

Csonthéjasok vírusmentesítése *in vitro* technikákkal (irodalmi áttekintés)

SZABÓ LUCA KRISZTINA, KIRILLA ZOLTÁN, PREININGER ÉVA

Nemzeti és Agrárkutatói Innovációs Központ,
Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet, Érdi Kutató Állomás

E-mail: szabo.luca.krisztina@fruitresearch.naik.hu

Összefoglalás

A csonthéjas gyümölcsfáknak számos vírusos betegsége ismert, melyek komoly problémát jelentenek a termesztésben és kihívások elé állítják a szakembereket. A kórokozómentes növények előállítása és az egészséges szaporítóanyag használata rendkívül fontos. A vírusmentesítés legismertebb és legrégebben használt módszere a hőkezelés. Csonthéjasok esetében a hagyományos hőkezelést ma már *in vitro* technikák váltják fel, melyeknek továbbra is fontos eleme a hőkezelés, de emellett gyakran kombinálják hajtáscsúcs izolálással, antivirális szerek táptalajhoz adásával, vagy a krioterápiát alkalmazzák a mentesítés hatékonyságának növelésére.

Kulcsszavak: *Prunus* sp., *in vitro*, hőkezelés, merisztéma, kemoterápia, krioterápia

Bevezetés

A csonthéjasokat fertőző vírusok komoly problémákat okoznak a termesztésben és a gyümölcsök értékesítésében. A kórokozók jelenléte legyengítheti a fákat, termésmennyiség csökkenést eredményezhet, végső esetben a fa pusztulásához is vezethet. A vírustünetek gyakran nem csak a levélen, hanem a gyümölcsön is megjelennek, amely jelentősen csökkenti a gyümölcsök piacképességét. A vírusok és fitoplazmák ellen nem áll rendelkezésre hagyományos növényvédelmi eszköz, ezért elengedhetetlen az egészséges szaporítóanyag használata és a vektorok elleni növényvédelem.

Magyarországon a 14/2017. (III. 23.) FM rendelet határozza meg azon károsítókat, amelyek esetében a kiindulási anyagokon, a prebázis, bázis, certifikált anyanövényeken és szaporítóanyagokon, C.A.C. ültetési anyagokon vizuális ellenőrzést és adott esetben mintavételt és laboratóriumi vizsgálatot kell végezni. *Prunus* fajok esetében általánosan jellemző kórokozók a Szilvahimlő vírus

(PPV), a Szilva törpülés vírus (PDV), a *Prunus* nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (PNRSV), az alma vírusok közül az Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV) és az Alma mozaik vírus (ApMV), valamint a Csonthéjasok európai sárgaság fitoplazmája (*Candidatus Phytoplasma prunorum*). Az egészséges gyümölcs szaporítóanyagok fenntartása állami feladat. Hazánkban a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézete (NAIK, GYDKI) végzi a kórokozómentes csonthéjas gyümölcs szaporítóanyagok előállítását és ezek fenntartását izolált központi törzsültetvényekben. Az intézetben osztrák-magyar együttműködés keretében 2002-ben indult el vírusmentesítési program *in vitro* technikák alkalmazásával (Mendonça et al. 2004).

Vírusmentes növények előállítására számos technikát alkalmaznak szerte a világon. Jelen tanulmány célja, hogy a csonthéjasok vírusmentesítésére irányuló kutatásokról adjon átfogó képet, különös tekintettel az *in vitro* technika jelentőségére.

Hagyományos hőkezelés

A legrégebben alkalmazott vírusmentesítési módszer a hőkezelés vagy hőterápia. A terápia lényege, hogy a növényeket hőkamrába helyezve tartósan 30 °C fölötti hőmérsékleten tartják, amely hőmérsékleten a vírusok inaktiválódnak, míg a hőkezelés ideje alatt növekvő növényi hajtáscsúcs kórokozómentessé válik.

Szabadföldi növényeken régi megfigyelés a hőmérséklet és a vírus tünetek erőssége közötti összefüggés. A vírus-tünetek alacsonyabb hőmérsékleten, jellemzően kora tavasszal a legszembetűnőbbek. Meleg nyarakon egészen el is tűnhetnek a tünetek, ekkorra a vírus mennyisége lecsökken a növényekben. Ma már bizonyított, hogy a növényekben is jelen van az eukarióta sejtekben konzerváltan működő védekező rendszer, az RNS csendesítés (silencing), mely alacsony hőmérsékleten gátolt, ez magyarázza a tünetek időszakos megjelenését vagy eltűnését (Szittyta et al. 2003). A hőkezelés során a növénynek ezt a saját védekező rendszerét indukálják magas hőmérsékleten a vírusmentesség elérése érdekében.

Kunkel már 1936-ban írt az őszibarack hőkezeléséről (Kunkel 1936). A hőkezelést követően a kezelt növények hajtáscsúcsait vírusmentes alanyra szemzik, de olyan kísérletet is végeztek, ahol a vírusos növény hőkezelése után a teljes növény mentesnek bizonyult (Polak és Hauptmanová 2009). A módszer hátránya, hogy egyes fajok és általában a csonthéjasok különösen érzékenyek a magas hőmérsékletre, kevés növény marad életben a kezelés végére és a vírusmentesség sem biztosított, mivel sok esetben a hajtáscsúcsban is jelen van a vírus.

***In vitro* technikák**

A szövettenyésztés a növényi kórokozó-mentesítésben széleskörűen alkalmazott technika. A szomatikus embriogenezis szőlő esetében nagy hatékonysággal és biztonsággal alkalmazható a különböző vírusok és viroidok eliminálására (Goussard et al. 1991; Gambino et al. 2006), azonban csonthéjasoknál egyéb vírusmentesítési módszerek terjedtek el, melyeket vegetatív hajtástenyészeteken kiviteleznek.

Merisztéma kultúra

Az 1980-as években elkezdődött az *in vitro* technikák használata a csonthéjas vírusmentesítés hatékonyabbá tételének érdekében (Deogratias et al. 1989). A merisztéma kultúra alkalmazása

azon alapszik, hogy a hajtáscsúcsi régióban a vírusok száma nagyon alacsony, illetve az apikális merisztéma sejtjeibe nem is jutnak be vírusok, ezért a merisztéma steril izolálásával vírusmentes növény regenerálható. A merisztéma izolálás és abból történő növényregeneráció *in vitro* körülmények között más növényfajoknál eredményezhet vírusmentes növényt (Kartha és Gamborg 1975), de csonthéjasok esetében a merisztémából történő csekély regenerációs képesség miatt önmagában ezt a technikát nem alkalmazzák.

A merisztéma izolálás utáni mikrooltás (mikrografting), vagyis *in vitro* körülmények közt vírusmentes alanyra oltás esetében is találhatunk példát vírusmentes őszibarack fajták előállítására (Shu és Timon 1996).

Hőkezelés

Csonthéjasok esetében a legelterjedtebb *in vitro* vírusmentesítési módszerré a hőkezelés utáni hajtáscsúcs izolálás vált. Hőkezelés hatására a vírusok inaktiválódnak és nagyobb méretű hajtáscsúcs szakasz maradhat vírusmentes. Az *in vitro* hőkezelés utáni hajtáscsúcs tenyésztés és növényregeneráció lehetővé tette a hőkezelés idejének lerövidítését az *in vivo* hőterápiával szemben, és a regenerációs képesség növekedését a merisztéma izoláláshoz képest, ezáltal több vírusmentes növény létrehozását eredményezte (Stein et al. 1991). Stein és kutatócsoportja megfigyelte, hogy a növények hőkezeléssel szembeni toleranciáját befolyásolja a hajtástenyészetek életkora és a táptalaj hormontartalma is, ezáltal növekedett a hajtáscsúcsból regenerált növények száma (Stein et al. 1991). A táptalajok makroelem tartalma is hatással van a tenyészetek túlélésére a hőkezelés ideje alatt (Dziedzic 2008). A hőkezelés eredményesebbé tehető változó hőmérséklet alkalmazásával is, nappal magasabb (38 °C), éjszakára alacsonyabb (28 °C) hőmérséklet beállításával (Spiegel et al. 1999). Az egyes növényfajok, fajták hőtoleranciája igen különböző lehet, illetve változó az is, hogy a különböző növényekből az adott vírus milyen hosszú hőkezelés hatására eliminálódik (Gella és Errea 1998), ezért a hőkezelés időtartamát és a hőmérsékletet genotípusonként kell optimalizálni.

A hőkezelés után izolált hajtáscsúcs mérete nagyban befolyásolja a vírusmentesítés eredményességét. A merisztémák túl kis méretük (0,2-0,5 mm) miatt gyakran elhalnak, nehezen regenerálódnak, viszont nagyobb eséllyel hordoznak vírust a több levél primordiumot tartalmazó, nagyméretű hajtáscsúcsok. PNRSV-vel fertőzött 'Earliblue' szilván 5 mm-es hajtáscsúcs izolálással is állítottak elő vírusmentes növényeket 14 napos 38/36 °C-os hőkezelést követően (Dziedzic 2008). Hőkezeléssel kombinálva PPV fertőzött 'Bebecou' kajszinál is eredményes a nagyobb méretű (1-2 mm) hajtáscsúcs használata, továbbá a kutatócsoport a hagyományos cserepes hőkezeléssel összehasonlítva megállapította, hogy *in vitro* módszerrel rövidebb idő alatt majdnem 6-szor annyi vírusmentes kajszi állítható elő, mint *in vivo* hőkezeléssel (Koubouris et al. 2007). Egy görög kutatócsoport PPV és PNRSV fertőzött nektarinon alkalmazott *in vivo* hőkezelést és azt követően 1,3-2,0 mm hosszú, míg a hőkezelés nélküli növényekből kisebb, 0,8-1,3 mm-es hajtáscsúcsokat izolált és helyezett táptalajra. A sikeresen regenerált növények jelentős része mentes volt a vírusoktól, azonban a kisméretű csúcsok nem tudtak regenerálódni, elkalluszosodtak vagy elbarnultak. Nektarin esetében tehát a hőkezelést követő nagyobb méretű (1,3-2,0 mm) hajtáscsúcsok alkalmazása eredményezett vírusmentes növényeket (Manganaris et al. 2003).

Kemoterápia

Az érzékeny, idő és aprólékos kézimunka igényes merisztéma kultúra alkalmazásának kikerülése érdekében további módszerek feltérképezése vált szükségessé. Kemoterápia során a humán gyógyászatból ismert antivirális szerek táptalajhoz adagolásával a növényi vírusok replikációjának gátlása a cél. A legelterjedtebb ilyen antivirális szer a ribavirin, mely a guanozin szintetikus analógja, RNS-be épülésével a virális RNS szintézist gátolja.

Cseresznye fajtáknál a ribavirin alacsony koncentrációban alkalmazva teljesen hatástalannak bizonyult, 50 mg/l koncentráció felett egyre több vírusmentes növényt eredményezett, de az *in vitro* növények fejlődését erősen gátolta, 80 mg/l felett már csúcs elhalást okozott (Deogratias et al. 1989). A különböző vírusok kemoterápiára adott eltérő reakcióját mutatja be egy mirabolánon végzett kísérlet, ahol komplex, 2 vírussal fertőzött növényeket kezeltek ribavirinnel 4 féle koncentrációban. PNRSV-re minden kezelés hatástalan volt, míg az ACLSV-tól mentes növények száma a koncentráció emelésével növekedett (Cieslińska 2007). 'Blufree' és 'Hanita' szilva esetében a ribavirin használata már alacsony (10 mg/l) koncentrációban alkalmazva is teljes PPV mentességet eredményezhet (Hauptmanová és Polák 2011). Olyan tudományos munkákat is olvashatunk, melyben az alkalmazott kemoterápia önmagában hatástalan vagy kis hatékonyságú volt a vírus eliminálására, előzetes hőkezelés után azonban nagyarányú vírusmentes növényt eredményezett (Spiegel et al. 1999; Cieslińska 2007; Hu et al. 2012; Hu et al. 2015). Jakab-Ilyefalvi és Pamfil kutatásai során a hagyományos *in vivo* hőkezeléssel szemben a kombinált *in vitro* hőkezelés, merisztéma kultúra és ribavirin alkalmazását a szilva növények regenerációs képességének csökkenése ellenére is eredményesebbnek találták PPV esetében (Jakab-Ilyefalvi és Pamfil 2011). A ribavirinnél kíméletesebb és hatékonyabb kemoterápiás szernek bizonyult őszibarack vírusmentesítésében a zidovudin, melynek nem számoltak be növényt károsító negatív hatásáról (Pavelkova et al. 2015). A zidovudin vagy azidotimidin a timidin analógjaként a reverz transzkriptáz enzimet gátolja, így megakadályozza a retrovírusok szaporodását a gazdaszervezetben.

Krioterápia

A krioprezerváció a hosszú távú tárolás mellett vírusmentesítési módszerként is alkalmazható. A folyamat során az *in vitro* növényi hajtáscsúcsot dimetil-szulfiddal és prolinnal kiegészített táptalajon 4 °C-on előkezelik, majd 20-40 percig krioprotektív folyadékba mártják, majd fokozatosan -40 °C-ra lehűtik és folyékony nitrogénbe helyezik 1 napra. Ezután gyors melegítést alkalmaznak, és normál táptalajra helyezik a hajtáscsúcsot (Brison et al. 1995). A technika előnye, hogy nem szükséges nagyon kisméretű merisztéma csúcsot metszeni, nagyobb hajtáscsúcs szakaszok is használhatók, így a regenerációs képesség növelhető.

PPV fertőzött *Prunus* alanyon végzett krioterápiás kísérlet során a 0,3-0,5 mm-es hajtáscsúcsok fagyasztás után nagyon gyengén fejlődtek (11%), azonban a nagyobb, 0,5-2,0 mm hosszúságú hajtáscsúcsok 50% felett regenerálódtak és így a krioterápia kétszer annyi vírusmentes növényt eredményezett, mint a fagyasztás nélküli hajtáscsúcs regeneráció (Brison et al. 1997). Egy török kutatócsoport Brison módszerével szintén eredményesen alkalmazott krioterápiát PPV fertőzött kajszin, azonban a növények jelentős része elpusztult a kezelés végére (Seker et al. 2015).

Összegzés

A hosszú múltra visszatekintő növényi vírusmentesítési kutatások máig nem adnak általánosan használható, megbízható, gyors megoldást csonthéjasok vírusmentesítésére. Ennek oka a növényfajok, fajták különböző toleranciája az alkalmazott kezelésekkel szemben, illetve a különböző vírusok is eltérően reagálnak a terápiákra, így előfordul, hogy a vírus eliminálásához szükséges erősségű kezelés már a növényi tűréshatáron túllép, és a növény elpusztul a kezelés során. Ezért elengedhetetlenek további kísérletek a mentesítési hatékonyság növeléséhez, továbbá új növényfajták vagy új vírusok megjelenésével a vírusmentesítés megoldására. Az *in vitro* technikák különös odafigyelést, precíz, steril munkavégzést követelnek meg, nagy előnyük azonban, hogy laboratóriumi, kontrollált körülmények között egész évben, kis helyigénnyel végezhető és a fent bemutatott módszerek alkalmazásával, kombinálásával és további módszerek fejlesztésével óriási lehetőségeket rejtenek a hatékony kórokozómentes növényi szaporítóanyag előállítás eléréséhez.

Irodalomjegyzék

1. Brison, M., De Boucaud, M.T. and Dosba, F. 1995. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks. *Plant Science*, 105(2): 235-242.
2. Brison, M., De Boucaud, M.T., Pierronnet, A. and Dosba, F. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Science*, 123(1-2): 189-196.
3. Cieslińska, M. 2007. Application of thermo-and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 15: 117-124.
4. Deogratias, J.M., Dosba, F. and Lutz, A. 1989. Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ring spot virus, and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy and *in vitro* culture. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11(4): 337-342.
5. Dziędzic, E. 2008. Elimination of *Prunus* necrotic ring spot virus (PNRSV) from plum 'Earliblue' shoots through thermotherapy *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16: 101-109.
6. Gambino, G., Bondaz, J. and Gribaudo, I. 2006. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 397-404.
7. Gella, R. and Errea, P. 1998. Application of *in vitro* therapy for ilarvirus elimination in three *Prunus* species. *Journal of Phytopathology*, 146(8-9): 445-449.
8. Goussard, P.G., Wiid, J. and Kasdorf, G.G.F. 1991. The effectiveness of *in vitro* somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 12: 77-81.
9. Hauptmanová, A. and Polák, J. 2011. The elimination of Plum pox virus in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of *in vitro* cultures. *Horticultural Science (Prague)*, 38: 49-53.
10. Hu, G.J., Hong, N., Wang, L.P., Hu, H.J. and Wang, G.P. 2012. Efficacy of virus elimination from *in vitro*-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. *Crop protection*, 37: 20-25.
11. Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F. and Zhou, J. 2015. Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121(2): 435-443.

12. Jakab-Ilyefalvi, Z. and Pamfil, D. 2011. Results regarding the classical and modern pathogen elimination techniques of Plum Pox Virus at plum (*Prunus domestica* L.). Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 16(1).
13. Kartha, K.K. and Gamborg, O.L. 1975. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. Phytopathology, 65(7): 826-828.
14. Koubouris, G.C., Maliogka, V.I., Efthimiou, K., Katis, N.I. and Vasilakakis, M.D. 2007. Elimination of Plum pox virus through *in vitro* thermotherapy and shoot tip culture compared to conventional heat treatment in apricot cultivar Bebecou. Journal of general plant pathology, 73(5): 370-373.
15. Kunkel, L.O. 1936. Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of Peach. Phytopathology, 26(9).
16. Manganaris, G.A., Economou, A.S., Boubourakas, I.N. and Katis, N.I. 2003. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. Plant Cell Reports, 22(3): 195-200.
17. Mendonça, D., Kriston, E., Toth, E.K., Kirilla, Z., Balla, I., Laimer, M. and Hanzer, V. 2004. Elimination and Detection of Pathogens from Tissue Cultures of *Prunus* sp. V. International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 725: 319-324.
18. Pavelkova, R., Kudelkova, M., Ondrusikova, E. and Eichmeier, A. 2015. Virus Elimination in Peach cv. 'Red Haven' by Chemotherapy. Agricultural Communications, 3(2): 16-20.
19. Polak, J. and Hauptmanova, A. 2009. Preliminary results of *in vivo* thermotherapy of plum, apricot and peach cultivars artificially infected with PPV-M and PPV-D strains of Plum pox virus. Horticultural Science, 36: 92-96.
20. Seker, M.G., Suzerer, V., Elibuyuk, I.O. and Ozden Ciftci, Y. 2015. *In vitro* elimination of PPV from infected apricot shoot tips via chemotherapy and cryotherapy. International Journal of Agriculture and Biology, 17(5).
21. Shu, W. and Timon, B. 1996. Preliminary study on the methods of getting virus-free peach plantlets *in vitro*. Acta Horticulturae, 374: 191-194.
22. Spiegel, S., Tam, Y., Rosner, A., Brison, M., Helliot, B., Pierronnet, A. and De Boucaud, M.T. 1999. *In vitro* elimination of Prunus necrotic ringspot virus in a plum cultivar. In Plant Biotechnology and *In vitro* Biology in the 21st Century. Springer Netherlands, 545-547.
23. Stein, A., Spiegel, S., Faingersh, G. and Levy, S. 1991. Responses of micropropagated peach cultivars to thermotherapy for elimination of Prunus necrotic ringspot virus. Annals of Applied Biology, 119: 265-271.
24. Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, Á., Lakatos, L., and Burgyán, J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. The EMBO Journal, 22(3): 633-640.

Virus elimination from stone fruits by *in vitro* techniques (review)

SZABÓ L.K., KIRILLA Z., PREININGER É.

National Agricultural Research and Innovation Centre,
Research Institute for Fruit Growing

E-mail: szabo.luca.krisztina@fruitresearch.naik.hu

Summary

Several viruses are known to infect stone fruit trees and cause serious problems in cultivation. Production of pathogen-free plant materials and use of healthy propagation materials are essential. The oldest and most commonly used method for virus elimination is thermotherapy. Recently *in vitro* techniques have become common instead of the traditional thermotherapy in case of stone fruits. Thermotherapy is still applied *in vitro* but often combined with shoot tip excision, antiviral compound application or cryotherapy for the efficient elimination of viruses.

Keywords: *Prunus* sp., *in vitro*, thermotherapy, meristem, chemotherapy, cryotherapy

Szerzők

Szabó Luca Krisztina (kapcsolattartó szerző) – tudományos segédmunkatárs, NAIK Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet, 1223, Budapest, Park u. 2.

Kirilla Zoltán – tudományos segédmunkatárs, NAIK Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet, 1223, Budapest, Park u. 2.

Preininger Éva – PhD, tudományos főmunkatárs, NAIK Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutatóintézet, 1223 Budapest, Park u. 2.