

Új csonthéjasokat fertőző vírusok kimutatása Magyarországon

Baráth Dániel^{1*}, Czotter Nikoletta¹, Bükki Alexandra¹, Oláh Beatrix¹, Balássy Júlia¹, Varga Tünde¹, Szabó Luca², Tóth Tímea², Kirilla Zoltán², Kocsis László³, Preininger Éva², Lakatos Tamás² és Várallyay Éva^{1*}

¹Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u. 4.

²Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet, 1223 Budapest Park utca 2.

³Pannon Egyetem Georgikon Kar, Kertészeti Tanszék, 8360, Deák Ferenc utca 16.

*email:barath.daniel@abc.naik.hu

Összefoglalás

A gyümölcsfákat fertőző vírusok igen fontos szerepet játszanak a kajszi megbetegítésében. Az egyre gyakrabban használt metagenomikai módszerek az ismert és karantén kórokozókon kívül olyan vírusok kimutatását is lehetővé teszik, melyek jelenléte az adott fajon, vagy adott országban eddig nem volt ismert. Munkacsoportunk egy ilyen metagenomikai módszerrel, a kis RNS-ek újgenerációs szekvenálásával írta le a Little Cherry Virus 1 (LChV-1) és a Cherry Virus A (CVA) vírusokat kajszin, hazánkban. Az így kapott eredményeiket RT-PCR-rel, a CVA esetében Northern blottingal is igazoltuk. A vírusdarabok klónozása és Sanger szekvenálása után a hazai variánsok filogenetikai rokonsági viszonyait, valamint a vírus magyarországi elterjedését is megállapítottuk.

Kulcsszavak: NGS, kajszi, LChV-1, CVA, vírusdiagnosztika

Abstract

Orchards can be affected by viral infections, which may have an important role to cause diseases on apricot. With new metagenomic approaches we can prove the presence of all viruses present in the investigated plant, including the ones not described on a particular host, or country yet. Our workgroup has demonstrated the presence of Little Cherry Virus 1 (LChV-1) and Cherry Virus A (CVA) from Hungarian apricot trees with the use of Next-Generation Sequencing (NGS)

of small RNAs. Our results were confirmed by RT-PCR, and by Northern blot in the case of CVA. After cloning and Sanger sequencing of viral fragments we investigated their phylogenetic relationships and we determined the spreading of these viruses at different part of Hungary.

Keywords: NGS, apricot, LChV-1, CVA, virus diagnostics

Bevezetés

Csonthéjas ültetvényeink számos patogén, köztük vírusok fertőzésének vannak kitéve. A vírusfertőzés során megjelenő tünetek következményeként csökkenhet a termés mennyisége, romolhat a minősége. A vírusok ellen nem áll rendelkezésünkre megfelelő növényvédelmi technológia, az egyetlen védekezési mód a megelőzés, ami az őket terjesztő vektorok elleni védekezésre és a vegetatívan szaporított gyümölcsfák esetében, a vírusmentes szaporítóanyag használatára korlátozódik. Ebből kifolyólag az ültetvény telepítésekor használt szaporítóanyag vírusdiagnosztikája kiemelkedően fontos szereppel bír. A vírusdiagnosztikát hagyományosan ELISA és PCR vizsgálatokkal, valamint biotesztekkel végzik. Ezek a vizsgálatok alkalmasak az adott kórokozó kimutatására, amennyiben rendelkezésünkre áll a vírus köpenyfehérjét felismerő antitest, vagy a vírus specifikus primerek tervezéséhez a vírus örökítő anyagának szekvenciája.

A metagenomikai módszerek használata ezzel ellentétben nemcsak egy adott, hanem az összes, jelenlevő vírus kimutatására alkalmas. Ilyen metagenomikai módszer a vizsgált minta totál RNS-ének, vagy a fertőzés során keletkezett vírus specifikus kis RNS-einek újgenerációs szekvenálása, melyekkel új, illetve az adott országban, vagy adott gazdanövényen még nem azonosított vírusok jelenlétének igazolása is lehetséges (Barba és mtsai, 2013; Czotter és mtsai, 2016).

Vizsgálataink során Érdről gyűjtött kajszi mintákon végeztünk vírusdiagnosztikai felmérést kisRNS-ek újgenerációs szekvenálásával, majd az így azonosított Cseresznye A vírus (Cherry virus A – CVA) és a Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (Little cherry virus 1 – LChV1) jelenlétét vizsgáltuk RT-PCR-rel a NAIK GYKI Ceglédi és Újfehértói telephelyén.

Anyag és módszer

Kísérleteinkhez 2014, 2016, 2017-ben gyűjtöttünk levélmintákat a NAIK Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet érdi, ceglédi és újfehértói izolátor házaiban nevelt gyümölcsfákról. Egy fáról négy levelet szedtünk (a négy égtájnak megfelelően, az ágak

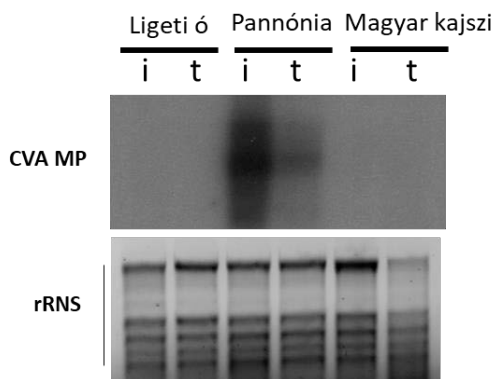
közepéről) és a felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az így begyűjtött mintákból 150 mg-ot használtunk fel RNS kivonáshoz, melyet Gambino optimalizált módszerével végeztünk (Gambino és mtsai, 2008).

A kivonatokból RNS keverékeket, „poolokat” állítottunk elő. Az így kapott RNS keverékből az Illumina TrueSeq Small RNA kit-jének általunk módosított protokollja alapján kisRNS könyvtárat készítettünk, majd a kisRNS könyvtárakat Illumina platformon szekvenáltattuk. A bioinformatikai elemzések után, a kapott eredményeket vírus specifikus RT-PCR-rel igazoltuk vissza. Ehhez az adott RNS keverékről reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk a Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit segítségével. Az RT-PCR-hez a Thermo Scientific Phire Green Hot Start II DNS polimerázát, a *Cherry virus A* tesztelésére a mozgási fehérje, míg a *Little cherry virus 1* esetében a HSP70 hőszokkfehérje, illetve a köpenyfehérje génekre tervezett indítószekvenciákat használtuk. Az amplifikált termékeket 1,2%-os agaróz gélen elektroforézissel választottuk el. Azokat a poolokat, melyekben a keresett vírust detektáltuk, fajta poolokra bontva vizsgáltuk tovább RT-PCR-rel a New England Biolabs Q5 polimerázát használva. Az így amplifikált termékek szekvenciáját pJET vektorba való klónozás után hagyományos Sanger szekvenálással határoztattuk meg. A filogenetikai elemzésekhez a MEGA6 program Maximum Likelihood algoritmusát használtuk. A vírusok Northern Blottal való kimutatásához 2 μg RNS-t választottunk el agaróz gélen. Nitrocellulóz membránra blottolás után radioaktívan jelölt vírusspecifikus próbával hibridizáltuk.

Eredmények

Az Érdről gyűjtött kajszi levélmintáink új generációs szekvenálása során találatot kaptunk a CVA és a LChV-1 vírusokra. A CVA jelenlétét igazoltuk izolátorházból és törzsültetvényből származó Pannónia kajsziából, a LChV-1 vírust pedig törzsültetvényben található Magyar kajsziából mutattuk ki.

A CVA előfordulása hazánkban eddig nem volt ismert. A vírus mozgási fehérjéjének amplifikált darabjának szekvenciáját a GenBank adatbázisában található szekvenciákhoz hasonlítva megállapíthatjuk, hogy a hazai izolátumot a nem cseresznye gazdanövényről izolált CVA szekvenciák közé tudjuk besorolni. A CVA jelenlétét nemcsak RT-PCR-rel, hanem Northern blottal is sikerült visszaigazolnunk.



1. ábra. CVA vírusra specifikus radioaktív próbával visszaigazoltuk a CVA vírus jelenlétét az Érdről gyűjtött Pannónia kajszi izolátorházban (i) és törzsültetvényen (t) nevelt egyedében is

A LChV1-et kajszi gazdáról először 2017 tavaszán Csehországban írták le, kutatócsoportunk ezzel egyidejűleg azonosította. A Magyar kajszi mintában azonosított LChV-1 vírus köpenyfehérjét és HSP70 hősokk fehérjét kódoló régiójának szekvenciáját is összehasonlítottuk az NCBI GenBank adatbázisával, amely alapján a hazai izolátum az olasz japánszilváról izolált LChV-1 szekvenciával (EU716000.1) mutatott legnagyobb hasonlóságot. Mivel ezen vírusok jelenléte hazánkban, a LChV1 jelenléte pedig kajszin eddig ismeretlen volt, meg szeretnénk volna vizsgálni, hogy vajon jelenlétük elszigetelt, vagy esetleg az ország más tájain is előfordulnak-e? A kérdés megválaszolásához további kajszi levélmintákat gyűjtöttünk Érdről, Ceglédre és Újfehértóról. A mintázott fák vírusfertőzöttségét a levélmintákból izolált RNS-ek RT-PCR vizsgálatával állapítottuk meg.

A CVA fertőzöttség elterjedésének vizsgálatakor az Érdről származó kajszikon tíz poolból hat esetben tapasztaltunk CVA fertőzöttséget. A vírus mind az izolátorházban, mind az új és öreg törzsültetvényen jelen volt. Az újfehértói és ceglédi izolátor házak fáit vizsgálva tíz poolból négy esetben találtunk CVA fertőzöttséget.

A LChV-1 kajsziarackon való elterjedésének vizsgálata során az Újfehértói és Ceglédi izolátor házakból gyűjtött poolozott minták közül tizből két esetben mutattuk ki a vírust. A LChV-1-et tartalmazó poolok további vizsgálata során a Ceglédi kedves, Ceglédi gömbölyű és Ceglédi zamatos fajtákon tapasztaltunk LChV-1 fertőzést. Az érdi kajsziarackok LChV-1 tesztelése során csak a régi törzsültetvényről gyűjtött mintákból sikerült igazolnunk a vírus

jelenlétét, az izolátorházban az új törzsültetvényen és a termőültetvényen ez a vírus nem volt kimutatható. A régi törzsültetvényen a Gönci magyar fajtánál találtunk LChV-1 fertőzést.

Megvitatás

Csoportunk újgenerációs szekvenálással végzett vírusdiagnosztikai eredményei alapján elsőként azonosítottuk a CVA és a LChV-1 vírusok jelenlétét Magyarországon.

A LChV-1 vírus kajsziarackról való diagnosztizálása nagy jelentőséggel bír, ugyanis gazdanövényének eddig a meggyet és a cseresznyét tekintették, a LChV-1 fertőzést kajsziarackról csak egy Csehországból származó publikáció igazolja (Šafářová és mtsai, 2017). A vírus régóta fertőzhet kajszi fákat, azonban ez a vírus nem szerepelt a kötelezően szűrendő karantén kórokozók között, így jelenléte kajszin idáig rejtve maradt.

A kajsziából izolált, klónozott CVA mozgási fehérje szekvenciájának filogenetikai vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a nem cseresznye gazdanövényt fertőző csoport tagjaihoz hasonlít legjobban. A CVA esetében már izolátorháló alatt lévő kajsziából is kimutattuk a vírus jelenlétét (Érden, Cegléd és Újfehértó is), ami felveti annak a lehetőségét, hogy a CVA fertőzés a szaporítóanyag közvetítésével történt. Mivel a vírus jelenlétét egy kiindulási anyagként szolgáló *in vitro* kultúrában is igazoltuk, a továbbiakban mindenképpen szeretnénk megválaszolni azt a kérdést, hogy vajon a PPV-re jól működő vírusmentesítési protokollok hatékonyak-e a CVA eliminálására, vagy a CVA mentesítésre egy ettől eltérő, új vírusmentesítési protokoll kidolgozása szükséges?

A LChV-1 vírus elterjedésének vizsgálata során, Érden csak a régi törzsültetvényben tudtuk a vírus jelenlétét kimutatni, Ceglédön viszont az izolátorháló alatti fákból is. Míg Érden azt feltételezzük, hogy a fertőzés szabadföldön, vektorok közvetítésével mehetett végbe, Ceglédön ennek megállapítása további vizsgálatokat igényel. A CVA és a LChV1 elsődleges gazdái a meggy és cseresznyefák. Mivel mind az érdi, és az újfehértói kajszi gyűjtemények közelében cseresznye és meggy ültetvények találhatóak, felmerül annak a lehetősége, hogy a vírus ezen fákról jutott a kajsziakra vírusvektorok közvetítésével. Ennek a hipotézisnek a vizsgálatára a cseresznye és meggy ültetvények, illetve génbank vizsgálatát kezdtük el, hogy megállapíthassuk, vajon a CVA és a LChV1 jelen van-e ezeken az ültetvényeken. A molekuláris vizsgálatok eredményeinek elemzését követően pontosabb képet kapunk a CVA és a LChV-1 elterjedéséről. CVA és LChV1 fertőzött fák vírusmentesítési protokolljainak optimalizálásával pedig azt reméljük, hogy a sikerül jelenlétüket visszaszorítani és a további elterjedésüket megakadályozni.

Köszönetnyilvánítás

A kutatásokhoz az FM nyújtott céltámogatást. B.D. a Szent-István Egyetem Biológia Tudományok Doktori Iskola, SZ.L. Szent-István Egyetem Kertészettudományi Doktori Iskola PhD hallgatója. B.D. részt vesz az FM Kutatói utánpótlást elősegítő programban. Köszönettel tartozunk Molnár Jánosnak a bioinformatikai elemzésekben nyújtott segítségért.

Hivatkozások

Barba, M., Czosnek, H., Hadidi, A. 2013. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6. 1. 106–136. <https://doi.org/10.3390/v6010106>

Czotter Nikolett, Czákó Kamilla, Várallyay Éva, Szegedi Ernő 2016. Molekuláris diagnosztikai módszerek a szőlő szaporítóanyaggal terjedő károsítóinak kimutatására, *Kertgazdaság* 48. 2. 37-44.

Gambino, G., Perrone, I., Gribaudo, I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19. 6. 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>

Šafářová, D., Faure, C., Candresse, T., Navrátil, M., Nečas, T., Marais, A. 2017. First Report of Little cherry virus 1 Infecting Apricot in the Czech Republic. *Plant Disease*, 101. 5. 845. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1289-PDN>