

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Növénykórtani Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

**A keleti liliomon (*Lilium orientale*) leggyakrabban előforduló vírusok
azonosítása molekuláris módszerekkel**

Halász Barnabás
Növényorvos Msc. II. évfolyam

Konzulensek: Pájtli Éva, tudományos segédmunkatárs

Dr. Palkovics László, tanszékvezető egyetemi tanár

Budapest, 2013

1 TARTALOMJEGYZÉK:

1	TARTALOMJEGYZÉK:	2
2	FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK.....	4
3	BEVEZETÉS	5
4	CÉLKITŰZÉS	6
5	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
5.1	A keleti liliomom (<i>Lilium orientale</i>) előforduló vírusok.....	7
5.2	Fontosabb liliomokat fertőző vírusok jellemzése	7
5.2.1	Lily symptomless virus (LSLV)	7
5.2.2	Lily mottle virus (LMoV) (syn.: Lily streak mottle virus).....	9
5.2.3	Lily virus X (LVX).....	10
5.2.4	Tulip breaking virus (TBV).....	11
5.2.5	Cucumber mosaic virus (CMV)	12
5.2.6	Plantago asiatica mosaic virus (PlAMV)	14
5.2.7	Arabis mosaic virus (ArMV)	15
5.2.8	Tobacco mosaic virus (TMV)	15
5.2.9	Tobacco ringspot virus (TRSV)	16
5.2.10	Tobacco rattle virus (TRV)	18
5.2.11	Tomato spotted wilt virus (TSWV).....	19
5.3	A liliomokat fertőző vírusok rendszertani besorolása	20
6	ANYAG ÉS MÓDSZER	22
6.1	Vizsgálatok helye	22
6.2	Vizsgálatok anyaga.....	22
6.3	Baktérium törzsek	22
6.4	Primerek.....	22
6.5	Plazmidok.....	22
6.6	Vegyszerek, enzimek, kitek	22
6.7	Nukleinsav szekvencia meghatározás	23
6.8	A szekvencia analízishez felhasznált programok	23
6.9	Vizsgálatok módszere.....	24
6.9.1	Össznukleinsav kivonás levélszövetből.....	24

6.9.2	Reverz transzkripció és polimeráz láncreakció (RT-PCR)	24
6.9.3	Gélelektroforézis.....	28
6.9.4	Gélből izolálás és PCR-termék tisztítás.....	28
6.9.5	A PCR-termékek klónozása	28
6.9.6	A plazmid tisztítása és az inzert ellenőrzése	29
6.9.7	Klónok tisztítása.....	29
7	EREDMÉNYEK.....	30
7.1	<i>Carlavirus</i> specifikus PCR eredménye.....	30
7.2	<i>Potyvirus</i> specifikus PCR eredménye.....	30
7.3	<i>Potexvirus</i> specifikus PCR eredménye.....	31
9	ÖSSZEFOGLALÁS	35
11	IRODALOMJEGYZÉK.....	37

2 FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

RÖVIDÍTÉS	MAGYAR NYELVŰ JELENTÉSE
aa	aminosav (amino acid)
A, C, G, T	adenin, citozin, guanin, timin
ArMV	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>
BBWV	<i>Broad bean wilt virus</i>
bp	bázispár
cDNS	komplementer DNS
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CTLV	<i>Citrus tatter leaf virus</i>
DNS	deoxiribonukleinsav
dNTP	deoxiribonukleotid
HMV	<i>Henbane mosaic virus</i>
HiMV	<i>Hippeastrum mosaic virus</i>
HR	Hypersensitive response (hiperszenzitív válasz)
LMoV	<i>Lily mottle virus</i>
LMMV	<i>Lily mild mosaic virus</i>
LSLV	<i>Lily symptomless virus</i>
LVX	<i>Lily virus X</i>
LYSV	<i>Leek yellow stripe virus</i>
MTBV	Enyhe tüneteket okozó <i>Tobacco mosaic virus</i> törzs
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PLAMV	<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció
SLRV	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>
SLV	<i>Shallot latent virus</i>
STBV	Súlyos tüneteket okozó <i>Tobacco mosaic virus</i> törzs
TBV	<i>Tulip breaking virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TRSV	<i>Tobacco ringspot virus</i>
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
ToRSV	<i>Tomato ringspot virus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
UV	ultraviola

3 BEVEZETÉS

2013 nyarán dr. Eke Sándor liliumtermesztő segítségért fordult a Növénykórtani Tanszék munkatársaihoz. A *Lilium orientale* növényeken klorózis, enyhe mozaikos tünet és gyenge növekedés volt megfigyelhető. Ezek a tünetek utalhatnak tápanyaghiányra (pl. vashiány), vagy vírusos fertőzésre is.

Dr. Eke Sándor Dabas környékén, Gyónon évtizedes tapasztalattal termeszt liliumot vágott virágnak. A családi vállalkozás keretein belül a munka 2 hektáron folyik, korszerű holland üvegházakban. Szezonban, május elején akár kilencven fajtát is hajtatnak egyszerre. A hagymákat túlnyomó többségben Hollandiából szerzik be. A talajt fertőtlenítik, a kórokozók felszaporodásának elkerülése érdekében. A friss hagymákat talajlazítóval előkészített ágyásokba ültetik, ezután tőzeggel, vagy kókuszdió rostjával fedik a talajt. A tápanyag jelentős részét szárított baromfitrágyával pótolják és tápoldatot is kap a későbbiekben az állomány. A tápanyagellátás során, sokéves tapasztalatokon nyugvó, jól bevált technológiát alkalmaznak, így a hiánybetegséget, mint kórokozót elvetették. A kialakult tünetek alapján így vírusfertőzésre gyanakodtunk.

A világon több mint 120 vad lilium faj él, újabb lehetőségeket kínálva a nemesítőknek. A legnagyobb nemesítési munka Hollandiában folyik. A nemesítés során kialakított új fajtának tíz év kell ahhoz, hogy bekerüljön az üvegházakba, a termesztésbe. Amit kiválasztanak először mikroszaporítással laboratóriumban tovább szaporítják és amikor először kikerül a talajba, még háromszor elültetik és felszedik, hogy 16-18 cm körméretű hagyma legyen belőle. Három évig gyűjti a hagyma a tartaléktápanyagot, ennyi idő kell ahhoz, hogy 4-6 virágú szép növényt kapjunk. Ezek alatt az évek alatt a növény számos vírussal fertőződhet, ami évről évre gyengítheti a növényt. Mivel a liliumot hagymáról szaporítjuk, így vírusok okozta fertőző leromlás áldozata lehet. Egy fajta 5-10 év alatt teljesen kikerülhet emiatt a termesztésből. Némely vírus már önmagában is súlyos károkat okoz, de a látens kórokozók tünetei is felerősödhetnek komplex fertőzés esetén. A növényházakban a sűrű növényállományban, nagyon könnyen terjednek a vírusok, a termesztésre szánt fajtákat fontos lenne rendszeresen vírusfertőzöttségre megvizsgálni, a fertőzött tételeket megsemmisíteni, hogy elkerülhessük a továbbfertőződést. Minden liliumtermesztő számára fontos lenne a vírusok legalább nemzeti szintű rendszeres detektálása, mert a terjedési módok ismeretében segítséget nyújthat a fertőző leromlás késleltetésében.

4 CÉLKITŰZÉS

Célul tűztük ki, hogy

- az irodalmi adatokat felhasználva, egy örökítőanyag alapú diagnosztikai módszert fejlesztünk, amivel detektálhatjuk a liliomot leggyakrabban fertőző hat vírus nemzetség (*Carlavirus*, *Cucumovirus*, *Nepovirus*, *Potyvirus*, *Potexvirus*, *Tobamovirus*) kórokozóit.
- A begyűjtött *Lilium orientale* 'Conca D'or' mintából a detektálás után a kórokozók fajszintű azonosítását is elvégezzük.
- A kapott szekvenciaadatok alapján feltérképezzük a rokonsági kapcsolataikat, elkészítjük a filogenetikai törzsfákat.
- A begyűjtött izolátumok szekvenciáit feltöltjük az NCBI adatbázisba.

5 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

5.1 A keleti liliomon (*Lilium orientale*) előforduló vírusok

A keleti liliomon (*Lilium orientale*) számos vírus előfordul, ezek között jelentősek a *Lily symptomless virus* (LSLV) (Allen, 1972b), a *Lily mottle virus* (LMoV) (Brierley & Smith, 1944), a *Lily virus X* (LVX) (Memelink et al., 1990), a *Tulip breaking virus* (TBV) (Asjes et al., 1973), a *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Smith, 1957) és a *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) (Minskaya et al., 1977). Holland kutatók szerint az LSV és a LMoV a domináns kórokozó, de gyakran okoz problémát a CMV és LVX is (Derks & Lemmers, 1997).

Kisebb jelentőségű liliom vírusok az *Arabis mosaic virus* (ArMV) (Asjes & Segers, 1983), a *Broad bean wilt virus* (BBWV) (Lee et al., 1996), a *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) (Inouye et al., 1979), a *Lily mild mosaic virus* (LMMV) (Lee et al., 1996), a *Strawberry latent ringspot virus* (SLRV) (Asjes & Segers, 1983), a *Tobacco rattle virus* (TRV) (Derks, 1975) és a *Tomato ringspot virus* (ToRSV) (Lee et al., 1996).

Továbbá előfordulhat még a liliomon a *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Shew & Lucas, 1991), a *Tobacco ringspot virus* (TRSV) (Lucas, 1975), a *Tobacco etch virus* (TEV) (Chen et al., 2001), a *Henbane mosaic virus* (HMV) (Alper et al., 1982), a *Narcissus mosaic virus* (NMV) (Lee et al., 1996) a *Shallot latent virus* (SLV) (Bos et al., 1978), a *Hippeastrum mosaic virus* (HiMV) (Jayasinghe & Dijkstra, 1979), a *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (Bos et al., 1978), a *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Clinton, 1909) és a *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Tehrani et al., 1990) is.

5.2 Fontosabb liliomokat fertőző vírusok jellemzése

5.2.1 *Lily symptomless virus* (LSLV)

A *Lily symptomless virus*-t először Brierley és Smith írta le, 1944-ben az Egyesült Államokban. Az LSLV *Betaflexiviridae* család, *Carlavirus* nemzetségébe tartozik. Partikulumai flexibilis fonál alakúak (1. ábra), hosszuk 640 nm, szélességük 18 nm. A vírus genomja pozitív egyszálú RNS (Allen, 1972a).



1. ábra: LSLV partikulumok (Fotó: Civerolo et al., 1968)

A világ liliom termesztő régióiban széles körben elterjedt. Leggyakrabban mechanikai úton, szaporítóanyaggal és levéltetvekkel terjed nem perzisztens módon. Az LSLV vektora legtöbbször a *Myzus persicae* és az *Aphis gossypi* és terjedhet még *Cuscuta* fajokkal is (Brierley & Smith, 1944) és (Allen & McWhorter, 1966).

Gazdanövényköre a *Liliaceae* családba tartozó növényekre korlátozódik. Általában szisztemikus tüneteket okoz, de a kialakult szimptómák jelentősen függenek a növényfajtól és annak fajtájától. A vírus okozta tünetek közt megtalálható, a levél halványzöld csíkozottsága (2. ábra), a nekrotikus foltok, valamint barna, megnyúlt, gyűrűs foltok majd ezek nekrotizálódhatnak (Asjes, et al., 1973). Az érzékeny fajták levelein mozaikfoltok jelennek meg. Ritkán előfordul, hogy a levélerek elbarnulnak, majd elszáradnak. Boontjes (1978) vizsgálatai szerint az LSLV-mentes növények magasabbak, mint a fertőzött növények, valamint a virágok jobban színesednek.



2. ábra: LSLV okozta tünetek liliomon

(Fotó: <http://www.weedimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5483080>)

Tesztnövénye a *Lilium longiflorum*. A fertőzést követő 3. héten jelentkeznek a jellegzetes tünetek, melyek a leveleken látható erekkel határolt, hosszúkas, nekrotikus foltok, amik idővel szürkésbarnává válnak (Brierley & Smith, 1944). A fertőzést követően 60-90 nap elteltével a levelek extrém módon megcsavarodnak és megjelennek a jellegzetes fehér csíkok rajta (3. ábra) (McWhorter & Allen, 1967).



3. ábra: LSLV fertőzött *Lilium longiflorum*, (Fotó: McWhorter & Allen, 1967)

5.2.2 *Lily mottle virus (LMoV)* (syn.: *Lily streak mottle virus*)

Az LMoV a *Potyviridae* család *Potyvirus* nemzetségébe tartozik. Fonál alakú virionjai pozitív, egy szálú RNS-t tartalmaznak. (Brierley & Smith, 1944). Leírták Ázsiában, Európában, az USA-ban és Ausztráliában. Tünetei: levélfoltosság, levélmozaik, klorózis, sárga csíkok a levélen, levéltorzulás, kisebb vöröses barnás nekrotikus foltok (4. ábra). Egyes fajtáknál okozhat színtöréses vagy aszimmetrikus virágokat (5. ábra). Másfajtáknál előfordul barna nekrotikus gyűrűsfoltosság.

Enyhébb esetekben akár tünetmentes is lehet a vírus jelenléte mellett a növény. Fertőzött hagymából fejlődő növények kisebbek, mint az egészségesek. Tünetek erősebbek lehetnek, ha jelen van LSLV is (Asjes et al., 1973).



4. ábra: LMoV okozta tünet *Lilium longiflorum* 'White Heaven'
(Fotó: Ágoston, 2010)



5. ábra: LMoV okozta virágfoltosság tünet liliomon
(Fotó: Ágoston, 2010)

5.2.3 *Lily virus X* (LVX)

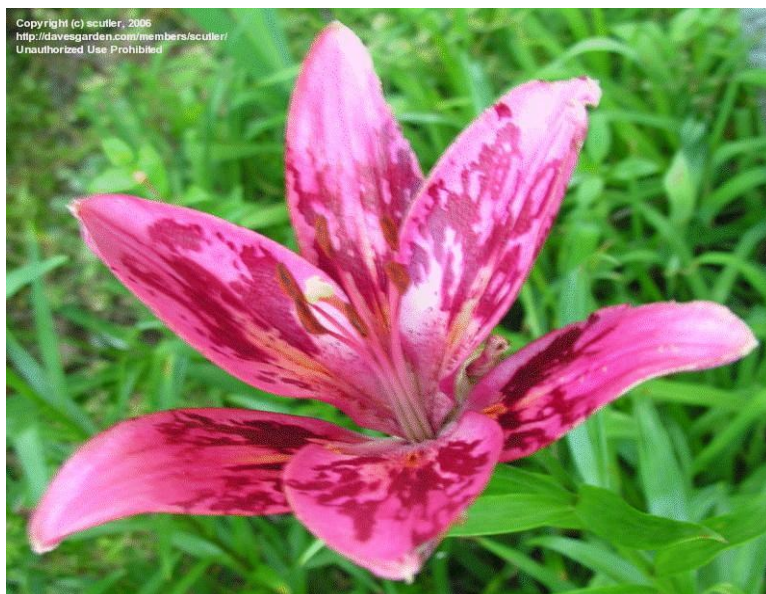
Az LVX a *Tymovirales* család *Potexvirus* nemzetségébe tartozik. Először Stone írta le *Lilium formosanum*-ról, 198-ban, az Egyesült Királyságban, de mára már az egész világon elterjedt. Mechanikailag átvihető. Virionja fonál alakú, kissé tengely irányba csavarodott. Hossza 470nm, átmérője 13nm. Az LVX pozitív, egyszálú RNS vírus. (Stone,1976; Stone,1980). Az általa okozott tünetek nagyon enyhék. Ritkán mozaikot okoz, de *Lilium*

formosanum—on például csak látens van jelen. *Tricyrtis formosana*-n Jordan és munkatársai (2008) klotrózist és enyhe mozaikot figyeltek meg.

5.2.4 *Tulip breaking virus* (TBV)

A *Tulip breaking virus*-t Cayley és Dorothy 1928-ban majd 1929-ben McKay és munkatársai azonosították elsőként. Világszerte elterjedt a *Liliaceae* családba tartozó növényeken a liliom mellett, a tulipánon is károsít. A TBV a *Potyvirus* nemzetségébe tartozik. A vírus partikulumai fonál alakúak, 740 nm hosszúak. Leggyakrabban mechanikai úton terjed, illetve levéltetvek nem perzisztens módon is átvihetik. Vektorai a *Myzus persicae*, az *Aphis gossypii*, a *Doralis fabae* és a *Macrosiphum euphorbiae* (McKenny, 1931). Terjedésében nagy szerepe van a fertőzött hagymáknak, illetve a termesztési folyamat során keletkező sebzéseknek.

Kártétele abban jelentkezik, hogy befolyásolja az antocián képződést az epidermisz sejtekben, ezáltal a szíromlevelek színe részben megváltozik (6. ábra). Főleg a sötét szirmú fajtáknál okoz súlyos kárt (Dufrenoy, 1931). A fehér és sárga virágú fajtákon nem okoz feltűnő tüneteket a virágon.



6. ábra: TBV tünetek liliomon virágon

(Fotó: <http://davesgarden.com/community/forums/fp.php?pid=2283908>)

A fertőzés erőssége szerint elkülöníthetünk két törzset is. Az egyik a súlyos tüneteket okozó (S-TBV), a másik a gyenge tüneteket okozó (M-TBV) törzs. Az S-TBV törzs gátlja a szíromlevelek antocián képzését, ezáltal úgynevezet „teljes törés”, amíg az M-TBV csak csekély mértékű színváltozást okoz. A fertőzött növények nagyrésznél az úgynevezet

„átlagos törés” esete áll fent, ami az S-TBV és a M-TBV együttes jelenlétét jelenti. Ilyenkor a tünetek is többfélék lehetnek (van Slogteren & de Vos, 1966; van Slogteren & Asjes, 1969). A leveleken okozott tünetek is igen változatosak lehetnek. A fiatal leveleken alig észrevehető, míg az idősebb leveleken feltűnő sárga és fehér foltok alakulnak ki (7. ábra). Az idő múlásával ezek a levelek csavarodnak, visszamaradnak a fejlődésben és ha virágot is hoznak az általában értéktelen lesz. A levélerek sötét színűek lesznek, előfordulhatnak bennük fehér pontok is (Allen. T. C., 1980).



7. ábra: Nekrotikus foltok a liliom levelén

(Fotó:<http://pnwhandbooks.org/plantdisease/node/3499/print>)

5.2.5 *Cucumber mosaic virus (CMV)*

A *Cucumber mosaic virus* Doolittle valamint Jagger és munkatársai által először 1916-ban közölt vírus. A *Bromoviridae* család *Cucumovirus* nemzetségébe tartozik. A vírus genomja három különböző RNS-ből áll, amik 30 nm átmérőjű izometrikus (ikozaéder) alakú partikulumokba csomagolódnak (Marrou, et al., 1973). Világszerte elterjedt és ismert kórokozó, de főleg a mérsékelt övben okoz gondot. A kártétel mértéke is függ a növény fogékonyságától, illetve a vírus törzs fertőzőképességétől.

Vektorai közt több mint 80 levéltetű fajt (33 nemzetségből) lehet felsorolni, köztük az *Aphis gossypii*-t és a *Myzus persicae*-t is (Kennedy & Eastop, 1962; Edwardson & Christie, 1991). Az átvitel hatékonyságát számos tényező befolyásolja, beleértve a vírustörzset, a hőmérsékletet, a levéltetű és a növény fajt is (Simons, 1957). A levéltetvek nem perzisztens módon terjesztik a CMV-t. Vetőmaggal történő átvitel nem gyakori, de például a „White

Acre” borsón, *Vigna sesquipedalis*-on és a *Vigna sinensis*-en feljegyezték már (Anderson, 1957). Átvitel történhet még legalább 10 *Cuscuta* fajjal is.

Rendkívül polifág kórokozó. Gazdanövényei összesen, mintegy 1200 növény faj közül kerülnek ki, melyek száznál is több családba tartoznak (Douine, et al., 1979; Edwardson & Christie, 1991).

Taiwanon több liliom fajról (*L. longiflorum*, *L. orientale*) is azonosították a CMV-t, de már Hollandiából és Franciaországból (*Lilium asiatic*) is rendelkezésre állnak ilyen nukleinsav szekvencia adatok (Chen & Hu, 1999; Chen et al., 2001).

Liliomon nagyon súlyos növénytorzulást és mozaikos foltokat okozhat (8. és 9. ábra).



8. ábra: CMV által okozott levél foltok liliomon
(Fotó:<http://www.pestid.msu.edu/PlantDiseases/CucumberMosaicVirus/tabid/96/Default.aspx>)



9. ábra: CMV liliomon okozott tünete
(Fotó:<http://www.pestid.msu.edu/PlantDiseases/CucumberMosaicVirus/tabid/96/Default.aspx>)

A tünetek erőssége a különböző vírustörzsek és liliom fajták közti kapcsolattól függ (Choi et al., 1999). A CMV liliomon okozhat levéltorzulást, gyenge növekedést, satnyulást, mozaik és nekrotikus foltokat is. Tünetei hasonlítanak a gyomirtószer okozta tünetekre.

5.2.6 *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV)

A *Plantago asiatica mosaic virus*-t először Oroszországban izolálták, *Plantago asiatica*-ról. Hughes és munkatársainak (2005) molekuláris vizsgálatai szerint a *Nandina mosaic virus* egy PIAMV izolátum. A *Tulip virus X* nagyon közeli filogenetikai rokonságban áll ezzel a vírussal (Komatsu et al., 2008). A PIAMV genomja pozitív, egyszálú RNS, a *Flexiviridae* család *Potexvirus* nemzetségébe tartozik. Mechanikailag és főképp szaporítóanyaggal terjed. (Minskaya et al., 1977; Adams et al., 2004).

PIAMV képes megfertőzni számos növényfajt és leggyakrabban nektrózist okoz (10. ábra) (Kostin V. D. & Volkov Y. G., 1976). Japánban izoláltak először PIAMV-t liliomról (*L. maximowiczii*). A téli, fényszegény időszakban a liliom levelein nagy kiterjedésű hosszanti, ér menti nektrózist vált ki, a növények felkopaszodnak, csökken a virágprodukción, a növények elhalnak. A tünetek erős fényintenzitás esetén maszkírozódnak. Az egyes liliomról származó izolátumok nukleotid szekvenciái nagyban hasonlítanak, de patogenitásban mutatnak eltérést. Az Li1-es elhalást okoz *Nicotiana benthamiana*-n, míg a Li6 fertőzi ugyan a növényt, de nem okoz tüneteket (Ozeki et al., 2006). Hollandiában 2010-ben számoltak be a vírus megjelenéséről *Lilium* spp.-ről. Ebben az évben a fertőzött állományokban 80%-os virághozam veszteségről számoltak be (Plant Protection Service of the Netherlands; 2010). Kutatások szerint a *L. orientale* sokkal fogékonyabb a vírusra, mint a *L. longiflorum* (Plant Protection Service of the Netherlands; 2012). 2012-ben Spanyolországból származó liliomhagymák PIAMV fertőzöttségét mutatták ki Angliában, a kár ott is elérte a 80%-ot (Fera diagnózis adat, 2012. július).



10. ábra: PLAMV tünet liliomon

(Fotó: Pest Report – The Netherlands, 2010. július)

(<http://www.vwa.nl/onderwerpen/kennis-en-advies-plantgezondheid/dossier/pest-reporting-eng/pest-reports>)

5.2.7 *Arabid mosaic virus* (ArMV)

Az *Arabid mosaic virus*-t először Smith és Markham írta le 1944-ben. A vírus, a *Secoviridae* családba és a *Nepovirus* nemzetségbe tartozik. Az ArMV örökítőanyaga RNS. Izometrikus partikulumai vannak, melyek 30 nm-es átmérőjűek. Széles gazdanövénykörrel rendelkezik. Terjesztésért főleg a fonálférges felelősek, elsősorban a *Xiphinema diversicaudatum* (Jha & Posnette, 1961.), a *Xiphinema diversica* (Jha & Posnette, 1959, Harrison & Cadman, 1959) és a *Xiphinema coxi* (Fritzsche & Schmidt, 1963). Az ArMV természetes elterjedése Európára korlátozódik.

A vírus gazdag gazdanövényköre miatt, az okozott tünetek is igen változatosak. Málnán sárgulást és törpenövekedést okoz. Szamócán és a rebarbarán mozaikos sárga foltokat képez. Uborkán és salátán klorotikus elhalással jelentkezik. Zellernél és bókoló aranyfánál (*Forsythia intermedia*) satnyulást, majd elhalást okoz. Gazdanövényei közt megtalálható még a cukorrépa, komló, torma, nárcisz, rózsza, bodza, orgona, fehér here és a szőlő (Murant, 1970). A liliomféléken a jellemző tünet a mozaik foltosság, nekrotikus foltosság a levélen, valamint a gyűrűs foltosság a hagyma buroklevelén (Asjes & Segers, 1983).

5.2.8 *Tobacco mosaic virus* (TMV)

A *Tobacco mosaic virus* okota tünetekre és a betegség átvihetőségére az első említésére 1886-ban került sor (Mayer, 1886). 1898-ban Beijerinck vizsgálta a kórokozót. A TMV a *Tobamovirus* nemzetségbe és a *Virgaviridae* családba tartozik. Partikulumai pálcika alakúak és pozitív egyszálú RNS-t tartalmaznak (Harrison & Wilson, 1999) és (Scholthof &

Zaitlin,1999). A TMV partikulumok egyenesek, merevek és pálcika alakúak. Hosszuk kb. 300 nm, átmérőjük maximum 9 nm. Körülbelül 2140 köpenyfehérje alegység és az RNS alkotja a vírus partikulumot (Caspar, 1964).

Az egyik legfontosabb dohánykárosító. Ahol dohánytermesztés folyik, ott számolni kell a megjelenésével (Gooding, 1991). Gazdanövényköre (közel 200 faj, 30 családból) és az okozott tünetek is igen változatosak. Nem mindig lehet elkülöníteni tüneteit más *Tobamovirus* törzsektől. A dohányon mutatja a „klasszikus” mozaikos tüneteket leginkább, de nekrotikus foltok is jellemezhetik (Shew & Lucas, 1991).

A vírus átvitele főleg mechanikai úton történik. Nincs igazi vektora, de egyes rágószájszerű rovarok felelőssé tehetők a terjesztésért (Lojek & Orlob, 1969; Harris & Bradley, 1973). Talajban a fertőzött növényi maradványok segítségével történhet meg az egészséges növények fertőződése. A vírus kifejezetten ellenálló hosszú ideig fent tud maradni például az emberi ruházaton vagy az üvegházi szerkezeteken is (Broadbent & Fletcher, 1963). Fertőzőképességét akár 50 évig is megőrzi (Silber & Burk, 1965). Magas a hőstabilitása is, hiszen 90°C-on 10 percig tartva is tud még a kezelést követően fertőzni (Hariharasubramanian et al., 1970). Nem vihető át vetőmaggal (belső magátvitel) vagy pollennel, azonban a vírus gyakran jelen van a mag felszínén és csírázáskor akár a fiatal növényt meg is fertőzheti (Broadbent, 1965). A *Cuscuta* fajok is terjeszthetik a vírust (Hosford, 1967).

5.2.9 *Tobacco ringspot virus (TRSV)*

A Fromme és munkatársai által először 1927-ben leírt *Tobacco ringspot virus* a *Secoviridae* család a *Nepovirus* nemzetségébe tartozik. A vírus partikulumai izometrikusak, 28 nm az átmérőjük és RNS-t tartalmaznak. Könnyen terjed, vektorai közt megtalálhatók: fonálférgek (*Xiphinema americanum*) (Bergeson,1964), tripszek (*Thrips tabaci*) (Messieha, 1969), takácsatkák (Thomas, 1969), szöcskék (Dunleavy, 1957), dohánybolhák (*Epitrix hirtipennis*) (Schuster, 1963) és levéltetvek is (Rani et al., 1969). Gazdanövényköre igen széles, fás és lágyszárúak is beletartoznak. Több mint 17 növénycsalád fajait fertőzheti meg. Vetőmaggal vagy gumóval történő átvitelt 12 növényfajnál írtak le. A szójánál (*Glycine max*) akár 100%, míg a sárgadinnyénél (*Cucumis melo*) alig 3% a gyakorisága (Mandahar, 1981). Gyűrűsfoltosságot okoz dohányon, uborkán, liliomon (11. és 12. ábra), hortenzián, íriszen, muskátlin, valamint nekrotikus foltosságot áfonyán. Szóján a becőt is károsítja, ami jelentős termésvesztést okozhat. Barna csíkok alakulnak ki a levélen, száron. A növény törékenyé válik és visszamarad a fejlődésben (Sinclair & Shurtleff, 1975). A TRSV széles körben

elterjedt, legnagyobb kárt dohányon okoz, ahol a gyűrűsfoltosság mellett lombozatvesztést, törpességet vált ki és rontja a minőséget (Lucas, 1975).

Mivel könnyen terjed, ezért a világ összes olyan helyén megtalálható, ahol jelentős dohány- és dísznövénytermesztés folyik és jelen van a *Xiphinema americanum* is.



11. ábra: Gyűrűsfoltosság liliomon

(Fotó: <http://www.missouribotanicalgarden.org/gardens-gardening/your-garden/help-for-the-home-gardener/advice-tips-resources/pests-and-problems/diseases/viruses.aspx>)



12. ábra: Gyűrűsfoltosság liliomon

(Fotó: <http://www.missouribotanicalgarden.org/gardens-gardening/your-garden/help-for-the-home-gardener/advice-tips-resources/pests-and-problems/diseases/viruses.aspx>)

5.2.10 *Tobacco rattle virus (TRV)*

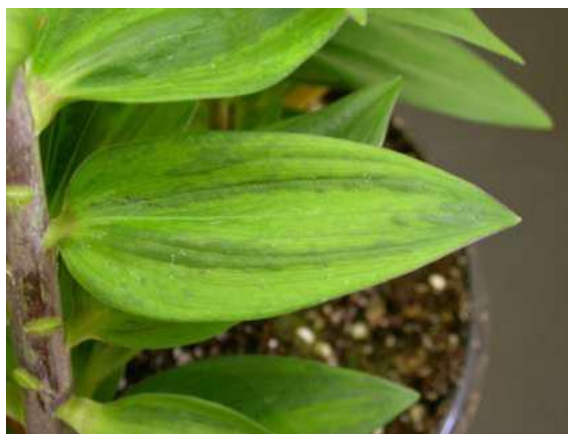
A TRV tüneteiről először Behrens számolt be 1899-ben. Quanjer azonosította a vírust 1943-ban. A *Virgaviridae* család *Tobravirus* nemzetségébe tartozik. A vírus partikulumai pálcika alakúak. A genomja egy nagyobb (180-210 nm) és egy kisebb (50-110 nm) pozitív egyszálú RNS-ből áll (Visser et al., 1999).

Tünetei rendkívül változatosak. Burgonyán gumószövetben okoz például úgy nevezet „parafás” gyűrűsfoltokat. Emellett hajtástartnyulást, torzulást okozhat, valamint a leveleken megjelennek a mozaikos foltok (Harrison & Robinson, 1981). A TRV-t először 1975-ben, Hollandiában írták le liliomról. Derks *Lilium hollandicum* 'Preludium'-ról jegyezte fel. A fertőzött növényeken az erek klorotikusak lesznek, valamint kicsi nekrotikus foltok alakulnak ki a levélen (13. és 14. ábra). Előfordul, hogy a levét torzul, csavarodik (Derks, 1975).



13. ábra: TRV tünet *Lilium orientale* 'Angelique'-n

(Fotó: <http://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5460035>)



14. ábra: TRV tünet liliomon 'Angelique' (*Lilium orientale*)

(Fotó: <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5460034>)

A kardvirágon fogazott levél (Cremer & Schenk, 1967), jácinton nekrotikus foltosság (Van Slogteren, 1958), őszirózsán gyűrűsfolt (Anderson, 1954), sárgafoltosság a cukorrépán és a spenóton a jellemző tünet (Gibbs & Harrison, 1964; Bailiss & Okonkwo, 1979). A már említett fajok mellett fertőzheti a liliomféléket, a salátát, a hortenziát, a nárciszt, a tulipánt és számos dísz- és gyomnövényt. Gazdanövényköre több mint 400 egy- és kétszikű növényre kiterjed 50 családból (Horváth, 1978). Elterjedése kiterjed Európára, Észak-Amerikára, Japánra és Új-Zélandra is.

Legalább 12 különböző fonálféreg faj terjesztheti, a *Paratrichodorus* (15. ábra) és *Trichodorus* nemzetségből. A TRV gyakran fordul elő Európában, Észak-Amerikában és Japánban is (Taylor & Brown, 1997). A *Paratrichodorus allius* 1 óra felvételi szívás után akár több hónapig is fertőzőképes maradhat. A kifejlett és a fiatal egyedek is fertőzhetnek, de vedléskor elvesztik a fertőzőképességüket. A vírus partikulumjai a fonálféreg nyelőcsővének falán tapadnak meg, így kerülnek a nyálba (Ayala & Allen, 1968; Taylor & Robertson, 1970).



15. ábra: Kifejlett *Paratrichodorus pachydermus* nőstény

(Fotó: <http://www.dpvweb.net/intro/>)

5.2.11 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)

A TSWV a *Bunyaviridae* család *Tospovirus* nemzetségébe tartozik. Először Brittlebank írta le 1919-ben. Partikuluma izometrikus, átmérője 85nm. Átvitelért főleg a tripsz fajok felelősek. Mint lehetséges vírusvektor a *Thrips tabaci*, *Thrips setosus*, *Thrips parvi*, *Frankliniella schultzei*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella fusca* és a *Scirtothrips dorsalis* is, amelyek perzisztens módon terjesztik a vírust (Mound, 1996) (Webb et al., 1998). A vírus mechanikailag is átvihető (Singh & Krishanareddy, 1996).

Igen polifág vírus. Közel 900 növényfaj 80 családból szerepel a károsított növények között. Világszerte elterjedt (Goldbach & Peters 1994). Okozott tünetei a klorotikus és nekrotikus lokális léziók, hervadás, mozaik foltosság, rendellenes fejlődés, erek sárgulása,

gyűrűsfoltosság, eseteként a virág színtörése. Liliomféléken is klorotikus gyűrűs foltokat okoz, melyek gyakran hosszanti irányban megnyúlnak (16. ábra) (Yamamota & Ohata, 1977).



16. ábra: TSWV tünetek 'Blackberry' liliomon (*Belamcanda chinensis*)

(Fotó: <http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5460043>)

5.2.11.1 TSWV előfordulása különböző liliomokon

- *Alstroemeria* sp. Peruvian lily (Tehrani et al., 1990)
- *Belamcanda chinensis* (Yamamota & Ohata, 1977)
- *Hippeastrum* sp. (Smith, 1937)
- *Lilium lancifolium* Thunb. Tiger lily (Best, 1968)
- *Lilium longiflorum* Thunb. Easter lily (Tehrani et al., 1990)

5.3 A liliomokat fertőző vírusok rendszertani besorolása

- ***Betaflexiviridae* család**
 - *Carlavirus* nemzetség
 - Lily symptomless virus* (LSLV)
 - Shallot latent virus* (SLV)
- ***Bunyaviridae* család**
 - *Tospovirus* nemzetség
 - Tomato spotted wilt virus* (TSWV)
- ***Bromoviridae* család**
 - *Cucumovirus* nemzetség
 - Cucumber mosaic virus* (CMV)
- ***Secoviridae* család**
 - *Fabavirus* nemzetség

Broad bean wilt virus (BBWV)

- *Nepovirus* nemzetség

Arabis mosaic virus (ArMV)

Tomato ringspot virus (ToRSV)

Tobacco ringspot virus (TRSV)

Strawberry latent ringspot virus (SLRV)

- **Potyviridae család**

- *Potyvirus* nemzetség

Lily mottle virus (LMoV)

Lily mild mosaic virus (LMMV)

Tulip breaking virus (TBV)

Hippeastrum mosaic virus (HiMV)

Leek yellow stripe virus (LYSV)

Tobacco etch virus (TEV)

Henbane mosaic (HMoV)

- **Alphaflexiviridae család**

- *Potexvirus* nemzetség

Lily virus X (LVX)

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV)

Narcissus mosaic virus (NMV)

- **Virgaviridae család**

- *Tobamovirus* nemzetség

Tobacco mosaic virus (TMV)

Tomato mosaic virus (ToMV)

- *Tobravirus* nemzetség

Tobacco rattle virus (TRV)

- **Családba nem sorolható:**

Capillovirus nemzetség

Citrus tatter leaf virus (CTLV)

6 ANYAG ÉS MÓDSZER

6.1 Vizsgálatok helye

A vizsgálatokat a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztük

6.2 Vizsgálatok anyaga

A tünetes *Lilium orientale* 'Conca D'or' növények a dabasi liliomhajtató üzemből származnak (17. ábra). A hagymákat Hollandiából importálták vágott virág előállítás céljából.



17. ábra: A tünetes *Lilium orientale* 'Conca D'or' (Fotó: Pájtli Éva)

6.3 Baktérium törzsek

A klónozáshoz az *Escherichia coli* DH5 α és JM109-es törzsét használtuk.

6.4 Primerek

A felhasznált oligonukleotidok szintézisét az IDT (Bio-Science Kft.) végezte.

6.5 Plazmidok

A PCR fragmenteket pGEM-T Easy (Promega) plazmid vektorba ligáltuk, melyet a Bio-Science Kft. szállított.

6.6 Vegyszerek, enzimek, kitek

A kísérletek során felhasznált oldatokhoz és táptalajokhoz különböző, kereskedelmi forgalomban kapható vegyszereket használtunk (Duchefa, Merck, Sigma-Aldrich, Reanal,

VWR). A reverz transzkriptázt, a DNS-polimerázt, a dezoxiribonukleotidokat (dNTP) a Biocenter (Fermentas), a GelRed fluoreszcens festéket (Biotium) az Izinta szállította. Az RNS izoláláshoz a SpectrumTM Plant Total RNA Kit-et a Sigma-Aldrich-tól, a PCR-fragmentek tisztításhoz, a High Pure Purification Kit-et a Roche-tól, a szevenálásra küldött plazmidok tisztítására, a Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit-et a Bio-Rad-tól szereztük be.

6.7 Nukleinsav szekvencia meghatározás

A tisztított klónokat, Szegeden a BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetben szekvenáltattuk.

6.8 A szekvencia analízishez felhasznált programok

A szekvenciák páronkénti összehasonlításához az EMBOSS Needle, Pairwise Sequence Alignment-et használtuk. A szekvenciák összeillesztéséhez és elemzéséhez a CLC DNA Workbench 6.6 (CLC Bio, Cambridge, MA; Knudsen és mtsai.) és a MEGA 5.1 (Tamura és mtsai., 2011) software csomagokat használtuk. A Maximum likelihood, UPGMA (Unweighted Pair Group Method) analíziseket használtuk a filogenetikai törzsfák készítésekor. A szekvenciák páronkénti összehasonlításához a ClustalW2 Multiple Sequence Alignment-et használtuk (Larkin et al., 2007).

6.9 Vizsgálatok módszere

6.9.1 Össznukleinsav kivonás levélszövetből

Eldörzsölés előtt a leveleket izoamilalkoholos kloroformba (izamilalkohol:kloroform, 1:24) áztattuk, hogy eltávolítsuk a levelek felületéről a viaszt. Az összribonukleinsav kivonást Spectrum™ Plant Total RNA Kit-tel végeztük, 100 mg levél szövetből a gyártó utasítása szerint.

6.9.2 Reverz transzkripció és polimeráz láncreakció (RT-PCR)

6.9.2.1 cDNS szintézis

Az össznukleinsav kivonatból, az antiszenz primerek felhasználásával reverz transzkripciót (RT) végeztünk.

A 10 µl végtérfogatú reakcióelegy:

össznukleinsav	4 µl
100 pM antiszenz primer	1 µl
5X RT puffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 25°C-on), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	2 µl
5 mM-os dNTP Mix	1 µl
RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (200 u/µl)	0,5 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 u/µl)	0,25 µl
desztillált víz	1,25 µl

Az össznukleinsavat az antiszenz primerek jelenlétében 65 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd az elegyeket 5 percen keresztül jégen hűtöttük. Ezt követően adtuk hozzá a reakcióelegy többi komponensét, ezután 60 percen át tartó reverz transzkripció következett 42 °C-on, majd 85 °C-on 5 perc alatt inaktiváltuk az enzimet. A cDNS-eket azonnal felhasználtuk, vagy -20 °C-on tároltuk.

6.9.2.2 Polimeráz láncreakció

A cDNS szintézist követően a PCR-t optimalizáltuk pozitív kontrollok jelenlétében, az 1.-6. táblázatban szereplő antiszenz és szenz primerek segítségével. A PCR-t Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 készülékben végeztük.

A PCR-analízis 50 µl végtérfogatú reakcióelegye:

cDNS	3 µl
10x Taq puffert (750 mM Tris-HCl pH: 8,8; 200 mM (NH ₄)SO ₄ ; 0,1 % Tween 20)	5 µl
25 mM-os MgCl ₂ -ot	3 µl
5 mM-os dNTP Mix,	2 µl
20 pM szenz primer	1 µl
20 pM antiszenz és	1 µl
Taq DNS polimeráz (5 u/µl)	0,5 µl
desztillált víz	34,5 µl

6.9.2.3 Potyvirus specifikus PCR

Primer neve	Primer szekvenciája	Publikálta	Termék hossza
Poty7941 (szenz)	5'-GGAATTCCCGCGGNAAYAAAYAGYGGNCARCC-3'	Salamon és Palkovics, 2005	~1200 bp
PolyT2 (antiszenz)	5'-CGGGGATCCTCGAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT-3'		

1. táblázat: Potyvirus specifikus PCR primerei

PCR paraméterei

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
3. 50 °C 30 másodperc (primer kötődés),
4. 72 °C 2 perc (láncosszabbítás),
5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 40 cikluson keresztül ismétlődik

6.9.2.4 *Potexvirus* specifikus PCR

Primer neve	Primer szekvenciája	Publikálta	Termék hossza
Potex 1 (szenz)	5'-CAYCARCARGCXAARGAYSA-3'	Gibbs et al., 1998	~400 bp
Potex 3 RC (antiszenz)	5'-GTATBKNGCCATNGTKCC-3'	Van der Vlugt et al., 2002	

2. táblázat: *Potexvirus* specifikus PCR primerei

PCR paraméterei

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
 2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
 3. 43°C 30 másodperc (primer kötődés),
 4. 72 °C 0,5 perc (láncosszabbítás),
 5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).
- A 2., 3. és a 4. lépés 40 cikluson keresztül ismétlődik

6.9.2.5 *Carlavirus* specifikus PCR

Primer neve	Primer szekvenciája	Publikálta	Termék hossza
CarlaCP (szenz)	5'-GGB YTN GGB GTN CCN CAN GA-3'	Gaspar et al., 2008	~960 bp
PolyT2 (antiszenz)	5'-CGGGGATCCTCGAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Salamon és Palkovics, 2005	

3. táblázat: *Carlavirus* specifikus PCR primerei

PCR paraméterei

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
 2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
 3. 50 °C 30 másodperc (primer kötődés),
 4. 72 °C 1 perc (láncosszabbítás),
 5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).
- A 2., 3. és a 4. lépés 40 cikluson keresztül ismétlődik

6.9.2.6 *Tobamovirus* specifikus PCR

Primer neve	Primer szekvenciája	Publikálta	Termék hossza
UniTobamo5 (szenz)	5'-GWC GCS GAK TCK GAT TCG TWT TAA ATA TG-3'	Kálmán et al., 2001	~700 bp
UniTobamo3 (antiszenz)	5'-TGG GCC SCT ACC SGS GG-3'		

4. táblázat: *Tobamovirus* specifikus PCR

PCR paraméterei

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
 2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
 3. 60 °C 30 másodperc (primer kötődés),
 4. 72 °C 1 perc (láncosszabbítás),
 5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).
- A 2., 3. és a 4. lépés 40 cikluson keresztül ismétlődik

6.9.2.7 *Nepovirus* A-típus specifikus PCR

Primer neve	Primer szekvenciája	Publikálta	Termék hossza
NepoA for	5'-GGHDTBCAKTMYSARRARTGG-3'	Digiario et al., 2006	~255 bp
NepoA for	5'-GGHDTBCAKTMYSARRARTGG-3'		

5. táblázat: *Nepovirus* A-típus specifikus PCR

PCR paraméterei

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
 2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
 3. 50 °C 30 másodperc (primer kötődés),
 4. 72 °C 0,5 perc (láncosszabbítás),
 5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).
- A 2., 3. és a 4. lépés 40 cikluson keresztül ismétlődik

6.9.2.8 *Cucumovirus* specifikus PCR

Primer neve	Primer szekvenciája	Publikálta	Termék hossza
CMV-1 (szenz)	5'-CCCCGGATCCACATCAYAGTTTTRAGRTTCAATTC-3'	Chen et al., 2001	~1100 bp
CMV-5 (antiszenz)	5'-CCCCGGATCCTGGTCTCCTT-3'		

6. táblázat: *Cucumovirus* specifikus PCR

PCR paraméterei

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
 2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
 3. 52°C 30 másodperc (primer kötődés),
 4. 72 °C 1 perc (láncosszabbítás),
 5. 72 °C 7 perc (láncosszabbítás).
- A 2., 3. és a 4. lépés 40 cikluson keresztül ismétlődik

6.9.3 Gélelektroforézis

A PCR-termékeket GelRed nukleinsav festéket tartalmazó 1%-os TBE-agaróz gélben, 1xTBE elektroforézis-puffer (89 mM Tris-HCl; 89 mM bórsav; 2,5 mM EDTA pH: 8,3) jelenlétében választottuk el és áteső UV fényben tettük láthatóvá (UVP, BioDoc-It™ System).

6.9.4 Gélből izolálás és PCR-termék tisztítás

A gélelektroforézissel szétválasztott termékekből a kívánt hosszúságú fragmenteket steril szikével vágtuk ki, hogy a degenerált primerek miatt képződött aspecifikus termékeket eltávolítsuk. Az izolált PCR-termékeket a High Pure Purification Kittel tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően.

6.9.5 A PCR-termékek klónozása

A tisztított PCR-termékeket ampicillin rezisztencia gént tartalmazó pGEM-T Easy Vector-ba ligáltuk. Az elegyeket egy éjszakán át, 4 °C-on inkubáltuk.

A 10 µl végtérfogató reakcióelegy:

- 3 µl tisztított PCR-termék
- 1 µl pGEM-T Easy Vektor (25 ng/µl)

5 μ l 2x ligáz puffert (60 mM Tris-HCl (pH: 7,8); 20 mM MgCl₂) 20 mM DTT; 2 mM ATP; 10% PEG)

1 μ l 2,5 u T4 DNS ligáz (2,5 u/ μ l)

A ligálást követően a rekombináns plazmidokat *E. coli* JM 109-es kompetens sejtekbe transzformáltuk. A kompetens sejtek előállítását és a hősokkos transzformálást Sambrook és munkatársai (1989) által kidolgozott módszer szerint végeztük. A 10 μ l ligátumot 50 μ l kompetens baktérium-szuszpenzióval elegyítettük, majd 15 percen keresztül jégen tartottuk. Ezután 1 percen keresztül 42 °C-os száraz blokkos termosztátban inkubáltuk, majd 2 percig jégre helyeztük, utána 300 μ l antibiotikum-mentes, folyékony LB táptalaj (10 g/l tripton; 5 g/l élesztőkivonat; 10 g/l NaCl; pH:7.2) hozzáadását követően 1 órán keresztül rázattuk, 37 °C-on, 200 rpm fordulatszámmal. Ezt követően 100 μ l-nyi szuszpenziót ampicillin tartalmú szilárd LB/IPTG+X-Gal táptalajon szélesztettünk (10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat; 10 g/l NaCl; 10 g/l agar; 50 μ g/ml ampicillin; szélesztés előtt a lemez felszínén 10 μ l (100 mM/ml) IPTG-t és 40 μ l (20 mg/ml) X-Gal-t oszlattunk szét). A kész lemezeket egy éjszakán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. A táptalajon csak azok a baktérium sejtek tudtak felszaporodni, melyek ampicillin rezisztencia gént hordoztak. A ligálás sikerességét kék-fehér szelekcióval ellenőriztük. Ezek után steril fogpiszkáló segítségével, minden lemezről 24 fehér színű telepet oltottunk le. A fogpiszkálóval egy kolóniát leemeltünk, amit egy masterplate-hez érintettünk, egy éjszakán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk.

6.9.6 A plazmid tisztítása és az inzert ellenőrzése

A sikeres ligálás ellenőrzéséhez kolónia PCR-t végeztünk. Minden PCR paraméter megegyezett a kiindulási értékekkel, csupán a cDNS helyett vízzel egészítettük ki, hogy a végtérfogat 50 μ l legyen. A masterplate-ről steril fogpiszkálóval a megfelelő PCR elegybe helyeztünk a rekombináns plazmidokat hordozó baktériumokból. Az eredményt gélelektroforézissel értékeltük.

6.9.7 Klónok tisztítása

A megfelelő hosszúságú fragmenteket hordozó klónok közül kiválasztottunk 3-3-at. A szekvenálásra kiválasztott klónokat a masterplate-ről, 2 ml 50 μ l/ml ampicillin tartalmú, folyékony LB táptalajt tartalmazó üvegcsőbe tettük. A lezárt üvegcsövet egy éjszakán át, 37 °C-on rázattuk, 200 rpm-mel. Szekvencia meghatározáshoz a plazmidot Quantum Prep Plasmid Miniprep Kittel a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk. A tisztított klónokat szekvencia meghatározásra küldtük el.

7 EREDMÉNYEK

Az alkalmazott molekuláris vizsgálatok során a *Carlavirus*, *Potyvirus* és a *Potexvirus* nemzetségekre végzett vizsgálatoknál a megfelelő méretű PCR termékeket kaptuk meg. A *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Nepovirus* vizsgálatok során csak a pozitív kontroll esetében kaptuk meg a várt hosszúságú terméket. A mintánkat így e vírus nemzetségektől mentesnek tekintjük.

7.1 *Carlavirus* specifikus PCR eredménye

A reakció során sikeresen felszaporítottuk a várt ~960 bp hosszú szakaszt, így feltételezhetően a vizsgált liliumot egy *Carlavirus* nemzetsége tartozó vírus is fertőzte. A *Carlavirus*-ok esetében a szekvencia meghatározás még nem készült el. Sajnos így nem tudtuk elvégezni a fajsztintű azonosítást.

7.2 *Potyvirus* specifikus PCR eredménye

A *Potyvirus* nemzetségre specifikus reakció során sikeresen felszaporítottuk a várt ~1200 bp hosszú szakaszt. A szerkvencia elemzés alapján kijelenthető, hogy a begyűjtött lilium *Lily mottle virus*-sal fertőzött. Elvégeztük az összehasonlítást az NCBI-ban található izolátumokkal (7. táblázat).

Vírus neve	NCBI azonosító	Származási hely	Publikálta
<i>Lily mottle virus</i>	AF531458	Kína	Chen et al., 2002
<i>Lily mottle virus</i>	AB570195	Japán	Sato et al., 2006
<i>Lily mottle virus</i>	FJ618539	Új-Zéland	Shiller et al., 2009
<i>Lily mottle virus</i>	AJ564636	Kína	Zheng et al., 2003
<i>Lily mottle virus</i>	AJ564637	Kína	Zheng et al., 2003
<i>Lily mottle virus</i>	HM222521	Kína	Li et al., 2010
<i>Lily mottle virus</i>	AM048875	Kína	Li et al., 2005
<i>Lily mottle virus</i>	AB054886	Japán	Yamaji et al., 2001
<i>Tulip breaking virus</i>	S44147	Hollandia	Langeveld et al., 1991

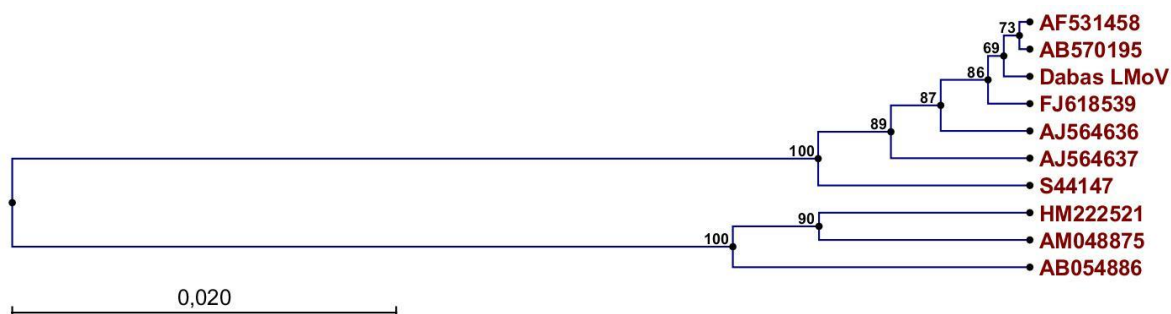
7. táblázat Az LMoV szekvenciaanalíziséhez felhasznált izolátumok

A mi izolátumunk (Dabas LMoV) a vizsgált szakaszon egy kínai izolátummal (AF531458) mutatja a legnagyobb hasonlóságot nukleotid szinten (99,89 %). A legnagyobb szekvencia különbséget a két japán izolátummal (AB570195, AB054886) mutat, ahol 90 % körüli az azonosság (8. táblázat).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1: AJ564636	100.00	98.26	99.13	99.24	99.13	98.91	97.50	90.66	89.47	90.34
2: AJ564637	98.26	100.00	98.70	98.81	98.70	98.48	97.07	90.12	89.14	89.79
3: AB570195	99.13	98.70	100.00	99.89	99.78	99.57	98.15	91.10	89.90	90.77
4: AF531458	99.24	98.81	99.89	100.00	99.89	99.67	98.26	91.21	90.01	90.88
5: Dabas LMoV	99.13	98.70	99.78	99.89	100.00	99.57	98.15	91.31	90.12	90.99
6: FJ618539	98.91	98.48	99.57	99.67	99.57	100.00	97.94	91.10	90.12	90.77
7: S44147	97.50	97.07	98.15	98.26	98.15	97.94	100.00	91.31	89.90	90.55
8: HM222521	90.66	90.12	91.10	91.21	91.31	91.10	91.31	100.00	97.19	97.84
9: AB054886	89.47	89.14	89.90	90.01	90.12	90.12	89.90	97.19	100.00	96.75
10: AM048875	90.34	89.79	90.77	90.88	90.99	90.77	90.55	97.84	96.75	100.00

8. táblázat A LMoV izlátumok páronkénti összehasonlítása ClustalW2 Multiple Sequence Alignment-tel

A filogenetikai törzsfán az izlátumok két jól elkülönülő ágon helyezkednek el. Az egyik ágon a HM222521, AM048875, AB054886 izlátumok egy különálló csoportot alkotnak. A másik csoportban a *Tulip breaking virus*-ként azonosított izlátum is közeli rokonságot mutat az LMoV izlátumokkal. A magyar izlátum legközelebbi filogenetikai rokonságot a kínai (AF531458) és a japán (AB570195) izlátumokkal mutat (18. ábra).



18. ábra Az LMoV izlátumok filogenetikai törzsfája (UPGMA)

7.3 *Potexvirus* specifikus PCR eredménye

A *Potexvirus* nemzetségre specifikus vizsgálat szerkvencia elemzése alapján kijelenthető, hogy a begyűjtött liliom *Plantago asiatica mosaic virus*-sal is fertőzött. A szekvencia analízis során kiderült, hogy a mintában két különböző PIAMV izlátum (PIAMV1, PIAMV2) is jelen van. A két magyar izlátum a vizsgált régióban 99,50%-os azonosságot mutatott. Elvégeztük az összehasonlítást az NCBI-ban található izlátumokkal (9. táblázat).

Vírus neve	NCBI azonosító	Származási hely	Publikálta
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	Z21647	Oroszország	Solovyev et al., 1994
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	AB360790	Japán	Komatsu et al., 2008
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	AB360791	Japán	Komatsu et al., 2008
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	AB360792	Japán	Komatsu et al., 2008
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	AB360794	Japán	Komatsu et al., 2008
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	AB360795	Japán	Komatsu et al., 2008
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	AB360793	Japán	Komatsu et al., 2008
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	AB360796	Japán	Komatsu et al., 2009
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	KF471012	Hollandia	Nem publikált
<i>Nandina mosaic virus</i>	AY800279	Egyesült Államok	Hughes et al., 2005

9. táblázat A PIAMV szekvenciaanalíziséhez felhasznált izolátumok

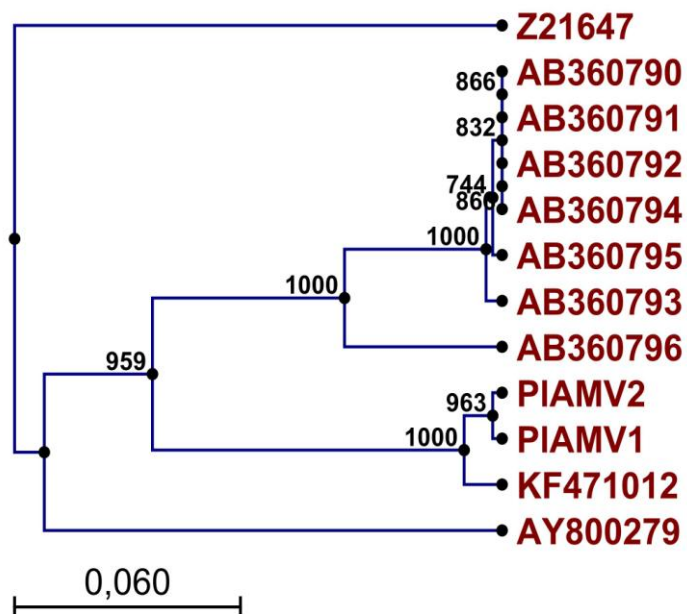
Az NCBI-ban található PIAMV izolátumok közül 98,01%-os azonosságot mutatnak a Hollandiában *Lilium* sp.-ről izolált izolátummal (KF471012). A magyar PIAMV izolátumok a Japánban *L. maximowiczii*-ről izolált 6 izolátummal 83 %-ban egyezik, míg a *Primula sieboldii*-ről (AB360796) származóval 83,83 %-ban. Az orosz és amerikai *Nandina domestica*-ról leírt izolátummal csupán 80 % körüli az egyezés (AY800279, Z21647) (10. táblázat).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1: PIAMV1	100.00	99.50	98.01	83.33	83.33	83.33	83.33	83.08	82.84	83.83	80.00	79.60
2: PIAMV2	99.50	100.00	98.01	83.33	83.33	83.33	83.33	83.08	82.84	83.83	80.00	79.60
3: KF471012	98.01	98.01	100.00	84.08	84.08	84.08	84.08	83.83	83.58	84.58	81.25	79.35
4: AB360791	83.33	83.33	84.08	100.00	100.00	100.00	100.00	99.50	99.25	92.04	80.25	77.11
5: AB360790	83.33	83.33	84.08	100.00	100.00	100.00	100.00	99.50	99.25	92.04	80.25	77.11
6: AB360792	83.33	83.33	84.08	100.00	100.00	100.00	100.00	99.50	99.25	92.04	80.25	77.11
7: AB360794	83.33	83.33	84.08	100.00	100.00	100.00	100.00	99.50	99.25	92.04	80.25	77.11
8: AB360795	83.08	83.08	83.83	99.50	99.50	99.50	99.50	100.00	98.76	91.54	80.00	76.87
9: AB360793	82.84	82.84	83.58	99.25	99.25	99.25	99.25	98.76	100.00	92.79	80.25	77.61
10: AB360796	83.83	83.83	84.58	92.04	92.04	92.04	92.04	91.54	92.79	100.00	80.25	78.61
11: AY800279	80.00	80.00	81.25	80.25	80.25	80.25	80.25	80.00	80.25	80.25	100.00	79.50
12: Z21647	79.60	79.60	79.35	77.11	77.11	77.11	77.11	76.87	77.61	78.61	79.50	100.00

10. táblázat A PIAMV izlátumok páronkénti összehasonlítása ClustalW2 Multiple Sequence Alignment-tel

A filogenetikai törzsfán az orosz izolátum teljesen elkülönül a többitől (Z21647). A magyar izolátumok ezzel a módszerrel is a holland izolátummal (KF471012) mutatják a

legközelebbi rokonságot. Ehhez a csoporthoz közel, külön álló csoportot képeznek a Japánból származó izolátumok (19. ábra).



19. ábra A PIAMV izolátumok filogenetikai törzsfája (UPGMA)

8 KÖVETKEZTETÉSEK

A dabasi liliom kertészetből származó *Lilium orientale* 'Conca D'or' mintákban komplex vírusfertőzöttséget diagnosztizáltunk. A tüneteket a vírusok együtt okozzák. A *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Nepovirus* nemzetségekbe tartozó vírust nem detektáltunk.

A *Carlavirus* nemzetségre specifikus PCR során keletkező PCR termékből arra következtettünk, hogy egy ebbe a nemzetségbe tartozó vírus is jelen van a növényben. A fajszintű azonosításhoz szükséges szekvencia analízis folyamatban van.

A szekvencia analízis alapján a *Potyvirus* nemzetségbe tartozó *Lily mottle virus* azonosítható volt. A magyar LMoV izolátum legközelebbi filogenetikai rokonságot a kínai (AF531458) izolátummal mutat. Az NCBI adatbázisban még nem áll rendelkezésre magyar LMoV adat. A mi izolátumunkról lesz az első Magyarországról származó LMoV szekvencia adat.

A begyűjtött mintából két különböző *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) izolátumot azonosítottunk. A két izolátum legnagyobb hasonlóságot a holland *Lilium* sp.-ről származó izolátummal mutat. Magyarországról elsőként és Európában negyedikként számolunk be a vírus megjelenéséről hajtattott liliomon. A szekvenciák NCBI adatbázisba való feltöltése folyamatban van, így magyar szekvenciákkal is bővül az adatbázis.

A tünetes liliomokon nem figyeltük meg a PIAMV-re jellemző nekrotikus tüneteket, ez azzal magyarázható, hogy a mintákat nyáron gyűjtöttük, amikor a tünetek maszkírozódnak. Viszont a téli hajtás időszakában, ezekben a tételekben jelentős kárra lehet majd számítani. Holland vizsgálatok szerint a kár a *Lilium orientale* esetében a vágottvirág termesztésben 80 %-nál is nagyobb lehet.

9 ÖSSZEFOGLALÁS

2013 nyarán dr. Eke Sándor liliomtermesztő segítségért fordult a Növénykórtani Tanszék munkatársaikhoz. A *Lilium orientale* növényeken klorózis, enyhe mozaikos tünet és gyenge növekedés volt megfigyelhető. A termelő évtizedes tapasztalatában és korszerű technológiájában bízva az abiotikus tényezők által kiváltott kórokokat elvetettük. A növényeket károsító kórokozók közül számos vírus okozhat hasonló tüneteket a keleti liliomon. Célul tűztük ki egy molekuláris, örökítőanyag alapú diagnosztikai módszer fejlesztését, amivel minden kétséget kizáróan azonosíthatjuk a kórokozókat.

Számos irodalmi adat összegyűjtése után összeállítottunk egy olyan polimeráz láncreakción alapuló detektálási eljárást, ami alkalmas a *Potyvirus*, *Potexvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Nepovirus* nemzetségekbe tartozó vírusok kimutatására.

A dabasi liliom kertészetből származó *Lilium orientale* 'Conca D'or' mintákban komplex vírusfertőzöttséget diagnosztizáltunk. A *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Nepovirus* nemzetségekbe tartozó vírusokat nem detektáltunk, viszont a *Carlavirus* nemzetségre specifikus PCR során keletkező termékből arra következtettünk, hogy a nemzetségbe tartozó vírus is jelen van a növényben. A fajszerűtű azonosításhoz szükséges szekvenciaanalízis folyamatban van.

A szekvencia analízis alapján a *Potyvirus* nemzetségbe tartozó *Lily mottle virus* is kimutatható a mintában. Az NCBI adatbázisban még nem áll rendelkezésre magyar LMoV adat. A mi izoláltunkról származó LMoV szekvenciaadat az első Magyarországról.

A begyűjtött mintából két különböző *Plantago asiatica mosaic virus* (PLAMV) izolátumot azonosítottunk. Magyarországról elsőként és Európában negyedikként számolunk be a vírus megjelenéséről hajtattott liliomon. A szekvenciák NCBI adatbázisba való feltöltése folyamatban van, így magyar szekvenciákkal is bővül az adatbázis.

A tünetes liliomokon nem figyeltük meg a PLAMV-re jellemző nekrotikus tüneteket, ez azzal magyarázható, hogy a mintákat nyáron gyűjtöttük, amikor a tünetek maszkírozódnak. Viszont a téli hajtattott időszakában, ezekben a tételekben jelentős kárra lehet majd számítani. Holland vizsgálatok szerint a kár a *Lilium orientale* esetében a vágott virág termesztésben 80 %-nál nagyobb is lehet.

Amint elegendő szekvenciaadat áll majd rendelkezésünkre, akkor a költségek csökkentése érdekében, tervezzük kiváltani a szekvenálást restriktív hasítóenzimek használatával, vagy fajspecifikus Nested-PCR-rel. A változtatásokkal a módszer tömegtesztelésre is alkalmas lehet.

10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálámat és köszönőnetemet szeretném kifejezni, mind azoknak, akik segítettek a dolgozat elkészítése során. Dr. Palkovics László tanszékvezető úrnak, aki biztosította a megfelelő háttérrel a munka elvégzéséhez, valamint azért is, hogy dolgozatomat a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszéken írhattam. Szeretném megköszönni a segítséget a tanszék összes dolgozójának is.

Hálával tartozom Ágoston Jánosnak, aki megosztotta velem tapasztalatait ebben a témában valamint húgomnak, aki a dolgozat szerkesztésében segített. Valamint dr. Eke Sándor, aki bizalommal fordult a Tanszék munkatársaihoz segítségért, így szolgáltatva a dolgozatom témáját.

Legnagyobb köszönetet konzulensemnek Pájtli Éva szeretném mondani, aki időt és energiát nem kímélve segítette a munkámat. Az ő útmutatása adott támaszt ahhoz, hogy elvégezzem az éppen aktuális feladatokat. Köszönöm a kitartását és türelmét, amit irányomban tanúsított.

11 IRODALOMJEGYZÉK

1. **Adams M.J., Accotto G. P., Agranovsky A. A., Bar-Joseph M, Boscia D., Brunt A. A., Candresse T., Coutts R. H. A., Dolja V. V., Falk B. W., Foster G. D., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A., Martelli G. P., Mawassi M., Milne R. G., Minafra A., Namba S., Rowhani A., Vetten H. J., Vishnichenko V. K., Wisler G. C., Yoshikawa N., Zavriev S. K., (2004) *Flexiviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV. Elsevier/Academic Press, London.1089–1124.**
2. **Allen, T. C., (1972a) *Lily symptomless virus*** Department of Botany and Pathology, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331, USA October
3. **Allen, T. C., (1972b) *Lily symptomless virus*.** In: Commonwealth Mycological Institute:Association of Applied Biologists. Descriptions of Plant Viruses, c/o Institute of Horticulture Research, Wellesbourne, Warwick, CV35 9EF, UK, No. 96.
4. **Allen, T. C., (1980) Diagnosis of virus diseases of lilies.** Lily Yearbook of the North American Lily Society, Inc. 33 : 41- 43.
5. **Allen, T. C., and F. P. McWhorter, (1966) Virus-like particles associated with curl-stripe disease of *Lilium longiflorum*.** Phytopathology 56:869.
6. **Alper M., Koenig R., Lesemann D. E., and Loebenstein G., (1982) Mechanical transmission of a strain of *tulip breaking virus* from *Lilium longiflorum* to *Chenopodium* spp.** Phytoparasitica 10 (3): 193- 199.
7. **Anderson, C. W., (1954) The aster ringspot virosis of central Florida.** Phytopathology 44.: 87-92.
8. **Anderson, C. W., (1957) Seed transmission of three viruses in cowpea.** Phytopathology 47.: 515.
9. **Asjes, C. J., Segers, L. C., (1983) Incidence and control of necrotic leaf mosaic caused by *Arabis mosaic virus* in *Lilium tigrinum splendens* in the Netherlands.** Journal of Phytopathology. 196:115–126.
10. **Asjes, C. J., Neeltje P. de Vos, and D. H. M. Van Slogteren., (1973) Brown ring formation and streak mottle, two distinct syndromes in lilies associated with complex infections of *lily symptomless virus* and *tulip breaking virus*.** Netherlands Journal of Plant Pathology 79.1: 23-35.
11. **Ayala, A., and M. W. Allen., (1968) Transmission of the California tobacco rattle virus (CTRV) by three species of the nematode genus *Trichodorus*.** Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 52.2: 101-125.
12. **Ágonston János, (2010) Hagymás dísznövények potyvírus és uborka mozaik vírus fertőzőttségének felmérése.** Diplomamunka, Budapest
13. **Bailiss, K. W., and V. N. Okonkwo, (1979) Virus infection of spinach (*Spinacia oleracea* L.) in Britain.** Journal of Horticultural Science. 54.
14. **Behrens, (1899) Landwirtschaftlichen Versuchsstationen** 52: 422.
15. **Beijerinck, (1898) Verhandelingen der Koninklyke academie van Wettenschappen te Amsterdam** 65: 3.

16. **Bergeson, G. B., K. L. Athow, and F. A. Laviolette, (1964)** Sister Mary Thomasine.. Transmission, movement, and vector relationships of *tobacco ringspot virus* in soybean. *Phytopathology* 54: 723-728.
17. **Best, R. J., (1968)** Tomato spotted wilt virus, pp 65-146. In K. M. Smith & M. A. Lauffer [eds.], *Advances in Virus Research*. Vol. 13. Academic Press, New York.
18. **Boontjes, J., (1978)** Vergelijking van bolproductie van virusvrije en lelielatentviruszieke lelies. *Bloembollencultuur* 88, 1219.
19. **Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., and Maat, D. Z., (1978)** *Leek yellow stripe virus* and its relationships to *onion yellow dwarf virus*; characterization, ecology and possible control. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84 (5), 185-204.
20. **Brierly, P.; Smith, F. F., (1944)** Study on lily virus diseases: the mottle group, *Phytopathology*: 34, p. 718.
21. **Brittlebank, C. C., (1919)** Tomato diseases. *Journal of Agriculture* 17, 231–235
22. **Broadbent, L., (1965)** The epidemiology of tomato mosaic. *Annals of Applied Biology* 56.2: 177-205.
23. **Broadbent, L., and J. T. Fletcher, (1963)** The epidemiology of tomato mosaic. *Annals of Applied Biology* 52.2: 233-241
24. **Caspar, D. L. D., (1964)** Assembly and stability of the *tobacco mosaic virus* particle. *Advances in protein chemistry* 18: 37-121.
25. **Cayley, Dorothy M., (1928)** Breaking in tulips. *Annals of Applied Biology* 15.4: 529-539.
26. **Chen C. C., Hu C. C., (1999)** Purification and characterization of a cucumovirus from *Lisianthus russellianus*. *Plant Protection* 41: 179–198
27. **Chen, Y.K., Derks, A.F.L.M., Langeveld, S., Goldbach, R. and Prins, M., (2001)** High sequence conservation among *cucumber mosaic virus* isolates from lily. *Archives of virology*. 146:1631-1636.
28. **Choi, S.K., Choi, J.K., Park, W.M. and Ryu, K.H., (1999)** RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*. 83:67-73.
29. **Civerolo, E. L., J. S. Semancik, and L. G. Weathers, (1968)** Partial purification of viruslike particles associated with the necrotic fleck disease of Easter Lily. *Phytopathology* 58.11: 1481-1486.
30. **Clinton, G. P., (1909)** Artificial cultures of *Phytophthora*, with special reference to oospores. Pages 891-907 in: *Connecticut Agricultural Experiment Station 1907-1908*, New Haven, CT.
31. **Cremer, Margaretha C., and P. K. Schenk, (1967)** Notched leaf in *Gladiolus* spp., caused by viruses of the *tobacco rattle virus* group. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 73.2: 33-48.
32. **Derks A. F. L. M., (1975)** *Tobacco rattle virus* in lilies. *Netherlands. Netherlands Journal of Plant Pathology*. 81. 78-80.
33. **Derks, A. F. L. M., Lemmers, M.E.C., (1997).** Komkommermozaiekvirus in lelies. *Buitenlandse partijen geven een risico*. *Vakwerk* 71 (19), 34–35.

34. **Doolittle, Sears Polydore, (1916)** A new infectious mosaic disease of cucumber." *Phytopathology* 6.2: 145-147.
35. **Douine, L., Quiot, J. B., Marchoux, G., Archange, P., (1979)** Recensement des espèces végétales sensibles au Virus de la Mosaïque du Concombre (CMV) Etude bibliographique. *Annales de Phytopathologie*. Vol. 11.
36. **Dufrenoy, J., (1931)** L'immunité locale. Premier congress intensionships microbiology. Paris 1: 635-641.
37. **Dunleavy, John M., (1957)** The Grasshopper as a Vector of Tobacco Ringspot Virus in Soybean. *Phytopathology* 47.11: 681-682.
38. **Edwardson & Christie, C. R. C., (1991)** Handbook of viruses infecting legumes, Boca Raton, CRC Press, 293.
39. **Fritzsche, R., and H. B. Schmidt, (1963)** *Xiphinema paraeolongatum* Altherr und *Xiphinema n. sp.*, zwei Vektoren des Arabis-Mosaikvirus. *Naturwissenschaften* 50.5: 163-163.
40. **Fromme, F. D., S. A. Wingard, and C. N. Priode, (1927)** Ringspot of Tobacco: an infectious disease of unknown cause. *Phytopathology* 17.5: 321-328.
41. **Gaspar J.O., Belintani P., Almeida A. M. R., Kitajima E.W. (2008)** A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. *Journal of Virological Methods*, 481:283–285.
42. **Gibbs, A. J., and B. D. Harrison, (1964)** Nematode-Transmitted viruses in sugar beet in East Anglia. *Plant Pathology* 13.4: 144-150.
43. **Gibbs A., Armstrong J., Mackenzie A. M., Weiller G. F., (1998)** The GPRIME package: computer programs for identifying the best regions of aligned genes to target in nucleic acid hybridisation base on diagnostic tests, and their use with plant viruses. *Journal of Virological Methods* 74: 67-76.
44. **Digiario M., Elbeaino T., Martelli G.P., (2007)** Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C. *Journal of Virological Methods*, 141: 34-40.
45. **Goldbach, R., Peters, D., (1994)** Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in Virology* 5, 113–120.
46. **Gooding, (1991)** In *Compendium of Tobacco Diseases* eds.H.D. Shew & G.B. Lucas. APS Press, St. Paul, MN, p. 44.
47. **Hariharasubramanian, V., Milton Zaitlin, and Albert Siegel, (1970)** A temperature-sensitive mutant of TMV with unstable coat protein. *Virology* 40.3: 579-589.
48. **Harrison, B. D., and C. H. Cadman, (1959)** Role of a dagger nematode (*Xiphinema sp.*) in outbreaks of plant diseases caused by *Arabis mosaic virus*. *Nature, Lond* 184: 1624-1626.
49. **Harrison & Robinson, (1981)** In *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, ed. Kurstak, Amsterdam: Elsevier/North-Holland. 515.
50. **Harrison & Wilson, (1999)** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 254: 517.
51. **Harris, Kerry F., and R. H. E. Bradley, (1973)** Importance of leaf hairs in the transmission of *tobacco mosaic virus* by aphids. *Virology* 52.1: 295-300.

52. **Horvath, J., (1978)** New artificial hosts and non-hosts of plant viruses and their role in the identification and separation of viruses III. Tobravirus group: tobacco rattle virus. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 13.1/2: 51-55
53. **Hosford, Robert M., (1967)** Transmission of plant viruses by dodder. *The Botanical Review* 33.4: 387-406.
54. **Hughes, P. L., Harper, F., Zimmerman, M. T. & Scott, S. W., (2005)** *Nandina mosaic virus* is an isolate of *Plantago asiatica mosaic virus*. *European Journal of Plant Pathology* 113:309–313.
55. **Inouye, N., Maeda, T., Mitsuhata, K., (1979)** Citrus tatter leaf virus isolated from lily. *Annual Review of Phytopathology Japan.* 45, 712–720.
56. **Jagger, Ivan Claude, (1916)** Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology* 6.2: 149-151.
57. **Jayasinghe U, Dijkstra J, (1979)** *Hippeastrum mosaic virus* and another filamentous virus in *Eucharis grandiflora* Netherlands Journal of Plant Pathology 85, 47–65.
58. **Jha, Asharfi, and A. F. Posnette, (1959)** Transmission of a virus to strawberry plants by a nematode (*Xiphinema* sp.). *Nature, Lond* 184: 962-963.
59. **Jha, Asharfi, and A. F. Posnette, (1961)** Transmission of *arabis mosaic virus* by the nematode *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.). *Virology* 13.1: 119-123.
60. **Jordan, R., Guaragna, M. A., and Putnam, M., (2008)** First Report of a New *Potyvirus*, *Tricyrtis virus Y*, and *Lily virus X*, a *Potexvirus*, in *Tricyrtis formosana* in the United States. *Plant Disease* 92.4: 648-648.
61. **Kálmán D. Palkovics L. Gáborjányi R., (2001)** Serological, pathological and molecular characterisation of Hungarian *pepper mild mottle tobamovirus* (PMMoV) isolates. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 36 (1-2):31-42.
62. **Kennedy, Day and Eastop, (1962)** A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. London, Commonwealth Institute of Entomology. 114.
63. **Kostin V.D., and Volkov Y. G., (1976)** Some properties of the virus affecting *Plantago asiatica* L. (in Russian). *Virusnye Bolezni Rastenij Dalnego Vostoka* 25: 205–210
64. **Knudsen B., Knudsen T., Flensburg M., Sandmann H., Heltzen M., Andersen A., Dickenson M., Bardram J., Steffensen P. J., Mønsted S., Lauritzen T., Forsberg R., Thanbichler A., Bendtsen J. D., Görlitz L., Rasmussen J., Tordrup D., Værum M., Nygaard Ravn M., Hachenberg C., Fisker E., Dekker P., de Meza J., Hein A-M. K., Buur Sinding J., Quorning J., Hvam K., Mikkelsen S., Liboriussen P., Grydholt J., Handberg H., Bundgaard M., Joecker A., Simonsen M., Nielsen P. D. R., Joecker A., Fleischer P., Jakobsen J., Juul S., Appelt U., Fejes A.** CLC Bio, Cambridge, MA. CLC DNA Workbench version 6.6.
65. **Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G., (2007)** ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
66. **Lee J. H., Bang K. W. and Lee J. K., (1996)** A study of runoff characteristics of pollutants in combined sewer overflow. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* 18(10):1147-1160.
67. **Lojek, John S., and Gert B. Orlob., (1969)** Aphid transmission of *tobacco mosaic virus*. *Science* 164.3886: 1407-1408.

68. **Lucas, G. B., (1975)** Disease of Tobacco. Biological Consulting Associates. Raleigh, N. Carolina. USA. 621.
69. **Mandahar, (1981)** In Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology, p. 241, eds K. Maramorosch and K. F. Harris, New York: Academic Press, 368.
70. **Marrou, Duteil, Lot & Clerjeau, (1973)** Pépiniéristes Horticulteurs Maraîchers 137: 37.
71. **Mayer, (1886)** Landwirtschaftliche Versuchs-Stationen 32: 451.
72. **McKay, Marion Bertice, P. Brierley, and T. P. Dykstra, (1929)** Tulip'breaking'is proved to be caused by mosaic infection. Yearbook of the United States Department of Agriculture: 596-597.
73. **McKenny Hughes, A. W., (1931)** Aphids as vectors of breaking in tulips. Annals of Applied Biology 28: 16-29.
74. **McWhorter & Allen, (1967)** In Easter Lilies, Eds. D. C. Kiplinger & R. W. Langhans, The New York and Ohio Lily Schools. 111.
75. **Memelink, J., van der Vlugt, C. I. M., Linthorst, H. J. M., Derks, A. F. L. M., Asjes, C. J., Bol, J. F., (1990)** Homologies between the genomes of *carlavirus* (*lily symptomless virus*) and a *potexvirus* (*lily virus X*) from lily plants. Journal of general virology 71:917–924
76. **Messieha, Mimi, (1969)** Transmission of *Tobacco ringspot virus* by thrips." Phytopathology 59.7: 943-945
77. **Minskaya L. A., Novikov V. K., Kostin V., D., (1977)** Physical and chemical properties of virus affecting the *Plantago asiatica* L. in the Soviet Far East (in Russian). Virusnye Bolezni Rastenij Dalnego Vostoka 48: 61–69
78. **Mound, L. A., (1996)** The Thysanoptera vector species of tospoviruses. Acta Horticulturae 431:299–309.
79. **Murant, A. F., (1970)** *Arabis mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant viruses.16.
80. **Ozeki J., Takahashi S., Komatsu K., Kagiwada S., Yamashita K, Mori T, Hirata H, Yamaji Y, Ugaki M, Namba S., (2006)** A single amino acid in the RNA dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica mosaic virus* contributes to systemic necrosis. Archives of virology 151: 2067–2075
81. **Pest Report – The Netherlands (2010)** *Plantago asiatica mosaic virus* on *Lilium* spp. Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality. July
82. **Plant Protection Service of the Netherlands (2012)** Follow-up: Pest status *Plantago asiatica mosaic virus* (*potexvirus*) on *Lilium* spp. in the Netherlands. <http://www.vwa.nl/onderwerpen/kennis-en-advies-plantgezondheid/dossier/pest-reporting-eng/pest-reports>
83. **Plant Protection Service of the Netherlands (2012)** Follow-up: Pest status *Plantago asiatica mosaic virus* (*potexvirus*) on *Lilium* spp. in the Netherlands. November 2012 Pest Report. <http://www.vwa.nl/onderwerpen/kennis-en-advies-plantgezondheid/dossier/pest-reporting-eng/pest-reports>
84. **Quanjier H. M., (1943)** Bijdrage tot de kennis van de in Nederland voorkomende ziekten van tabak en van de tabaksteelt op kleigrond. European Journal of Plant Pathology 49.2: 37-51.

85. **Rani, Shyama, H. N. Verma, and G. S. Verma, (1969)** A virus disease of *Petunia hybrida*. Plant Disease Reporter 53.11: 903-907.
86. **Salamon, P. and Palkovics, L., (2005)** Occurrence of *Colombian datura virus* (CDV) in *Brugmansia* hybrids, *Physalis peruviana* L. and *Solanum muricatum* Ait. in Hungary. Archives of virology 49 (2): 117-122.
87. **Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. A., (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
88. **Scholthof, Shaw & Zaitlin, (1999)** *Tobacco Mosaic Virus: One Hundred Years of Contributions to Virology*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. 256.
89. **Schuster, Michael F., (1963)** Flea beetle transmission of *Tobacco ringspot virus* in the Lower Rio Grande Valley. Plant Disease Reporter 47.6: 510-511.
90. **Shew & Lucas, (1991)** Compendium of Tobacco Diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
91. **Silber, G., and L. G. Burk, (1965)** Infectivity of *tobacco mosaic virus* stored for fifty years in extracted, 'unpreserved' plant juice. Nature, London 206: 740-741.
92. **Simons, John N., (1957)** Three strains of *cucumber mosaic virus* affecting bell pepper in the Everglades area of south Florida. Phytopathology 47: 145-150.
93. **Sinclair & Shurtleff, (1975)** Compendium of Soybean Diseases, St. Paul: American Phytopathological Society, 69.
94. **Singh, S. J., Krishanareddy, M., (1996)** Watermelon bud necrosis: a new tospovirus disease. Acta Horticulturae 431:68-77.
95. **van Slogteren, D. H. M., (1958)** Ratelvirus als oorzaak van ziekten in bloembolgewassen en de mogelijkheden de infectie door middel van grondontsmetting te bestrijden. European Journal of Plant Pathology 64.5: 452-462.
96. **van Slogteren, D. H. M., and C. J. Asjes, (1969)** Virus diseases in Tulips. The Daffodil and Tulip Year Book 1970. 35: 85-99.
97. **van Slogteren D. H. M., and de Vos, (1966)** Viruses of Plants, Eds. A. B. R. Beemster & Jeanne Dijkstra, North-Holland, Amsterdam. 320.
98. **Smith, K. M., (1937)** A Textbook of Plant Virus Diseases. P. Blakiston's Son & Co. Inc., Philadelphia. 615.
99. **Smith, K. M., (1957)** A Textbook of Plant Virus Diseases, 2d ed., Churchill, London.
100. **Smith, K. M., and R. Markham, (1944)** Two new viruses affecting Tobacco and other plants. Phytopathology 34.3: 324-329.
101. **Stone, O.M., (1976)** Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. 1975. 122.
102. **Stone, O.M., (1980)** Two new potexviruses from monocotyledons. Acta Horticulturae. 110:59-63.
103. **Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., (2011)** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
104. **Taylor, Charles E., and D. J. F. Brown, (1997)** Nematode vectors of plant viruses. CAB International. 268.

105. **Taylor, C. E., and W. Mo Robertson, (1970)** Location of *tobacco rattle virus* in the nematode vector, *Trichodorus pachydermus* Seinhorst. Journal of General Virology 6.1: 179-182.
106. **Tehrani, B., W. R. Allen and J. A. Matteoni, (1990)** Update on the incidence of *tomato spotted wilt virus* in greenhouses. Canadian Journal of Plant Pathology 70: 102-103.
107. **Thomas, C. E., (1969)** Transmission of *tobacco ringspot virus* by *Tetranychus* sp. Phytopathology 59: 633-636.
108. **Van der Vlugt, R. A. A. and Berendsen, M., (2002)** Development of a general potexvirus detection method. European Journal of Plant Pathology, 108:367-371.
109. **Visser, Peter B., and John F. Bol, (1999)** Nonstructural proteins of *Tobacco rattle virus* which have a role in nematode-transmission: expression pattern and interaction with viral coat protein. Journal of general virology 80.12: 3273-3280.
110. **Webb, S., Tsai, J., Mitchell, F., (1998)** Bionomics of *Frankliniella bispinosa* and its transmission of Tomato spotted wilt virus. In: Peters, D., Goldbach, R. (Eds.), Recent Progress in Tospovirus and Thrips Research. Wageningen. 67.
111. **Yamamoto, C.M. & K. Ohata. (1977)** Some properties and electron microscopy of *tomato spotted wilt virus* isolated from blackberry lily (*Belamcanda chinensis* DC.). Bull. Shikoku Agricultural Experiment Station, Zentzi, Kagawa Prefecture, Japan 30: 39-47.