szilván (*P. domestica*) kívül a kökény (*P. spinosa*), a cseresznyeszilva (*P. cerasifera*), és a szilvarózsa (*P. triloba*), míg a hamvas szilvalevéltetű ősanyák a szilva, az őszibarack (*P. persica*), ritkábban a mandula (*P. amygdalus*), és a kajszai (*P. armeniaca*) levelén élnek. A *B. helichrysi* szárnyas nemzedékei nyáron fészkesvirágzatúakra, a *H. pruni* szárnyas egyedei pedig nádra vándorolnak, és azon alkotnak kolóniákat. Ez időponttól kezdve számuk a PPV terjesztése szempontjából lényegtelen. Ellenük a védekezést azelőtt kell elkezdni, mielőtt a migráció elindulna, vagyis a szárnyas alakok kirajzanának.

Az *A. craccivora* nem gazdanövényváltós faj, ennek ellenére folyamatosan jelen volt a kertészeti és a szántóföldi kultúrákban is. Ellenük az izolációs távolságok betartásával tudunk a leghatékonyabban védekezni.

Későbbi munkánk során a Magyarországon előforduló szilvahimlő vírus izolátumok törzsi hovatartozását tanulmányoztuk. Az ország különböző pontjain gyűjtött izolátumokon, szerológiai és molekuláris módszerek segítségével felmértük a törzsek előfordulását és elterjedését. A PPV izolátumok vizsgálata során bebizonyosodott, hogy a hazai izolátumok sem patogenitásukban, sem szerológiai tulajdonságaikban nem egységesek. A begyűjtött közel száz izolátummal dohánynövényeket (*Nicotiana benthamiana*) fertőztünk, majd a sikeres inokuláció után a tesztnövényeket üvegházi körülmények között tartottuk fenn.

A fás szárú növények közül manduláról (*Prunus amygdalus*) először sikerült bizonyítani, hogy a növény a vírus tünetmentes hordozója (Pa1 izolátum). A *Datura stramonium* (Ds1 izolátum) gyomfajból és a *Lycium halimifolium* (Lh1 izolátum) félcserjéből szintén először izoláltuk sikeresen a kórokozót; így először mutattuk ki, hogy a PPV lehetséges gazdanövényei. A PPV lágyszárú gyomnövényekben való jelenléte alapvető jelentőségű, mert egyrészt az évelő gyomok rezervoár növények lehetnek, másrészt a vektor levéltetű fajok a kórokozót nemcsak tápnövényeikből képesek felvenni, és azt nemcsak tápnövényeikre tudják leadni. A vándorlás során minél több gazdanövény kerül útjukba, annál több esélyük van arra, hogy a levélen szívogatva szájszervük megfertőződjön.

A *Nicotiana benthamiana* dohánynövényeken fenntartott törzsizolátumok közül agargél-diffúziós tesztekkel 15 jellemző izolátumot választottunk ki. Ezeknek a karakteres fenotípusú izolátumoknak a tünettani vizsgálatát a PPV kimutatására alkalmas teszt növényeken végeztük, de a növényeken kialakuló tüneti variabilitás nem tette lehetővé, hogy az eltérő szerológiai csoportokat megkülönböztessük egymástól.

Az izolátumok sokszínűségét ezután poliklón, majd monoklón antitestekkel vizsgáltuk tovább. A vírus géntermékeinek funkciót elemezve megállapíthatjuk, hogy a levéltetűekkel történő terjedésért, valamint a tünetek kialakulásáért többek között a köpenyfehérje (CP) felelős (Pirone, 1991; Salomon and Bernardi, 1995; López-Moya és Pirone, 1998; Varrelmann és Maiss, 2000). A köpenyfehérje N-vége

olyan epitópokat tartalmaz, amelyek alkalmasak az egyes törzsek elkülönítésére. A szerológiai vizsgálatok során a CP felszínen elhelyezkedő részeit (epitópok) ismerik fel az immunválaszban keletkezett antitestek, majd azokkal kapcsolatba lépnek. A monoklón antitestekkel végzett szerológiai vizsgálatokban, amelyet egy D szerotípusnak megfelelő izolátum köpenyfehérje eltérő epitópjaival (belső, középső, külső) szemben készítettek nyilvánvalóvá vált, hogy a PPV-M szerotípus mellett - amelyet az Lh1, Pc13, Pd17, Pd20 izolátumok képviselnek -, a PPV-D szerotípus is igen gyakori (Pa1, Pc12, Pd3, Pd9, Pd11, Ra).

Az izolátumok egy részét (Pd4, Pd7, Pd14, Pd15, Pd16) azonban nem lehetett sem az egyik sem a másik fő szerocsoportba besorolni. Ezeket az izolátumokat ezért egy átmeneti típusba osztottuk. Nyilvánvalóvá vált, hogy a hazai PPV populációt nem csupán egyféle törzs (M) képviseli – mint azt korábban gondolták -, hanem a fő típusok mellett más, átmeneti jellegű csoportok is jelen vannak.

A PPV izolátumok további osztályozását molekuláris módszerekkel folytattuk (lásd Anyag és módszer fejezet). A molekuláris virológiai vizsgálatok szerint a hazai izolátumok közül M törzsbe tartoznak a Pd4, Pd7, Pd14, Pd20, Pd30, Pd31 és az SK68 jelű, D törzsbe pedig a Pa1, Pc12, Pd3, Pd9, Pd11, Pd15, Pd17 és az Ra jelű izolátumok.

A Ds1, Lh1, Pc13 és a Pd16 jelű izolátumok hovatartozását különleges viselkedésük miatt, molekuláris módszerekkel sem lehetett megállapítani. Ez a négy izolátum képviselte a továbbiakban az átmeneti csoportot. A két szerotípus éveken keresztül élt és

replikálódott egymás mellett a fás szárú növényekben, ezért feltételezésünk szerint az átmeneti csoport az M és a D törzsbe tartozó vírusok természetes rekombinációjából jött létre.

A Pa1 izolátum köpenyfehérje gén nukleotid és aminosav szekvenciájának meghatározásával közelebb jutottunk a vírus felépítésével, genetikai változékonyságával és evolúciójával kapcsolatos kérdések megválaszolásához. A manduláról általunk elsőként izolált Pa1 jelű izolátum szerológiai vizsgálataink szerint a D csoport típus tagja.

A nukleinsav sorrend azonossága alapján elhelyeztük ezt az új izolátumot az eddig ismert PPV izolátumok filogenetikai rendszerében. A Pa1 izolátum nukleotid sorrendje alapján a 3.3 jelű, D törzsbe tartozó spanyol izolátummal mutat legközelebbi rokonságot (99,09 %), így a molekuláris analízis eredményei szintén megerősítették, hogy a manduláról Magyarországon elsőként izolált PPV a D szerotípushoz sorolható.

Az átmeneti csoportba tartozó izolátumok eredetének tisztázása még további vizsgálatokat igényel. Az RNS vírusok rekombinációs képességét először az állatokat megbetegítő poliovírusokban figyelték meg (Hirst, 1962). Később ilyen természetes genetikai átrendeződéseket különböző növényvírusokban is kimutattak. Számos ezek közül defektív interferáló RNS-eket, vagy szatellit RNS-ek rekombinációit hordozza magában. Az RNS rekombinációk kétfélek lehetnek: homológok vagy nem homológok. Homológ rekombinációról akkor beszélünk, amikor a „szülői pár” két azonos

vírus, és az átrendeződés után keletkezett „utód” megőrzi a potyvírusokra jellemző nyitott leolvasási keretet (ORF). Az RNS rekombináció nem homológ, ha a keletkező poliprotein hasítása más módon megy végbe. A természetes homológ rekombinációk az RNS-replikáz enzim által elkövetett hibák kijavításához nyújtanak segítséget, megkönnyítik az előnyös szakaszok beépítését a vírusgenomba, valamint a hátrányos területek eltávolítását a genomból (Simon és Bujarski, 1994; Nagy és Simon, 1997). A genetikai információk kicserélődése RNS vírusok, vagy a vírus és a gazdanövény között nagyfokú variabilitás létrejöttét teszik lehetővé. Az RNS rekombinációk lényeges lépést jelentenek a vírus evolúciója szempontjából, vizsgálatukkal nyomon követhető a törzsfajlás folyamata (Dolja és Carrington, 1992; Lai, 1992).

1993-ban, amikor két, a volt Jugoszlávia területéről származó izolátum (PPV-PS és PPV-06) nukleotid és aminosav szekvenciáját meghatározták, elsőként merült fel a lehetősége a potyvírusok között annak, hogy ezek az izolátumok esetleg rekombináció útján jöttek létre (Cervera et al., 1993). Akkoriban még csak néhány izolátum (PPV-D, PPV-NAT, PPV-Ranković, PPV-El Amar) szekvencia adatait ismerték. Amikor ezeket összevetették a PPV-PS és a PPV-06 szekvenciájával nem várt különbségekre bukkantak. A két új izolátum biológiai tulajdonságaiban (gazdanövénykör, tünettanilagosságok) is eltért a többi izolátumtól. A potyvírusok szekvencia analízise azt mutatta, hogy a vírusok és a vírus törzsek között olyan helyeken is kialakulnak különbségek (pl. a köpenyfehérje C-végén, vagy a 3' nem

kódoló szakaszon), amelyeket igen konzervatívnak tartanak. Ez azonban megengedett ebben a nemzetségben.

Az eddig felsorolt PPV izolátumok konzerváltnak tartott szakaszain is megmutatkoznak ezek a megengedett eltérések, amelyek alapján Cervera et al. (1993) három törzset alakítottak ki. Az elsőbe a PPV-PS, a másodikba a PPV-El Amar, a harmadikba a PPV-D, a PPV-NAT és a PPV-Ranković izolátumokat osztották. A PPV-ö6 jelű izolátum egyik csoportba sem tartozott. A PPV-ö6 nukleotid szekvenciájának elemzése azt sugallta, hogy ez az izolátum homológ rekombinációt tartalmaz, amely az általánosan elfogadott típusok (D, NAT, Ranković) és a PS izolátum között jött létre. A rekombináció pontos helyét nem határozták meg, csak annyit tudtak, hogy az megközelítőleg a Ranković izolátum 8447-es nukleotid pozíciójának felel meg. Ebben a szakaszban aspecifikus részeket, vagy másodlagos szerkezetbeli eltéréseket vettek észre. A PPV-ö6 példája azt mutatja, hogy a homológ rekombinációval keletkező új vírusoknak nehéz eredményesen felvenni a versenyt a „szülőikkel”.

A növényvírusok más csoportjaiban gyakran találunk példát erre az eseményre. Revers et al. (1996) módszeresen keresték az RNS rekombinációk előfordulását a *potyvirus* izolátumok között. A potyvírusok szekvencia adatait adatbázisból vagy egyéb irodalomból szerezték be. Elsősorban a köpenyfehérjét vizsgálták, mert ez a rész a leggyakrabban célpontja a szekvencia kutatásoknak, és így rengeteg adat állt rendelkezésre. A vizsgálatokat a burgonya Y vírussal (potato Y *potyvirus*, PVY) kezdték. A PVY ökonómiai jelentősége miatt az

analízisbe más, a *potyvirus* nemzetségbe tartozó vírusokat is bevontak. Először egy egyszerű megközelítést alkalmaztak a vélt rekombinánsok gyors kiszűrésére Chenault és Melcher (1994) vizsgálataihoz hasonlóan. Két, a köpenyfehérje végén elhelyezkedő domain nukleotid sorrendjét meghatározták, majd ezeket evolúciós fákra összehasonlították. Rekombináció hiányában az evolúciós fák topológiája, alakja megegyezett. Ha az izolátumokban rekombináció jött létre, akkor a két evolúciós fa azonos ágai megmutatták a vélt rekombináció helyét, de ehhez mindkét fákcskában a szülőknél nagyon közeli rokonságban kellett lenniük. Ezután statisztikai felmérést végeztek a köpenyfehérje teljes kódoló szakaszán, így megerősítették a vélt rekombinánsok jelenlétét. Ezzel a módszerrel 109 vizsgált esetből 13 izolátumnál mutattak ki rekombinációt a CP 3' nem kódoló szakaszában, valamint 5 bizonytalan esetet jegyeztek fel.

Érdekes módon, a PPV izolátumok között nem sikerült újabb rekombinánsokra bukkanniuk. A jelenség gyakoriságának okát még nem tisztázták. Néhány vírus, például a tarlórépa mozik vírus (turnip mosaic *tymovirus*, TuMV) esetében a rendelkezésre álló szekvencia adatok, vagyis a minták kis száma lehetett az oka annak, hogy nem sikerült bennük rekombinációt kimutatni. Az adatbázisban azonban sok PPV izolátum szekvencia adatait lehet megtalálni. A PPV-06 példája is azt mutatja, hogy a PPV esetében alacsony gyakorisággal történnek meg homológ rekombinációk. Ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy a két fő csoport (M és D) az európai kontinensen földrajzilag elkülönül egymástól. Bulgáriában és a Balkánon az M

típus gyakori, míg Nyugat-Európára a D törzs jelenléte a jellemző. Kevés olyan ország van (Franciaország, Ausztria, Csehország, Magyarország, Horváthország, Szerbia), ahol a D és az M típus is megtalálható, és épp ezért keveredni tud egymással. Ha a két törzsnek nincs módja arra, hogy egymással kapcsolatba lépjen, akkor az eleve kizárja a rekombináció lehetőségét. Eddig csak egyetlen PPV rekombinánsot találtak (PPV-06), amely a volt Jugoszlávia területéről származik. Ez az ország egyike azoknak, ahol a PPV két típusa együtt fordul elő. Bulgáriában a mai napig csak az M törzs jelenléte bizonyított, ezért joggal feltételezhetjük, hogy a PPV evolúciója szempontjából ez a legősibb forma. A D típus időben később jelenhetett meg, majd távoli helyeken (Egyiptom, Moldávia) újabb törzsek (El Amar, SoC) is kialakultak.

A PPV fél évszázados hazai jelenléte, és a kiindulási góctól (Bulgária) való kis távolsága rendkívül sokszínű víruspopuláció létrejöttét tette lehetővé. A hazánkban előforduló izolátumok heterogenitása egyazon ültetvényen belül is kimutatható (Tóbiás et al., 1999; Pribék et al., 2000). A fás szárú növények folyamatos fertőződése miatt a különböző vírustörzsek (Marcus és Dideron) évekig együtt éltek a növényben. Így elvileg lehetőségük nyílt arra, hogy a két eltérő genom között mutáció, génkicserélődés, vagyis rekombináció történjen. Ha ezeknek a rekombinánsoknak a létrejöttét bizonyítani tudjuk az ország területén is, ez új patológiai, szerológiai, valamint epidemiológiai kérdéseket vetne fel. Adamolle et al. (1994a) már kimutatták, hogy az M és a D törzs levéltetvekké történő átvitele különböző

hatékonyságú; ezért joggal feltételezhetjük, hogy egy újonnan létrejött vírus is más átviteli tulajdonságokkal fog rendelkezni. Az általunk gyűjtött, rekombinánsnak vélt különleges izolátumok patológiája eltért a többi típusos izolátumtól. A nukleinsav analízis során fény derülhet a különbség okára. Ha ezek az izolátumok valóban homológ rekombinációt hordoznak, meg kell állapítanunk a rekombináció pontos helyét.

A világon nagy erőfeszítéseket tesznek annak érdekében, hogy a PPV által okozott, egyre fokozódó gazdasági károkat csökkentsék, a vírus terjeszkedését megfékezzék. A betegség visszaszorításának leghatékonyabb módja a vírusmentes szaporítóanyag használata (Németh és Kölber, 1998). Hazánkban is – mint a többi gyümölcsstermesztő országban – olyan zárt, központosított vírusmentesítési rendszereket alakítottak ki, ahol szervezeten végzik a fajtaminősítést, a törzskönyvezést és a vírusellenőrzési munkákat. A rendszerhez az is szervesen hozzátartozik, hogy a vírusmentes faiskolákból kikerülő termékeket igazolással látják el (certifikáció). A növényegészségügyi követelményeket, az ellenőrzés rendszerét, valamint a vírumentesség igazolásának rendjét hatósági rendeletek szabályozzák. A nagy faiskolákban a növényvédelmi munkákat korábban szakmérnökök irányították, akik szoros munkakapcsolatban álltak a megyei karantén felügyelőkkel. Jelenleg a kisebb faiskolákban (5000 oltvány alatt) a termelés általában növényvédelmi szakemberek nélkül történik. Az ellenőrzést tovább nehezíti a növényvédelmi hálózat létszámának leépítése. A faiskolai termelés több évet vesz

igénybe. Az előállított oltványokra nincs előrendelés, ezért a faiskolák nem tudják kiszámítani a szükséges igényeket, így általában nem is tudják kielégíteni azokat. Az anyagi bizonytalanság miatt a telepítések fajtaösszetétele nem megfelelő, ezért a faiskoláknak az eladatlan készletekre állami támogatást kellene kapniuk. A faiskolák helyzetét az is nehezíti, hogy a központi törzsültetvényeket a termelőktől elszakítva, nyereségérdekeltségű vállalatok tartják fenn. A jövőben az alapanyagok előállítását, -termelését, -kiadását, a minőség ellenőrzését és tanúsítását, vagyis a biológiai alapok fenntartását, ugyanazon szervezet kezébe kellene összpontosítani. A központi törzsültetvények a szervezet tagjai lennének. A rendszert olyan elkötelezett szakemberek irányítanák, akik beszámolási kötelezettséggel tartoznának a minisztériumnak. Ahhoz, hogy az értékes magyar szaporítóanyag és a telepítésekből származó gyümölcs minőségben versenyképes maradjon a külföldi piacokon, a termelést a nemzetközi EPPO-, és az Európai Közösség előírásaihoz kell igazítanunk. Ehhez többek között korszerűsíteni kell a vírusmentességet megőrző technológiákat, új tesztelési módszereket kell kidolgozni, és nem utolsósorban folytatni kell a PPV törzsek vizsgálatát. Munkánkkal, a hazai izolátumok előfordulásának, és elterjedtségének felméréssel, a különböző törzsek átvihetőségének és molekuláris tulajdonságainak megállapításával, remélhetőleg hozzájárultunk a vírusmentességet megőrző növényvédelmi technológiák korszerűsítéséhez, a vírus elleni okszerű védekezési módszerek kidolgozásához.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

1. Szívócsapdás és sárgatálás módszerekkel csapdáztuk a Magyarországon előforduló leggyakoribb levéltetű fajokat. A rovarok befogásakor más-más eredményt kaptunk attól függően, hogy milyen eljárást alkalmaztunk, illetve milyen területen helyeztük el a csapdákat. A befogott levéltetvek jóval nagyobb egyedszámban fordultak elő a szívócsapdában, mint a sárgatálakban.
2. A szívócsapdás adatok általánosabb képet adtak az országban élő levéltetvek populációinak változásairól, hiszen ez a csapda típus nagy teljesítménnyel szívja be abból a magasságból a rovarokat, amelyben távolsági repüléskor tartózkodnak. A szívócsapdában a *Hyalopterus pruni*, az *Aphis craccivora* és a *Brachycaudus helichrysi* fajokból határoztuk meg a legtöbbet. Mindhárom faj ismert PPV vektor.
3. A keszthelyi kertészetben és a kabai burgonyatábla mellett elhelyezett sárgatálak anyagában is rendszeresen, nagy számban felleltük a *Hyalopterus pruni*, az *Aphis craccivora* és a *Brachycaudus helichrysi* fajokat. A sárgatálak jobban tükrözik a helyi viszonyokat, egy adott területen előforduló rovarok mozgását, amelynek ismerete elengedhetetlen a vegyszeres védekezés időzítése szempontjából. Az említett adatok a két csapda típus alkalmazhatósága közötti különbségekre hívta fel a figyelmet.

4. Meghatároztuk az egyes fajok átviteli aktivitását. Az átviteli százalék 7 és 83 % között változott. A PPV átvitelére – az átviteli aktivitás csökkenő sorrendjében - a következő fajokat találtuk alkalmasnak: *Aphis nasturtii* (83 %), *Uroleucon achilleae* (83 %) *Phorodon humuli* (23 %), *Aphis sambuci* (22 %), *Myzus cerasi* (16 %), *Hyalopterus pruni* (13 %), *Aphis idaei* (10 %), *Aphis spiraephaga* (10 %), *Rhopalosiphum padi* (10 %), *Sitobion avenae* (10 %), *Brachycaudus helichrysi* (7 %), *Hyalopterus amygdali* (7 %). E fajok közül a világirodalomban elsőként leírt vektor fajok: *Aphis idaei*, *Aphis nasturtii*, *Aphis sambuci*, *Aphis spiraephaga*, *Hyalopterus amygdali*, *Myzus cerasi*, *Sitobion avenae*, *Uroleucon achilleae*.
5. Nem tudtunk átvitelt elérni a következő fajokkal: *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis cirsi-achanthoides*, *Aphis craccivora*, *Aphis cytisorum*, *Aphis gossypii*, *Aphis pomi*, *Aphis rumicis*, *Aphis spiraephaga*, *Chaitophorus salicti*, *Callipterinella tuberculata*, *Capitophorus elaeagni*, *Cavariella theobaldi*, *Cryptomyzus ribis*, *Dysaphis devectora*, *Hyperomyzus pallidus*, *Macrosiphoniella oblonga*, *Macrosiphum rosae*, *Myzus cerasi* ssp. *pruniavium*, *Schizaphis graminum*, *Uroleucon cichorii*, *Uroleucon sonchi*. A felsorolt fajok között található két ismert vektor faj is (*Aphis gossypii*, *Aphis craccivora*). E két faj közül az *Aphis craccivora* vektornál a forrásnövény (*Nicotiana clevelandii*) okolható a sikertelenségért, amit az *Aphis spiraephaga* esete is bizonyít

(*Prunus persica* cv. GF 305 magoncról 10 %-os, *Nicotiana clevelandii* dohánynövényről 0 %-os átvitel).

6. A PPV-vel erősen fertőzött Besztercei szilva ültetvénybe kihelyezett fogónövények természetes fertőződésének ideje május elejétől augusztus első feléig tartott. Tetőpontja többször egybeesett a *Hyalopterus pruni* és az *Aphis craccivora* rajzáscsúcsával. A vektortevékenység hatékonyságát az egyedszám és az átviteli százalék szorzatának tekintettük. A vektorhatékonyság kiszámításával megállapítottuk, hogy a PPV legfontosabb vektora alacsony átviteli képessége (13%) ellenére a legnagyobb számban jelenlévő *Hyalopterus pruni*.
7. Bizonyítottuk, hogy egyetlen levéltetű faj sem tehető ettől függetlenül egyedül felelőssé a PPV természetes terjesztéséért. A kórokozó elleni védekezéskor távol kell tartani mindazokat a fajokat, amelyek vektornak bizonyultak. A *Hyalopterus pruni* és a *Brachycaudus helichrysi* a szilván népes kolóniákban élnek. Nyár elején elhagyják az ültetvényeket, és nyári tápnövényeikre vándorolnak. Ellenük a migráció kezdetekor, valamint őszi visszatérésükkor kell védekeznünk. Az *A. craccivora* nem gazdanövényváltós faj, ennek ellenére folyamatosan jelen volt a kertészeti és a szántóföldi kultúrákban is. Ellenük az izolációs távolságok betartásával tudunk a leghatékonyabban védekezni.
8. A vírus rendkívül nagy tüneti változatosságot mutatott nemcsak a hazai csonthéjas ültetvények fáin, hanem a lágyszárú gazdanövényeken is. A begyűjtött közel száz izolátummal

dohánynövényeket (*Nicotiana benthamiana*) fertőztünk, majd a sikeres inokuláció után a tesztnövényeket üvegházi körülmények között tartottuk fenn. A tesztnövényeken kialakuló tüneti variabilitás nem tette lehetővé, hogy az eltérő szerológiai csoportokat megkülönböztessük egymástól.

9. A fás szárú növények közül manduláról (*Prunus amygdalus*) először sikerült bizonyítani, hogy a vírus tünetmentes hordozója (Pa1 izolátum). A *Datura stramonium* (Ds1 izolátum) lágyszárú gyomnövényből, valamint a *Lycium halimifolium* (Lh1 izolátum) félcserjéből szintén először izoláltuk sikeresen a kórokozót.; így először mutattuk ki, hogy a vírus lehetséges gazdanövényei.
10. Az izolátumok szerológiai sokszínűségét először monoklon antitestekkel mutattuk ki. Az elvégzett szerológiai (IDAS-ELISA) vizsgálatok szerint a hazai izolátumok egyik része az M (Marcus), másik része a D (Dideron), harmadik része egy átmeneti szerocsoportba sorolható. Kísérleteinkkel elsőként bizonyítottuk, hogy Magyarországon nemcsak az M típus van jelen, hanem a D törzs is gyakori.
11. A két fő szerotípus jelenlétét a nukleinsavak endonukleázos hasításával is igazoltuk. A szerológiai és a molekuláris virológiai vizsgálatok szerint a hazai izolátumok közül M törzsbe tartoznak a Pd4, Pd7, Pd14, Pd20, Pd30, Pd31 és az SK68 jelű, D törzsbe pedig a Pa1, Pc12, Pd3, Pd9, Pd11, Pd15, Pd17 és az Ra jelű izolátumok.

12. A Ds1, Lh1, Pc13 és a Pd16 jelű izolátumok hovatartozását különleges viselkedésük miatt, molekuláris módszerekkel sem lehetett megállapítani. Ez a négy izolátum képviselte a továbbiakban az átmeneti csoportot. A két szerotípus éveken keresztül élt és replikálódott egymás mellett a fás szárú növényekben, ezért véleményünk szerint az átmeneti csoport az M és a D törzsbe tartozó vírusok rekombinációjából jött létre.
13. A manduláról általunk elsőként izolált PPV-Pa1 jelű izolátum köpenyfehérje génjének teljes nukleotid és aminosav szekvenciáját meghatároztuk, és azt a nemzetközi génbankban közzöltük. A nukleinsav sorrend azonossága alapján elhelyeztük ezt az új izolátumot az eddig ismert PPV izolátumok filogenetikai rendszerében. A Pa1 izolátum nukleotid sorrendje alapján a 3.3 jelű, D törzsbe tartozó izolátummal mutat legközelebbi rokonságot (99,09 %).
14. Az átmeneti csoportba tartozó izolátumok eredetének tisztázása – nevezetesen az, hogy a természetben előforduló kevert fertőzések eredményezhetik-e rekombinánsok létrejöttét – még nem teljesen bizonyított, a kérdés eldöntése további vizsgálatokat igényel.

8 SUMMARY

1. Flight activity of the most frequent winged aphids was monitored by Rothamsted type suction- and by yellow pan trap in Hungary. Results depend on type of trap and geographical environment. The suction trap captured much more aphids than yellow pan traps.
2. Suction trap showed general view about population dynamics of aphids. This trap was able to collect insects from the level of flying. *Hyalopterus pruni*, *Aphis craccivora* and *Brachycaudus helichrysi* were the most abundant PPV vector aphids in the suction trap. These aphids were recurrent species every year. All of them were known as PPV vectors.
3. Yellow pan traps were placed in orchard of Horticultural Department in Keszthely and on potato field in Kaba. *Hyalopterus pruni*, *Aphis craccivora* and *Brachycaudus helichrysi* were found regularly in yellow traps. The yellow pan traps, showed better the local situation connected to movement of insects on a given area, which was very important for timing for pest management. There were significant differences in results as a consequence of the application of these two types of traps (Rothamsted type suction trap and yellow pan trap).
4. Transmission activities of 33 aphid species were tested. Among them 12 species proved to be as vectors of PPV. Following aphid species were able to transmit PPV: *Aphis nasturtii* (83 %), *Uroleucon achilleae* (83 %) *Phorodon humuli* (23 %), *Aphis*

sambuci (22 %), *Myzus cerasi* (16 %), *Hyalopterus pruni* (13 %), *Aphis idaei* (10 %), *Aphis spiraephaga* (10 %), *Rhopalosiphum padi* (10 %), *Sitobion avenae* (10 %), *Brachycaudus helichrysi* (7 %), *Hyalopterus amygdali* (7 %). Transmission ability of eight species has not been published before our experiments. New PPV vectors in our study were *Aphis idaei*, *Aphis nasturtii*, *Aphis sambuci*, *Aphis spiraephaga*, *Hyalopterus amygdali*, *Myzus cerasi*, *Sitobion avenae*, *Uroleucon achilleae*.

5. In our conditions, 21 species were not able to transmit the pathogen: *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis cirsi-acanthoides*, *Aphis craccivora*, *Aphis cytisorum*, *Aphis gossypii*, *Aphis pomi*, *Aphis rumicis*, *Aphis spiraephaga*, *Chaitophorus salicti*, *Callipterinella tuberculata*, *Capitophorus elaeagni*, *Cavariella theobaldi*, *Cryptomyzus ribis*, *Dysaphis devectora*, *Hyperomyzus pallidus*, *Macrosiphoniella oblonga*, *Macrosiphum rosae*, *Myzus cerasi* ssp. *pruniavium*, *Schizaphis graminum*, *Uroleucon cichorii*, *Uroleucon sonchi*.

Some of them were known vectors too, but probably the source plant and the conditions were not suitable for transmission (for example *A. spiraephaga* transmitted the virus from peach, but not from *Nicotiana clevelandii*).

6. *Prunus persica* cv. GF 305 (peach) seedlings, as trap plants, for aphids as well as virus indicator plants of PPV were placed for a week exposition period into a plum orchard (*Prunus domestica* var. *Besztercei*) totally infected by PPV. The period of natural

infection was relatively long from the beginning of May until the beginning of August. In 1993, 1994 and 1995 a positive correlation was found between the period of natural PPV infection and the migration of *Hyalopterus pruni* and *Aphis craccivora*.

A vector efficiency model was created, whereas vector efficiency was equivalent of product of transmission activity and aphid number. In spite of relatively low transmission activity (13 %) of *H. pruni*, this aphid – as the most abundant species - had the greatest vector efficiency in Hungary.

7. It was stated that not only but many species could be involved in the epidemy of PPV, therefore we had to protect against all PPV vectors in the nurseries and the orchard.
8. Studies on test plants demonstrated that Hungarian PPV isolates were different, indicating their heterogeneity. More than 100 leaf samples were collected from PPV infected woody and herbaceous plants. Isolates were propagated in *Nicotiana benthamiana*. The test plants were not adequate to separate the two main (M and D) serogroup.
9. The pathogen was isolated first from almond (*Prunus amygdalus*, Pa1 isolate), which did not cause visible symptoms in this plants. PPV was successfully isolated from *Datura stramonium* (Ds1 isolate) and *Lycium halimifolium* (Lh1 isolate) plants, too.
10. Formerly in Hungary only one (SK68) isolate was characterised as a typical M type. Serological studies with monoclonal antibodies demonstrated that in Hungary both M (Marcus) and D (Dideron)

serotypes were common. The presence of D serotype was first demonstrated in our experiments. Some isolates represented intermedier serotype.

11. On the bases of restriction profiles – corresponding to the two main serotype – isolates could be separated into three different group. The first, M group was represented by an M-standard SK 68 isolate, similarly with Pd4, Pd7, Pd14, Pd20, Pd30, Pd31 isolates. The second, D group was represented by a D-standard Ra (Ranković) isolate. Pa1, Pc12, Pd3, Pd9, Pd11, Pd15, Pd17 belonged to the D serotype.
12. Few isolates (Ds1, Lh1, Pc13 and Pd16) gave much less PCR product then others. These PCR products gave ambiguous reactions with the used restriction enzymes too. They showed intermediate properties, which could be due to the natural recombination of the two main types. The two main types recombined side by side for years in woody plants. According to our theory the intermediate group, a genetically mixed population originated from D and M strain of PPV.
13. Nucleotide sequences of CP region of almond isolate (PPV-Pa1) were determined. It can be also found in EMBL/genBank/DDBJ database (Acc. No: AJ000340). Comparison of the CP region nucleic acid sequences of PPV-Pa1 isolate showed 87 % identity to SK68 and 98,8 % to Ra isolate. Homology of amino acid sequences were 92 % and 98 % respectively. These results

confirmed that Hungarian PPV almond isolate belonged to the D serotype.

14. Comparison of Hungarian PPV isolates by serological or molecular level were complete correlation and confirmed the existence of the two major serotype and pointed out the possibility of the natural recombination of these isolates too. The great variability of the isolates was probably due to the geographically short distance from the origin of the virus. Analysis of unique isolates is still in progress.

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Prof. Gáborjányi Richard egyetemi magántanárnak, az MTA doktorának, aki öt éven keresztül időt és fáradságot nem kímélve követte végig munkámat. Önzetlenül tanított nemcsak a virológia tudományára, hanem arra is, hogyan kell egy előadást érdekessé és szemléletessé tenni, és hogyan kell egy szacikket úgy megfogalmazni, hogy mindenki számára érthető legyen. Szakmai tudásával, gyakorlatias gondolkodásával, valamint emberi hozzáállásával mindvégig a tudományos pályán való előrehaladásomat segítette.

Köszönettel tartozom alprogram vezetőmnek, Prof. Horváth József intézetigazgatónak, az MTA levelező tagjának. Az egyetemre történő visszakerülésem után biztosította a vizsgálatok befejezésének, valamint a disszertáció elkészítésének feltételeit. Támogatását, jószándékú észrevételeit ezúton is köszönöm.

Köszönetet mondok Dr. Basky Zsuzsának, akivel sokat dolgoztam együtt a rajzásdinamikai felmérések alatt, és akitől rengeteg hasznos tanácsot kaptam a levéltetvek határozásakor. Beszélgetéseink során egész életre szóló útravalót adott.

Köszönöm Dr. Palkovics Lászlónak a molekuláris virológiai vizsgálatokban nyújtott nélkülözhetetlen segítségét. A molekuláris technika módszereinek valamennyi lépését tőle tanultam.

A dolgozat végső formába öntésében nagy segítségemre volt Lucskai Attila PhD.

Legtöbb köszönettel szüleimnek tartozom, akik lelki- és anyagi támogatása nélkül sohasem érhettem volna el céljaimat.

10 IRODALOMJEGYZÉK

- Acuña, R. (1993): Outbreaks of plum pox virus in Chile. Conf. on Plum Pox, Bordeaux. EPPO Bulletin 23: 141-146.
- Adamolle, C., Boeglin, M., Labonne, G., Candresse, T. and Quiot, J. B. (1994a): A necrogenic strain of plum pox *potyvirus* causing decline in some peach cultivars. EPPO Bulletin 24: 721-730.
- Adamolle, C., Quiot, L., Bousalem, M., Boeglin, M. and Quiot, J. B. (1994b): Use of antisera to nonstructural proteins in the study of plum pox *potyvirus*. EPPO Bulletin 24: 657-668.
- Al Rwahnih, M., Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Boscia, D. (2000): First record of plum pox virus in Jordan. 18th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Canterbury, England, Abstr. 87.
- Ammar, E. D., Rodríguez-Cerezo, E., Shaw, J. G. and Pirone, T. P. (1994): Association of virions and coat protein of tobacco vein mottling *potyvirus* with cylindrical inclusions in tobacco cells. Phytopathology 84: 520-524.
- Andrejeva, J., Puurand, Ü., Merits, A., Rabenstein, F., Järvekülg, L. and Valkonen, J. P. T. (1999): *Potyvirus* helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. J. Gen. Virol. 80: 1133-1139.
- Asensio, M., Gorris, M. T., Sanz, A., Camarasa, E., Perez, E., Carbonell, E. A. and Cambra, M. (1995): Characterization and

- detection of PPV using monoclonal antibodies. Acta Hort. 386: 354-356.
- Atanasoff, D. (1932): Sarka po slivite, Edna nova virus a bolest. Jb. Univ. Sofia, Agronom. Fak. 11: 49-70.
- Atanasoff, D. (1934): Mosaic disease of drupaceous fruit trees. Jb. Univ. Sofia, Agronom. Fak. 13: 9-42.
- Atanasoff, D. (1935): Mosaic of stone fruits. Phytopath. Z., 8: 259-284.
- Atreya, C. D. (1992): Application of genome sequence information in *potyvirus* taxonomy: an overview. In: Barnett, O. W. (ed.) *Potyvirus* Taxonomy. Springer, New York 1992.
- Atreya, P. L., Atreya, C. D. and Pirone, T. P. (1991): Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of plant virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7887-7891.
- Atreya, C. D., Atreya, P. L., Thornbury, D. W. and Pirone, T. P. (1992): Site-directed mutations in the *potyvirus* HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. Virology 191: 106-111.
- Atreya, P. L., López-Moya, J. J., Chu, M. and Atreya, C. D. (1995): Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in *potyvirus* transmission by aphids. J. Gen. Virol. 76: 265-270.
- Atreya, C. D. and Pirone, T. P. (1993): Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a *potyvirus*: Effects amino

- acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11919-11923.
- Atreya, C. D., Raccah, B. and Pirone, T. P. (1990): A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a *potyvirus*. Virology 178: 161-165.
- Avinent, L., Sanchis, A., Hermoso de Mendoza, A., Llacer, G. y García, S. (1993): Transmission del virus de la Sharka y sensibilidad varietal en albaricoquero. II. Congreso iberico de ciencias hortícolas, Zaragoza 200-206.
- Balázs E. (1997): A növényvédelem új feladata a géntechnológiai úton módosított szervezetekről alkotott törvény végrehajtása. Növényvédelem 33: 582-584.
- Balázs E. és Gáborjányi R. (1984): A génátültetés alkalmazása: a korszerű növényvédelem új lehetősége. Növényvédelem 20: 145-151.
- Basky Zs. (1983): A vírusfertőzöttség csökkentése uborkavetőmag-termő táblán tükröző felületekkel végzett sorköztakarással. Kertgazdaság 2: 53-58.
- Basky Zs. (1984a): Útmutató a sárgatálba repült szárnyas levéltetvek meghatározásához. Növényvédelem 20: 403-414.
- Basky, Zs. (1984b): Effect of reflective mulches and oil sprays on mosaic virus incidence in seed cucumbers. Protection Ecology 7: 243-248.

- Basky, Zs. (1993): Identification key for alate aphids caught in yellow pan traps. *Acta Phytopathol. et Entomol. Hung.* 28: 71-121.
- Basky Zs. és Benyák B. (1993): Levéltetű rajzásvizsgálat szívócsapdával és sárgatállal. *Növényvédelem* 29: 2-10.
- Basky Zs. és Gáborjányi R. (1994): A szilvahimlő vírust terjesztő levéltetvek rajzása és a természetes fertőzés összefüggései. *Növényvédelem* 30: 201-206.
- Basky, Zs., Pribék, D. and Gáborjányi, R. (1997): Flight and transmission activity of PPV vector aphids. *J. Aphidology* 11: 1-7.
- Baumgartnerova, H. (1996): First findings of plum pox virus in walnut trees (*Juglans regia* L.). *Acta-Virologica* 40: 59-60.
- Berger, P. H. and Pirone, T. P. (1986): The effect of helper component on the uptake and localisation of *potyviruses* in *Myzus persicae*. *Virology* 153: 256-261.
- Bhardwaj, S. V., Dhakur, P. D., Kohosla, K. and Sharma, D. R. (1995): Detection of plum pox virus in India. *Acta Hort.* 386: 237-240.
- Blanc, S., Ammar, E. D., García-Lampasona, S., Dolja, V. V., Llave, C., Baker, J. and Pirone, T. P. (1998): Mutations in the *potyvirus* helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* 79: 3119-3122.
- Blanc, S., López-Moya, J. J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D. W. and Pirone, T. P. (1997): A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a *potyvirus*. *Virology* 231: 141-147.

- Bousalem, M., Candresse, T., Quiot-Douine, L. and Quiot, J. B. (1994a): Correlation between three techniques for differentiating between plum pox *potyvirus* isolates. EPPO Bulletin 24: 651-656.
- Bousalem, M., Candresse, T., Quiot-Douine, L. and Quiot, J. B. (1994b): Comparison of three methods for assessing plum pox virus variability: Further evidence for the existence of two major groups of isolates. J. Phytopathol. 142: 163-172.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. and Watson, L. (1996): Viruses of Plants – Descriptions and Lists from the VIDE Database. CAB International, Wallingford 1996.
- Calder, V. L. and Ingerfeld, M. (1990): The roles of the cylindrical inclusion protein of a *potyvirus* in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. J. Struct. Biol. 105: 62-66.
- Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Perez, E., Camarasa, E., García, J. A., López-Moya, J. J., López-Abella, D., Vela, C. and Sanz, A. (1994): Detection of plum pox *potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non structural proteins. EPPO Bulletin 24: 569-577.
- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J. B. and Dunez, J. (1998): Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates of plum pox *potyvirus*. Phytopathology 88: 198-204.

- Candresse, T., Macquaire, G., Lanne, M., Bousalem, M., Quiot-Douine, L., Quiot, J. B. and Dunez, J. (1995): Analysis of plum pox virus variability and development of strain-specific PCR assay. *Acta Hort.* 386: 357-369.
- Candresse, T., Macquaire, G., Laneau, M., Bousalem, M., Wetzel, T., Quiot-Douine, L., Quiot, J. and Dunez, J. (1994): Detection of plum pox *potyvirus* and analysis of its molecular variability using immunocapture PCR. *EPPO Bulletin* 24: 585-594.
- Carrington, J. C. and Freed, D. D. (1990): Cap-independent enhancement of translation by a plant *potyvirus* 5' nontranslated region. *J. Virol.* 64: 1590-1597.
- Carrington, J. C., Freed, D. D. and Sanders, T. C. (1989): Autocatalytic processing of the *potyvirus* helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *J. Virol.* 63: 4459-4463.
- Carrington, J. C., Jensen, P. E. and Schaad, M. C. (1998): Genetic evidence for an essential role for *potyvirus* CI protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal* 14: 393-400.
- Cervera, M. T., Reichmann, J. L., Martín, M. T. and García, J. A. (1993): 3' -Terminal sequence of the plum pox virus PS and ö6 isolates: evidence for RNA recombination within the *potyvirus* group. *J. Gen. Virol.* 74: 329-334.
- Chenault, K. D. and Melcher, U. (1994): Phylogenetic relationships reveal recombination among isolates of cauliflower mosaic virus. *J. Mol. Evol.* 39: 496-505.

- Christoff, A. (1947): Sharkata po slivite. Izvest. na Kam. na nar. kultura. Ser. Biol. Zemed. Lesovod. 1(60): 261-296.
- Chu, M., López-Moya, J.J., Llave-Correas, C. and Pirone, T.P. (1997): Two separate regions in the genome of tobacco etch virus contain determinants of the wilting response of Tabasco pepper. Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 472-480.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977): Characteristics of the microplate of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- Converse, R. H. and Martin, R. R. (1993): ELISA methods for plant viruses. In: Hampton, R., Ball, E. and De Boer, S. (eds) Serological Methods for Detection of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul. Second Printing 179-196.
- Crescenzi, A., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Levy, L. and Hadidi, A. (1994): Plum pox virus (PPV) in sweet cherry. Acta Hort. 386: 219-225.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman, C. R., Schaad, M. C. and Carrington, J. C. (1995): Long-distance movement factor: A transport function of the *potyvirus* helper component proteinase. Plant Cell 7: 549-559.
- Deborré, G., Maiss, E. and Jelkmann, W. (1995): Biological and molecular biological investigations of several plum pox virus (PPV) isolates. Acta Hort. 386: 253-362.
- Dolja, V. V. and Carrington, J. C. (1992): Evolution of positive-strand RNA viruses. Semin. Virol. 3: 315-326.

- Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vadenbosch, K. A. and Carrington, J. C. (1995): Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch *potyvirus*. *Virology* 206: 1007-1016.
- Dolja, V. V., Herndon, K. L., Pirone, T. P. and Carrington, J. C. (1993): Spontaneous mutagenesis of a plant *potyvirus* genome after insertion of a foreign gene. *J. Virol.* 67: 5968-5975.
- Dougherty, W. G. and Hiebert, E. (1980): Translation of *potyvirus* RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the *potyvirus* genome. *Virology* 104: 174-182.
- Dougherty, W. G. and Parks, T. D. (1989): Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptid cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assay. *Virology* 172: 145-155.
- Edwardson, J. R. and Christie, R. G. (1991): The *Potyvirus* Group. Volume III. Agricultural Experiment Station, University of Florida, Gainesville 1991. Monograph No. 16-III. 733-751.
- Erdős, Z., Kerek, M., Kölber, M., Nyújtó, E. and Németh, M. (1995): Reaction of Hungarian apricot cultivars and hybrids exposed to high PPV infection. *Acta Hort.* 386: 298.
- Fernández, A., Laín, S. and García, J. A. (1995): RNA helicase activity of the plum pox *potyvirus* CI protein expressed in

Escherichia coli. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 23: 1327-1332.

Gáborjányi R. (1986): Biológiai védekezés a növényi vírusok ellen: Elméleti lehetőségek és gyakorlati eredmények. *Növénytermelés* 35: 561-567.

Gáborjányi R. (1998): Vírusok. In: Érsek T. és Gáborjányi R. (szerk.) *Növénykórokozó mikroorganizmusok*. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest 1998. 61-92.

Gáborjányi R., Horváth J. és Wolf I. (1999): A vírus-ellenállóságra nemesítés hagyományos módszerei. In: Horváth J. és Gáborjányi R. (szerk.) *Növényvírusok és növényvirológiai vizsgálati módszerek*. Mezőgazda Kiadó, Budapest 1999. 341-359.

Gáborjányi R., Kőmíves T. és Király Z. (1995): A fenntartható mezőgazdaság növényvédelme. *Növényvédelem* 31: 49-57.

Gáborjányi R. és Tóbiás I. (1986a): A vírusfertőzés inhibitorai és a vírusbioszintézist gátló anyagok. *Növénytermelés* 35: 139-146.

Gáborjányi R. és Tóbiás I. (1986b): A növényi vírusok elleni kémiai védekezés lehetőségei: Indukált antivirális anyagok és kemoterápiás szerek. *Növénytermelés* 35: 341-350.

Gal-On, A. (2000): A point mutation in the FRNK motif of the *potyvirus* helper component-proteinase gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. *Phytopathology* 90: 467-473.

- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. and Raccach, B. (1992): A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *J. Gen. Virol.* 73: 2183-2187.
- García, J. A., Martín, M. T., Cervera, M. T. and Riechmann, J. L. (1992): Proteolytic processing of the plum pox *potyvirus* polyprotein by NIa protease at a novel cleavage site. *Virology* 188: 697-703.
- García, J. A., Riechmann, J. L. and Laín, S. (1989a): Proteolytic activity of the plum pox *potyvirus* NIa-like protein in *Escherichia coli*. *Virology* 170: 362-369.
- García, J. A., Riechmann, J. L. and Laín, S. (1989b): Artificial cleavage site recognized by plum pox *potyvirus* in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 63: 2457-2460.
- García, J. A., Riechmann, J. L., Martín, M. T. and Laín, S. (1989c): Proteolytic activity of the plum pox *potyvirus* NIa-protein on excess of natural and artificial substrates in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 257: 269-273.
- Govier, D. A. and Kassanis, B. (1974): A virus-induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. *Virology* 61: 420-426.
- Gunashinge, U. B. and Berger, P. H. (1991): Association of potato virus Y gene products with chloroplast in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 452-457.

- Guo, H. S. and García, J. A. (1997): Delayed resistance to plum pox *potyvirus* mediated by a mutated RNA replicase gene: Involvement of a gene-silencing mechanism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 160-170.
- Guo, H. S., López-Moya, J. J. and García, J. A. (1998): Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric plum pox *potyvirus* genome after insertion of a foreign gene. *Virus Res.* 57: 183-195.
- Guo, H. S., López-Moya, J. J. and García, J. A. (1999): Mitotic stability of infection-induced resistance to plum pox *potyvirus* associated with transgene silencing and DNA methylation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 103-111.
- György B. (1976): A sharka vírus - plum pox - fertőzés hatása a Besztercei szilva beltartalmi értékére. *Gyümölcsstermesztés* 3: 161-171.
- Haldeman-Cahill, R., Daros, J. A. and Carrington, J. C. (1998): Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *J. Virol.* 72: 4072-4079.
- Harrison, B. D. (1992): Advances and prospects in potato virology with special reference to virus resistance. *Neth. J. Plant Pathol.* 98: 1-12.
- Hirst, G. K. (1962): Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses and influenza virus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 27: 303-309.

- Horváth J. (1972): Növényvírusok, vektorok, vírusátvitel. Akadémiai Kiadó, Budapest 1972.
- Horváth, J. (1993a): A list of proposed letter codes for hosts and non-hosts of plant viruses. *Acta Phytopathol. Hung.* 28: 21-58.
- Horváth, J. (1993b): Hosts and non-hosts in the diagnostic strategy of plant viruses. *Acta Phytopathol. Hung.* 28: 257-354.
- Horváth J. (1999): A vírusok osztályozása és rendszertana. In: Horváth J. és Gáborjányi R. (szerk.) Növényvírusok és növényvirologiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó, Budapest 1999. 22-67.
- Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H. and Raccah, B. (1994): Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* 75: 1407-1414.
- Husz B. és Klement Z. (1950): A csonthéjas gyümölcsfák vírusos mozaik-betegsége. *Agrártud. Egyetem Kert- és Szőlőgazdaságtudományi Karának Évkönyve 1950.* 83-94.
- Jacobson, S. J., Konings, D. M. A. and Sarnow, P. (1993): Biochemical and genetic evidence for pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral amplification. *J. Virol.* 67: 2961-2971.
- Jayaram, Ch., Van Deusen, R. A., Eggenberger, A. L., Schwabacher, A. W. and Hill, J. H. (1998): Characterisation of a monoclonal antibody recognizing a DAG-containing epitope conserved in aphid transmissible *potyviruses*: evidence that the DAG motif is in a defined conformation. *Virus Res.* 58: 1-11.

- Jenser G. (1989): A szilvahimlő vírus epidemiológiájáról. *Növényvédelem* 6: 241-246.
- Jenser, G., Szalay-Marzsó, L. and Meszleny, A. (1980): Study on the flight activity of aphid vectors of plum pox virus. *Acta Phytopathol. Hung.* 24: 445-447.
- Jordović, M. and Janda, L. (1963): Morphological, anatomical and chemical changes on the fruits of some plum varieties infected by virus plum pox disease. *Zašt. Bilja* 14 (16): 653-670.
- Kalashyan, Yu. A. and Bilkely, N. D. (1989): Identifikatsiya virus sharky na vishne. *Plant Virology. Proceedings of the 10th Conference of the Czechoslovak Plant Virologist* 106.
- Kálmán D. és Gáborjányi R. (1998): A szalicilsav és a BTH hatása a dohánynövények dohány mozaik vírussal szembeni fertőzés-fogékonyságára és betegség-ellenállóságára. *Növény-védelem* 34: 593-599.
- Kassanis, B. and Šutić, D. (1965): Some results of recent investigations on sarka (plum pox) virus disease. *Zast. Bilja* 85-88: 335-340.
- Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. (1995): Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch *potyvirus*. *Virology* 206: 268-273.
- Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. (1998): A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-470.

- Kasschau, K. D., Cronin, S. and Carrington, J. C. (1997): Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch *potyvirus* helper component-protease. *Virology* 228: 251-262.
- Kegler, H. (1962): The sarka disease of plum. *Nachrbl. Dtsch. Pflanzensch. Dienst* 16: 41-43.
- Kerlan, C. et Dunez, J. (1979): Differentiation biologique et serologique de soches de virus de la Sharka. *Ann. Phytopathol.* 11: 241-250.
- Klein, P. G., Klein, R. R., Rodriguez-Cerezo, E., Hunt, A. G. and Shaw, J. G. (1994): Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204: 759-769.
- Krczal, H., und Kuncze, L. (1972): Untersuchungen zur Übertragung de Sharkavirus durch Blattläuse. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Fortstwirtschaft. Berlin-Dahlem* 144: 71-83.
- Kúdela, O., Glasa, M., Fuchs, E. and Kúdelová, M. (1998): Strain variability of plum pox virus isolates from Western Slovakia. *Acta Virol.* 42: 71-74.
- Kuncze, L. und Krczal, H. (1968): Versuche zur Übertragung des sarkavirus durch die Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* Sulz. *Nachrbl. Dtsch. Pflanzensch. Dienst.* 20: 97-98.
- Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J. B., Avinent, L. and Llacer, G. (1995): Aphids as vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Hort.* 368: 207-218.

- Lai, M. M. C. (1992): RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* 56: 61-79.
- Lain, S., Riechmann, J. L. and García, J. A. (1989): The complete nucleotide sequence of plum pox *potyvirus* RNA. *Virus Res.* 13: 157-172.
- Lain, S., Riechmann, J. L. and García, J. A. (1990): RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res.* 18: 7003- 7006.
- Lain, S., Riechmann, J. L., Méndez, E. and García, J. A. (1988): Nucleotid sequence of the 3' terminal region of plum pox virus RNA. *Virus Res.* 10: 325-342.
- Langenberg, W. G. and Zhang, L. (1997): Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *J. Struct. Biol.* 118: 243-247.
- Lawson, R. H. and Hearon, S. S. (1971): The association of pinwheel inclusions with plasmodesmata. *Virology* 44: 454-456.
- Leclant, F. (1973): Ecological aspect of sharka (plum pox) virus transmission in southeastern France: Additional aphid vectors. *Ann. Phytopathol.* 54: 431-439.
- Lecoq, H., Lot, H., Kleinhempel, H. and Kegler, H. (1988): Europe. In: R. G. Milne (ed.) *The Plant Viruses. Vol. 4. The Filamentous Plant Viruses.* Plenum Press, New York 349-356.
- Levy, L., Damsteegt, V., Mavrodieva, V., Goley, E., Welliver, R. and Luster, D. (2000): Identification of plum pox *potyvirus* in the Unated States. 18th International Symposium on Virus and Virus-

like Diseases of Temperate Fruit Crops, Canterbury, England
Abstr. 37.

- Levy, L., Scorza, R., Damsteegt, V., Callahan, A. and Ravelonandro, M. (1998): Transfer of plum pox resistance from a transgenic clone of *Prunus domestica* through hybridization. 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland Abstr. Vol. 3. 5.3.21.
- Li, X. H., Valdez, P., Olvera, R. E. and Carrington, J. C. (1997): Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *J. Virol.* 71: 1598-1607.
- López-Moya, J. J., Canto, T., Díaz-Ruíz, J. R. and López-Abella, D. (1995): Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox virus isolate with the aid of a potato virus Y helper component. *J. Gen. Virol.* 76: 2293-2297.
- López-Moya, J. J., Canto, T., López-Abella, D. and Díaz-Ruíz, J. R. (1994a): Differentiation of Mediterranean plum pox virus by coat protein analysis. *Plant Pathol.* 43: 164-171.
- López-Moya, J. J., López-Abella, D., Díaz-Ruíz, J. R., Martínez-García, B. and Gáborjányi, R. (1997): Serological characterization of Hungarian plum pox virus isolates. *Z. Naturforsch.* 52c: 391-395.
- López-Moya, J. J. and Pirone, T. P. (1998): Charge changes near the N terminus of the coat protein of two *potyviruses* affect virus movement. *J. Gen. Virol.* 79: 161-165.

- López-Moya, J. J., Sanz, A., Cambra, M., Gorris, M. T., Anaya, C., Miguet, J. G., Cores, E. and López-Abella, D. (1994b): Production and characterization of monoclonal antibodies to plum pox virus and their use in differentiation of Mediterranean isolates. *Arch. Virol.* 135: 293-304.
- López-Moya, J. J., Wang, R. Y. and Pirone, T. P. (1999): Context of the coat protein DAG motif affects *potyvirus* transmissibility by aphids. *J. Gen. Virol.* 80: 3281-3288.
- Mahajan, S., Dolja, V. V. and Carrington, J. C. (1996): Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *J. Virol.* 70: 4370-4379.
- Maia, I. G., Haenni, A. L. and Bernardi, F. (1996): Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J. Gen. Virol.* 77: 1335-1341.
- Maiss, E., Deborré, G., Jelkmann, W. and Casper, R. (1995): Complete nucleotide sequence of plum pox *potyvirus* isolate (PPV-SC) deriving from sour cherries and influence of a coat protein sequence motif on aphid transmission. *Acta Hort.* 386: 340-345.
- Maiss, E., Timpe, U., Brisske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. and Kattinger, H. W. D. (1989): The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *J. Gen. Virol.* 70: 513-524.
- Malysenko, S. I., Kondakova, O. A., Nazarova, J. V., Kaplan, I. B. and Atabekov, J. G. (1993): Reduction of tobacco mosaic virus

- accumulation in transgenic plants production non-functional viral transport proteins. *J. Gen. Virol.* 74: 1149-1156.
- Martín, M. T., Cervera, M. T. and García, J. A. (1995): Properties of the active plum pox *potyvirus* RNA polymerase complex in defined glycerol gradient fractions. *Virus Res.* 37: 127-137.
- Martín, M. T. and García, J. A. (1991): Plum pox *potyvirus* RNA replication in a crude membrane fraction from *Nicotiana clevelandii* leaves. *J. Gen. Virol.* 72: 785-790.
- Martín, M. T., García, J. A., Cervera, M. T., Goldbach, R. W. and van Lent J. W. M. (1992): Intracellular localization of three non-structural plum pox *potyvirus* proteins by immunogold labelling. *Virus Res.* 25: 201-211.
- Massonie, G. (1976): Pucerons et transmission de la Sharka. Extrait en la brochure "la Sharka". Publ. par l' INUU. FLEC. INRA. 13-20.
- Matthews, R. F. (1991): *Plant Virology*. Academic Press. New York 1991.
- Meyer-Kahsnitz, S. (1993): *Angewandte Pflanzenvirologie*. Bernhard Thalacker Verlag, Braunschweig 218.
- Migliori, A., Quiot, J.-B., Labonne, G., Boudon, J.-P., Lauriaut, F., Freydeir, M. et Renaud, L.-Y. (1998): L'huile minérale, moyen de lutte préventive. Contre l'agent de la Sharka, disséminé par des pucerons en pépinière. *PHYTOMA-La Défense des Végétaux* 507: 32-35.
- Milius, S. (1999): First plum pox turns up in North America. *Sciences News* 21: 325.

- Minoiu, N. (1979): Neue Untersuchungen über das Scharka-Virus (plum pox virus). Arch. Phytopathol. Pflanzensch., Berlin 11: 389-397.
- Moericke, V. (1955): Über die Lebensgewohnheiten der geflügelten Blattläuse (Aphididae) unter besonderer Berücksichtigung des Verhaltens beim Laden. Zeitschrift für Angewandte Entomologie. 8: 877-910.
- Mueller, E., Gilbert, J., Davenport, G., Brigneti, G. and Baulcombe, D. C. (1995): Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. Plant J. 7: 1001-1013.
- Mumford, R. A., Ostoja-Starzewska, S. A., Preston, S. and Danks, C. (2000): The diagnosis of plum pox virus in the UK: from strain differentiation to on-site detection. 18th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Canterbury, England, Abstr. 98.
- Myrta, A., Boscia, D., Potere, O., Kölber, M., Di Terlizzi, B., Cambra, M. and Savino, V. (2000): Existence of two serological subclusters of plum pox virus, strain M. 18th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Canterbury, England, Abstr. 97.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B. and Digiario, M. (1994): Occurrence and distribution of sharka in Abania. Phytopathol. Medit. 33: 59-62.
- Nagy, P. D. and Simon, A. E. (1997): New insights into the mechanisms of RNA recombination. Virology 235: 1-9.

- Németh, M. (1963): Field and greenhouse experiments with plum pox virus. *Phytopath. Medit.* 2: 162-166.
- Németh, M. (1986): *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Akadémiai Kiadó, Budapest 1986.
- Németh M. (1992): Helyzetkép a gyümölcsfa vírusok elterjedéséről és gazdasági jelentőségéről a hazai gyümölcsösökben. *Növényvédelem* 28: 26-32.
- Németh, M. and Kölber, M. (1980): A new and quick detection of sharka virus in the field. *Acta Phytopath.* 15: 207-214.
- Németh, M. and Kölber, M. (1983): Additional evidence of seed transmission of plum pox virus in apricot, peach und plum proved by ELISA. *Acta Hort.* 130: 293-300.
- Németh M. és Kölber M. (1998): A vírusmentes gyümölcs szaporítóanyag-előállítás rendszerének hazai kialakulása, jelenlegi problémái és kutatási feladatai. *Növényvédelem* 35: 409-414.
- Nemtchinov, L., Hadidi, A., Maiss, E., Cambra, M., Candresse, T. and Damsteegt, V. D. (1996): Sour cherry strain of plum pox virus (PPV): Molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology* 86: 1215-1221.
- Palkovics, L., Burgyán, J. and Balázs, E. (1993): Comparison sequence analysis of four complete sequences of plum pox virus strains. *Virus Genes* 7: 339-347.
- Palkovics, L., Karamova, N., Pribék, D. and Balázs, E. (1998): Changes in the 5' non-coding region of plum pox virus in

- connection with symptom development. 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland, Abstr. Vol.2. 1.11.34.
- Palkovics, L., Wittner, A. and Balázs, E. (1995): Pathogen-derived resistance induced by integrated plum pox *potyvirus* coat protein gene in *Nicotiana benthamiana* plants. Acta Hort. 386: 311-317.
- Papingji, A. (1965): Plum ring pox on plum. (Lija në formë unaze e kumbullës.) Bull. Shke. Bujq. Tiranë 2: 31-32.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. and Wimmer, E. (1998): Protein-primed RNA synthesis by purified *poliovirus* RNA polymerase. Nature 393: 280-284.
- Peng, Y. H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. and Raccach, B. (1998): Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic *potyvirus*: effects on aphid transmission and binding to purified virions. J. Gen. Virol. 79: 897-904.
- Pirone, T. P. (1977): Accessory factors in non-persistent virus transmission. J. Gen. Virol. 55: 221-235.
- Pirone, T. P. (1991): Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. Semin. Virol. 2: 81-87.
- Pirone, T. P. and Blanc, S. (1996): Helper-dependent vector transmission of plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 34: 227-247.
- Pocsai E. és Horváth J. (1997): Növénypatogén vírusok előfordulása a magyarországi folyók és tavak vizeiben. Növényvédelem 33: 69-76.

- Pocsai, E., Horváth, J. and Kazinczi, G. (1998): New results on the occurrence of plant viruses in Hungarian rivers and lakes. *Acta Bot. Croat.* 57: 1-10.
- Powell-Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. and Beachy, R. N. (1986): Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Pribék, D. and Gáborjányi, R. (1997): Hungarian plum pox virus isolates represent different serotypes. *Acta Phytopathol. Hung.* 32: 281-288.
- Pribék D., Tóbiás I., Palkovics L., Horváth, J. és Gáborjányi R. (2000): A szilvahimlő vírus szerológiai változékonyságának vizsgálata. X. Növényvédelmi Fórum, Keszthely Abstr. 52.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C. and Bowman Vance, V. (1997): Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9: 859-868.
- Ravelonandro, M., Monsion, M., Delbos, R. and Dunez, J. (1993): Variable resistance to plum pox virus and potato virus Y infection in transgenic *Nicotiana* plants expressing plum pox virus coat protein. *Plant Sci.* 91: 157-169.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., Bachelier, J. C., Labonne, G., Levy, L., Damsteegt, V., Callahan, A. M. and Dunez, J. (1997): Resistance of transgenic *Prunus domestica* to plum pox virus infection. *Plant Dis.* 81: 1231-1235.

- Regner, F., da Camara Machado, A., Laimer da Camara Machado, M., Steinkellner, H., Mattanovich, D., Hanzer, V., Weiss, H. and Katinger, H. (1992): Coat protein mediated resistance to plum pox virus in *Nicotiana clevelandii* and *N. benthamiana*. *Plant Cell Rep.* 11: 30-33.
- Restrepo, M. A., Freed, D. D. and Carrington, J. C. (1990): Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell* 2: 987-998.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M. and Dunez, J. (1996): Frequent occurrence of recombinant *potyvirus* isolates. *J. Gen. Virol.* 77: 1953-1965.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. and Maule, A. J. (1999): New advances in understanding the molecular biology of plant/*potyvirus* interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 367-376.
- Riechmann, J. L., Cervera, M. T. and García, J. A. (1995): Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *J. Gen. Virol.* 76: 951-956.
- Riechmann, J. L., Laín, S. and García, J. A. (1990): Infectious in vitro transcripts from a plum pox *potyvirus* cDNA clone. *Virology* 177: 710-716.
- Riechmann, J. L., Laín, S. and García, J. A. (1991): Identification of the initiation codon of plum pox *potyvirus* genomic RNA. *Virology* 185: 544-552.
- Riechmann, J. L., Laín, S. and García, J. A. (1992): Highlights and prospects of *potyvirus* molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73: 1-16.

- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E. D., Pirone, T.P. and Shaw, J. G. (1993): Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusion in *potyvirus*-infected cells. *J. Gen. Virol.* 74: 1945-1949.
- Rodríguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J. G., Lomonosoff, G. P., Qiu, S. G., Linstead, P., Shanks, M. and Risco, C. (1997): The coat and cylindrical inclusion proteins of a *potyvirus* are associated with connections between plant cells. *Virology* 236: 296-306.
- Rodríguez-Cerezo, E. and Shaw, J. G. (1991): Two newly detected nonstructural viral proteins in *potyvirus*-infected cells. *Virology* 185: 572-579.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. and Lucas, W. J. (1997): Capsid protein and helper component-proteinase function as *potyvirus* cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237: 283-295.
- Roy, A. S. and Smith, I. M. (1994): Plum pox situation in Europe. *EPPO Bulletin* 24: 515-523.
- Sáenz, P., Cervera, M. T., Dalot, S. Quiot, L, Quiot, J-B., Riechmann, J. L. and García, J. A. (2000): Identification of a pathogenicity determinant of plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. *J. Gen. Virol.* 81: 557-566.
- Salamon P. és Palkovics L. (1997): A plum pox virus (PPV) természetes előfordulása kökényen (*Prunus spinosa* L.) és a törpemandula (*Amygdalus nana* L.) vonalas levélmintázottság betegsége. 43. Növényvédelmi Tudományos Napok. Abstr. 125.

- Salomon, R. and Bernardi, F. (1995): Inhibition of viral aphid transmission by the N-terminus of the maize dwarf mosaic virus coat protein. *Virology* 213: 676-679.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York 1989.
- Sasaya, T., Torrance, L., Cowan, G. and Ziegler, A. (2000): Aphid transmission studies using helper component proteins of potato virus Y expressed from a vector derived from potato virus X. *J. Gen. Virol.* 81: 1115-1119.
- Schaad, M. C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S. and Carrington, J. C. (1996): Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch *potyvirus*: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J. Virol.* 70: 7039-7048.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. and Carrington, J. C. (1997a): Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO Journal* 16: 4049-4059.
- Schaad, M. C., Lellis, A. D. and Carrington, J. C. (1997b): VPg of tobacco etch *potyvirus* is a host genotype-specific determinant for long distance movement. *J. Virol.* 71: 8624-8631.
- Scorza, R., Ravelonandro, M., Callahan, A. M., Cordts, J. M., Fuchs, M., Dunez, J. and Gonsalves, D. (1994): Transgenic plums (*Prunus*

- domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. Plant Cell Rep. 14: 18-22.
- Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H. and Ward, C. W. (1988): The N and C termini of the coat proteins of *potyviruses* are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. J. Gen. Virol. 69: 1497-1508.
- Shukla, D. D., Ward, C. W. and Brunt, A. A. (1994): The Potyviridae. CABI, University Press, Cambridge UK 1994.
- Simon, A. E. and Bujarski, J. J. (1994): RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 337-362.
- Simón-Buela, L., Guo, H. S. and García, J. A. (1997): Long sequences in the 5' noncoding region of plum pox virus are not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. Virology 233: 157-162.
- Simón-Buela, L., Osaba, L., García, J. A. and López-Moya, J. J. (2000): Preservation of 5'-end integrity of a *potyvirus* genomic RNA is not dependent on template specificity. Virology 269: 377-382.
- Staniulis, J., Stankiene, J., Sasnauskas, K. and Dargeviciute, A. (1998): First report of sharka disease caused by plum pox virus in Lithuania. Plant Dis. 82: 1405.
- Surányi D., Pribék D. és Gáborjányi R. (1996): nem közölt eredmények alapján.

- Šutić, D., Babović, M. and Marković, S. (1976): Transmissibility of some sharka virus strains by *Myzus persicae* Sulz. depending on various infection sources. *Acta Hort.* 67: 165-170.
- Šutić, D., Jordović, M., Ranković, M. and Fesić, H. (1971): Comparative studies of some sharka (plum pox) virus isolates. *Ann. Phytopathol.* 185-191.
- Szabó Z., Nyéki J. és Orova M. (1991): Szilvafajták ellenállósága a szilvahimlő vírussal (plum pox virus) szemben. *Kertgazdaság* 23(3): 30-45.
- Szalay-Marzsó L. (1969): Levéltetvek a kertészetben. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest 1969.
- Szilassy D, Kazinczi G. és Horváth J. (1999): A vírus-ellenállóságra nemesítés biotechnológiai módszerei. In: Horváth J. és Gáborjányi R. (szerk.) *Növényvírusok és növényvirologiai vizsgálati módszerek.* Mezőgazda Kiadó, Budapest 1999. 360-388.
- Szirmai J. (1948a): A kajszi vírusbetegsége. *Magyar Bor és Gyümölcs* 3(17): 7-8.
- Szirmai J. (1948b): Kajszi vírus a faiskolában. *Kert és Szőlő* 2: 10.
- Szirmai, J. (1961): Report on fruit tree virus diseases in Hungary. *Tijds. Planteavl.* 65: 220-229.
- Taylor, L. R. (1974): Insect migration, flight periodicity and the boundary layer. *J. Anim. Ecol.* 43: 225-238.
- Taylor, L. R. (1980): *A Handbook for Aphid Identification.* Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Hertfordshire, England 1980.

- Taylor, L. R., French, R. A. and Palmer, J. M. P. (1969): The significance of the trapping height of 40 ft. 1969. Rothamsted Experimental Station, Report for 1968. Part 1.
- Tepfer, M. and Balázs, E. (1997): Virusresistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact. Springer Verlag, Berlin 1997.
- Teycheney, P. Y., Tavert, G., Delbos, R. P., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1989): The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). *Nucleic. Acids Res.* 17: 10115- 10116.
- Thakur, P. D., Bhardwaj, S. V., Garg, I. D., Kishore-Khosla, Sharma, D. R. and Khosla, K. (1994): Plum pox virus on stone fruits from India – a new record. *Plant Dis. Res.* 9: 100-102.
- Thornbury, D. W., Patterson, C. A., Dessens, J. T. and Pirone, T. P. (1990): Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain potato virus C. *Virology* 178: 573-578.
- Thresh, J. M. (2000): szóbeli közlés
- Timpe, U., Maiss, E., Landsmann, J. und Casper, R. (1992): “Coat protein mediated cross protection” gegen das Sharka virus. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem* 283: 212.
- Tóbiás I. (1992): A szilvahimlő vírus hazai előfordulása őszibarackon. *Növényvédelem* 28: 49-53.
- Tóbiás I., Győző K., Barkaszi I. és Szabó Z. (1992): A szilvahimlő vírus kimutatása őszibarackból és a fajták érzékenysége. *Kertgazdaság* 24: 69-77.

- Tóbiás I. és Papp L. (1991): A plum pox vírus kimutatása csonthéjas gyümölcsökből. *Kertgazdaság* 3: 59-65.
- Tóbiás I., Pribék D., Palkovics L. és Gáborjányi R. (1999): A szilvahimlő vírus változékonysága természetes körülmények között. IX. Növényvédelmi Fórum, Keszthely Abstr. 65.
- Trifonov, D. (1965): Plum pox infection rate of some varieties of plums in the heavily contained region of Bulgaria. *Zast. Bilja* 16: 375-378.
- Trifonov, D. (1974): Susceptibility to the plum pox virus of twelve varieties of the cultivar Kyustendilska sinya sliva. *Publ. House Bulg. Acad. Sc., Sofia* pp. 131-137.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I. G., Arruda, P., Haenni, A. and Bernardi, F. (2000): Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* 268: 104-111.
- Vaclav, V. (1966): Sirenje sarke slive u produkcju centralne Bosne. *Rad. Poljopriv. Fak. Univ. Sarajevo* 15: 3-15.
- Van Oosten, H. J. (1975): Susceptibility of some woody plant species, mainly *Prunus* ssp. to sharka (plum pox) virus. *Neth. J. Plant Pathol.* 81: 199-203.
- Varrelmann, M. and Maiss, E. (2000): Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* 81: 567-576.

- Verhot, J. and Carrington, J. C. (1995a): Debilitation of plant *potyvirus* infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *J. Virol.* 69: 1582-1590.
- Verhot, J. and Carrington, J. C. (1995b): Evidence that the *potyvirus* P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J. Virol.* 69: 3668-3674.
- Wang, R. Y., Ammar, E. D., Thornbury, D. W., López-Moya, J. J. and Pirone, T. P. (1996): Loss of *potyvirus* transmissibility and helper component activity correlates with non-retention of virions in aphid stylets. *J. Gen. Virol.* 77: 861-867.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macqualre, G., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1992): A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox *potyvirus* detection. *J. Virol. Methods* 39: 27-37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R. P., Mazyad, H., Aboul-Ata, A. E. and Dunez, J. (1991a): Nucleotide sequence of the 3' -terminal region of the RNA of the El Amar strain of plum pox *potyvirus*. *J. Gen. Virol.* 72: 1741-1746.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., and Dunez, J. (1991b): A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox *potyvirus* detection. *J. Virol. Methods* 33: 355-365.
- White, J. L. and Kaper, J. M. (1989): A simple method for detection of viral satellite RNAs in small tissue samples. *J. Virol. Methods* 23: 83-94.

- Wisler, G. C., Purcifull, D. E. and Hiebert, E. (1995): Characterization of the P1 protein and coding region of the zucchini yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 76: 37-45.
- Wittner, A., Palkovics, L. and Balázs, E. (1998): *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Res.* 53: 97-103.