

## Vírusmentes szőlő szaporítóanyag előállítása szövettenyésztési módszerek alkalmazásával (irodalmi áttekintés)

TURCSÁN MIHÁLY, OLÁH KRISZTINA, OLÁH RÓBERT

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet,  
Kecskeméti Kutató Állomás

E-mail: turcsan.mihaly@szbki.naik.hu

### Összefoglalás

A szőlőt számos patogén képes fertőzni, köztük viroidok, vírusok, fitoplazmák, baktériumok és gombák. Mivel a szőlőültetvényekben nem létezik megfelelően kidolgozott módszer a fertőző megbetegedéseket okozó vírusok és viroidok elleni védekezésre, a patogénmentes szaporítóanyag előállításnak kritikus szerepe van. Az elmúlt évtizedekben a kutatók számos technikát dolgoztak ki az egyes kórokozók, különösképpen a vírusok eliminálására. Mivel a különböző mentesítési eljárások más mechanizmus alapján hatnak, így eltérő hatékonysággal alkalmazhatók a különböző szőlővírusok eltávolítására. Ez a cikk a potenciális vírusmentesítési eljárások legfontosabb eredményeinek áttekintését szolgálja.

**Kulcsszavak:** merisztéma izolálás, kemoterápia, szomatikus embriogenezis

### Bevezetés

A vírusok obligát intracelluláris sejtparaziták, amelyek jelentős károkat okoztak és okoznak a növényeknek, állatoknak és embernek egyaránt, és az egyik legjelentősebb veszélyforrást jelentik bármely élőlény számára (Chauhan és tsai 2019).

A növényi vírusok tanulmányozása az 1890-es években kezdődött. A dohánymozaik vírus (TMV) volt az első leírt és jellemzett vírus, amelynek köszönhetően a vírusokat a betegségek kórokozójaként azonosították (Beijerinck 1898; Roossinck 2010). A vírusok taxonómiájáért felelős nemzetközi bizottság (ICTV) adatai alapján ma már több mint 900 növényi vírust azonosítottak és még számos új vár felfedezésre (King és tsai 2012). A termesztett növényeket érintő fertőzések legnagyobb hányada akut, vagyis rövid időn belül drasztikus tüneteket eredményeznek, míg a vad fajok esetében általában perzisztens életciklust mutatnak, amelyet a növényi gazda segítségével folytatnak tovább. Ezek a vírusfertőzések a növényekben jelentős károkat okoznak a termés mennyiségét és minőségét tekintve is (Chauhan és tsai 2019).

A szőlőt, mint sok más egyéb termesztett növényt is, számos kórokozó veszélyezteti. Ezek közé tartoznak a viroidok, vírusok, fitoplazmák, baktériumok és a gombák is. A szőlőnek ma már több mint 80 fertőző vírusa ismert, amelyek közül az utóbbi években a nagy átterjesztőképességű szekvenálás (HTS) segítségével 16 újat azonosítottak (Martelli 2018). Magyarországon a *Szőlő fertőző leromlás vírus/Grapevine fanleaf virus* (GFLV), az *Arabid mozaik vírus/Arabid mosaic virus* (ArMV), a *Szőlő látens foltosság vírus/Grapevine fleck virus* (GFkV), a *Szőlő levélsodródás vírus-1, 2, 3/Grapevine leafroll-associated virus-1, 2, 3* (GLRaV-1, 2, 3), valamint a *Szőlő vírus A és B/Grapevine virus A, B* (GVA, GVB) esnek hatósági szabályozás alá (Demián és tsai 2020).

A szőlő levélsodródás megbetegedés a gazdaságilag és világszerte legelterjedtebb szőlő betegség, amely akár 40% -os termésvesztést is okozhat (Naidu és tsai 2014), és a három legelterjedtebb kórokozója a GLRaV-1, GLRaV-2 és GLRaV-3, amelyek a többenél erőteljesebb levéltüneteket okoznak (Maree és tsai 2013).

A GVA és GVB vírusok a szőlő faszöveti barázdáltság megbetegedés kórokozói közé tartoznak, akárcsak a *Szőlő vírus D/Grapevine virus D* (GVD) és a *Szőlő rupsetris faszöveti barázdáltság vírus/Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) (Martelli és tsai 2007). *Vitis vinifera* esetén a betegség tipikus tünetei a fás rész kéreg alatti régióiban megjelenő lyukak és barázdák, amelyek a víz és ásványi anyagok szállítására is negatív hatással vannak (Maliogka és tsai 2015).

A szőlő legyezőlevél deformitás megbetegedés Európa és Észak-Amerika szinte összes művelt területén előfordul. A betegség fő kórokozója a GFLV. Jellemző tünetei a torz levél, citromsárga mozaikosság a főerek közelében, világossárga érpöttyözöttség, szélesen nyitott levélváll, dupla náduszok és rövid, torz internódiumok (Basso és tsai 2017).

Az ArMV közeli rokonságot mutat a GFLV-vel, amelynek sárgamozaik törzsével alkotott komplex fertőzése igen gyakori, sőt rekombináns változatok is előfordul. A vírus fő tünete a főerek és helyenként a kisebb erek mentén kialakuló élénksárga elszíneződések, amelyek esetenként kiterjedt foltokká fejlődnek. Tünete lehet még az aszimmetrikus levél, madárkás fürt és kis termés-hozam is (Lázár 2011).

A szőlő látens foltosság megbetegedés az összes szőlőt termesztő országban előfordul (Martelli 2014), kórokozója a GFkV, amely egy mechanikailag nem átvihető vírus és pöttyös tünetek megjelenését eredményezi a leveleken (Sabanadzovic és tsai 2000).

A fent leírt vírusok fertőzését nem feltétlenül követi a tünetek megjelenése, ugyanis határozatlan ideig látens formában maradhatnak. Így a látszólag egészséges, tünetmentes növények is veszélyes kórokozókat hordozhatnak, amelyek a vegetatív szaporítás során is terjedhetnek és komoly gazdasági károkat, valamint termés kiesést okozhatnak (Bisztray és tsai 2012). Mivel nincs megfelelő védekezési módszer a szőlő vírusos megbetegedéseinek kezelésére, ezért kulcsfontosságú az egészséges szaporítóanyagok használata, amelyek előállításánál a különböző kórokozók detektálásának kiemelkedő szerepe van (Oláh és tsai 2017; Szegedi és tsai 2018).

Kutatók az elmúlt évek során számos technikát dolgoztak ki az egyes kórokozóktól, különösképpen a vírusoktól mentes kiindulási anyag előállítására. Ilyen technikák a hőterápia, a hajtáscsúcs- és merisztéma tenyésztetek, a kemoterápia és a krioterápia, valamint a szomatikus embriogenezis alapú tenyésztetek.

## Hőterápia

A hőterápia alatt a már régóta alkalmazott rövid ideig tartó hőkezelések mellett (pl. melegvízes kezelés), ma már inkább a huzamosabb ideig alkalmazott terápiás kezeléseket értjük. A rövid ideig tartó magas hőmérsékleten alkalmazott egyszeri kezeléseket a nyugalmi állapotban lévő növényi részeken lehet alkalmazni, amik hatásosak a prokarióta és eukarióta patogénekkal szemben, ugyanakkor vírusmentesítésre nem alkalmasak. Ma a hőterápián általában az aktív növekedésben lévő növényi részek hosszabb ideig emelt hőmérsékleten történő kezelését értjük, aminek a segítségével a vírus sokszorozódásának gátlásával vírusmentes új hajtáscsúcsok vagy merisztémák nyerhetők (Grondeau és tsai 1994).

A hagyományos melegvízes kezelés során a nyugalmi állapotban lévő vesszőket általában 50-52 °C-os vízben inkubálják kb. 30 percig, amely hatékonyan bizonyult számos endogén és exogén kártevő ellen is (Gramaje és tsai 2014). Burr és tsai (1989) például a kimutatási szint alá csökkentették az *Agrobacterium tumefaciens* AT3 törzsét 30 perces 50 °C-on való melegvízes kezeléssel három különböző szőlőfajtában. Később leírták, hogy a 60 perces 50 °C-on való kezelés jobb rügyfakadást is eredményezett a kezeletlen vesszőkhöz képest (Burr és tsai 1996). Ez a technológia azonban közvetetten a vírusmentesítés hatékonyságát is növeli, hiszen megfigyeléseink szerint a melegvízes kezelést követően előállított *in vitro* állományok növekedési erélye általában meghaladja a kezeletlen állományokét (Bisztray és tsai 2011). Bisztray és tsai (2011) leírták, hogy a melegvízes kezelés kombinálása a regenerált növények 38 °C-on való hőkezelésével 3-4 hónapon keresztül már a vírusok ellen is hatásos.

Gifford és Hewitt (1961) már a hatvanas évek legelején megkísérelték GFLV fertőzött szőlőnővények hőkamrában való kezelését. Az *in vitro* növényeiket 60-90 napon át 38 °C-on inkubálták, majd azokról 1-2 mm nagyságú hajtáscsúcsot helyeztek szilárd táptalajra növényregeneráció céljából. A regenerált növények korai növekedési stádiuma során nem mutatkoztak a vírus tünetei, viszont akkoriban még nem állt rendelkezésre kellően érzékeny diagnosztikai módszer a vírusok kimutatására. Később más kutatók hasonló kísérleti körülmények között ELISA és RT-PCR módszerrel igazoltan GFLV-mentes növényeket regeneráltak, de sikereket értek el a GVA, GFkV, GLRaV-1 és GLRaV-3 vírusok esetében is (Panattoni és Triolo 2010).

Monette (1986) 40 napon keresztül hőkezelte a GFLV-vel és ArMV-vel fertőzött *in vitro* szőlőnővényeit. A 6 órás 39 °C-os inkubációt egy 18 órás 22 °C-os időszak követte minden nap. A kezelt növényekről ezután 2 mm-es hajtáscsúcsokat preparált és a regenerációt követően minden egyed vírusmentesnek bizonyult.

A szakirodalomban azonban nemcsak *in vitro* hőkezelésre találunk példát. Gribaudo és tsai (2006) két éves, üvegházban nevelt cserepes és egy hónapos *in vitro*, GRSPaV fertőzött növényeken is végeztek kísérleteket. Előbbieket 38 °C-on, utóbbiak 34 °C-on tartották átlagosan 58-59 napig, attól függően, hogy mikor mutattak stresszreakciókat. A hőkezelés után az üvegházi növényekről 5 mm-es, az *in vitro* növényekről pedig 2 mm-es hajtáscsúcsot preparáltak és helyeztek MMS táptalajra, majd a regenerált növények vírusfertőzöttségét RT-PCR-el tesztelték. A teszt után világossá vált, hogy kaptak ugyan vírusmentes vonalakat, de a növények kétharmada fertőzött maradt. Később Skiada és tsai (2009) is sikeresen kombinálták a hőterápiát és a merisztéma tenyészetek alkalmazását, aminek köszönhetően sikeresen távolították el a GLRaV-1 és a GRSPaV vírusokat.

Az aktív növekedésben lévő növényeken hosszabb ideig alkalmazott hőterápia tehát mind *in vivo* mind *in vitro* körülmények között hatásos lehet a vírusmentes hajtásszegmensek előállítására. Hátránya, hogy a kezelés következtében a hajtáscsúcsok egy része károsodik, illetve a növények életképessége fajtától függően jelentősen csökkenhet.

### Hajtáscsúcs- és merisztéma tenyészetek

A hajtáscsúcs- és merisztématenyésztést több évtizede használják vírusok vegetatívan szaporított növényekből történő eltávolítására és különösen hatékony technikának bizonyult a floémre korlátozott vírusok esetében. A hajtáscsúcs tenyésztés során egy meghatározott méretű hajtáscsúcsot vágnak le az anyanövényekről *in vitro* tenyésztés céljából (Wang és Valkonen 2009; Lassois és tsai 2012). Ezek a hajtáscsúcsok általában az apikális vagy laterális hajtásmerisztémából és három-négy levélprimordiumból állnak (1-1,5 mm). A hajtásregeneráció mértéke és a felhasznált szövet mérete között egyenes összefüggés mutatkozik, de a vírusmentesítés szempontjából a kisebb hajtáscsúcsok (0,2-0,4 mm) alkalmazása ajánlott (Wang és Valkonen 2009). Ezek a kisméretű hajtáscsúcsok csak a hajtás apikális merisztémáját tartalmazzák. Előfordul, hogy a szakirodalomban tévesen az ennél nagyobb hajtáscsúcsokat is merisztémának nevezik. Fontos megjegyezni, hogy a fél milimétert meghaladó hajtáscsúcsok tenyésztési sokszor csak más technikák (hőterápia, krioterápia, kemoterápia) alkalmazása után képesek hatékony vírusmentesítésre. A merisztématenyésztés során ezzel szemben olyan kis explantumokkal dolgozunk, amelyek mentesek a patogén organizmusoktól, ezért a módszer önmagában is alkalmas a vírusok eltávolítására (Ancora és tsai 1981).

Számos esetben sikerrel távolítottak el szőlővírusokat merisztéma tenyészetek alkalmazásával, például a GFLV-t és a GLRaV-1-t is (Weiland és tsai 2003; Youssef és tsai 2009). Maliogka és tsai (2009) sikerrel eliminálták a GRSPaV-t görög szőlőfajtákból hajtáscsúcsenyészetek alkalmazásával. Megfigyelték, hogy a 2 mm alatti hajtáscsúcsok regenerációs képessége jóval alacsonyabb, mint az 5 mm körüli mérettartományban lévőké, de utóbbi kombinálása hőterápiával már elegendő lehet a vírus eltávolítására.

Shatnawi és tsai (2011) GLRaV-1, GLRaV-3 és GFLV fertőzött szabadföldi szőlőnövényekről gyűjtötték be 2-5 mm nagyságú hajtáscsúcsokat, majd azokon felületi fertőtlenítés végeztek. A fertőtlenített hajtáscsúcsokból 0,1–0,2 mm nagyságú merisztémákat preparáltak mikroszkóp segítségével és különböző növényi növekedésszabályozók (benzil-amino-purin, naftil-ecetsav, indol-ecetsav, indol-vajsav) használatával regenerálták azokat intakt növényekké. Ezek után RT-PCR vizsgálatokkal kimutatták, hogy a merisztéma eredetű növényeik mindegyike mentes volt a korábban leírt vírusoktól.

A hajtás- és merisztéma tenyészetek kombinálása egyéb technikákkal szintén sok esetben sikerrel járt. Wang és tsai (2003) például a krioterápiával kiegészítve vírusmentesítettek GVA-val fertőzött növényeket. Hu és tsai (2018) ribavirinnel végzett *in vitro* kemoterápiás kezelés után hajtáscsúcsenyészet (1 mm) létrehozásával nagy hatékonysággal szabadultak meg a GRSPaV-tól.

A merisztéma tenyészetek alkalmazása hatékony vírusmentesítési technika, de a merisztémák kivágása, túlélésük és regenerációjuk biztosítása rendkívül nehéz feladat. Még a nagyobb hajtások kipreparálása szabad szemmel is lehetséges, addig a merisztéma preparáláshoz mikroszkóp használata és fejlett finommotoros mozgások kivitelezése is szükséges, valamint a gyorsaság is fontos tényező,

mert a kisméretű szövetek táptalaj hiányában hamar kiszáradnak (Wang és Valkonen 2009). A preparálás a szabadföldi és üvegházi növények hajtáscsúcsai mellett történhet *in vitro* növények hajtáscsúcsáról is. *In vitro* növények esetében a módszer így egész évben alkalmazható, és a szabadföldi növényekre jellemző sterilítással kapcsolatos problémák sem okoznak gondot.

### Kemoterápia

Az antivirális vegyületek hatékonyak lehetnek a növényi vírusos megbetegedések kezelésére. A leg hatásosabb szerek az inozin-monofoszfát dehidrogenáz (IMPDH) inhibitorok, az S-adenozilhomocisztein hidroláz (SAH) inhibitorok és a neuraminidáz (NA) inhibitorok közül kerültek ki. Ezek a vegyületek a tápanyagfelvétel során kerülnek a növénybe és ott gátolják a virális RNS-ek replikációját (Lal és tsai 2015). Az IMPDH inhibitorok a nukleotid-trifoszfát anyagcserére vannak hatással. Az ebbe a csoportba tartozó szerek célpontja az inozin-monofoszfát-dehidrogenáz enzim, amely gátlásával közvetve csökkentik intracelluláris guanozin-trifoszfát (GTP) szintet és eképpen gátolják a virális RNS-ek replikációját.

A SAH hidroláz inhibitorok az S-adenozilhomocisztein (SAH) hidroláz enzimet gátolják. A SAH molekula az S-adenozilmetioninból (SAM) keletkezik, miután az a metilcsoportját a nukleinsavakra (és más egyéb akceptor molekulákra) helyezte át. A SAH ezt követően homociszteinre és adozinra bomlik szét a SAH hidroláz segítségével. A homocisztein ezt követően újra képes metilcsoport átvételére és a folyamat kezdődik elölről. A SAH hidroláz inhibitorok hatására a SAH szint megemelkedik, így a virális nukleinsavak metilációja nem megy végbe és érésük, különösképpen az 5' sapka kialakulása ellehetetlenedik (Panattoni és tsai 2013).

A NA inhibitorok a virális neuraminidáz enzimhez kapcsolódnak és gátolják az újonnan szintetizált virionok egészséges sejtekbe történő eljutását. A kutatók a csoporthoz tartozó oseltamivir alkalmazásával már növényi vírusok eltávolításában is értek el sikereket. A növényi vírusok azonban nem kódolnak neuraminidáz enzimet, így az NA inhibitorok azokra gyakorolt hatásmechanizmusa jelenleg ismeretlen (Panattoni és tsai 2013).

Az egyes vegyületek különböző hatásmechanizmussal bírnak (De Clercq 2005) és általában magasabb koncentrációban alkalmazva sem hatásosak hosszú távon *ex vitro* körülmények között (Chinestra és tsai 2015), de *in vitro* körülmények között több kutató is jelentős sikereket ért el a használatukkal.

A szőlővírusok eliminálására leggyakrabban használt vegyület az IMPDH-k közé sorolható ribavirin. A ribavirin egy szintetikus nukleozid analóg, amely antivirális hatást fejt ki számos RNS vírus ellen (Crotty és tsai 2002). Az évek során több kutató is sikeresen használta ezt a vegyületet különböző fajták *in vitro* kultúráiban pl. a GRSPaV, a GLRaV-1, a GFkV és a *Szőlő Pinot gris vírus* (GPGV) eliminálására (Guta és Buciumeanu 2011; Skiada és tsai 2013; Komínek és tsai 2016). A GLRaV-3 vírus ellen az NA inhibitorok és a purin bioszintézis inhibitorok bizonyultak különösen hatékonyak, míg az IMPDH inhibitorok a GLRaV-1 fertőzések leküzdésében (Panattoni és tsai 2011) segítettek. Hu és tsai (2018) Kyoho szőlőfajta esetében qPCR-el kimutatták, hogy már a kezelés ötödik napjától megkezdődik a vírus titer csökkenése a GRSPaV-vel fertőzött növényekben. Ugyanezen kutatók hatékonyan kombinálták a ribavirin és a merisztéma tenyészetek alkalmazását, amivel 81,7%-ban voltak képesek GRSPaV-mentes növényeket regenerálni. Eichmeier

és tsai (2019) a GLRaV-1 és a GFkV mellett GVA-val, valamint viroidokkal fertőzött Riesling fajta esetében alkalmaztak ribavirint. A kezelés nyolc hetes időszaka után további három évig *in vitro* állományban tartották a növényeket és időszakosan kis RNS szekvenálással ellenőrizték vírus- és viroidmentességüket. A vírusok nem voltak kimutathatók, de a viroidok továbbra is jelen voltak.

Panattoni és tsai (2007) GVA fertőzött növények esetében alkalmazták a ribavirint és az SAH inhibitorok csoportjába tartozó dihidroxi-propil-adenint (DHPA). A vegyszereket külön és kombinációban is használták és azt figyelték meg, hogy az együttes alkalmazásuk a legcélravezetőbb, ugyanis mindkét szer gátolja a GVA szempontjából esszenciális lépést, az 5' sapka kialakulását. A két hatóanyag valószínűleg eltérő úton fejt ki ugyanazt a hatást és így szinergista módon erősítik egymást.

Guta és tsai (2010) GLRaV-1 és GLRaV-3 fertőzött szőlőket kezeltek ribavirinnel és az NA inhibitorok csoportjába tartozó oseltamivir vegyülettel. A ribavirines kezelés nem hozott biztató eredményt, de az oseltamivir használatával kaptak mindkét vírustól mentes növényeket. Később GFkV és GVA vírusokkal fertőzött szőlőnövényeken együttesen alkalmazták a két szert. A GFkV-t nagy hatékonysággal sikerült eliminálni mindkét vizsgált fajta esetében, míg a GVA esetében kaptak ugyan vírusmentes növényeket, de mindössze 9%-ban. Vizsgálataik alapján megállapították, hogy az oseltamivir kevésbé fitotoxikus a növényre nézve, mint a ribavirin. RAPD technikával azt is igazolták, hogy nem történt genetikai változás a növényekben, így ezek a szerek nagy valószínűséggel nincsenek hatással a genetikai variabilitásra (Guta és tsai 2014).

Látható tehát, hogy az antivirális szerek számos esetben hatásosak a szőlővírusok elleni küzdelemben. A módszer egyik hátránya, hogy hatékonyan és pontos koncentrációban csak *in vitro* körülmények között alkalmazható, valamint, hogy a virális RNS-ek szintézisének gátlása mellett sok esetben a gazda eredetű mRNS molekulák is érintettek, ami a növény fejlődését gátolhatja és szélsőséges esetben annak pusztulását is eredményezheti. A módszer nagy előnye más technikákkal szemben, hogy az újonnan szintetizálódó vírusok létrejöttére vagy azok terjedésére van hatással, így az új hajtáscsúcsok sejtjei nagy eséllyel fertőzésmentesek, ezért a merisztémánál nagyobb szövetek izolálásával is vírusmentes növényeket állíthatunk elő.

### Krioterápia

A növényi krioterápia során a növényi szöveteket és bennük rejtőző patogéneket rövid ideig (általában 1 óráig) alacsony hőfokra (-196 °C) hűtik. A fertőzött növényi hajtáscsúcsokat folyékony nitrogénben inkubálják különböző krioprezervációs protokollok felhasználásával. A legnépszerűbb protokollok a kapszulás-dehidratáció, vitrifikáció, kapszulás-vitrifikáció és a cseppek-vitrifikáció (Feng és tsai 2013).

A vitrifikáció során a növényanyagot krioprotektív glicerol alapú oldatban (PVS2, PVS3) dehidratálják, hogy a gyorsfagyasztás során ne képződjenek a szövetet károsító jégkristályok. A kapszulázott-dehidratáció során a kimetszett hajtáscsúcsot mesterséges endospermiumba (alginát gyöngyök) csomagolják és növekvő szacharóz koncentrációjú oldatokban tartják, aminek hatására ellenállóbbak lesznek a kiszáradás és a fagyasztás ellen is. A kapszulázott-vitrifikáció a két módszer kombinációja, amely magában foglalja az alginát gyöngyökbe való ágyazást, a szacharóz oldatban való inkubációt és a krioprotektív oldatok használatát is. A cseppek-vitrifikáció során a hajtáscsúcsokat krioprotektív anyagokkal előkezelik, majd alufóliára helyezik őket, amely cseppek formájában vitrifikáló oldatot tartalmaz és aztán merítik azt folyékony nitrogénbe (Bettoni és tsai 2016).

A kezelési körülményeket úgy választják meg, hogy azokat csak a hajtáscsúcs apikális részének legkevesébe differenciálódott, erősen citoplazmatikus sejtjei éljék túl, míg a vakuoláris sejtek és a vaszkuláris régióban található fertőzött sejtek elpusztulnak (Bettoni és tsai 2016) a magasabb víztartalmuk miatt (Marković és tsai 2015). A fagyasztás után az életben maradt merisztematikus szövetekből növényregenerációt kísérnek meg (Lal és tsai 2015; Vieira és tsai 2015). A regenerált növények száma általában kisebb, mint a hagyományos merisztéma tenyészetek alkalmazásakor, de a leválasztott rész nagyobb és könnyebben kezelhető, valamint nagyobb arányban lehet vírusmentes egyedeket regenerálni (Wang és Valkonen 2009).

Pathirana és tsai (2013) fertőzött fajták rügyeit kezelve sikeresen mentesített azokat több szőlő levsodródást okozó vírustól (GLRaV-1, GLRaV-2 és GLRaV-3) is. Véleménye szerint a módszer költséghatékony lehetőséget kínál a klónok növényanyagának fenntartására.

Wang és tsai (2003) az izraeli Bruti szőlőfajtából 97% -os hatékonysággal távolították el a szőlő faszöveti barázdáltság megbetegedés egyik fő kórokozóját, a GVA-t, krioterápia és merisztéma tenyészetek kombinációjával. Krioterápia nélkül ez a szám csupán 12% volt. Bayati és tsai (2011) ugyanezt a vírust 42%-os sikerrel tudták eltávolítani, amely kevesebb, mint a fele a Wang és tsai (2003) által korábban leírt 97%-os aránynak. Ezt az eltérést okozhatja az eltérő dehidratációs protokollok alkalmazása vagy a felhasznált diagnosztikai módszerek érzékenysége közötti különbség (Western blot illetve RT-PCR), de természetesen a genotípus hatása sem hagyható figyelmen kívül.

Marković és tsai (2015) 78 és 100% -os hatékonysággal távolították el a GFLV és GLRaV-3 vírusokat Chardonnay és Sauvignon blanc fajták 1 mm-es hajtáscsúcsának fagyasztásával. Véleményük szerint a krioterápia hatékony módszer lehet a vírusok eliminálása szempontjából, de további, a kezelt növények genetikai stabilitására irányuló, teljes genomot lefedő vizsgálatok szükségesek, mert a technika egyes lépései növelhetik a DNS polimorfizmusok kialakulásának valószínűségét.

Összességében a krioterápia egyik nagy előnye, hogy a vírusmentesítés sikere független a kezelt hajtáscsúcs méretétől, amit több publikáció is alátámaszt (Wang és tsai 2003; Wang és Valkonen 2008), ugyanis csak a fagyasztást túlélő sejtek képesek növényre regenerálódni. Hátrányt jelent, hogy a kipeparált hajtáscsúcsok regenerációs aránya kisebb a kezelés után, mint pl. merisztémák esetében, és a leírt módszerek reprodukálása is nehézkes, emiatt kevésbé tudott elterjedni. Előnye, hogy alkalmazásával viszonylag magas hatékonysággal lehet vírusmentes növényeket regenerálni.

### Szomatikus embriogenezis

A szakirodalomban találunk példákat szomatikus embriogenezisen keresztül történő vírus-, sőt viroidmentesítésre, amelyet genotípus függősége miatt ritkábban alkalmaznak. Ugyanakkor az irodalmi adatok alapján a viroidot vagy vírust tartalmazó sejtekből nem regenerálódnak növények, így az eljárással nagy biztonsággal kaphatunk viroid- és vírusmentes növényeket (Oláh és tsai 2019).

Gambino és tsai (2006) vírusmentesítés céljából ovárium és portok eredetű embriogén kultúrákat hoztak létre különböző szőlőfajtákból. Vizsgálataik során megállapították, hogy a módszer mindkét esetben alkalmas a főemre korlátozott vírusok, pl. a GRSPaV, GLRaV-1, GLRaV-3 és GVA eltávolítására. Négyhónapos kallusz kultúrákban még nagyobb arányban (65%) tudták kimutatni az egyes vírusokat, amelyek később a 8 hónapos kultúrákból már ritkán voltak detektálhatók. A fertőzött növényekből származó kalluszok fertőzött és nem fertőzött sejtek mozaikjából állnak, amelyekből később az életképesebb sejtek tudnak osztódásnak indulni, így a regenerált növények

nagy eséllyel vírusmentesek lehetnek. Ugyanezen kutatók (Gambino és tsai 2009) elsőként regeneráltak GFLV fertőzéstől mentes növényeket kizárólag szomatikus embriogenezis alkalmazásával, ami azért volt fontos, mert korábban Goussard és Wiid (1992) ezt csak a portok kultúrák előzetes hőkezelésével tudták elérni. Ezzel a kísérlettel bebizonyosodott, hogy a szomatikus embriogenezis nem kizárólag a floémre korlátozott vírusok eltávolítására alkalmas.

San Pedro és tsai (2017) számos, GFkV és/vagy GFLV vírussal fertőzött, valamint négy, GLRaV-3 vírussal fertőzött fajta portokján indukáltak szomatikus embriogenezist. A regenerált növények 100%-a bizonyult GFkV-mentesnek és 68%-a GFLV-mentesnek. A GLRaV-3 esetében ez a szám 92% volt.

Oláh és Bordé (2017) szintén jó eredményeket értek el a GFkV fertőzés leküzdésében. A módszer szűk keresztmetszetét az embriogén kallusz indukcióra felhasznált hormonkombinációk genotípus függősége adja. Tapasztalataik alapján a 2,4-D (2,4-diklór-fenoxi-ecetsav) és BA (benzil-adenin) vagy a 2,4-D és TDZ (thidiazuron) tartalmú táptalajok a fajták széles körén alkalmasak erre a célra.

Borroto-Fernandez és tsai (2009) portoktenyészetek indításával sikerrel eliminálták az ArMV-t Domina szőlőfajtából. A kísérletük során 46 növényt sikerült regenerálniuk, amik mind vírusmentesnek bizonyultak és klónszelekcióra is alkalmasak voltak, ugyanis kivétel nélkül fajtahű jellegeket mutattak, valamint ploidszintjük is megfelelő volt. A növények vírusmentességét később további ELISA és RT-PCR vizsgálatokkal ellenőrizték *in vitro* és kiültetés utáni állapotukban is.

A szomatikus embriogenezissel regenerált növényeket illetően rendszeresen felmerül a szoma-klonális variabilitás okozta problémák és a megfelelő ploidszint kérdése. A genetikai állományra irányuló számos vizsgálat történt a regenerált növényeken SSR (San Pedro és tsai 2017) és RAPD (Othmani és tsai 2010; Yang és tsai 2008) módszerek alkalmazásával, de a ploidszint meghatározás is gyakran előfordult flow citometria (Borroto-Fernandez és tsai 2009; Yang és tsai 2008; Leal és tsai 2006) segítségével. A legtöbb esetben nem találtak DNS polimorfizmust vagy ploidszintbeli eltérést a kiindulási anyagokhoz képest, de például Leal és tsai (2006) 41 tesztelt szőlőnövény közül egy esetben tetraploid regeneránst azonosítottak. A genom méret meghatározást szolgáló vizsgálatok alapján kimutatták azt is, hogy a *Vitis vinifera* fajták igen stabilak a sejtmagi DNS tartalmuk tekintetében.

Összefoglalva az itt említett módszerek közül a szomatikus embriogenezis a leghatékonyabb a növényi vírusok eltávolítására, de több hátránnyal is rendelkezik. A virágzatok begyűjtése a virágnylást megelőző két hétben ajánlott, ugyanis a portokok ilyenkor vannak a megfelelő fejlettségi stádiumban. A módszer tehát évente egyszer alkalmazható és nem ismételhető, ezért ha valamilyen oknál fogva nem jár sikerrel, akkor más technikákat kell alkalmazni. A viroidok egyre nagyobb figyelmet kapnak a kutatásokban, mivel a jelenleg ismert legkisebb kórokozók a vírusokkal együtt kevert fertőzéseket is okoznak. A jelenleg hatályos szaporítóanyag rendelet a viroidok vizsgálatát nem szabályozza, de ez a jövőben változhat, ezért a szomatikus embriogenezis viroidokra gyakorolt hatásának érzékeny diagnosztikai módszerekkel (pl. HTS) történő felmérése is indokolt lehet.

### Következtetések

A fent leírtak alapján elmondható, hogy az egyes technikák vírusmentesítési hatékonyságát számos tényező befolyásolja. Ilyen tényező például a genotípus, amely szinte minden módszer esetében meghatározó szereppel bír. A sikeres eliminációban az egyes vírusok biológiai jellemzői, a fertőzési mechanizmusuk és a növényi szövetekben való eloszlásuk is szerepet játszhat. Egyes módszerek lényegesen nagyobb tapaszta-



latot és technikai hátteret igényelnek, ami szűk keresztmetszetet jelenthet a technológia kiválasztásakor.

A fás vesszők melegvízes kezelése jó kezdőlépés lehet, hiszen számos esetben jobb rügezést biztosít a vesszők számára, amely rügekből létrehozott *in vitro* növények általában életképesebbek. A hajtáscsúcs tenyészetek létrehozása kiemelt fontosságú, ugyanis a legtöbb leírt vírusmentesítési technikában szerepük van.

A hajtáscsúcs tenyészetek önmagukban is elegendők lehetnek a floematikus vírusok (pl.: GRSPaV, GFkV, GVA, GVB, GLRaV-1, -2, -3, -7) eliminálására, de ehhez kellően nagy tapasztalat szükséges, ugyanis a 0,5 mm alatti hajtáscsúcsok kipreparálása és túlélésük biztosítása genotípusonként eltérő nehézségű feladat. A technika nagy tapasztalatot és mikroszkópot is igényel, amely a kemoterápia és szomatikus embriogenezis alkalmazása során nem feltétlenül szükséges. A kemoterápia során alkalmazott antivirális szerek hatására a hajtáscsúcsok nagyobb része (akár több mm hosszúságban) lesz vírusmentes, így azok szabad szemmel is jól preparálhatók, akár csak a szomatikus embriogenezis során a felhasznált portokok és termők. Emellett a megfelelő hormonkombinációk alkalmazásával nem csupán nagy eséllyel vírusmentes, de olykor viroidmentes vonalakat is regenerálhatunk. A portok preparálási időszak a vesszők hajtásával hosszabbítható, ugyanakkor ilyenkor a virágok általában jóval kisebbek. A krioterápia során a magasabb víztartalmú sejtek elpusztulnak, ezért, ha a hajtáscsúcsról nagyobb szövetet is preparálunk, abból csak az életképes és fertőzésmentes sejtek osztódásával regenerálódik növény, amennyiben sikerül a soklépcsős protokolt megfelelően adaptálni.

A hőterápia akár konténeres anyagon is elvégezhető, ami előnyös, mert nem követeli meg *in vitro* tenyészetek előzetes létrehozását, így a hajtáscsúcsokat a kezelés után is elegendő kipreparálni. A szomatikus embriogenezissel és a kemoterápiával egyetemben ez a technika főmre korlátozott vírusok eliminálásán túl más egyéb vírusok eltávolítására is jól alkalmazható (pl.: ArMV, GCMV, GFLV).

Tapasztalatok alapján a különböző módszerek kombinálásával nagymértékben növelhető a regenerált vírusmentes növények aránya. A hőterápiának vagy krioterápiának a hajtáscsúcs tenyészetekkel történő együttes alkalmazása nagy sikereket ért el a különböző floematikus vírusok esetében. A hőterápia kombinálása a kemoterápiával szintén jó választás lehet, ugyanis előbbi hatásosan csökkenti a vírus titert, míg utóbbi az új vírusok szintézisének gátlásában ért el kiemelkedő eredményeket. A szőlő kemoterápiában alkalmazható, kevésbé fitotoxikus szerek palettájának folyamatos bővítése izgalmas kutatási terület, amelyben az egyes szerek viroidokra gyakorolt hatását is szükséges vizsgálni.

Fontos megemlíteni a diagnosztika fontosságát is, ahol az ELISA és RT-PCR módszerek alkalmazása általános a növényvírusok kimutatásában, azonban a nagy áteresztőképességű szekvenálás (HTS) nagyobb érzékenységgű és a még le nem írt vírusok kimutatását is lehetővé teszi. A kiindulási anyagok előzetes HTS tesztelése így sokat segíthet egy-egy vírusprofil felállításakor és a regenerált növényanyag tesztelésekor is.

A különböző szőlő genotípusok *in vitro* szaporíthatósága és regenerációs hatékonysága meghatározza a felhasználható technikák körét, de jelenleg nincs egységesen hatékony módszer az összes szőlő vírus eltávolítására. Éppen ezért a hatékony vírusmentesítési stratégia megválasztását nagyban befolyásolja, hogy a kiindulási anyagok milyen vírusokkal fertőzöttek és a szakirodalomban korábban mely módszerek alkalmazásával tudták azokat hatékonyan eltávolítani.

### Köszönetnyilvánítás

Munkánkhoz az NKFIH nyújtott anyagi támogatást (K131679), valamint a GINOP 2.3.3-15-2016-00042 számú pályázata támogatta (OR). TM a SZIE Kertészettudományi Doktori Iskola PhD hallgatója.

## Irodalomjegyzék

1. Ancora, G., Belli-Donini, M.L. and Cuzzo, L. 1981. Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Sci. Hortic.* 14(3): 207-213.
2. Basso, M.F., Fajadro, T.V. and Saldarelli, P. 2017. Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management. *Rev. Bras. Frutic.* 39(1).
3. Bayati, S., Shams, B.M. and Moieni, A. 2011. Elimination of *Grapevine virus A* (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. *J. Agr. Sci. Tech.* 13:443-450.
4. Beijerinck, M.W. 1898. On a Contagium vivum fluidum causing the spot disease of the tobacco-leaves. *Phytopathol. Classics.* 7(1):33-52.
5. Bettoni, J.C., Costa, M.D., Gardin, J.P.P., Kretzschmar, A.A. and Pathirana, R. 2016. Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. *Rev. Bras. Frutic.* 38(2).
6. Bisztray, G.D., Civerolo, E.L., Dula, T., Kölber, M., Lázár, J., Mugnai, L. and Savka, M.A. 2012. Grapevine pathogens spreading with propagating plant stock: Detection and methods for elimination. *Grapevines: Varieties, cultivation, and management.* Nova Sci. Pub., Hauppauge, NY, 1-86.
7. Bisztray, G.D., Lázár, J., Szegedi, E., Varga, G., Nagy, B. and Hajdu, E. 2011. A complex system for the production of pathogen-free grapevine propagating material. *Int. J. Hortic. Sci. Technol.* 17(3): 59-62.
8. Borroto-Fernandez, E.G., Sommerbauer, T., Popowich, E., Schartl, A. and Laimer, M. 2009. Somatic embryogenesis from anthers of the autochthonous *Vitis vinifera* cv. Domina leads to *Arabis mosaic virus*-free plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 124(1): 171-174.
9. Burr, T.J., Ophel, K., Katz, B.H. and Kerr, A. 1989. Effect of hot water treatment on systemic *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in dormant grape cuttings. *Plant Dis.* 73(3): 242-245.
10. Burr, T.J., Reid, C.L., Splittstoesser, D.F. and Yoshimura, M. 1996. Effect of heat treatments on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis* *in vitro* and in dormant grape cuttings. *Am. J. Enol. Vitic.* 47(2): 119-123.
11. Chauhan, P., Singla, K., Rajbhar, M., Singh, A., Das, N. and Kumar, K. 2019. A systematic review of conventional and advanced approaches for the control of plant viruses. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 7(04): 89-98.
12. Chinestra, S.C., Curvetto, N.R. and Marinangeli, P.A. 2015. Production of virus-free plants of *Lilium* spp. from bulbs obtained *in vitro* and *ex vitro*. *Sci. Hortic.* 194: 304-312.
13. Crotty, S., Cameron, C. and Andino, R. 2002. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J. Mol. Med.* 80(2): 86-95.
14. De Clercq, E. 2005. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. *Antivir. Res.* 67(2): 56-75.
15. Demián, E., Jaksa-Czotter, N., Molnár, J., Tusnády, G.E., Kocsis, L. and Várallyay, E. 2020. Grapevine rootstocks can be a source of infection with non-regulated viruses. *Eur. J. Plant Pathol.* 156(3): 897-912.
16. Eichmeier, A., Kominkova, M., Pecenkova, J. and Kominek, P. 2019. High-throughput small RNA sequencing for evaluation of grapevine sanitation efficacy. *Journal of virological methods*, 267: 66-70.
17. Feng, C.H., Cui, Z.H., Li, B.Q., Chen, L., Ma, Y.L., Zhao, Y.H. and Wang, Q.C. 2013. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of *in vitro*-grown apple shoot-tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 112(3): 369-378.
18. Gambino, G., Bondaz, J. and Gribaudo, I. 2006. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* 114(4): 397-404.
19. Gambino, G., Di Matteo, D. and Gribaudo, I. 2009. Elimination of *Grapevine fanleaf virus* from three *Vitis vinifera* cultivars by somatic embryogenesis. *Eur. J. Plant Pathol.* 123(1): 57-60.
20. Gifford, E.M. and Hewitt, W.B. 1961. The use of heat therapy and *in vitro* shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.* 12(3): 129-130.
21. Goussard, P.G. and Wiid, J. 1992. The elimination of fanleaf virus from grapevines using *in vitro* somatic embryogenesis combined with heat therapy. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 13(2): 81-83.

22. Gramaje, D., Mañas, F., Lerma, M.L., Muñoz, R.M., García-Jiménez, J. and Armengol, J. 2014. Effect of hot-water treatment on grapevine viability, yield components and composition of must. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20(1): 144-148.
23. Griboaud, I., Gambino, G., Cuozzo, D. and Mannini, F. 2006. Attempts to eliminate *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* from grapevine clones. *J. Plant Pathol.* 293-298.
24. Grondeau, C., Samson, R. and Sands, D.C. 1994. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13(1): 57-75.
25. Guta, I.C. and Buciumeanu, E.C. 2011. Grapevine chemotherapy for elimination of multiple virus infection. *Rom. Biotechnol. Lett.* 16(5).
26. Guta, I.C. Buciumeanu, E.C. and Visoiu, E. 2014. Elimination of *Grapevine fleck virus* by *in vitro* Chemotherapy. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj Napoca*, 42(1): 115-118.
27. Guta, I.C., Buciumeanu, E.C., Gheorghie, R.N. and Teodorescu, A. 2010. Solutions to eliminate *grapevine leafroll associated virus* serotype 1+3 from *V. vinifera* L. cv. Ranâi Magaraci. *Rom. Biotechnol. Lett.* 15(1): 73.
28. Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F., Li, Z. and Zhang, S. 2018. Elimination of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* from *Vitis vinifera* 'Kyoho' by an antiviral agent combined with shoot tip culture. *Sci. Hortic.* 229: 99-106.
29. King, A.M., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. 2012. Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 486-487.
30. Komínek, P., Komínková, M. and Jandová, B. 2016. Effect of repeated Ribavirin treatment on grapevine viruses. *Acta Virol.* 60(4): 400-403.
31. Lal, A.N.K.I.T.A., Pant, M.A.N.U. and Rani, A.N.J.U. 2015. The who's who of plant viruses: A cognitive approach. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 8(1): 60-68.
32. Lassois, L., Lepoivre, P., Swennen, R., van den Houwe, I. and Panis, B. 2012. Thermotherapy, chemotherapy, and meristem culture in banana. In *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*. Humana Press, Totowa, NJ. 419-433.
33. Lázár J. 2011. Szaporítóanyaggal terjedő patogének. In: Hajdu E. (szerk.): *Szőlőfajták, szaporítóanyagok és betegségeik*. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest, 179-210.
34. Leal, F., Loureiro, J., Rodriguez, E., Pais, M.S., Santos, C. and Pinto-Carnide, O. 2006. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Rep.* 25(9): 978-985.
35. Maliogka, V.I., Martelli, G.P., Fuchs, M. and Katis, N.I. 2015. Control of viruses infecting grapevine. In *Advances in Virus Research*. Academic Press. 91: 175-227.
36. Maliogka, V.I., Skiada, F.G., Eleftheriou, E.P. and Katis, N.I. 2009. Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining *in vitro* thermotherapy with shoot tip culture. *Sci. Hortic.* 123(2): 280-282.
37. Maree, H.J., Almeida, R.P., Bester, R., Chooi, K.M., Cohen, D., Dolja, V.V. and Naidu, R. A. 2013. *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *Front. Microbiol.* 4: 82.
38. Marković, Z., Preiner, D., Stupić, D., Andabaka, Ž., Šimon, S., Vončina, D. and Engelmann, F. 2015. Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 54(SI): 247-251.
39. Martelli, G.P. 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J. Plant Pathol.* 96(1sup): 1-136.
40. Martelli, G.P., Adams, M.J., Kreuze, J.F. and Dolja, V.V. 2007. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45: 73-100.
41. Martelli, J.P. 2018. Where grapevine virology is heading to. In: *Proceedings of the 19th Congress of ICVG (April 2018, Santiago, Chile)*.
42. Monette, P.L. 1986. Elimination *in vitro* of two grapevine nepoviruses by an alternating temperature regime. *J. Phytopathol.* 116(1): 88-91.
43. Naidu, R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D. and Martelli, G.P. 2014. Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Dis.* 98(9): 1172-1185.

44. Oláh R. és Bordé Á. 2017. Módszertani fejlesztések a szőlő vírusmentesítésében. *Kertgazdaság*, 49(4): 39-41.
45. Oláh R., Turcsán M., Szénási M., Oláh K., Szegedi E. és Lázár J. 2019. A szőlő patogénmentesítése szövettenyésztési eljárások alkalmazásával. In: Szabó Péter (Ed.): *Innováció a Szőlőszaporításban*. Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest. 54-59.
46. Oláh, R., Deák, T., Turcsán, M., Szénási, M., Bordé, Á. and Szegedi, E. 2017. Use of an intron containing grapevine gene as internal control for validation of cDNA synthesis in virus detection by RT-PCR. *European J. Plant Pathol.* 149(3): 765-770.
47. Othmani, A., Rhouma, S., Bayouhd, C., Mzid, R., Drira, N. and Trifi, M. 2010. Regeneration and analysis of genetic stability of plantlets as revealed by RAPD and AFLP markers in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Deglet Nour. *Int. Res. J. Plan. Sci.* 1(3): 48-55.
48. Panattoni, A., Luvisi, A. and Triolo, E. 2011. Selective chemotherapy on *Grapevine leafroll-associated virus-1* and *-3*. *Phytoparasitica*, 39(5): 503-08.
49. Panattoni, A. and Triolo, E. 2010. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on *in vitro* collection of Kober 5BB. *Sci. Hortic.* 125(1): 63-67.
50. Panattoni, A., D'Anna, F., Cristani, C. and Triolo, E. 2007. Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. *J. Virol. Methods.* 146(1-2): 129-135.
51. Panattoni, A., Luvisi, A. and Triolo, E. 2013. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish J. Agric. Res.* (1): 173-188.
52. Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Carra, A., Carimi, F. and Panis, B. 2013. Removal of leafroll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification. In VIII International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding. *Acta. Hortic.* 1083: 491-498.
53. Roossinck, M.J. 2010. Lifestyles of plant viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci.* 365(1548): 1899-1905.
54. Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem, N., Castellano, M.A., Digiaro, M. and Martelli, G.P. 2000. *Grapevine fleck virus*-like viruses in *Vitis*. *Arch. Virol.* 145(3): 553-565.
55. San Pedro, T., Gammoudi, N., Peiró, R., Olmos, A. and Gisbert, C. 2017. Somatic embryogenesis from seeds in a broad range of *Vitis vinifera* L. varieties: rescue of true-to-type virus-free plants. *BMC Plant Biol.* 17(1): 226.
56. Shatnawi, M., Anfoka, G., Shibli, R., Al-Mazra'awi, M., Shahrou, W. and Arebiat, A. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. *Turk. J. Agric. For.* 35(2): 173-184.
57. Skiada, F.G., Grigoriadou, K., Maliogka, V.I., Katis, N. and Eleftheriou, E.P. 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. *J. Plant Pathol.* 177-184.
58. Skiada, F.G., Maliogka, V.I., Katis, N.I. and Eleftheriou, E.P. 2013. Elimination of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars by *in vitro* chemotherapy. *Eur. J. Plant Pathol.* 135(2): 407-414.
59. Szegedi, E., Deák, T., Turcsán, M., Szénási, M., Bordé, Á. and Oláh, R. 2018. Evaluation of intron containing potential reference gene-specific primers to validate grapevine nucleic acid samples prepared for conventional PCR and RT-PCR. *Vitis*, 57: 69-73.
60. Vieira, R.L., da Silva, A.L., Zaffari, G.R., Steinmacher, D.A., de Freitas Fraga, H.P. and Guerra, M.P. 2015. Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. *Acta Physiol. Plant.* 37(1): 1733.
61. Wang, Q. and Valkonen, J.P. 2009. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends Plant Sci.* 14(3): 119-122.
62. Wang, Q., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I. and Tanne, E. 2003. Elimination of *grapevine virus A* (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci.* 165(2): 321-327.
63. Wang, Q.C. and Valkonen, J.P.T. 2008. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. *J. Virol. Methods.* 154(1-2): 135-145.

64. Weiland, C.M., Cantos, M., Troncoso, A. and Perez-Camacho, F. 2003. Regeneration of virus-free plants by *in vitro* chemotherapy of GFLV (*Grapevine fanleaf virus*) infected explants of *Vitis vinifera* L. Cv 'Zalema'. In International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research, 652: 463-466.
65. Yang, X.M., An, L.Z., Xiong, Y.C., Zhang, J.P., Li, Y. and Xu, S.J. 2008. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos and monitoring the genetic fidelity of regenerated plants in grapevine. *Biol. Plant.* 52(2): 209-214.
66. Youssef, S.A., Al-Dhaher, M.M.A. and Shalaby, A.A. 2009. Elimination of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine leaf roll-associated virus-1* (GLRaV-1) from infected grapevine plants using meristem tip culture. *Int. J. Virol.* 5(2): 89-99.

## **Production of virus-free grapevine propagation material by tissue culture methods (mini review)**

**TURCSÁN M., OLÁH K., OLÁH R.**

National Agricultural Research and Innovation Centre,  
Research Institute for Viticulture and Oenology, Research Station of Kecskemét

E-mail: turcsan.mihaly@szbki.naik.hu

### **Summary**

Grapevine can be infected by numerous pathogens including viroids, viruses, phytoplasmas, bacteria and fungi. Since there are no properly developed methods for the defense against viruses and viroids causing infectious diseases, which can be used in vineyards, producing pathogen-free propagation materials has a critical importance. In the last decades researchers developed several techniques for the elimination of certain pathogens, particularly viruses. As effect of these methods are based on different mechanism, they are applicable with distinct effectiveness for the elimination of different grapevine viruses. The aim of this article is to review the most important results of the potential virus elimination techniques.

**Keywords:** meristem isolation, chemotherapy, somatic embryogenesis

### **Szerzők**

Turcsán Mihály – PhD hallgató, tudományos segédmunkatárs, NAIK Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, Kecskeméti Kutató Állomás, 6000 Kecskemét, Katona Zsigmond utca 5.

Oláh Krisztina – kutató mérnök, NAIK Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, Kecskeméti Kutató Állomás, 6000 Kecskemét, Katona Zsigmond utca 5.

Oláh Róbert – PhD, tudományos tanácsadó, NAIK Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, Kecskeméti Kutató Állomás, 6000 Kecskemét, Katona Zsigmond utca 5.