

Budapesti Corvinus Egyetem

Kertészet Tudományi Kar

Genetika és Növénynevelés Tanszék
Szőlészeti Tanszék

Viroidmentesítés *in vitro* szomatikus embriogenezis
által különböző szőlőfajtáknál

Krivényi Ádám
Kertészmérnök BSc hallgató
IV. évfolyam

Dr Oláh Róbert	egyetemi docens
Dr Lózsa Rita	egyetemi tanársegéd
Forgács István	tanszéki mérnök

A dolgozat lezárásának dátuma: 2015.01.02.

TARTALOMJEGYZÉK

1. Felhasznált rövidítések.....	3
2. Bevezetés.....	4
3. Célkitűzések	5
4. Irodalmi áttekintés.....	6
4.1. A szőlő gazdasági jelentősége.....	6
4.2. Vírusok és viroidok	6
4.2.1. Szőlővírusok.....	6
4.2.2. Magyarországon fellelhető szőlővírusok csoportosítása tüneteik alapján	7
4.2.3. Szőlőviroidok	10
4.2.4. Komló törpülés viroid (<i>Hop stunt viroid</i> , HSVd)	10
4.2.5. Törvényi szabályozás a szőlő szaporítóanyagok előállításáról, minősítéséről és forgalomba hozataláról.....	12
4.3. A vírus- és viroidmentesítés módszerei	13
4.3.1. A vírus- és viroidmentesítés háttere	13
4.3.2. Hőkezelés	13
4.3.3. Merisztématenyésztés, mint vírusmentesítési módszer.....	14
4.3.4. Az indirekt szomatikus embriogenezis, mint vírusmentesítési módszer.....	15
4.4. Az indirekt szomatikus embriogenezis háttere.....	16
4.4.1. Az indirekt szomatikus embriogenezis kialakulásának története.....	17
4.4.2. A növényi szövetek dedifferenciálódása és redifferenciálódása.....	17
4.4.3. Szőlő indirekt szomatikus embriogenezis	17
4.5. Vírusdiagnosztikai módszerek	18
4.5.1. Bioteszt.....	19
4.5.2. ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	19

4.5.3. Polimeráz láncreakció, (<i>Polymerase chain reaction</i>) PCR.....	20
5. Anyag és módszer	21
5.1. Növényanyag.....	21
5.2. Indirekt szomatikus embriogenezis	21
5.2.1. Embriogén kallusz fejlődésének indukálása	21
5.2.2. A növények regenerálása	24
5.3. Diagnosztika.....	26
5.3.1. Szőlőnél alkalmazott RNS kivonás	26
5.3.2. cDNS írás	27
5.3.3. PCR vizsgálatok	27
6. Eredmények.....	29
6.1. Az anyanövények tesztelése.....	29
6.2. Szomatikus embriogenezis indukálása.....	31
6.3. Kalluszminták tesztelése	34
6.4. Regenerált növények tesztelése.....	34
7. Eredmények megvitatása.....	36
7.1. Szomatikus embriogenezis indukálása.....	36
7.2. Vírusdiagnosztika.....	37
8. Összefoglalás.....	40
9. Köszönetnyilvánítás	42
10. Irodalomjegyzék.....	43
11. Mellékletek.....	47

1. FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

2,4-D	2,4-diklór-fenoxi-ecetsav
AGVd	<i>Australian grapevine viroid</i>
ArMV	<i>Arabis mosaic virus</i>
BAP	6-benzil-aminopurin
BGLV	<i>Grapevine chrome mosaic virus</i>
cDNS	<i>Complementary</i> dezoxiribonukleinsav
CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i>
DNS	Dezoxiribonukleinsav
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FVM	Földművelés és Vidékfejlesztési Minisztérium
GCMV	<i>Grapevine chrome mosaic virus</i>
GFkV	<i>Grapevine fleck virus</i>
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
GLRaV	<i>Grapevine leafroll-associated virus</i>
GVA	<i>Grapevine virus A</i>
GVB	<i>Grapevine virus B</i>
GVD	<i>Grapevine virus D</i>
GYSVd	<i>Grapevine yellow speckle viroid</i>
HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>
MS	Murashige és Skoog
NAIK MBK	Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RNS	Ribonukleinsav
RSPaV	<i>Rupestris stem pitting-associated virus</i>

2. BEVEZETÉS

A viroidok a vírusoknál is egyszerűbb növényi paraziták, melyek egy fehérjét nem kódoló, csupasz cirkuláris egyszálú RNS-ből állnak. A szőlőviroidok többnyire látensek, ha mégis okoznak tüneteket, akkor azok megjelenése kiszámíthatatlan. Szőlőben gazdasági jelentőségük nem tisztázott, azonban ismeretes, hogy egyes szőlőviroidok szinergisztikusan hathatnak bizonyos vírusokkal kevert fertőzésekben. Az általunk vizsgált viroid, a Komló törpülés viroid (*Hop stunt viroid* – HSVd) volt, mely jelentős károkat okoz a komló és uborkatermesztésben, de fertőz különböző citrus- és csonthéjas fajokat is. Mivel szőlőn a HSVd látens, így az tünetmentes rezervoárnövényként, tehát fertőzési forrásként funkcionálhat.

Máig egyetlen olyan munka ismert, melynek során néhány szőlőviroidot sikerrel elimináltak szomatikus embriogenezis során, ismereteink tehát korlátozottak ebben a témában. A szőlőviroidok sejtmagi lokalizációjuk, míg a szőlővírusok többsége citoplazmás, ezért elképzelhető, hogy a viroidok más mechanizmus útján vesznek el a szomatikus embriogenezis során, mint a vírusok. Feltételezzük, hogy a sejtmagi lokalizáció megnehezítheti a viroid eliminációját a kallusz-fázis alatt, illetve a szomatikus embriogenezis folyamán. Ez gyakorlati szempontból jelenthetné azt, hogy a viroidokat elvesztett regenerált növények jó eséllyel a vírusokat is elvesztették, így a viroidmentesség egyfajta indikátora lehetne a vírusmentességnek a patogénmentes szaporítóanyag előállításakor.

A HSVd ilyen szempontból ideálisan követhető viroid: szinte minden szőlőben megtalálható a világ minden táján, olcsón és nagy biztonsággal kimutatható PCR-el, stabilabb egy növényi mintában, mint a vírusok általában.

Munkánk kezdetén különböző szőlőfajtákon vírus- és viroid teszteket végeztünk. HSVd-t és legalább még egy vírust tartalmazó szőlőnövényekkel dolgoztunk. *In vitro* szomatikus embriogenezisen keresztüli növényregeneráláshoz portokokból embriogén kallusztényészeteket indítottunk. Mivel zömmel olyan szőlőfajtákkal dolgoztunk, melyeknek szövettényésztésbe vonásáról nem voltak előzetes ismereteink, ezért adatokat gyűjtöttünk néhány fajta kalluszosodási képességéről a portokméret, valamint a tőke (azaz az egyedek közti variáció) szerint.

Eredményeink eltéréseket mutatnak a fajták és az egyedek kalluszosodási képességében, és biztatóak a viroidmentesítés tekintetében is.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Szőlő esetében a szomatikus embriogenezis a leggyakrabban felhasznált módszer a növény-sejt-növény regenerációban, mely számos biotechnológiai módszer alapját képezi. Munkám során a szomatikus embriogenezist elsősorban mint viroidmentesítési módszert kívántam alkalmazni különböző interspecifikus és *Vitis vinifera* szőlőfajták esetében. Ugyanakkor, a fajták között jelentős eltérések lehetnek az embriogén kalluszképzés terén, ezért fontosnak tartottuk, hogy erről is adatokat gyűjtsünk.

Célul tűztük ki, hogy

- 1.) a bizonyítottan vírus- és HSVd-fertőzött növényekből vírus- és viroidmentes növényeket állítsunk elő *in vitro* szomatikus embriogenezisen keresztül,
- 2.) olyan Magyarországon elterjedt szőlőfajtákat vonjunk szövettenyésztésbe, melyekről nem rendelkezünk irodalmi információkkal az *in vitro* embriogén kalluszindukcióról, és megvizsgáljuk ezen fajták esetében, hogy a portokok mérete hatással van-e a kalluszosodó portokok arányára, illetve, hogy az egyes tőkék hatással vannak-e a kallusz indukció hatékonyságára,
- 3.) párhuzamosan kövessük a viroidok és vírusok elvesztését a szomatikus embriogenezis során, ezzel vizsgálva, hogy a viroidmentesség jelezheti-e a vírusmentességet.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. A szőlő gazdasági jelentősége

A szőlő világszerte igen jelentős növény, mind gyümölcsként, mind pedig borkészítés szempontjából. A nyers fogyasztáson és borászati felhasználáson kívül is fontos szerepet tölt be az élelmiszeriparban (ivólé, aszalt gyümölcs). A Food and Agriculture Organization (FAO) adatai alapján világ teljes szőlőtermesztő területe 2012-ben 7,528 millió hektár volt. Ennek a területnek jelentős része (49%) az Európai Unió országainak területén található. Közülük is kiemelkedik Spanyolország, hiszen ez az ország rendelkezik a világon a legnagyobb szőlőtermő területtel (1,2 millió hektár, ami a világ szőlőtermő területének 16%-a) (www.fao.org).

A világ szőlőtermő területeire csökkenő tendencia jellemző, aminek a legfőbb oka az, hogy a kiöregedett ültetvények felszámolása gyorsabb ütemben zajlik, mint az új ültetvények telepítése. Európában és Észak-Amerikában a szőlőtermesztő területek csökkenése tapasztalható, míg ezzel párhuzamosan, a fejlődő országokban gyors ütemben növekszik a szőlőtermő terület és egyre jelentősebb szerepet kap a meglévő területek fejlesztése. Chile például 2000 és 2007 között majdnem a duplájára növelte a szőlőtermő területét. A Föld teljes szőlőtermő területének csökkenő tendenciája mellett (2000-ben 7,913 millió hektár, 2007-ben pedig 7,501 millió hektár), a teljes termésmennyiség stagnál, illetve enyhén növekszik (a fent említett időszakban 26,422 millió literrel 26,987 millió literre nőtt) (www.fao.org). Hazánkra is a szőlőterület folyamatos csökkenése jellemző. 2000-ben a teljes szőlőtermő terület 127000 hektár, 2013-ban pedig mindössze 72000 hektár volt (www.ksh.hu).

4.2. Vírusok és viroidok

4.2.1. Szőlővírusok

A vírusok olyan fertőzőképes obligát sejtparaziták, melyek sejttes organizmusok megfertőzésére képesek. A vírusok saját anyagcserével nem rendelkeznek, replikációjuk során a gazdasejt fehérje és nukleinsav szintetizáló képességeit használják fel. A fertőzés folyamatában a vírus a gazdasejt anyagcseréjét programozza át. A vírusok genetikai információjukat egy vagy kétszálú, lineáris vagy cirkuláris ribonukleinsav (RNS) vagy deoxiribonukleinsav (DNS) szálon hordozzák. A nukleinsav védelmét a kapszidnak (köpenynek) nevezett fehérjeburok látja el, mely úgynevezett kapszomerekből, köpenyfehérje egységekből épül fel.

Minden növényi vírus átvihető az adott vírusra fogékony gazdanövényre. A természetes terjedés vektorokkal, vagy mechanikai úton, sérüléseken keresztül történik. Növényi vírusvektorok lehetnek fonálférgek (*Nematoda*), pajzstetvek (pl. *Pseudococcidae*), vagy parazita növények (pl. *Cuscuta spp*). A vektor rovarok a fertőzött növényt rágva, szívogatva veszik fel a vírust, majd áthurcolják azt az egészséges növényre és táplálkozás közben megfertőzik azt. A vírusok terjedhetnek még kertészeti oltással, illetve vegetatív szaporító szervekkel. A mechanikai terjedést megakadályozhatjuk, ha ügyelünk a művelő eszközeink, például a metszőolló tisztán tartására, fertőtlenítésére. Az oltvánnyal való terjedés patogénmentes szaporítóanyag használatával küszöbölhető ki (Uyemoto et al. 2009).



1. ábra. Néhány gazdaságilag is jelentős vírus tünete (A) GLRaV-1; (B) ArMV; (C) RSPaV (Uyemoto et al. 2009)

Szőlőben a világon összesen 63 vírushajt írtak le (Ferguson 2012), ebből hazánkban tizenöt megjelenését regisztrálták eddig (Cseh 2012). A vírusok fertőzése a szőlőben tőkeleromlást, majd tőkepusztulást okozhat. Ennek következtében csökken a termés hozam, és romlik a termés minősége, rövidül a tőkék produktív időszaka.

4.2.2. Magyarországon fellelhető szőlővírusok csoportosítása tüneteik alapján

A szőlőt fertőző vírusokat tüneteik alapján öt csoportba soroljuk (Uyemoto et al. 2009), de ezek közül Magyarországon csak az alább részletezett négy tünetegyüttes jelentős:

A szőlő fertőző leromlása. A betegséget a *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) és más *Nepovirus* nemzetségbe tartozó vírusok okozzák. A betegség Európa szerte komoly problémákat okoz.

- ***Grapevine fanleaf virus, Szőlő fertőző leromlás vírus (GFLV)***

A GFLV a *Secoviridae* családba, *Nepovirus* törzsbe tartozik. A vírusnak tünettanilag két csoportját különböztetjük meg, a sárga mozaik törzset (*yellow mosaic strain* GFLV-YM) és az érmenti szalagosodás törzset (*vein banding strain* GFLV-VB). A GFLV szinergisztikusan okoz tüneteket a *Grapevine yellow speckle viroid-1* (GYSVd-1) viroiddal (Cseh 2012). A tünetek leginkább ősszel, és nyár végén látszanak. A tünetei igen változatosak lehetnek. A leveleken klorotikus foltok jelennek meg, a levél torzul, széle erősen fogazottá válik. A hajtáson az ízközők rövidülnek, a rügyek kisebbek, mint az egészséges növényen. Az egész világon szinte minden szőlőfajtát fertőz. Gazdasági jelentősége nagy, a tőkék gyors leromlását, pusztulását okozza. Elsősorban fonalférgekkel, de oltással is terjedhet.

- ***Arabis mosaic virus, Arabis mozaik vírus (ArMV)***

A vírus a *Secoviridae* családba *Nepovirus* törzs „A” alcsoportjába tartozik, tünetei sokban hasonlítanak, a GFLV víruséhoz. Igen sok gazdanövénye ismert, szőlőn kívül rengeteg más növényt is fertőz, mint például komlót, kendert, és muskátlit is. A vírust szintén a fonalférgék terjesztik, de akár oltással is terjedhet. Hazánkban jelentős károkat okoz (1. ábra B).

- ***Grapevine chrome mosaic virus, Szőlő króm mozaik vírus (GCMV)***

A vírust először hazánkban a Balaton-felvidék ültetvényeiben találták meg (Lehoczky et al. 1969). A GCMV a *Secoviridae* családba, és a *Nepovirus* törzsbe tartozik. A fertőzött növény levelei krómsárgára színeződnek, esetleg deformálódhatnak, a hajtás ízközei rövidülnek. Vektora nem ismert, de a talajban való terjedése feltételezhető. Oltással, és szaporítóanyaggal terjed.

- ***Tomato black ring virus, Paradicsom fekete gyűrűs vírus (TBRV)***

A vírus a szőlő tőkesatnyulás „T” típusát okozza. A tőkék növekedése lassul, az idősebb leveleken apróbb foltok jelennek meg, a levél széle sárgul. Frissen fertőzött szőlő levelén nekrotikus foltok kialakulását is okozhatja. Fonalférgekkel, oltással is terjedhet.

- ***Grapevine Bulgarian latent virus, Szőlő bolgár látens vírus (BGLV)***

A *Comoviridae* családba és a *Nepovirus* törzsbe tartozik. A vírus a szőlőfajtákat általában látensen fertőzi. Fertőzésre utaló jelek lehetnek a kései rügypattanás, hajtás megnyúlás, valamint az egyenetlen fűrtképzés. Vektora még nem ismert, oltással terjedhet.

A szőlő levélsodródása. A betegséget a *Grapevine leafroll-associated virus* 12 faja okozhatja (GLRaV-1;-2;-3;-4;-5;-6;-7;-8;-9, -Pr, -Car és -De). A GLRaV-1 -3, az egész világon jelentős, míg a többi típus csak Európában lelhető fel (Uyemoto et al. 2009). A

levélsodródás tünetet a vírusok külön-külön, vagy akár együttesen is okozhatják. A kórokozók a *Closteroviridae* családba, *Closterovirus*, valamint az *Ampelovirus* nemzetségbe tartoznak, kivéve a GLRaV-7, mely taxonómiaiilag nincs besorolva (Ferguson 2012). Gazdasági jelentőségük vitathatatlan, hiszen akár 20-70%-os termés kiesést is okozhatnak. Crimson seedless és Pinot noir fajtáknál a bogyók beltartalmi értékét is ronthatja (Uyemoto et al. 2009). Jellemző továbbá, a bogyók alacsony cukortartalmához köthető kései és aszinkron bogyóérés, rendellenesen megvastagodó, lefelé sodródó levelek és a vörösbort adó fajták leveleinek vöröses elszíneződése. A tünetek ősszel, a vegetációs időszak vége felé a legszembetűnőbbek. A vírus terjedése GLRaV-fajonként változó, de mindegyikük terjedhet kertészeti oltással, vegetatív szaporítással. Egyes fajok vektorai lehetnek pajzstetvek (pl. GLRaV-1), míg mások (GLRaV-2) természetes vektorai eddig nem ismertek. (Cseh 2012) (1. ábra A)

Szőlő faszöveti barázdáltság (*Rugose wood complex*). Négy különböző betegségcsoport alkotja: a *Rupestris* faszöveti barázdáltság, amit a *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), a Kober faszöveti barázdáltság, aminek a kórokozója a *Grapevine virus A* (GVA), a *Grapevine virus B* (GVB) által okozott Parakérgűség, és az LN33 faszöveti barázdáltság.

- ***Rupestris stem pitting-associated virus*, *Rupestris* faszöveti barázdáltsága (RSPaV)**

Az RSPaV *Betaflexiviridae* családba, és a *Foveavirus* nemzetségbe tartozik. A vírus mechanikai átvitele nem lehetséges, természetes vektora nem ismert. Tünete az oltás helye alatt, de esetenként a fás részen bárhol megjelenő sávos gödrök, barázdák (1. ábra C).

- ***Grapevine virus A*; *Grapevine virus B*, Szőlő A és B vírusa (GVA; GVB)**

A vírusok a *Betaflexiviridae* család *Vitivirus* nemzetségéhez tartoznak. Tünetük lehet az oltáskor fellépő alany-nemes összeférhetetlenség, kései rügyfakadás, a tőkék korai leromlása, majd pusztulása.

A szőlő látens foltossága. A tünetet több különböző betegség, vagy vírus is okozhatja, de a legelterjedtebb a *Grapevine fleck virus* (GFkV). A vírus a *Tymoviridae* családba, a *Maculavirus* nemzetségbe tartozik. Észlelhető tünetet csupán a *Vitis rupestris* St. George fajtán okoz, a *vinifera* fajtákon látens. Tünetei lehetnek az erek kivilágosodása, a levéllemezen áttetsző foltok megjelenése. Magyarországon 2014-ben jelentős GFkV fertőzöttséget regisztráltak (Cseh 2014).

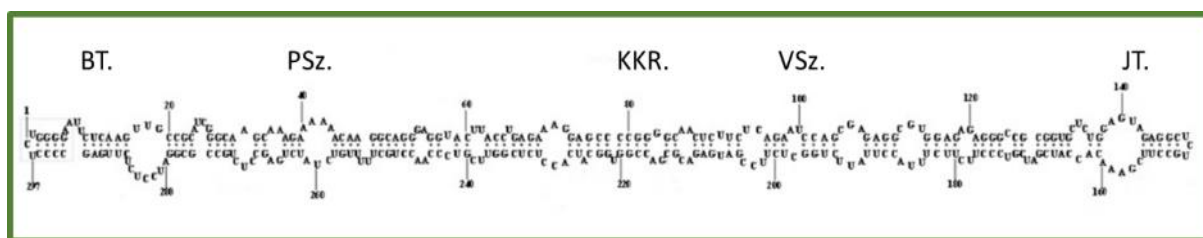
4.2.3. Szőlőviroidok

A viroidok a vírusoknál sokkal kisebb (szubvirális) növényi molekuláris paraziták, melyek nem rendelkeznek köpenyfehérjével, csak egy egyszálú, csupasz cirkuláris RNS szálból állnak, mely mindössze 100-500 bázis hosszúak. A viroidok fehérjét nem kódolnak. Formájukat a genomjuk másodlagos szerkezetének köszönhetik, mely lehet pálcika alakú, vagy ún. kalapácsfej. Tüneteikben hasonlítanak a vírusokhoz, de lehetnek látensek is. Nehezen kimutatható tüneteik miatt a szőlőviroidok sokáig rejtve maradhattak. A HSVd volt az első viroid, amit kimutattak szőlőben 1984-ben (Eiras 2006). Ezután több más viroidot, *Citrus excortis viroidot* (CEVd), *Grapevine yellow speckle viroid* 1. és 2. törzsét (GYSVd-1, GYSVd-2), valamint *Australian grapevine viroidot* (AGVd) is kimutatták (Gambino et al. 2014). Mostanra világossá vált, hogy a viroidok minden jelentős szőlőkultúrában jelen vannak, gazdasági jelentőségük azonban még nem tisztázott (Uyemoto et al. 2009).

A GYSVd-1 és -2 viroidok a vírusok közé, a viroidok osztályába, a *Pospiviroidae* családba, és az *Apscaviroid* nemzetségbe tartoznak. Ezek a viroidok okoznak makroszkopikus tüneteket is, sárga klorotikus foltokat a főbb erek mentén. A tünetek többnyire nyár közepén jelentkeznek fiatal növényeknél. GYSVd-1, GYSVd-2 és HSVd-vel fertőzött növényekben kimutatták, hogy azok szinergisztikusan hatnak a GFLV-vel, azaz felerősítik, súlyosbítják annak tüneteit (Szychowski et al. 1995). Az *Apscaviroid* törzsbe tartozó AGVd és a *Pospiviroidae* családba tartozó CEVd viroidok önmagukban ismert tünetet nem okoznak, de például CEVd, és HSVd közös fertőzése okozhat látható tüneteket is (4. ábra) (Eiras et al. 2006).

4.2.4. Komló törpülés viroid (*Hop stunt viroid*, HSVd)

A HSVd a vírusok közé, a viroidok osztályába, a *Pospiviroidae* családba, és a *Hostuviroid* nemzetségbe tartozik. Az egész világon elterjedt, jelentős kártevőnek számít a komló (*Humulus lupulus*) ültetvényekben (3. ábra), de több más növényfaj fertőzésére is képes. Magyarországon szőlőültetvényekben jelentős (90%) fertőzöttséget regisztráltak (Farkas et al. 1999).



2. ábra *Hop stunt viroid* szerkezete. A viroid 5 részre tagolható: bal terminális (BT), patogén szakasz (PSz), központi konzervált régió (KKR), változó szakasz (VSz), jobb terminális (JT) régió (Eiras et al. 2006).

A HSVd a *Pospiviroidae* családra jellemző genomi szerkezettel rendelkezik, ami öt részre tagolható: bal terminális, patogén szakasz, központi konzervált régió, változó szakasz, jobb terminális (2. ábra). Korábbi kutatások eredménye szerint a más-más gazdanövényből izolált HSVd viroidok szekvenciája különbözik, ami jól tükrözi a vírusok, és viroidok alkalmazkodó képességét (Tabler & Tsagris 2004).

A viroid gazdanövény köre igen tág, a komló növényen kívül uborkát, különböző citrusféléket, *Prunus* fajokat, eperfát, fügét, almát, körtét és szőlőt is fertőz. A legtöbb gazdanövényben azonban nem, vagy csak alig észlelhető tüneteket okoz, melyeknek



3. ábra A Hop stunt viroid tünetei komlóban. A növény növekedése leáll (A) (Pethybridge et al. 2008) levelei besárgulnak (B) (Radisek et al. 2012).

gazdasági jelentősége alacsony. A HSVd szinergisztikus tüneteket azonban okozhat más vírusokkal, vagy viroidokkal (Eiras et al. 2006) (4. ábra), és jelentős károkat okoz az uborka és komlótermesztésben. Komló esetén a fertőzött növények növekedése lelassul, megáll, romlik a növények kondíciója, romlik a virágok minősége, ezzel jelentős termés kiesést okoz a világ szinte minden részén. Az egyetlen védekezési lehetőség a fertőzött növények mihamarabbi eltávolítása az ültetvényből. A viroid terjedése a természetben limitált, nincs ismert vektora. Termesztési körülmények között azonban igen gyorsan terjedhet, mind a vegetatív szaporításkor, mind pedig mechanikai úton különböző agrotechnikai munkák folyamán (például aratás) (Parkinson & Reed 2013).



4. ábra A HSVd és CEVd szinergisztikus fertőzésének tünete szőlőn (Eiras et al. 2006)

4.2.5. Törvényi szabályozás a szőlő szaporítóanyagok előállításáról, minősítéséről és forgalomba hozataláról

Elmondható, hogy a szőlő növényt támadó kórokozók elleni védekezés fontos feladat. A patogénmentes szaporítóanyagok felhasználása új ültetvény telepítésekor meghatározó tényezője a gazdálkodó későbbi sikerének. Egy elhanyagolt, vírusokkal fertőzött ültetvény komoly gazdasági kiesést okoz a tulajdonosnak (Borroto-Fernandez et al. 2009), valamint a vektorként működő rovarok migrálása miatt veszélyt jelent a környezetében lévő egészséges területekre is. Az egész közösség számára fontos, hogy törvényi szinten legyen szabályozva a növényvédelem, és a kórokozók terjedésének megelőzése is. Az Európai Unióban sokaig nem volt egységes szűrési rendszer, a tagországok saját szabályozása volt érvényben. Ez többnyire, csak az adott régióra jellemző kórokozók szűrését tette kötelezővé. Az Európai Unióban jelenleg csupán a következő vírusokra kötelező tesztelni: GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3 és GFkV (ez utóbbit csak alanyokban) (Brüsszel, 2010.7.5. COM(2010)359).

A szőlő szaporítóanyag állami elismeréséről, valamint a szaporítóanyagok előállításáról, és forgalomba hozataláról Magyarországon a 87/2006. (XII. 28.) FVM. rendelet gondoskodik. A rendelet célja, hogy továbbszaporításra és köztermesztésbe a felhasználói igényeknek megfelelő, gazdaságosan termeszthető, a minőségi igényeket kielégítő szőlőfajták és azok klónjainak jó minőségű, egészséges szaporítóanyaga kerüljön. A rendelet fitoplazmák, baktériumok, és vírusok ellen teszi kötelezővé a szűrést. A szaporítóanyag tesztelése az alábbi vírusokra kötelező Magyarországon: GFLV; ArMV; GFkV; GLRaV-1,-3; GVA; GVB; GVD.

4.3. A vírus- és viroidmentesítés módszerei

4.3.1. A vírus- és viroidmentesítés háttere

Gombás fertőzések leküzdésére hatékony vegyszerek állnak a rendelkezésünkre, ezek használata elterjedt a kertészeti és szántóföldi termesztésben. Vírusok ellen azonban semmilyen hatékony vegyszeres védekezés nem áll rendelkezésünkre. Itt meg kell említeni, hogy vírusok ellen nem, de azok vektorai ellen tudunk védekezni (Lukács 2013). Minden növényvírus tovább vihető más gazdanövényre oltással, de természetes terjedésük főképpen vektorokkal, például levéltetvekkel, kabócákkal, fonálférgekkel, talajban élő gombákkal és parazita növényekkel történik. A vektormentes átvitelen kívül a vegetatív szaporítószervekkel (gumó, hagyma, rizóma), a generatív szaporítószervekkel (pollen) és a mechanikai úton történő terjedésnek van jelentősége. Mechanikai terjesztésnek számít többek között az is, hogy az agrotechnikai munkák közben a műveléshez használt eszközeinkkel növényről növényre hordozzuk a vírusokat, ezért fontos a szerszámok rendszeres tisztítása, valamint a növényeken okozott felületi sérülések gyors kezelése. Ha a növényt a vírus megfertőzi, annak eliminálására már nincs lehetőségünk. Fontos azonban megemlíteni, hogy a tünetek megjelenése erősen függ a növény élettani állapotától, egy esetleges vírusfertőzés súlyosabb termésvesztést okozhat egy rossz kondícióban lévő ültetvényben.

A szaporítóanyag kórokozó mentessége kiemelt fontosságú a szántóföldi, és a szőlőhöz hasonlóan vegetatívan szaporított kertészeti növények esetében. A magról szaporított növényeknél ennek jelentősége kevésbé fontos, mivel az eddig ismert vírusok többsége maggal nem terjed. Vegetatív szaporítás esetén viszont, a kórokozók jelen vannak a szaporításra használt szervekben is, tehát feltételezhető, hogy a fertőzött anyanövény klónjai is fertőzöttek lesznek, ezzel jelentős gazdasági károkat okozva. Éppen ezért kiemelt fontosságú a kórokozómentes szaporító anyag előállítása. A probléma leküzdésére több különböző módszert dolgoztak ki (Dudits & Heszky 2000). Az alább felsorolt módszereken kívül más módszerek is léteznek (hidegkezelés, kemoterápia, elektroterápia, krioterápia) (Panattoni et al. 2013, Bayati et al. 2011), de ezek gyakorlati jelentősége szőlő esetében csekély.

4.3.2. Hőkezelés

A hőkezelés a növények, vagy azok valamilyen vegetatív szervének magas, a vírusok számára nem optimális hőmérsékleten való inkubációját jelenti (Panattoni et al. 2013). A

magas hőmérséklet hatására a vírusok részben, vagy teljesen eliminálódhatnak a terápia ideje alatt frissen növekvő hajtásokban. A hőkezelést eredetileg a múlt század első felében más patogének (gombák és baktériumok) eliminálására alkották meg, hiszen a technika kidolgozásakor (Kunkel 1936) a vírusokat még nem tudták kimutatni.

Napjainkra a diagnosztika fejlődésével igazolódott, hogy a hőkezelés alkalmas lehet bizonyos vírusok eliminálására, és így a legelterjedtebb vírusmentesítési módszerré vált. A hőkezelést számtalan növény esetében sikerrel alkalmazták (1. táblázat) (Panattoni et al. 2013). Sok esetben a nagyobb hatékonyság érdekében a hőkezelést a gyorsan fejlődő *in vitro* merisztéma kultúrák létrehozásával (ami önmagában is alkalmas vírusmentesítésre) kombinálják (Skiada et al. 2009).

1.táblázat. A hőkezelés segítségével az alábbi családokba tartozó vírusokat eliminálták sikerrel fontosabb fás szárú gazdanövényekből (Panattoni et al. 2013).

Gazdanövény	Vírus család
Szőlő	<i>Bromoviridae, Comoviridae, Secoviridae, Flexiviridae, Closteroviridae, Tymoviridae</i>
Alma	<i>Betaflexiviridae, Bromoviridae, Flexiviridae, Potyviridae</i>
Barack	<i>Bromoviridae</i>
Körte	<i>Flexiviridae, Tombusviridae</i>
Sárgabarack	<i>Potyviridae</i>
Szilva	<i>Bromoviridae</i>

4.3.3. Merisztématenyésztés, mint vírusmentesítési módszer

A módszer azon az elven alapszik, hogy a vírusok és a viroidok eloszlása a növényen belül egyenlőtlen. Már a múlt század közepén, megfigyelték, hogy a vírussal fertőzött növény gyökér tenyészőkúpja vírusoktól mentes. Később ugyanezt kimutatatták hajtáscsúcsokban is. A vírusmentesítési céllal létesített merisztéma tenyészeteknél az izolált apikális merisztémát *in vitro* tenyésztik, és ebből regenerálnak növényeket. Vírusmentesítésnél a lehető legkisebb méretű merisztémából kell kiindulni, ennek mérete 0,1-0,5 mm. Ennél kisebb merisztéma túlélésének és fejlődésének az esélye azonban nagyon alacsony, valamint nagy a kalluszosodás valószínűsége is. Az optimális méret fajonként eltérő lehet (Panattoni et al. 2013).

Az elimináció sikere azonban növényfaj- és vírusfüggő, a módszer így nem alkalmazható minden növényenél, illetve nem minden vírus, viroid mentesítésére alkalmas. Például burgonya

esetében merisztéma tenyésztéssel sikerült eliminálni a burgonya A- és Y-vírust (*Potato A virus*, *Potato Y virus*), míg az X-és S-vírusokkal (*Potato X virus*, *Potato S virus*) fertőzöttek maradtak (Dudits & Heszky 2000).

4.3.4. Az indirekt szomatikus embriogenezis, mint vírusmentesítési módszer

A merisztématenyésztés mellett elterjedt másik szövettenyésztési eljárás a vírusmentes növények előállítására az indirekt szomatikus embriogenezis. A gyorsan osztódó kallusz kultúrában a vírusok sejtről-sejtre való mozgása nagyon lelassul vagy teljesen megáll, de a vírusvesztés pontos biológiai háttere mindezidáig még nem ismert (Gambino et al. 2006, Panattoni et al. 2013).

A szomatikus embriogenezist, mint vírusmentesítési módszert leggyakrabban a szőlőnél alkalmazzák. Az elmúlt húsz évben publikált sikeres vírusmentesítések több mint egyharmadát szőlőben hajtották végre, de a módszer más növények mentesítésére is alkalmas (2. táblázat) (Panattoni et al. 2013). Sikeresen elimináltak kilenc különböző vírus családba tartozó vírust, köztük sok, a szőlőben gazdaságilag is jelentős vírust, mint például a GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, RSPaV, (Gambino et al. 2006) GFLV (Gambino et al. 2009) ArMV (Borroto-Fernandez et al. 2009) valamint viroidokat is, mint például a GYSVd-1 és HSVd (Gambino et al. 2011).

2. táblázat A szomatikus embriogenezis, mint vírusmentesítési módszer alkalmazása különböző növényeknél. A százalékos eloszlás az adott növényről publikált sikeres vírusmentesítések aránya az összes sikeres vírusmentesítési beszámolóhoz képest (Panattoni et al. 2013).

Növény	Eliminált vírus család	Százalékos eloszlás
Fás szárú		
Szőlő	<i>Closteroviridae</i> , <i>Comoviridae</i> , <i>Flexiviridae</i> , <i>Tymoviridae</i>	34,5%
Egyéb	<i>Bromoviridae</i> , <i>Caulviridae</i> , <i>Potyviridae</i>	13,8%
Lágyszárú		
Cukornád	<i>Luteoviridae</i> , <i>Potyviridae</i>	13,8%
Fokhagyma	<i>Potyviridae</i>	10,3%
Burgonya	<i>Potyviridae</i>	6,9%
Egyéb	<i>Bromoviridae</i> , <i>Caulviridae</i> , <i>Potyviridae</i> , <i>Flexiviridae</i>	20,7%

Több kutatócsoport a kallusz kultúrákból folyamatosan, rendszeres időközönként vett mintákat és tesztelték azokat PCR segítségével. Azt tapasztalták, hogy különböző vírusok eliminálásához a tenyészeteknek eltérő ideig kell kallusz fázisban maradniuk, valamint, hogy

a portokból indukált kallusz gyorsabban veszít a vírusaiból, mint a bibéből származó. Három hónap kallusz fázis után regenerált növényekből jelentettek sikeres ArMV eliminációt (Borroto-Fernandez et al. 2009). Más kutatások GLRaV-1 GLRaV-3, GVA, RSPaV vírusok vizsgálatánál számoltak be négy hónap kallusz állapot után részleges vírus eliminációról, nyolc hónap azonban elégnek bizonyult a kísérleti anyag teljes megtisztításához (3. táblázat) (Gambino et al. 2006; Gambino et al. 2010).

3. táblázat. A vírusfertőzöttség nyomonkövetése szomatikus embriogenezis során Müller-Thurgau, Grignolino és Bosco fajtákon (Gambino et al. 2006)

Minta	Eltelt hónapok száma a kallusz indukciótól mérve	Vírusesztek eredményei (fertőzött minta db/összes minta db)			
		GLRV-1	GLRaV-3	GVA	RSPaV
Embriogén kallusz (portokból)	4	0/5	1/5	1/5	8/15
Embriogén kallusz (bibéből)	4	4/4	3/5	1/4	8/14
Szomatikus embrió	8	0/32	0/10	0/32	0/74
<i>In vitro</i> növény	12	0/45	0/49	0/46	0/95

4.4. Az indirekt szomatikus embriogenezis háttere

Az indirekt szomatikus embriogenezis, melynek során differenciálatlan kallusz sejtekből embriók fejlődnek az élővilágban egyedülálló és csak a növényekre jellemző. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az élet stratégiája a növények és állatok esetén jelentősen eltér. Míg az állatok aktív mozgásuk révén képesek válaszolni a környezeti körülmények megváltozására, addig a növények erre anyagcseréjük módosításával és/vagy merisztéma szöveteiknek köszönhetően folyamatos fejlődésükkel képesek. A növények bizonyos differenciált testi sejtjei képesek szélsőséges körülmények között az egyed igényeinek megfelelően a dedifferenciálódásra és osztódásra, ami az ontogenetikai program nagyfokú rugalmasságát tükrözi. Általánosságban így elmondható, hogy a növényi fejlődési program sokkal nyitottabb a különböző „alternatív” fejlődési utakra, mint az állatoké. Erre az egyik legszélsőségesebb példa, hogy a zigótán kívül például több sejttípus is képes a természetben embrionális fejlődésre (apomixis) (Fehér et al. 2003).

A növények fejlődésének ezen rugalmassága nyújtott lehetőséget arra, hogy az 1900-as évek elején elkezdődhessenek azok a növényi sejt- és szövettenyésztési munkák, melyeket a jelenlegi *in vitro* szövettenyésztés alapjainak tekintünk.

4.4.1. Az indirekt szomatikus embriogenezis kialakulásának története

A növényi biotechnológia alapjának tekinthetjük azt az elméletet, melyet a német Theodor Schwann és Matthias Schleiden alkotott meg 1838-ban. Feltételezték, hogy a soksejtű szervezetek minden egyes differenciálódott sejtje megtartja azt az „információt”, amely a megtermékenyített petesejtben, az egyetlen kiinduló sejtben jelen van (Dudits & Heszky 2000). Egy másik, a növényi biotechnológia szempontjából fontos feltételezés, Gottlieb Johann Friedrich Haberlandt osztrák botanikus nevéhez köthető. A növényi sejtek totipotensek, vagyis, ha tartalmazzák az összes genetikai információt, ami a megtermékenyült petesejtben, zigótában jelen van, akkor a növény vegetatív szöveteiből új növény (szomatikus embrió) állítható elő mesterséges körülmények között.

4.4.2. A növényi szövetek dedifferenciálódása és redifferenciálódása

A magasabb rendű növények sejtjei szövetekbe, szervekbe és szervrendszerekbe organizálódnak. Minden egyes szerv saját feladatokat lát el, az adott feladatra specializálódott szövetei, sejtjei révén. A Schwann- és Schleiden-féle sejtelmélet szerint a differenciálódott sejtek ugyan rendelkeznek az adott növény teljes genetikai készletével, de ennek csak a töredéke van „bekapcsolva”, attól függően, hogy a sejt milyen feladatot lát el. Sejttenyészet indításakor osztódó, még nem differenciálódott merisztéma szöveteket kell izolálnunk. Amennyiben már differenciálódott szövetekből akarunk kiindulni, először a sejtek dedifferenciálódását kell indukálnunk. A felhasznált szövetrészek dedifferenciálódásának indukálásához valamely stressz kezelés alkalmazása szükséges, hogy a sejtek eredeti fejlődési irányát „átprogramozzuk”. Ezek közül legelterjedtebbek a növényi növekedésszabályozók alkalmazása (legtöbbször auxinok esetleg citokininekkal kombinálva), valamint a szövetek hőkezelése (Zavattieri et al. 2010). A kallusz (dedifferenciált osztódósejtek halmaza) fenntartása és szaporítása, valamint a növényregeneráció (redifferenciálódás) eltérő feltételeket igényel (Arnold et al. 2002). Míg a kallusztenyészetek fenntartásához a növényi növekedésszabályozók alkalmazása elengedhetetlen, addig a szomatikus embriogenezis indukcióját gátolják. Ezeken felül a tenyészetek sűrűsége és pH-ja is hatással lehet a szomatikus embriogenezis indukciójára és a növényregenerációra (Arnold et al. 2002).

4.4.3. Szőlő indirekt szomatikus embriogenezis

A szomatikus embriogenezist mint *in vitro* regenerációs rendszert rutinszerűen alkalmazzák különböző szőlővel kapcsolatos nemesítési, és biotechnológiai eljárások során (Panattoni et al. 2013), mint például a genetikai transzformáció (Vidal et al. 2009) vagy akár

in vitro szelekciós és mutációs kísérletek (Kuksova et al. 1997, Jayasankar et al. 2000). Elmondhatjuk, hogy számos növényi rész (levél, pártá, hajtásszegmens, portok, termő) felhasználásával állítottak elő embriogén kalluszt, majd végeztek sikeres növényregenerációt (Vivier & Pretorius 2000). Jelenleg viszont két inokulum használata a legelterjedtebb: a még fel nem nyílt bimbóból preparált portok és a termő (Kikkert et al. 2005; Vidal et al. 2009, Oláh et al. 2009). A kallusz indukció hatékonyságát továbbá a zárt virágzatok hidegkezelése is javíthatja a portokok izolációja előtt (Perl et al. 1995). Az általam tanulmányozott kísérletek során, a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (2,4-D) és benzil-aminopurin (BAP) növekedésszabályozók kombinációja bizonyult a leghatékonyabbnak (Oláh et al. 2009). A Genetika és Növénynemesítés Tanszék korábbi összehasonlító vizsgálata szintén igazolta, hogy ezen növekedésszabályozók alkalmazása Murashige és Skoog (1962) (MS) alaptáptalajban hatékony indirekt szomatikus embriogenezis indukálására (Oláh et al. 2007, Novák et al. 2010).

A kallusztenyészetek létesítéséhez felhasznált portokok mérete és fejlettsége is hatással lehet a kallusz indukcióra. Gribaudo és munkatársai (2004) 6 fejlettségi stádiumot különítettek el. A portokok hossza 0,5-2,5 mm között volt. Úgy tapasztalták, hogy a különböző fajták esetén eltérő fejlettségű portokok az alkalmasak a tenyészetek indításához. Chardonnay és Barbera fajtáknál a fejletlenebb 2-es stádiumú, a *Vitis berlandieri* x *V. rupestris* Richter 110 fajta esetén pedig a fejlettebb 5-ös stádiumú portokok között magasabb volt a kalluszosodó portokok aránya. Vidal és munkatársai (2009) viszont 3 fejlettségi stádiumot különítettek el és szintén úgy tapasztalták, hogy különböző fejlettségű portokok esetén eltérő a kalluszindukció hatékonysága az egyes fajtáknál, valamint a regeneráció genotípus függőségéről számoltak be.

Több szerző is beszámolt a tenyészetekben különböző morfológiájú embriogén és nem embriogén kallusz típusok fejlődéséről. Az embriogén kallusz jellemzően fehér-halványsárga színű, szemcsés illetve morzsalékos szerkezetű, míg a nem embriogén kallusz jellegzetesen vízenyős/lágy vagy kompakt szerkezetű, de számoltak be az embriogén kalluszhoz hasonlóan morzsalékos szerkezetűről is (Kikkert et al. 2005; Vidal et al. 2009). Sok esetben a kallusz csomókat ezek a típusok vegyesen és heterogén módon alkotják (Kikkert et al. 2005).

4.5. Vírusdiagnosztikai módszerek

Bármely vírus-, és viroidmentesítési eljárás értelmetlen lenne, ha nem lennénk képesek a vírusok, és viroidok jelenlétét kimutatni. A legegyszerűbb módszernek a vizuális megfigyelés tekinthető, bár különösen nagy szakértelmet, és tapasztalatot igényel, hiszen gyakran a

tünetek (ha vannak) nehezen észlelhetőek, vagy nehezen elkülöníthetőek más élettani tünetektől. Némely vírusok és viroidok azonban semmilyen ismert tünetet nem okoznak adott gazdanövényen, ilyen például a HSVd is szőlő esetében (Kawaguchi-Ito et al. 2009).

4.5.1. Bioteszt

Klasszikusnak tekinthető, széles körben alkalmazott módszer. Jelentősége nem csak azért fontos, mert ez az egyik legrégebb óta használatos módszer, hanem azért is mert olyan vírusok, és viroidok is kimutathatóak vele, melyekre nem áll rendelkezésre más diagnosztikai módszer (Dudits & Heszky 2000). A használt lágyszárú vagy fásszárú tesztnövényeken egy-egy vírus, vagy viroid jellegzetes, jól definiálható tünetet okoz. Ezeket a tesztnövényeket fertőzzük meg mesterségesen (inokuláljuk) a vizsgálandó növényekkel oltással, vektor segítségével, vagy mechanikai úton (pl. növényi nedvvel való bedörzsöléssel). Ha a fertőzés sikeres volt, a tesztnövényeken megjelennek az ismert tünetek. A lágyszárú teszt (ahol a tesztelendő szőlőről lágyszárú tesztnövényre viszik a vírusokat) gyors, de nem minden vírus szűrhető vele. A fásteszt (ahol egy indikátor szőlőfajtát oltanak a vizsgálandó szőlőfajtára) sok időt vesz igénybe (2-3 év), valamint a vizuális teszthez hasonlóan problémát jelenthet a megjelenő tünetek elkülönítése az élettani tünetektől, ez pedig a kapott eredmények kiértékelését bizonytalanná teheti.

4.5.2. ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Az enzimhez kötött ellenanyag vizsgálat (ELISA) az egész világon elterjedt szerológiai diagnosztikai módszer, melyet növényi vírusok kimutatására is széleskörűen alkalmaznak. A gerincesek adaptív immunválasza során egy idegenként felismert molekula (antigén) antitestek termelődését indukálja a B-sejtekben. Ezeket az antitesteket a kimutatandó vírussal immunizált állatból (általában nyúlból) kitisztíthatjuk, és ezzel kimutathatjuk az antigénként használt vírust. Az antigén-antitest kölcsönhatás nagyon specifikus és erős, az ELISA eljárás pedig ezt használja ki. A módszer lényeges eleme, hogy felszínhez kötötten zajlik, tehát az antigén immobilizációját igényli. Az immobilizált antigénhez kötődő antitesteket egy vagy több lépésben színreakciót adó szubsztráttal mutathatjuk ki, melyet egy, az antitesthez kovalensen kötött enzim állít elő. A színreakció erőssége információt ad az antigén koncentrációjáról is, tehát a módszer kvalitatív bizonyos határokon belül.

Mivel az ELISA módszer igen érzékeny, és nem igényli a vizsgálandó minták hosszas és bonyolult előkészítését, így gazdaságosan lehet tömeges tesztek elvégzésére használni, és hamar a legnépszerűbb eljárás lett növényi vírusok diagnosztizálására (Lukács 2013).

4.5.3. Polimeráz láncreakció, (*Polymerase chain reaction*) PCR

A PCR a nukleinsavak (DNS, RNS) felszaporítására használt eljárás. A módszert Kary Mullis fejlesztette ki 1983-ban, ezzel nagyban hozzájárulva a biotechnológiai kutatások felgyorsulásához. A felfedezés fontosságát jól mutatja, hogy Mullis találmányát 1993-ban Nobel-díjjal jutalmazták.

A PCR-t a DNS rövid (maximum 10000 bázispár) szakaszának megsokszorozására használjuk. A folyamat során kis mennyiségű templátot sokszorozítunk exponenciálisan. A sejtekben lezajló DNS replikációhoz hasonló folyamat zajlik le *in vitro* körülmények között. PCR készítéséhez szükségünk van enzim specifikus pufferre, 5' és 3' primerre (indító szekvencia), dezoxinukleozid-trifoszfátokra (ezekből épülnek fel az új DNS szálak), DNS-polimeráz enzimre, valamint DNS templátra amit felszaporítani szeretnénk. A primer kiválasztása, és a PCR kondíciók megfelelő beállítása miatt pontosan ismernünk kell a sokszorozni kívánt DNS nukleotid sorrendjét. (Lukács 2013)

A PCR igen pontos diagnosztikai eszköz, segítségével, nagy hatékonysággal kereshetünk vírusokat és viroidokat, hiszen a felszaporításhoz elméletileg elég egyetlen vírus DNS molekulát sikerrel izolálnunk. Az általunk vizsgált összes vírus és a HSVd genomja ismert, megfelelő primerek álltak a rendelkezésünkre, így lehetséges volt a PCR használata.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Növényanyag

A vizsgált fajták kiválasztásakor arra törekedtünk, hogy legyen közte olyan világfajta is, mely több munka során is alkalmasnak bizonyult szomatikus embriogenezis indukálására (Chardonnay), valamint tartalmazzon régi magyar fajtákat is (Kövidinka, Ezerjő), melyeket eddig nem vizsgáltak szövettenyésztő munkákban, illetve olyan fajtákat, melyek vírusmentes szaporítóanyagával nem rendelkezünk. A választott fajták a következők voltak: Chardonnay, Csillám, Cserszegi fűszeres, Duna gyöngye, Viktória gyöngye, Ezerjő, Bianca, Kövidinka, Csaba gyöngye és Pegazus. A kísérletben használt Chardonnay mintákat a Károly Róbert Főiskola Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete (3301 Eger, Kőlyuktető, Pf. 83.) bocsátotta rendelkezésünkre, míg a többi minta a Corvinus Egyetem Genetika és Növénytermesztés Tanszék, valamint a Szőlészeti Tanszék fajtagyűjteményéből származott. A begyűjtött érett vesszőket fényszobában hajtattuk és ezekről gyűjtöttük a virágzatokat mind a vírusesztekhez, mind a portokok preparálásához.

5.2. Indirekt szomatikus embriogenezis

5.2.1. Embriogén kallusz fejlődésének indukálása

A munkánkhoz a téli nyugalmi időszakban gyűjtöttünk vesszőket szabadföldről és azokat a hajtás megkezdéséig hűtőszekrényben 4°C fokon tároltuk. Egyrügyes csapokra vágtuk őket, és vízbe helyeztük. A hajtást fényszobában végeztük ahol állandó hőmérsékletet (22°C), és hosszúnappalos megvilágítást (16 óra fény/8 óra sötét) biztosítottunk (5. ábra). A rügyek kihajtása után a lombleveleket folyamatosan eltávolítottuk, így készítetve a növényt a virágrügyek megtartására és virágképzésre.

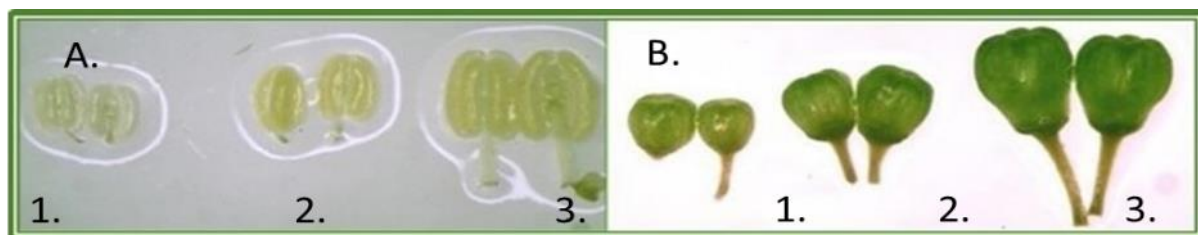


5. ábra Az egyrügyes csapok hajtatása fényszobában

A virágok felszínét 15 másodpercig 70% etanolban, majd 10 percig 15% Clorox és felületnedvesítő (3 csepp Tween-20 (Duchefa)) oldatban sterilizáltuk, ezután pedig háromszor 3 percig steril desztillált vízben mostuk. Lamináris boxban (DEFI Laminar Air Flow BA900) steril körülmények között, sztereomikroszkóp (Leica MZ6) alatt, szike és csipesz segítségével feltártuk a virágokat és a portokokat a porzószállal együtt Petri-csészékbe (csészénként 5 bimbó, kb. 25-30 portok) táptalajra helyeztük.

Cserszegi fűszeres, Bianca, Ezerjő, Csillám és Csaba gyöngye fajták esetén 3 különböző fejlettségi stádiumú portokot helyeztünk táptalajra (6. ábra A) 1-es stádium: a kocsánykorona a bimbó hosszának legalább a felét teszi ki, a portokok áttetszőek és a porzószál nem haladja meg a portok hosszának a felét. 2-es stádium: A pártasapka megnyúlt, a kocsánykorona nem haladja meg a bimbó hosszának a felét, a portokok világossárga színűek. 3-as stádium: A pártasapka erősen megnyúlt, duzzadt, a portokok sárga színűek, a porzószál erősen megnyúlt, duzzadt (6. ábra B).

A Csillám, Cserszegi fűszeres, Ezerjő és Csaba gyöngye fajtáknál 3-3, a Bianca esetén 2 tőkéről tőkeazonosan helyeztük a portokokat a táptalajra. Így lehetőségünk nyílik vizsgálni, hogy az egyes tőkék esetén van-e eltérés a kalluszosodó portokok arányában, illetve hogy a különböző méretű portokok eltérő mértékben kalluszosodnak-e. A vizsgált fajták minden tőkéje esetén méretenként 20-24 petricsészényi portokot preparáltunk ki. A többi fajta esetén (Duna gyöngye, Pegazus, Chardonnay, Kövidinka és Viktória gyöngye) pedig 1-3 tőkéről, tőkeazonosan összesen kb. 1500-1500 portokot helyeztünk táptalajra a portokok méretének feljegyzése nélkül.

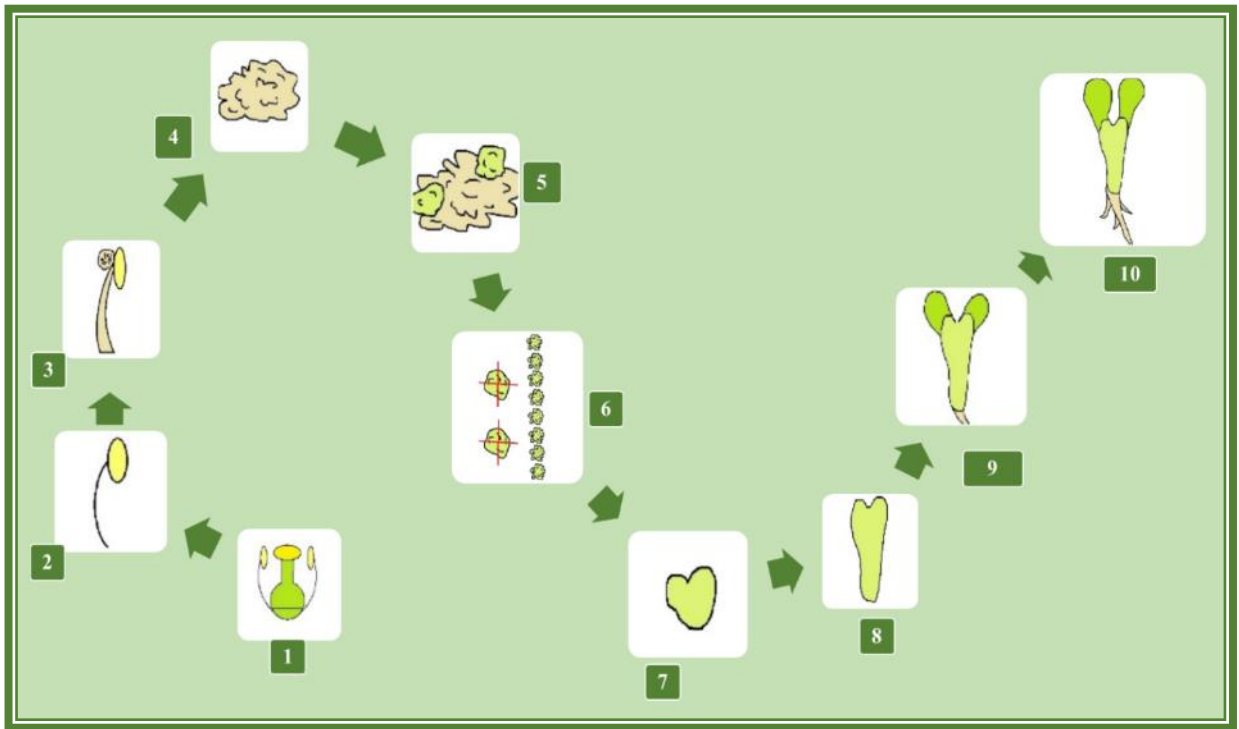


6. ábra A kísérlet során három különböző portok fejlettségi stádiumot különböztettünk meg (A). A különböző portokok különböző fejlettségű bimbókból származnak (B) (Csaba gyöngye)

A kísérlet során Murashige és Skoog (MS) (Duchefa) alaptáptalajt használtuk (Murashige, & Skoog 1962), 2,4-D (2,4-diklórfenoxi-ecetsav) 1mg/l és BAP (6-benzil-aminopurin) 0,2 mg/l (Duchefa) hormonokkal és 20g/l szacharózzal (Reanal) kiegészítve. A pH értéket 5,80-ra állítottuk, majd 6,5 g/l agarral szilárdítottuk meg a táptalajt. A portok tenyészeteket sötétben, inkubációs szekrényben (Labor Műszeripari Művek LP114) 22-25°C-on tenyésztettük a továbbiakban (7. ábra). A tenyészeteket ezután havonta friss táptalajra passzáltuk. Ez azért indokolt, mivel a táptalajban lévő hormonok egy része lebomlik, másik részét maguk a kalluszcsomok veszik fel, valamint a táptalaj víztartalma is folyamatosan csökken. A hormonok biztosítása fontos az embriogén kallusz számára, a megfelelő hormonszabályozás nélkül idő előtt megindul a sejtek differenciálódása, az embriók fejlődése, és a növények regenerálódása. A harmadik passzálás alkalmával szelektáltuk a tenyészeteket és csak a kallusz csomókat passzáltuk friss táptalajra, és használtuk a továbbiakban a szomatikus embriogenezis indukciójához és a növényregenerációhoz (8. ábra)



7. ábra A kallusz tenyészetek tárolására használt inkubációs szekrény

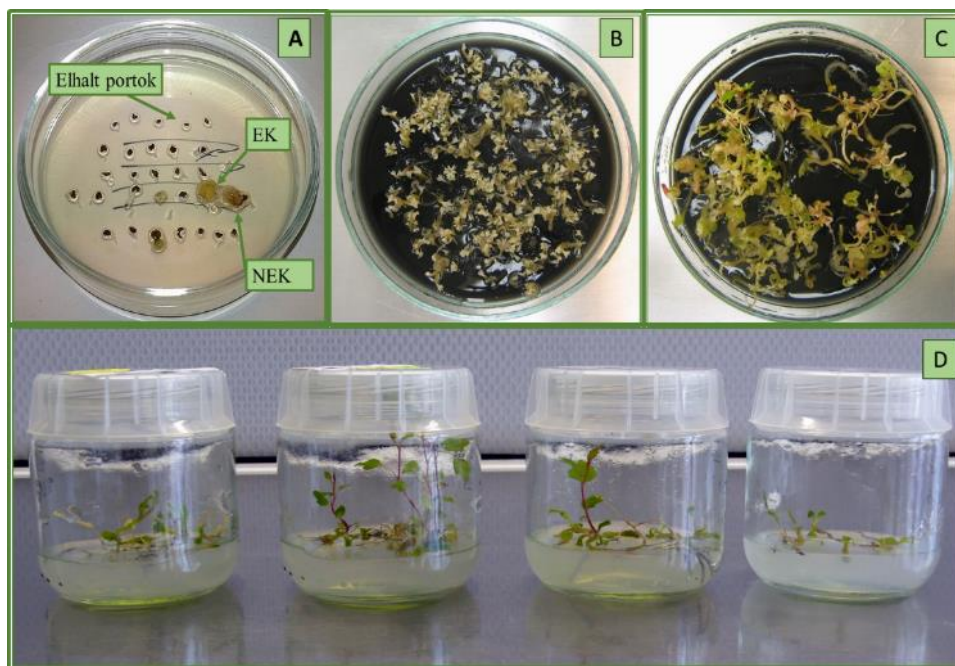


8. ábra A szomatikus embriogenezis folyamatábrája. 1; A bimbókat sterilizáljuk és preparáljuk 2; A portokokat táptalajra helyezzük 3; A portok és a portoknyél megduzzad, felületén megjelennek a kalluszcsonók 4; A kalluszcsonó növekedésnek indul, rendszeres időközönként passzáljuk 5; Az embriogén kallusz megjelenésével, már csak azt passzáljuk tovább 6; Az embriogén kallusz csonókat daraboljuk, és felszaporítjuk 7; A hormonmentes táptalajra helyezés után megindul az embrió regenerálódása. Az embrió szív formájú lesz 8; Az embrió megnyúlik, felveszi az ún. torpedó formát 9; Megjelennek a sziklevelek és a gyökérkezdemény 10; Az embrió csírázása

5.2.2. A növények regenerálása

Chardonnay fajta esetén 1 év elteltével elkezdtuk a növények regenerálását (9. ábra A). Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy nyolc hónap elegendő kallusz állapotban, hogy a regenerált szőlő növényből már ne lehessen vírusokat kimutatni (Gambino et al. 2006). A regeneráláshoz $\frac{1}{2}$ MS hormonmentes táptalajt használtunk 2 g/l aktív szénnel (Reanal) és 10 g/l szacharózzal kiegészítve (MSEMC táptalaj), a pH értéket szintén 5,80-ra állítottuk és 6,5 g agarral (Duchefa) szilárdítottuk meg a táptalajt.

A kalluszcsonókat ezután a fent leírt táptalajra Petri-csészékbe passzáltuk (9. ábra B-D), majd fényszobába helyeztük. A fényszoba állandó hőmérséklete 25°C, a nappalok és a sötét szakaszok aránya pedig 16/8 óra volt (10. ábra).



9. ábra *Portoktenyészet MS táptalajon EK- embriogén kallusz, NEK- nem embriogén kallusz (A), regenerálódó embriók (B), csírázó embriók (C) és regenerált növények (D)*

A hormonmentes táptalajon elkezdődött a kalluszkultúrák differenciálódása, a csomók mérete gyors ütemben növekedett, megjelentek az első differenciálódott embriók (9. ábra B), majd azok csírázását követően az első sziklevelek és hajszálgökök (9. ábra C). Az állományt ezt követően négy héten keresztül kéthetente passzáltuk MSEM táptalajra (MSEMC táptalaj aktív szén kiegészítés nélkül). A negyedik héten a fejlettebb embriókat nagyobb tároló üvegbe ültettük, ahol elegendő hely állt rendelkezésére a növekedéshez (4-5 növény üvegenként) (9. ábra D). A passzálások sűrűségét ez után a növények növekedéséhez egyedileg igazítottuk (4-5 hetente), illetve a Petri-csészékből is folyamatosan kiültettük a fejlettebb embriókat. A növények esetében mindig csak a hajtáscsúcsot csíptuk le a felső két ízközzel együtt, és raktuk át a friss táptalajba.

Az állományból végül huszonnégy függetlenül regenerált embrióból származó vonalat különítettünk el (vonalanként több mikroszaporított növényt fenntartva) a későbbi vizsgálatokhoz.



10. ábra A szőlőnövények regenerálására és mikroszaporítására használt fényszoba

5.3. Diagnosztika

5.3.1. Szőlőnél alkalmazott RNS kivonás

Az extrakciós puffert (2% cetil-trimetil-ammónium-klorid (Molar Chemicals), 2,5% polivinil-pirrolidon (VWR), 100 mM TRIS (pH 8,00) (VWR), 25 mM EDTA (Reanal), 2 M NaCl (Reanal) 65°C-ra melegítettük, majd hozzá mértünk 20 µl/ml β-merkaptó-etanol (Fluka). 100 mg szőlőhajtást folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, dörzsmozsárban még fagyos állapotban homogenizáltunk, és mintánként 650 µl extrakciós puffert adtunk hozzá, tovább homogenizáltuk, majd 1,5 ml térfogatú mikrocsovekbe öntöttük. A kivonás alatt végig jégen tartottuk a mintákat, hogy megakadályozzuk az RNS lebomlását. Ezután erősen vortexeltük a mintákat, majd 10 percig 65°C-on inkubáltuk őket. A mintákra ráértünk 650 µl kloroform/izoamil-alkoholt (Reanal), majd vortexeltük. Ezután 4°C-ra előhűtött, szabályozható hőmérsékletű centrifugában (Hermle Labortechnik GmbH Z216MK) 10 percig centrifugáltuk a mintákat (10000 rpm). Új mikrocsovekbe mértünk 600 µl kloroform/izoamil-alkoholt, majd ráértük a már lecentrifugált minták felülúszóját, vortexelve kevertük. Újra 10 percig centrifugáltuk a mintákat (10000 rpm 4°C), majd új mikrocsovekbe pipettáztuk a felülúszót, majd ráértünk 0,5 térfogatnyi 9M LiCl-et (Molar Chemicals) minden mintára. Óvatosan kevertük, majd 30 percig jégen inkubáltuk. Ezután 20 percig centrifugáltuk a mintákat (13000 rpm), majd óvatosan kiöntöttük a felülúszót. A mikrocsovekbe mértünk 450

μl 65°C-ra előmelegített SSTE puffert (1M NaCl, 0,5% Na-dodecil-szulfát (Reanal), 10mM TRIS-HCl-t (pH 8,00), 1 mM EDTA-t (pH 8,00), vortexeltük, és hozzá adtunk további 450 μl kloroform/izoamil-alkoholt, majd óvatosan kevertük. A mintákat 10 percre (10000 rpm 4°C) centrifugába raktuk. Új mikroszövekbe mértünk mintánként 280 μl izopropanolt (Reanal), és 40 μl 3 M Na-acetátot (Molar Chemicals), valamint 400 μl felülúszót a már lecentrifugált mintákról, és óvatosan forgatva kevertük. A mintákat ismét centrifugáltuk 20 percig (10000 rpm 4°C). Ezután leöntöttük a felülúszót, és a csapadékot átmostuk 1 ml 70%-os 4°C-os etanollal (Reanal). Újra centrifugáltuk a mintákat 5 percig (10000 rpm 4°C), ezután óvatosan pipettával eltávolítottuk az alkoholt a mintákról, majd szobahőmérsékleten szárítottuk őket. Végül 25 μl steril desztillált vízben visszaoldottuk a kicsapott RNS-t.

Összemértünk 3 μl steril desztillált vizet, 2 μl RNS-t, és 5 μl FDE festéket (100 % deionizált formamid (VWR), 0,25 % brómfenolkék (VWR), 0,25 % xilencianol (VWR), 1 mM EDTA), termoblokkban (Bio TDB 105) 65°C-on 5 percig inkubáltuk, majd ezután vittük fel a gélre a mintákat.

A kivonás után agaróz gélelektroforézissel (Cleaver Scientific MultiSUB) ellenőriztük a minták mennyiségét és minőségét 1,2%-os agaróz (SeaKem) 1xTBE pufferben (89mM TRIS, 89 mM bórsav (Reanal), 2 mM EDTA), 0,8 V/cm-el (tápegység: Major Science MP-250V).

5.3.2. cDNS írás

Az RNS mintákról DNS-t kell készíteni reverz transzkriptázzal ahhoz, hogy azokról majd PCR-t lehessen készíteni. A cDNS-ek elkészítéséhez az Applied Biosystems (Life Technologies) High Capacity cDNA Reverse transcription Kit-jét használtuk, a gyártó utasításait követve.

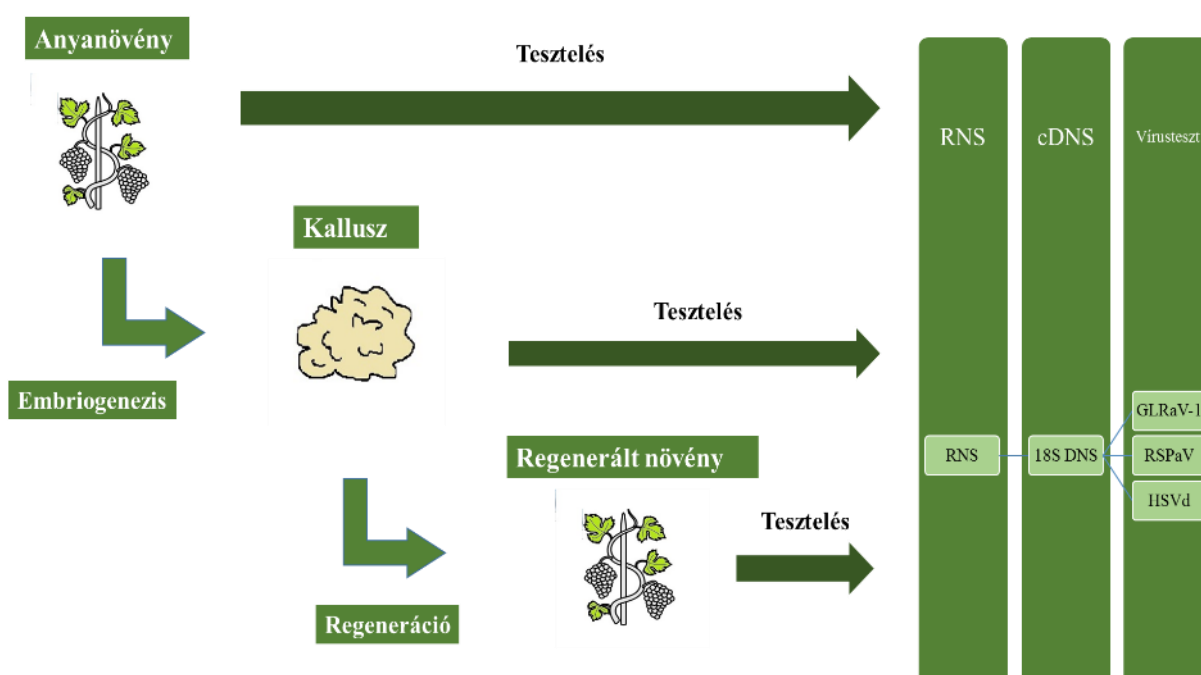
5.3.3. PCR vizsgálatok

A cDNS elkészítése után ellenőriztük azok minőségét 18S riboszomális RNS-re (rRNS) készített PCR segítségével (GeneAmp PCR System 9200) (18S-F: CGCATCATTCAAATTTCTGC, 18S-R: TTCAGCCTTGCGACCATACT). Két vírusra szűrtünk, a GLRaV-1-re (GLRaV-1-F: TCTTTACCAACCCCGAGATGAA, GLRaV-1-R: GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG) és az RSPaV-ra (RSPaV-F: GGGTGGGATGTAGTAACTTTTGA, RSPaV-R: GCAAGTGAAATGAAAGCATCACT) (Gambino et al. 2006), valamint a HSVd-re (HSVd-F: ACTCTTCTCAGAATCCAGCGAG, HSVd-R: TGCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGT (Eiras et al. 2006)), majd megkezdjük a

vírus- és viroid-teszteléseket az anyanövényekre, a kalluszkra és a regenerált növényekre is, melynek átfogó folyamatát a 10. ábra mutatja be.

A PCR reakcióban a Taq-polimeráz enzimet használtuk, az alábbi beállításokkal: 18S: 94°C 5 perc, (94°C 30 s. 55°C 30 s. 72°C 60 s.) 35 ciklus 72°C 7 perc; GLRaV-1, RSPaV: 94°C 5 perc (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s) 35 ciklus 72°C 7 perc; HSVd: 95°C 5perc (95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 60 s) 35 ciklus 72°C 5 perc.

A kivonás után agaróz gélelektroforézissel (Cleaver Scientific MultiSUB) ellenőriztük a PCR termékeket 1,2 %-os agaróz 1xTBE-ben (89 mM TRIS, 89 mM bórsav, 2 mM EDTA), 0,8 V/cm-el.



10. ábra A dolgozatban bemutatott viroidmentesítés sémája

6. EREDMÉNYEK

6.1. Az anyanövények tesztelése

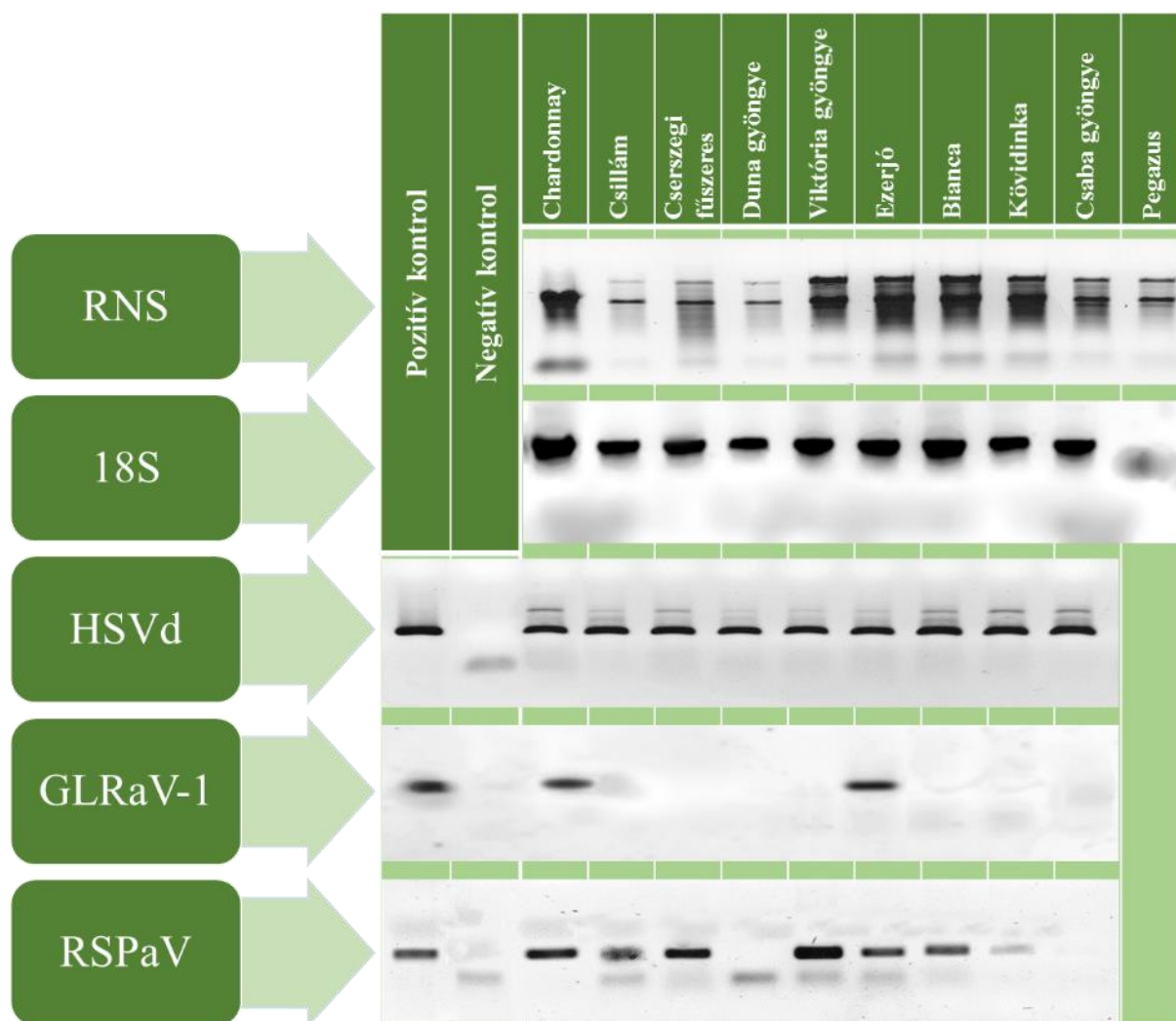
A munkánkhoz kiválasztott 10 fajtából (Chardonnay, Csillám, Cserszegi fűszeres, Duna gyöngye, Viktória gyöngye, Ezerjő, Bianca, Kövidinka, Csaba gyöngye és Pegazus) először RNS-t vontam ki minden anyanövényből, majd gélelektroforézis segítségével ellenőriztem azok mennyiségét és minőségét (11. ábra RNS panel). Minden mintából sikeres volt a kivonás, a minták között csak mennyiségi (koncentrációs) különbségek voltak. Ezután az anyanövényekből kivont RNS cDNS-re írását végeztem el, a cDNS minőségét pedig az endogén 18S rRNS-re specifikus PCR-el ellenőriztem (11. ábra 18S panel). A Chardonnay, Csillám, Cserszegi fűszeres, Duna gyöngye, Viktória gyöngye, Ezerjő, Bianca, Kövidinka, Csaba gyöngye mintáknál sikeres volt a cDNS készítés, mivel ezekben az esetekben kaptunk megfelelő méretű PCR terméket. Ezzel szemben többszöri próbálkozás után sem sikerült megfelelő cDNS-t írni a Pegazus fajtánál kiválasztott anyanövényből izolált RNS-ről, így azt a további tesztekben nem szerepeltettem (11. ábra 18S panel).

4. táblázat A NAIK MBK –ban megrendelt vírustesztek eredményének összefoglalása.

	Chardonnay	Csillám	Cserszegi fűszeres	Dunagyöngye	Viktória gyöngye	Ezerjő	Bianca	Kövidinka	Csabayöngye	Pegazus
GLRaV-1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GLRaV-2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
GLRaV-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RSPaV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GVA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GVB	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
GFLV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ArMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GFKV	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-

Ez után felkértük a gödöllői Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ (NAIK) Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet (MBK) Diagnosztikai Csoportját, hogy a következő vírusokra végezzenek nekünk PCR-el szűrést: GLRaV-1 -2 -3, RSPaV, GVA, GVB, GFLV, ArMV és GFKV. GLRaV-1 tesztre pozitívak lettek az Ezerjő és a Chardonnay anyanövények, GLRaV-2 pozitívak lettek a Cserszegi fűszeres és a Pegazus minták. Az RSPaV pozitív lett az összes anyanövény, GVA pozitív lett az Ezerjő minta, GVB pozitívak lettek a Csillám és a Pegazus fajták, valamint GFKV pozitívak lettek a Duna gyöngye, a

Viktória gyöngye és az Ezerjő tőkék. ArMV, GFLV, és GLRaV-3 vírusoktól mentes volt az összes kiindulási anyag (4. táblázat).



11. ábra Az általam elvégzett anyanövény vírusesztek eredménye (agaróz gélelektroforézis kép). RNS (az össz RNS kivonatok mennyiségi és minőségi ellenőrzése), 18S riboszomális RNS-re készített PCR (~900 bázispár), HSVd kimutatására készített PCR (~330 bázispár), GLRaV-1 vírus kimutatására készített PCR (~230 bázispár), RSPaV kimutatására készített PCR (~155 bázispár). pozitív kontrol: minden esetben az adott vírusra/viroidra pozitív mintából készült cDNS-t használtam, negatív kontrol: vizes kontrol

A gödöllői eredmények alapján kiválasztottuk az RSPaV és GLRaV-1 vírusokat, és ezekre újra elvégeztem a teszteket. GLRaV-1 vírusra pozitív lett a Chardonnay, Ezerjő (11. ábra GLRaV-1 panel, 5. táblázat), mely megerősítette az előzetes eredményeket. Az RSPaV teszt pozitív lett a Chardonnay, Cserszegi fűszeres, Csillám, Viktória gyöngye, Ezerjő, Bianca, és Kövidinka minták esetében, negatív eredményt kaptunk azonban a Csaba gyöngye és a Duna gyöngye minta tesztelésénél (11. ábra RSPaV panel, 5. táblázat). Itt tehát a Csaba gyöngye és a Duna gyöngye esetén nem sikerült alátámasztanunk a Gödöllőn kapott eredményt.

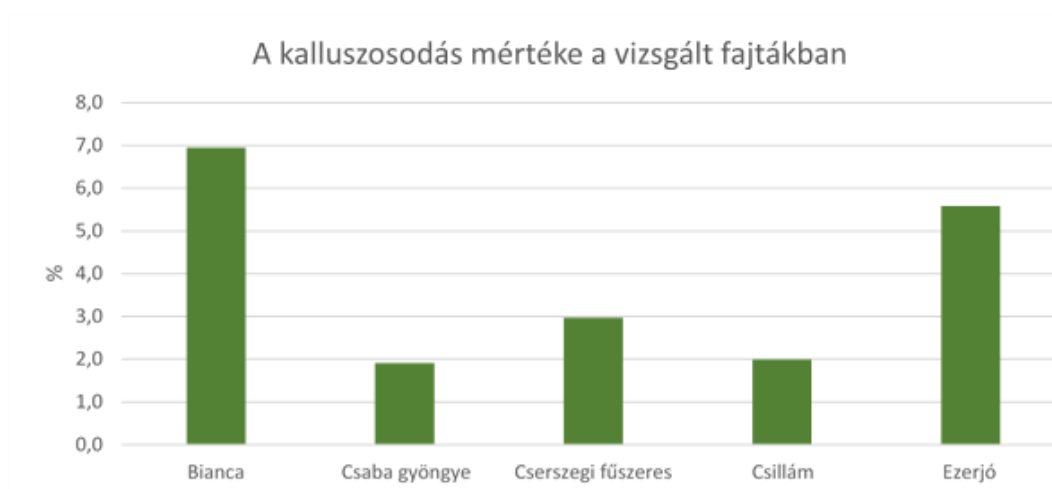
5. táblázat Az anyanövényeken általam végzett PCR alapú vírus tesztek eredményének összefoglalása. +: az adott tesztre pozitív eredmény, -: az adott tesztre negatív eredmény, n.t.: nem tesztelt

	Chardonnay	Csillám	Cserszegi fűszeres	Dunagyöngye	Viktória gyöngye	Ezerjő	Bianca	Kövidinka	Csabagyöngye	Pegazus
HSVd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt.
GLRaV1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	nt.
RSPaV	+	+	+	-	+	+	+	+	-	nt.

6.2. Szomatikus embriogenezis indukálása

Munkánk során összesen mintegy 29000 portokot preparáltunk ki és helyeztünk kallusz-indukciós táptalajra. Az eltérő méretű portokok kalluszosodásának vizsgálatához 21000 portokot izoláltunk a Bianca, Csaba gyöngye, Cserszegi fűszeres, Csillám és Ezerjő fajtákból, és további 8000 portokot vírusmentesítési munkához a Chardonnay, Duna gyöngye, Viktória gyöngye, Kövidinka és Pegazus fajtákból. A tenyészetek fenntartása/passzálása során a befertőződött tenyészeteket (kb. 5800 portok) nem vontuk be a kiértékelésben. Három hónap után megszámoltuk a kalluszosodó portokokat. A portokok jelentős része elbarnult és elpusztult, míg néhány portok esetében a portokok megduzzadtak, felrepedtek és jól láthatóan kallusz fejlődött rajtuk (9. ábra A).

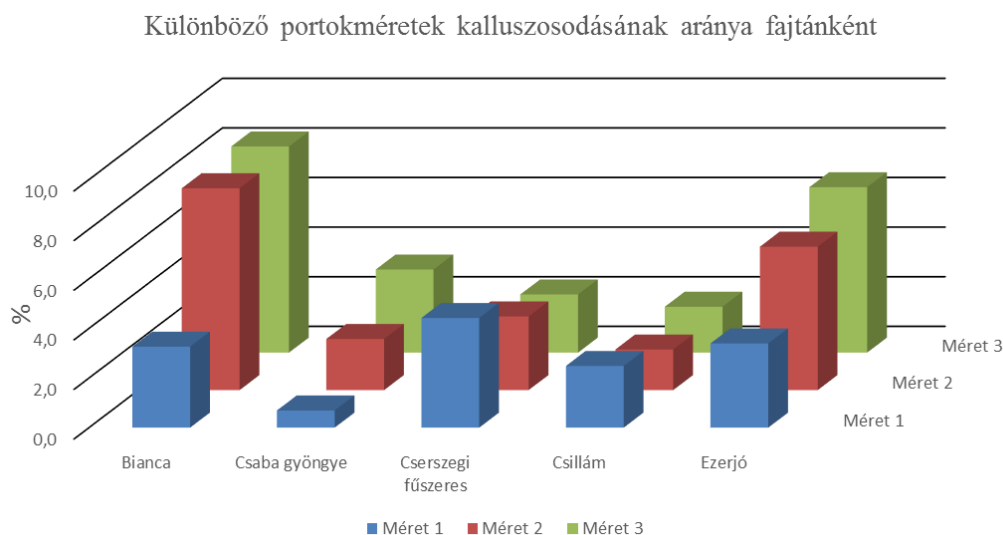
A különböző fajták esetében eltérő mértékű volt a kalluszosodás. Legnagyobb arányban a Bianca fajta portokjain fejlődött kallusz (6,9 %), Ezerjő esetében 5,6 %, míg a többi fajta esetében ez az érték 1,9-3,0 % volt (Cserszegi fűszeres, Csillám és Csaba gyöngye) (12. ábra, 1. és 2. mellékletek).



12. ábra A kalluszosodó portokok mértéke százalékban

Szerettük volna azonban azt is vizsgálni, a megfigyelt fajtáknál, melyik fejlettségi stádiumú portok kalluszosodik el a legnagyobb mértékben. Az adatok alapján Bianca és Ezerjő fajták esetén úgy tapasztaltuk, hogy a fejlettebb (2-es és 3-as méret) portokok esetén nagyobb volt a kalluszosodó portokok aránya (5,8-8,3 %), míg az 1-es stádiumú portokoknál ez 0,7 % és 3,4 % között volt. Fontos megemlíteni azonban, hogy a Csaba gyöngye fajtára is jellemző volt a fenti tendencia, de ennél a fajtánál minden mérettartományban az előző két fajtától eltérően alacsonyabb értékeket kaptunk (13. ábra, 1. melléklet).

Cserszegi fűszeres és Csillám fajtáknál azonban azt tapasztaltuk, hogy az 1-es stádiumú portokból fejlődött nagyobb arányban kallusz (2,5-4,4 %), míg a nagyobb portokokból kisebb arányban alakult ki (1,6-3,0 %) (2. melléklet).



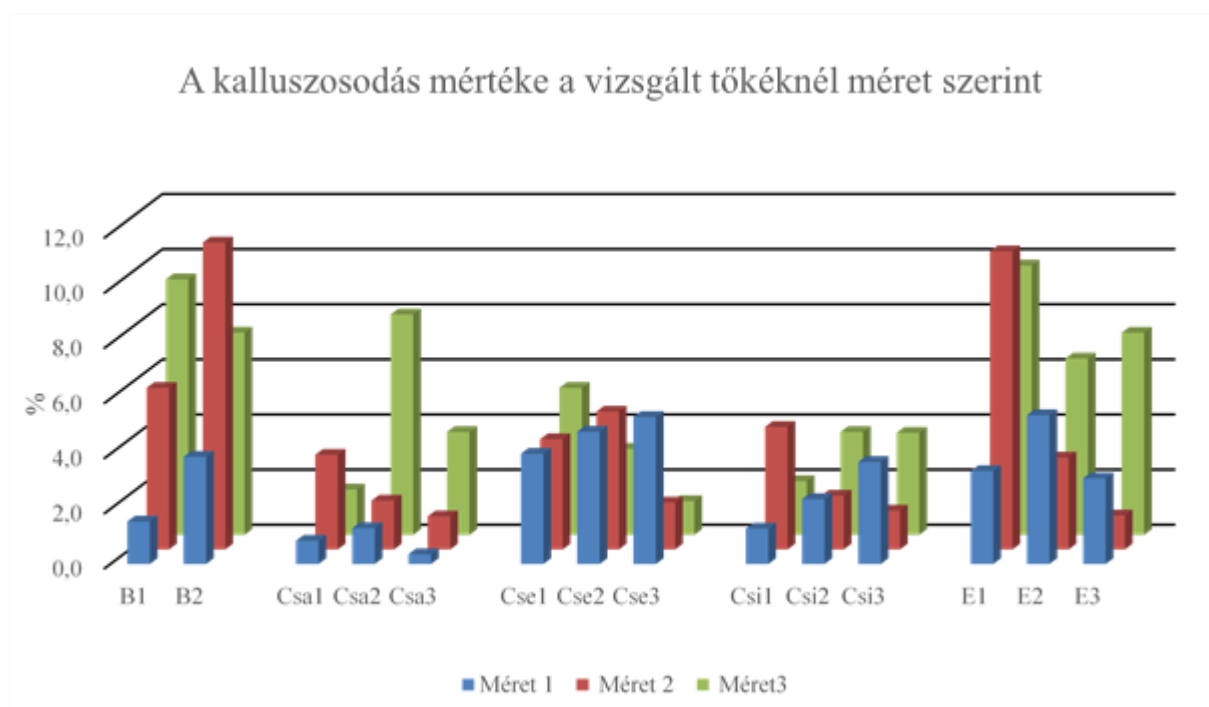
13. ábra A kalluszosodás mértéke a vizsgált fajtáknál fejlettsége szerint a vizsgált fajtáknál százalékban kifejezve

A kísérlet folyamán vizsgálni kívántuk a fajtákon belül a tőkék közötti variabilitást, ezért vizsgálatunk során a fajtákon belül több különböző tőkét hasonlítottunk össze. Azt tapasztaltuk, hogy a kalluszosodás mértéke nagyban eltér a fajtákon belül az egyedek között. Bianca, Csaba gyöngye és Ezerjő fajtáknál minden tőke esetén a 2-es vagy 3-as méretű portokok bizonyultak a legjobbnak. A fajtákon belül az 1-es méretű portokok a Cserszegi fűszeres és Csillám fajtáknál kalluszosodtak el a legnagyobb mértékben (13. ábra).

Azonban, ha a fajták után az egyedek szintjén vizsgáljuk a kalluszosodó portokok százalékát azok fejlettségének függvényében, láthatjuk, hogy igen nagy a variabilitás. Nem minden tőke esetén az a portokméret bizonyult a legjobbnak, amely a fajta esetében. 14 tőkéből 7 esetben (Bianca 2. tőke, Csaba gyöngye 1. tőke, Cserszegi 1. és 2. tőke, Csillám 1. és 2. tőke és Ezerjő 1. tőke) azt tapasztaltuk, hogy nem az a portokméret kalluszosodott el

legnagyobb százalékban, ami az adott fajtáknál. Egy esetben (Csillám 3. tőke) az 1. és a 3. portokméretek mind százalékba, mind lerakott és elkalluszosodott portokszámban tökéletesen egyeztek (1. melléklet).

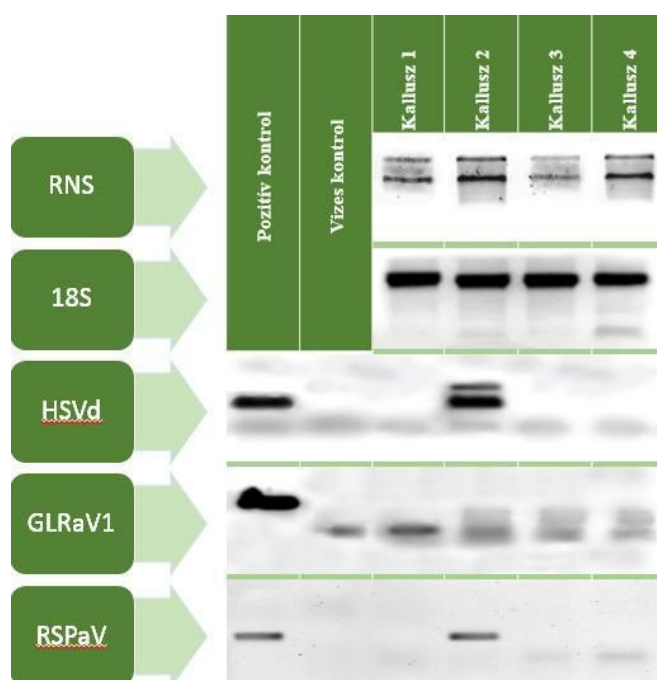
Ha a portokméretek sorrendbe tesszük a kalluszosodás mértékében, akkor kevés olyan tőkét találunk, ahol a fajtáknál felállított sorrend megegyezik a tőkénél megfigyelt sorrenddel. A vizsgált 14 tőke közül ez csupán három – a Bianca 1. tőke, a Csaba gyöngye 2. tőke, és a Czerszegi fűszeres 3. tőkére volt igaz (13. ábra v.ö. 14. ábra).



14. ábra Kalluszosodás mértéke a vizsgált tőkénél B- Bianca, Csa- Csaba gyöngye, Cse- Czerszegi fűszeres, Csi- Csillám, E- Ezerjő.

6.3. Kalluszminták tesztelése

Bár összesen tíz fajta vírusmentesítését indítottuk el, jelenleg még csak a Chardonnay esetében állnak rendelkezésünkre megfelelő méretű kalluszcsoomók és regenerált növények. Ezért a további víruseszteket ezen a fajtán végeztük el. Tíz hónapos Chardonnay kalluszcsoomók makroszkópos vizsgálatát követően a kalluszcsoomók feltételezhetően embriogén részéből kiválasztottunk négy véletlenszerű mintát, és teszteltük HSVd viroidra, GLRaV-1 és RSPaV vírusokra. Egyedül a 2. számú minta mutatott pozitív eredményt HSVd, és RSPaV vírusokra, GLRaV-1 vírusra mind a négy minta negatív lett (15. ábra és 6. táblázat)



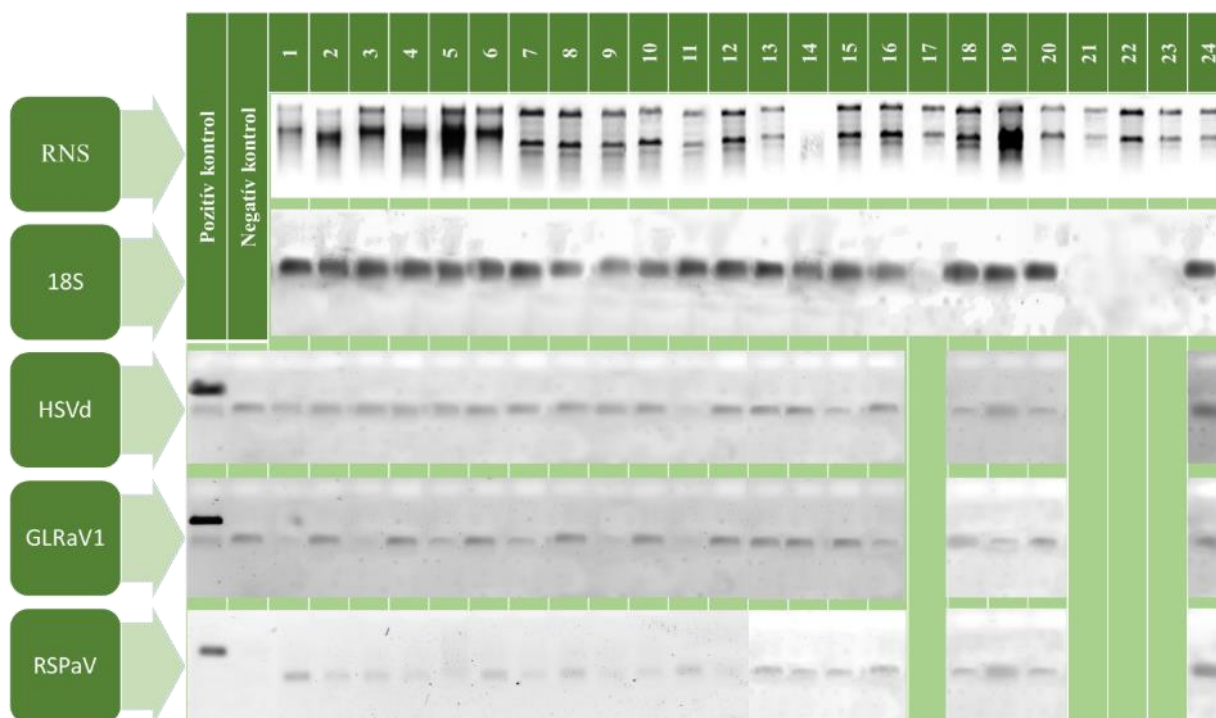
6. táblázat A kallusz mintákon végzett vírusesztek eredményének összefoglalása +: az adott tesztre pozitív eredmény, -: az adott tesztre negatív eredmény, n.t.: nem tesztelt

	1	2	3	4
HSVd	-	+	-	-
GLRaV1	-	+	-	-
RSPaV	-	+	-	-

15. ábra Az általam elvégzett kallusz vírusesztek eredménye (agaróz gélelektroforézis kép). RNS (az össz RNS kivonatok mennyiségi és minőségi ellenőrzése), 18S riboszomális RNS-re készített PCR (~900 bázispár), HSVd kimutatására készített PCR (~330 bázispár), GLRaV-1 vírus kimutatására készített PCR (~230 bázispár), RSPaV kimutatására készített PCR (~155 bázispár). pozitív kontrol: minden esetben az adott vírusra/viroidra pozitív mintából készült cDNS-t használtam, negatív kontrol: vizes kontrol

6.4. Regenerált növények tesztelése

Végül elvégeztem a 24 regenerált Chardonnay vonal tesztelését is. Először az RNS kivonás sikerességét ellenőriztem (16. ábra RNS panel). Ezután cDNS-t készítettem, majd ennek sikerességét is ellenőriztem a 18S rRNS belső kontrollra készített PCR-el (16. ábra 18S panel). Húsz minta esetén sikeres volt a cDNS tesztelése, azonban többszöri próbálkozás után sem sikerült megfelelő minőségű cDNS előállítás a 17; 21; 22 és 23 vonalak mintáiból, ezért ezeket a vonalakat a kísérlet további részében nem vizsgáltam (16. ábra 18S panel). Ezután



16. ábra Az általam elvégzett anyanövény-vírus tesztek eredménye (agaróz gélelektroforézis kép(agaróz gélelektroforézis kép). RNS (az össz RNS kivonatok mennyiségi és minőségi ellenőrzése), 18S riboszomális RNS-re készített PCR(~900 bázispár), HSVd kimutatására készített PCR (~330 bázispár), GLRaV-1 vírus kimutatására készített PCR(~230 bázispár), RSPaV kimutatására készített PCR (~155 bázispár). pozitív kontrol: minden esetben az adott vírusra/viroidra pozitív mintából készült cDNS-t használtam, negatív kontrol: vizes kontrol

végeztem el a vírus és viroid tesztek. Az összes regenerált vonal negatívnak bizonyult HSVd viroidra, és szintén negatív eredményt kaptunk GLRaV-1 és RSPaV vírusokra (16. ábra).

A Chardonnay fajtán elvégzett összes vírusteszt eredményét az alábbi táblázatban foglalom össze (10. táblázat). A vizsgált anyanövény az általam végzett tesztekben pozitívnak bizonyult GLRaV-1 és RSPaV vírusokra, valamint HSVd viroidokra. Ezzel szemben a Chardonnay kalluszban, az indukciótól számított tizedik hónapban csupán egyetlen mintánál sikerült kimutatni a GLRaV-1 vírus és HSVd viroid jelenlétét. A növényregeneráció után egyetlen vonalban sem tudtunk vírust, vagy viroidot kimutatni a növényekben (7. táblázat).

7. táblázat A Chardonnay fajta vírus mentesítése közben végzett vírus tesztek összefoglalása

Tesztelt minta	Kallusz indukciótól eltelt hónapok száma	Vírus tesztek eredményei (fertőzött minta db/összes minta db)		
		HSVd	GLRaV-1	RSPaV
Anyanövény	0	1/1	1/1	1/1
Kallusz minták	10	1/4	0/4	1/4
Regenerált növények	12	0/20	0/20	0/20

7. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

7.1. Szomatikus embriogenezis indukálása

Az embriogén kallusz indukcióját és fejlődését, illetve annak mértékét rengeteg tényező befolyásolja. A tenyészetek indításához használt genotípus, az alkalmazott táptalaj, a felhasznált növényi rész, a növényi inokulum fejlettsége, a különböző növényi növekedésszabályozók (azok mennyisége és egymáshoz viszonyított aránya) illetve az évjáráthatás is mind befolyással lehet a tenyészetek indításának sikerére. Öt különböző fajtán (Bianca, Csaba gyöngye, Cserszegi fűszeres, Csillám, Ezerjő) vizsgáltuk a kallusz fejlődés mértékét. Tudomásunk szerint ezen fajtákon embriogén kallusz indukálására irányuló kísérleteket még nem végeztek. Vizsgáltuk a portokok fejlettségének hatását a kallusz indukcióra, illetve a tenyészeteket tökeazonosan indítottuk, így lehetőségünk volt vizsgálni, hogy az egyes egyedek esetén mennyire tér el a kallusz indukció mértéke a fajta átlagához képest. Az eltérő fejlettségű portokok kalluszosodásának vizsgálatához 21000 portokot izoláltunk összesen 3 fejlettségi stádiumban. A tenyészetek felvételezésére az indítás utáni 3. passzálást követően került sor. A tenyésztés ezen szakaszában még sok esetben nehéz a kallusz embriogén jellegének megítélése, így erre nem is törekedtünk, hanem felvételeztük az összes portokok kalluszosodásának arányát a tenyészetekben. A továbbiakban még tervezzük a kultúrák újbóli felvételezését is az adatok pontosítása érdekében.

A vizsgált fajták közül legnagyobb arányban a Bianca fajta portokjain fejlődött kallusz (6,9 %), Ezerjő esetében 5,6 %, míg a többi fajta esetében ez az érték 1,9-3,0 % volt (Cserszegi fűszeres, Csillám és Csaba gyöngye). Több szerző is ehhez hasonlóan a kalluszindukció gyakoriságának erős genotípus függőségéről számolt be (Perrin et al. 2004, Kikkert et al. 2005, Oláh et al. 2009, Vidal et al. 2009). Bianca és Ezerjő fajták esetén úgy tapasztaltuk, hogy a nagyobb méretű (2-3-as méret) portokok nagyobb százalékban a kalluszosodtak (5,8-8,3 %), míg az 1-es stádiumú portokoknál ez 0,7-3,4 % volt. Fontos megemlíteni azonban, hogy a Csaba gyöngye fajtára is jellemző volt a fenti tendencia, de ennél a fajtánál minden mérettartományban az előző két fajtától eltérően alacsonyabb volt a kallusz indukció hatékonysága. Cserszegi fűszeres és Csillám fajtáknál azonban az 1-es stádiumú portokból fejlődött nagyobb arányban kallusz (2,5-4,4 %), szemben a nagyobb portokokkal (1,6-3,0 %).

A fajtákon belül az egyes tőkék vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a kalluszosodás mértéke jelentősen eltér a portokok méretének függvényében. Míg a Bianca és a Csaba gyöngye fajtáknál minden tőkénél a fejlettebb (2-3-as méret) portokok bizonyultak a legjobbnak, addig Cserszegi fűszeres, Csillám és Ezerjő esetében az egyedek közötti

variabilitás miatt nem választható ki egyértelműen a legnagyobb arányban kalluszosodó portok méret. Szőlőben Gribaudo és munkatársai (2004) közölték először a portokok fejlettségének hatását a kallusz indukcióra. 6 méretcsoportot különítettek el. Chardonnay és Barbera esetén a fejletlenebb (1-3) *Vitis berlandieri* x *V. rupestris* Richter110 fajta esetén pedig fejlettebb (4-5.) méret esetén magasabb volt a kallusz indukció mértéke. Vidal és munkatársai (2009) 3 méretcsoportot különítettek el. Sultanina fajta esetén a fejlettebb, a többi fajta (Albarino, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Garnacha, Muscat Hamburg, Tempranillo) esetén viszont a fejletlenebb portokoknál volt nagyobb a kalluszosodás mértéke. Vidal és munkatársai 2 egymást követő év adatai alapján jelentős eltérést tapasztaltak az egyes években több fajta esetén is a fajták válaszadó képességében, amit az évjáráthatással magyaráztak. Az évjáratok vizsgálata mellett viszont nincs tudomásunk arról, hogy az egyedek közötti variabilitást vizsgálták volna portokkultúrákban. Eredményeink alapján (ami 1 évjárat eredményeit tükrözi) a tenyészetek indításához - a felsorolt fajták esetén - alkalmasabb a nagyobb, fejlettebb portokok izolálása.

Meg kell azonban jegyeznünk, hogy az eddigi eredményeink nem tesznek különbséget embriogén és nem-embriogén kallusz indukálásának hatékonysága között, mert jelenleg a tenyészetek fejlettsége nem alkalmas ennek pontos meghatározására. Ez is lehet az egyik magyarázata annak, hogy jelenlegi adataink nincsenek összhangban az irodalomban közöltekkel, mely szerint a fajták többségénél a fejletlenebb portokok esetén magasabb a kalluszindukció mértéke. A különbség abból is adódhat még, hogy a fejletlenebb portokok az izoláció során könnyebben megsérülhetnek, ami azok pusztulásához illetve sebkallusz képződéséhez vezethet. Ugyanakkor, mivel más fajtákkal dolgoztunk, az eredményeink nem feltétlenül összehasonlíthatóak az irodalmi adatokkal. A jövőben tehát lényeges eleme lesz munkánknak az embriogén/nem-embriogén kallusz arányának meghatározása. Ehhez tervezzük még a tenyészetek további kiértékelését, valamint a kísérletek megismétlését.

7.2. Vírusdiagnosztika

Irodalomban eddig számos olyan munka készült, melyben *in vitro* szomatikus embriogenezis alkalmazásával végeztek vírusmentesítést (pl. Gambino et al. 2006, Borroto-Fernandez et al. 2009, Gambino et al. 2010), de eddig csupán egy publikáció született a szomatikus embriogenezis viroidmentesítésre való alkalmazásáról (Gambino et al. 2011). Egyetlen közlemény sem született azonban, ahol a vírusok és viroidok eliminációját egymással párhuzamosan követték volna nyomon. Így jelenleg nincs információnk arról, hogy

a vírus- és viroidvesztés milyen relációban áll egymással, és nem tudjuk azt sem, hogy milyen mechanizmus által történik.

Munkám kezdetén 10 szőlőfajta *in vitro* indirekt szomatikus embriogenezisen keresztüli vírusmentesítését kezdtem el. Arra a kérdésre szerettem volna választ kapni, hogy vajon a szomatikus embriogenezis során a viroidok elvesztése jelzi-e a vírusok eliminálódását is. A választott szőlőfajták között egy világfajta (Chardonnay), magyar fajták (Ezerjó, Kövidinka, Csaba gyöngye, Cserszegi fűszeres), valamint interspecifikus fajták (Csillám, Bianca, Pegazus, Duna gyöngye, Viktória gyöngye) is képviselve voltak. Első lépésként felmértük a választott fajták vírusfertőzöttségét, és vizsgáltuk a HSVd viroid jelenlétét is. A Pegazus csemegeszőlő fajta kivételével mindegyik mintából sikerült kimutatnunk a HSVd-t. A Pegazus esetében valószínűleg az RNS kivonat minősége nem volt megfelelő ahhoz, hogy PCR-re alkalmas cDNS-t írjunk róla. A továbbiakban tervezem a Pegazus fajtából az újabb RNS kivonást és a tesztek ismétlését.

A vizsgálandó fajtákból mintát küldtünk a gödöllői NAIK MBK Diagnosztika Csoportjának is, hogy teszteljék azokat kilenc szőlővírusra (4. táblázat). Eredményeik alapján két vírust választottunk ki nyomon követésre: az RSPaV-t, melyre minden minta pozitív lett, illetve az GLRaV-1-et, mivel ez egy Magyarországon igen jelentős és gyakran előforduló vírus (Cseh 2012, Apró et al. 2014). Erre a két vírusra mi is elvégeztük a teszteket, melyek nagyrészt megerősítették az MBK-ból kapott eredményeket. Két minta esetében kaptunk eltérést, a Duna gyöngyénél és a Csaba gyöngyénél nem sikerült kimutatnunk RSPaV-t, ellentétben a gödöllői eredményekkel. Ez az eltérés jól példázza, hogy rendkívül fontos a diagnosztikai vizsgálatokat többször, egymástól függetlenül elvégezni, és hogy a negatív eredmény nem jelent feltétlenül vírusmentességet.

A további vírus- és viroid teszteket csak a Chardonnay fajtán végeztem, mivel ezzel a fajtával kezdtem el legelőször a portokizolálást és kalluszindukciót, ezért ebből a fajtából regenerálhattam először növényeket.

Négy embriogén kallusz csomót teszteltem HSVd-re, RSPaV-ra és GLRaV-1-re. Míg GLRaV-1-et egyik kalluszban sem sikerült detektálnom, addig RSPaV-t kimutattam egy kalluszból. Ugyanebben a kalluszban a HSVd is kimutatható volt. Ezek az eredmények megerősítik elképzelésünket, miszerint a viroidmentesség utalhat a vírusmentességre, illetve a viroid jelenléte indikálhatja a vírusok esetleges jelenlétét. Ugyanakkor itt is meg kell jegyeznünk a diagnosztika egyik fő nehézségét, miszerint a negatív eredmény nem elégséges ahhoz, hogy kijelenthessük, vírusmentes a mintánk. Tovább bonyolítja a képet, hogy a

kalluszban a vírusok, viroidok mozaikos eloszlásúak (Gambino et al. 2010 és 2011). Elképzelhető tehát, hogy egy adott kallusz kiemelt és tesztelt része vírusmentes, más része azonban nem. A hipotézisünk megerősítéséhez további, nagyszámú tesztre van szükség.

A regenerált növények közül 24-et választottunk ki, melyek közül 20-at tudtunk sikerrel tesztelni. Ezek mind teljesen vírus- és viroidmentesnek bizonyultak mindhárom nyomon követett patogénre nézve. Ez megerősíti, hogy az szomatikus embriogenezisen keresztüli növényregeneráció hatékony módszer a vírusok és viroidok eliminálására is.

A vírusesztek tehát biztatóak, hiszen egyetlen regenerált növényben sem detektáltunk sem vírust sem viroidot. Mindazonáltal, a negatív teszt háttérében állhat alacsony vírustiter, mintavételi és feldolgozási hiba is, tehát a tesztek meg kell ismételni majd az akklimatizált növényállományon is.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A viroidok szubvirális molekuláris paraziták, melyek között számos gazdaságilag jelentős kórokozót találunk. A szőlőkultúrákban játszott gazdasági szerepük valószínűleg nem releváns, de a szőlő számottevő termőterülete és világszerte kiterjedt viroidfertőzöttsége miatt rezervoárnövényként jelentős szerepe lehet. A viroidok többsége mechanikai úton terjed, ezért ellenük a legfontosabb védekezési módszer a viroidmentes szaporítóanyag használata. A viroidokat nehéz eliminálni a vírusmentesítésre használt egyszerűbb technikákkal (hőkezelés, csúcsmerisztéma-kultúra), de az *in vitro* szomatikus embriogenezis ígéretes technikának tűnik csakúgy, mint a vírusmentesítés terén. A szőlőviroidok mind a *Pospiviroidae* családba tartoznak, így sejtmagi lokalizációjuk, ami felveti annak lehetőségét, hogy nehezebb eliminálni azokat az *in vitro* tenyésztés során, mint a vírusokat. Ilyen módon elképzelhető lenne az is, hogy a viroidmentesség indikálhatná a vírusok elvesztését, ezáltal egyszerűsítene és költséghatékonyabbá tenné a vírusmentesítés folyamatát.

Munkámban célul tűztem ki, hogy Magyarországon elterjedt, vírus- és viroid-fertőzött szőlőfajtákat viroidmentesítsek *in vitro* szomatikus embriogenezis alkalmazásával. Olyan szőlőfajtákat választottam, melyeket eddig nem vontak *in vitro* tenyésztésbe, ezért vizsgálni kívántam ezen fajták kalluszosodási képességét is. Céлом volt ezen kívül, hogy kövessem a HSVd viroid és néhány vírus szomatikus embriogenezis során való eliminációját.

Összesen 10 fajta viroidmentesítését kezdtük meg, ezek mindegyike fertőzött volt HSVd-vel, és RSPaV-vel, illetve két fajta GLRaV-1-el is. A 10 fajtából összesen 29000 portokot preparáltunk, ebből pedig öt fajta 15200 portokjának kalluszosodását értékeltem ki a portok fejlettségi állapotának, és az egyedek közti variációknak a függvényében. Megállapítottam, hogy a fajták között eltérő a kalluszosodási képesség, és hogy a fajták között más-más fejlettségi állapotú portokokból képződik nagyobb arányban kallusz. A fajtákon belül az egyedek között is eltérőnek bizonyult a kalluszosodási képesség. Ez utóbbi eredmény különösen érdekes, mivel jelenlegi tudásunk szerint az egyedek közti különbségekről eddig nem rendelkezőnk semmilyen irodalmi információval.

Növényregenerálást eddig csak egy fajta, a Chardonnay esetén végeztük el. Ennél a fajtánál a *Hop stunt viroid* (HSVd) viroid mellett két vírust (*Grapevine leafroll associated virus 1* (GLRaV-1) és *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV)) választottuk ki nyomunkövetésre az *in vitro* szomatikus embriogenezis során. A 10 hónapos kalluszosokban a HSVd-t vírussal együtt sikerült kimutatnunk, a viroidra negatív minták viszont vírust sem tartalmaztak. Eddig 20 regenerált növényt sikerült előállítanom, melyek közül egyikben sem

detektáltunk sem vírus-, sem viroidfertőzést. Ez az eredmény megerősíti, hogy a szomatikus embriogenezis hatékony eszköz a viroidok eliminálására, de a regenerált növények újbóli tesztelése elengedhetetlen a vírusmentesség alátámasztásához.

A továbbiakban tervezem a növényregenerálást a maradék 9 fajtánál, és a viroidfertőzés nyomonkövetését nagyszámú kalluszmintában és regenerált növényben, hogy vizsgálhassam, vajon a viroidmentesség indikátora lehet-e a vírusmentességnek a szomatikus embriogenezis során.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A Genetika és Növénynemesítés Tanszéken és a Szőlészeti Tanszéken végzett munkám során rengeteg segítséget kaptam a tanszéken dolgozó tanároktól, PhD hallgatóktól és laboránsoktól, amit ezúton szeretnék megköszönni.

Köszönöm Prof. Dr. Pedryc Andrzej és Prof. Dr. Bisztray György Dénes tanszékvezető uraknak, hogy biztosították számomra kísérleti munkám hátterét.

Köszönöm konzulenseimnek Dr. Lózsa Ritának és Forgács Istvánnak témavezetésüket és iránymutatásukat.

Köszönöm Dr. Oláh Róbertnek szakmai segítségét.

Köszönöm Dr. Bodor Péternek az adatfeldolgozás során nyújtott segítségét.

Köszönöm a NAIK MBK Diagnosztika Csoportjának, valamint Varga Tündének a vírustesztek elvégzését.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Apró M, Cseh E, Gáborjányi R, Takács AP (2014) Leggyakoribb vírusbetegségek a hazai szőlőültetvényekben. *Kertészet és Szőlészet* 29. pp. 22-26.
- Arnold S Von, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, pp. 233–249.
- Bayati, Shams-Bakhsh, Moieni A (2011) Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 443–450.
- Borroto-Fernandez EG, Sommerbauer T, Popowich E, Scharl A, Laimer M (2009) Somatic embryogenesis from anthers of the autochthonous *Vitis vinifera* cv. Domina leads to *Arabis mosaic virus*-free plants. *European Journal of Plant Pathology*, 124(1), pp.171–174.
- Cseh E (2012) Szőlővírusok előfordulása Magyarországon, valamint a hazai *Grapevine leafroll associated virus* 1 és 3 izolátumok molekuláris vizsgálata. Doktori értekezés. Pannon Egyetem.
- Cseh E (2014) Zárójelentés OTKA K 67658 Hazai szőlőültetvények virológiai vizsgálata
- Dudits D. & Heszky L (2000) Növényi biotechnológia és géntechnológia, Budapest, Agroiinform Kiadóház Rt.
- Eiras M, Targon MLPN; Fajardo TVM; Flores R; Kitajima EW (2006) *Citrus exocortis viroid* and *Hop Stunt viroid* Doubly Infecting Grapevines in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 31(5), pp. 440–446.
- Farkas E, Palkovics L; Mikulás J; Balázs E (1999) High incidence of hop stunt viroid in Hungarian grapevines. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 34(1/2), pp. 7-11.
- Fehér A, Pasternak, T, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3), pp. 201–228.
- Ferguson, B., (2012) Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Davis, California
- Food and Agriculture Organization (FAO) www.fao.org/docrep/012/al176e/al176e.pdf.
letöltés dátuma: 2014.10.22.

- Gambino G, Bondaz J, Gribaudo I (2006) Detection and Elimination of Viruses in Callus, Somatic Embryos and Regenerated Plantlets of Grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), pp. 397–404.
- Gambino G, Di Matteo D, Gribaudo I (2009) Elimination of Grapevine fanleaf virus from three *Vitis vinifera* cultivars by somatic embryogenesis. *European Journal of Plant Pathology*, 123(1), pp. 57–60.
- Gambino G, Navarro B, Torchetti EM, Notte P La, Schneider A, Mannini F, Serio F Di (2014) Survey on viroids infecting grapevine in Italy: identification and characterization of *Australian grapevine viroid* and *Grapevine yellow speckle viroid 2*. *European Journal of Plant Pathology*, 140(2), pp. 199–205.
- Gambino G, Navarro B, Vallania R, Gribaudo I, Serio F Di (2011) Somatic embryogenesis efficiently eliminates viroid infections from grapevines. *European Journal of Plant Pathology*, 130(4), pp. 511–519.
- Gambino G, Vallania R, Gribaudo I (2010) *In situ* localization of *Grapevine fanleaf virus* and phloem-restricted viruses in embryogenic callus of *Vitis vinifera*. *European Journal of Plant Pathology*, 127(4), pp. 557–570.
- Gribaudo I, Gambino G, Vallania R (2004) Somatic Embryogenesis from Grapevine Anthers : The Optimal Developmental Stage for Collecting Explants. 55(4), pp. 427–430.
- Jayasankar S, Li Z, Gray DJ (2000) *In-vitro* selection of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. *Planta*, 211(2), pp. 200–208.
- Kawaguchi-Ito Y, Li SF, Tagawa M, Araki H, Goshono M, Yamamoto S, Tanaka M, Narita M, Tanaka K, Liu SX, Shikata E, Sano T (2009) Cultivated Grapevines Represent a Symptomless Reservoir for the Transmission of Hop Stunt Viroid to Hop Crops: 15 Years of Evolutionary Analysis. *PLoS ONE* 4(12), pp. 1-13.
- Kikkert JR, Striem MJ, Vidal JR, Wallace PG, Barnard J, Reisch BI (2005) Long-term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of 12 grapevine (*Vitis* sp.) genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 41(3), pp. 232–239.
- Központi Statisztikai Hivatal www.ksh.hu *letöltés dátuma: 2014.10.22*.
- Kuksova VB, Piven NM, Gleba YY (1997) Somaclonal variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49(1), pp.17–27.
- Kunkel LO (1936) Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of peach. *Phytopathology*, 26(9), pp. 809–830.

- Lehoczky, J., Martelli, G. P. and Sárospataki, Gy. (1969): Leafroll of grapevine in Hungary. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 4: 117-124.
- Lukács N (2013) *Növényi biotechnológia*, Budapest, Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kara.
- Murashige T, Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, pp. 473–497.
- Novák E, Oláh R, Pedryc A, Howard SF, Kovács GL (2010) Embriogén kultúrák indítása szőlő portokon. *Kertgazdaság*, 42(2), pp. 77-80.
- Oláh R, Zok A, Pedryc A (2007) A szőlőregeneráció és transzformáció módszertani lehetőségei. *Kertgazdaság*, 39(2), pp. 63-68.
- Oláh R, Zok A, Pedryc A, Howard SF, Kovács GL (2009) Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Scientia Horticulturae*, 120(1), pp. 134–137.
- Panattoni A, Luvisi A, Triolo E (2013) Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(1), pp. 173–188.
- Parkinson N, Reed P (2013) Rapid Pest Risk Analysis for *Hop stunt viroid* <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/hopStuntViroid.pdf> *letöltés dátuma: 2014.10.01.*
- Perl, A. Saad S, Sahar N, Holland D (1995) Establishment of long-term embryogenic cultures of seedless *Vitis vinifera* cultivars — a synergistic effect of auxins and the role of abscisic acid. *Plant Science*, 104(2), pp. 193–200.
- Perrin M, Gertz C, Masson JE (2004) High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Science*, 167(6), pp. 1343–1349.
- Pethybridge SJ, Hay FS, Barbara DJ, Eastwell KC, Wilson CR (2008) Viruses and Viroids Infecting Hop: Significance, Epidemiology, and Management. *Plant Disease*, 92(3), pp. 324-338.
- Radisek S, Majer A, Jakse J, Javornik B, Matoušekase J (2012) First Report of Hop stunt viroid Infecting Hop in Slovenia. *Plant Disease*, 96(4), pp. 592
- Skiada FG, Grigoriadou K, Maliogka VI, Katis NI, Eleftheriou EP (2009) Elimination of *Grapevine leafroll-associated virus 1* and *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* from grapevine cv. Agiorgitiko, and a micropropagation protocol for mass production of virus-free plantlets. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), pp. 177–184.

- Szychowski JA, McKenry M V, Walker MA, Wolpert JA, Credi R, Semancik JS (1995) The vein-banding disease syndrome: a synergistic reaction between grapevine viroids and fanleaf virus. *Vitis*, 34(4), pp. 229–232.
- Tabler M, Tsagris M (2004) Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends in plant science*, 9(7), pp. 339–48.
- Uyemoto JK, Martelli GP, Rowhani A (2009) Grapevine Viruses, Viruslike Diseases , and Other Disorders. In *Virus Diseases of Plants: Grape, Potato and Wheat Image Collection and Teaching Resource CD-Rom*. APS Press, St. Paul, MN 55121
- Vidal JR, Rama J, Taboada L, Martin C, Ibanez M, Segura A, González-Benito ME (2009) Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(1), pp. 85–94.
- Vivier MA, Pretorius IS (2000) Genetic improvement of grapevine: Tailoring grape varieties for the third millennium - a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(Special issue), pp. 5–26.
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), pp. 1–9.

11. MELLÉKLETEK

1. melléklet A vizsgálatba bevont fajták lerakott portokjainak száma, és az kalluszosodás aránya tőkékre lebontva

Fajta	Tőke szám	Méret	Lerakott portok (db)	Kapott kallusz (db)	Kalluszosodás aránya (%)
Bianca	1	1	195	3	1,5
		2	580	34	5,9
		3	550	51	9,3
	2	1	540	21	3,9
		2	440	49	11,1
		3	545	40	7,3
Csaba gyöngye	1	1	355	3	0,8
		2	495	17	3,4
		3	425	7	1,6
	2	1	385	5	1,3
		2	565	10	1,8
		3	425	34	8,0
	3	1	850	3	0,4
		2	250	3	1,2
		3	375	14	3,7
Cserszegi fűszeres	1	1	275	11	4,0
		2	125	5	4,0
		3	300	16	5,3
	2	1	125	6	4,8
		2	280	14	5,0
		3	320	10	3,1
	3	1	75	4	5,3
		2	235	4	1,7
		3	490	6	1,2
Csillám	1	1	390	5	1,3
		2	225	10	4,4
		3	410	8	2,0
	2	1	170	4	2,4
		2	205	4	2,0
		3	375	14	3,7
	3	1	405	15	3,7
		2	425	6	1,4
		3	405	15	3,7
Ezerjő	1	1	445	15	3,4
		2	490	53	10,8
		3	665	65	9,8
	2	1	37	2	5,4
		2	240	8	3,3
		3	250	16	6,4
	3	1	225	7	3,1
		2	325	4	1,2
		3	300	22	7,3
Összes			15187	643	4,2

2. melléklet A vizsgálatba bevont fajtáknál lerakott és elkalluszosodott portokok száma

Méret	Lerakott portok (db)	Kapott kallusz (db)	Kalluszosodás aránya (%)
Bianca			
Méret 1	735	24	3,27
Méret 2	1020	83	8,14
Méret 3	1095	91	8,31
Összes	2850	198	6,95
Csaba gyöngye			
Méret 1	1590	11	0,69
Méret 2	1310	27	2,06
Méret 3	1225	41	3,35
Összes	4125	79	1,92
Cserszegi fűszeres			
Méret 1	475	21	4,42
Méret 2	640	19	2,97
Méret 3	1110	26	2,34
Összes	2225	66	2,97
Csillám			
Méret 1	965	24	2,49
Méret 2	855	14	1,64
Méret 3	1190	22	1,85
Összes	3010	60	1,99
Ezerjő			
Méret 1	707	24	3,39
Méret 2	1055	61	5,78
Méret 3	1215	81	6,67
Összes	2977	166	5,58