

DIPLOMADOLGOZAT

Utassy Kristóf

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Növényorvosi mesterképzési szak

Egyedi tüneteket okozó GFLV és ArMV fertőzések molekuláris vizsgálata szőlőn

Belső konzulens: Dr. Várallyay Éva
tudományos tanácsadó

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** MATE NVI, Növénykórtani
Tanszék, Genomikai
Kutatócsoport

Belső konzulens: Koósné dr. Szathmáry
Erzsébet
adjunktus

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** MATE NVI, Növénykórtani
Tanszék

Készítette: Utassy Kristóf

Budapest

2024

„A világ történelmében még SOHA nem állt rendelkezésre a lehetőségek ama tárháza,
mint most, ama személy számára, aki hajlandó szolgálni, mielőtt begyűjteni próbálna.”

Napoleon Hill

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	7
1.1 Problémafelvetés, témaválasztás indoklása	7
1.2 Célkitűzés	8
2. Szakirodalmi áttekintés	9
2.1 A szőlő gazdasági jelentősége	9
2.2 Nematodák	10
2.3 A szőlőt fertőző vírusok, viroidok és az általuk okozott tünetek	11
2.3.1 A szőlő korai vírusos leromlása (grapevine degeneration and decline).....	12
2.3.1.1 <i>Arabid mosaic virus</i> (ArMV).....	13
2.3.1.2 <i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV).....	13
2.3.1.3 <i>Grapevine deformation virus</i> (GDefV)	14
2.3.2 Levélsodródás (leafroll)	15
2.3.3 Faszöveti barázdáltság (rugose wood)	16
2.3.4 Látens foltosság (grapevine fleck)	17
2.3.5 Pararetrovírusok és a DNS vírusok megjelenése a szőlőben	18
2.3.6 Viroidok	18
2.4 RNS rekombináció	19
2.5 Hazai szőlőültetvények vírusfertőzöttsége	20
2.6 Nagy áteresztőképességű szekvenálás a vírusdiagnosztikában	21
3. Alkalmazott módszerek (anyag és módszer).....	22
3.1 Vizsgálatok helye	22
3.2 Vizsgálat anyaga.....	22
3.2.1 A vizsgált minták	22
3.2.2 A vizsgálat során alkalmazott enzimek, kitek.....	22
3.2.3. Felhasznált primerek.....	23
3.2.4. A bioinformatikai elemzések során használt bioinformatikai programok	25

3.3 Vizsgálatok módszere	25
3.3.1 Bioinformatikai elemzések	25
3.3.1.1 KisRNS szekvenálás bioinformatikai elemzése	25
3.3.1.2 RNS szekvenálás (RNAseq) bioinformatikai elemzése	25
3.3.2 cDNS szintézis	26
3.3.3 cDNS minőségének ellenőrzése PCR-rel.....	27
3.3.4 Primertervezés.....	27
3.3.5 RT-PCR.....	28
3.3.6 Gélelektroforézis	30
3.3.7 PCR termék tisztítása agaróz gélből	30
3.3.8 PCR-termék klónozása.....	31
3.3.9 Miniprep.....	31
3.3.10 Sanger szekvenálás és szekvenciaelemzés.....	32
4. Eredmények és értékelésük	33
4.1 Bioinformatikai elemzések	33
4.1.1 KisRNS könyvtárak elemzésének eredményei	33
4.1.2 RNAseq elemzések eredményei.....	34
4.2 cDNS szintézis – aktin teszt eredménye	35
4.3 RT-PCR eredménye.....	35
4.3.1 Nepovírus kimutatása a Furmint mintában a HTS alapján tervezett primerekkel ...	35
4.3.2 Nepovírus kimutatása a Szilváni mintában a HTS alapján tervezett primerekkel ...	37
4.4 Klónozás és a restriktió hasítás eredménye	38
4.5 Sanger szekvenálás elemzésének eredménye	38
4.5.1 A Furmint mintában található nepovírus szekvenciájának elemzése.....	38
4.5.2 A Szilváni mintában található nepovírus szekvenciájának elemzése	41
4.6 A mintákban található nepovírusok filogenetikai elemzése	43
4.6.1 Furmint mintában található nepovírus filogenetikai elemzésének eredményei	43

4.6.2 Szilváni mintában található nepovírus filogenetikai elemzésének eredményei.....	45
5. Következtetések és javaslatok.....	49
6. Összefoglalás.....	51
7. Köszönetnyilvánítás	53
8. Irodalomjegyzék.....	54
9. NYILATKOZATOK.....	58

1. Bevezetés és célkitűzés

1.1 Problémafelvetés, témaválasztás indoklása

2021-ben lettem figyelmes egy Demjén melletti dűlőben található 'Turán' szőlőfajtaival telepített parcellában egyedi tüneteket mutató szőlőtőkékre. A lombozat szokatlanul vörös volt már augusztusban is, vesszőik pedig laposan, torzan és szabálytalanul növekedtek (1. ábra). Az ott dolgozók elmondása alapján *Grapevine fanleaf virus*-sal (GFLV) volt fertőzött az állomány. A kutatás célja eredetileg az lett volna, hogy meghatározzuk ennek az egyedi tünetnek az okozóját (kórokozó vírusait) molekuláris módszerek segítségével. A terület tulajdonosa azonban felelősségteljesen felszámolta az ültetvényt. Így a MATE Növényvédelmi Intézet, Genomikai Kutatócsoport laborjának fagyasztójában található két hasonlóan egyedi tüneteket mutató szőlőmintáival kezdtük meg kísérleteinket. Az egyik minta egy 'Rizlingszilváni' ('Szilváni') fajtáról, Zala vármegyéből származott és hasonló tüneteket mutatott (2. ábra), mint a fentebb említett 'Turán'. Másik mintánk 'Furmint' fajtáról, a Kecskeméti Kutatóintézetből származott. Az eredeti származási helyét nem tudtuk kideríteni, azonban a kutatóintézetbe klónszelekció miatti vírusesztelés miatt került. Ez utóbbi esetben az okozott tünetek nem voltak olyan mértékűek, mint a 'Turán' vagy 'Szilváni' fajtáknál. Ismert, hogy a GFLV az említettekhez hasonló, de nem ennyire szélsőséges tüneteket képes okozni a szőlőn.



1. ábra: Egyedi tüneteket mutató 'Turán' szőlővessző (Fotó: Utassy)



2. ábra: Egyedi tüneteket mutató 'Szilváni' szőlővesszők (Fotó: Várallyay)

1.2 Célkitűzés

Kutatásunk során célul tűztük ki:

1. A 'Szilváni' és a 'Furmint' szőlőfajták vírusprofiljának meghatározását, nagy áteresztőképességű szekvenálás segítségével, különös tekintettel a nepovírusokra.
2. Az így kapott eredmények független módszerekkel történő visszaigazolását és elemzését.
3. A szőlőmintákban előforduló nepovírus (GFLV, GDefV, ArMV) variánsok molekuláris jellemzését.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1 A szőlő gazdasági jelentősége

A szőlő (*Vitis spp.*) a legrégebbi kultúrnövényeink közé tartozik. Régóta elterjedt növény Magyarországon, az itt élő népek már több mint 2000 éve foglalkoznak termesztésével a történelmi borvidékeken. A szőlő fontos gazdasági növény, világszerte széles körben termesztik, elsősorban gyümölcséért, melyet feldolgozatlan (friss gyümölcs), illetve feldolgozott (bor, szeszes ital, mazsola) formában is fogyasztanak. A bor, mely belőle készül jelentős kulturális és gazdasági értéket képvisel és a világ élvezeti cikkeinek listáján az eső helyek egyikét foglalja el. A jelenleg elérhető 2023-as adatok szerint 7 201 944 hektáron folyik termesztése a világon (OIV, 2023). Magyarországon a termőterület nagysága az elmúlt években csökkenő tendenciát mutat, a 2024-es adatok szerint összesen 58 258 hektár (HNT, 2024), mely nagyrészt borvidéki területeken található. Területi eloszlása a 22 hazai borvidéken: 1. Kunsági – 19 161,4814 ha; 2. Mátrai – 5 819,2568 ha; 3. Egri – 5 360,9752 ha; 4. Tokaji – 5 027,1906 ha; 5. Balatonboglári – 3 403,5076 ha; 6. Villányi – 2 276,2207 ha; 7. Szekszárdi – 2 135,5121 ha; 8. Tolnai – 1 990,4450 ha; 9. Balatonfüred-Csopaki – 1 792,0948 ha; 10. Hajós-Bajai – 1 728,4956 ha; 11. Etyek-Budai – 1 603,2733 ha; 12. Soproni – 1 291,4446 ha; 13. Badacsonyi – 1 152,4354 ha; 14. Neszmélyi – 868,7664 ha; 15. Bükki – 743,1046 ha; 16. Csongrádi – 706,3187 ha; 17. Zalai – 641,6742 ha; 18. Balatonfelvidéki – 638,8018 ha; 19. Pannonhalmi – 559,6487 ha; 20. Pécsi – 484,5763 ha; 21. Somlói – 453,9861 ha; 22. Móri – 419,0844 ha (HNT, 2024).

Az egészséges szaporítóanyag alkalmazása és kiválasztása az alapja a minőségi és hatékony szőlőtermesztésnek. Ezeket szigorúan szűrik a gazdaságilag jelentős vírusokra. Látens módon lehetnek jelen a növényekben a fertőzés szisztemikus jellege miatt, ebből kifolyólag a tünetmentes szaporítóanyaggal könnyen tovább tudnak terjedni, miután pedig bekerültek az ültetvénybe jelentős gazdasági kárt tudnak okozni. Egyetlen módja a kártétel csökkentésének, ha a terjedésnek elejét vesszük a kórokozómentes szaporítóanyag előállításával, ami az alkalmazott diagnosztikai módszerek megbízhatóságától és pontosságától nagymértékben függ.

2.2 Nematodák

A Földön a fonálféreg törzse példányszámával az első, fajszerével a harmadik helyen áll. Életformájukat tekintve lehetnek paraziták (élősködők) vagy szabadon élők, mint növényi nedvszívók. A fitonematoda kártevők jelentős szerepet töltenek be a növényvédelemben. A 4000-et is meghaladja az eddig leírt fajok száma. Jelentős kártételt, súlyos termésvesztést a vándorló gyökérkárosító életmódot folytató egyes *Longideridae* és *Trichoderidae* család fajai okozhatnak. Megtámadhatják a szárat, rügyet és gyökérzetet, de növényi vírusvektorokként is fontos szerepet játszanak. Nehezíti az ültetvények védelmét, hogy a hazai szőlőültetvények fonálféreg összetételéről, fajairól kevés adat áll rendelkezésre. A nematocid készítmények használata az elsődleges eljárás a fonálféreg elleni védekezésben elsősorban a kertészetekben és a mezőgazdaságban. A fitonematoda fajok sok mindenben eltérnek egymástól, azonban a szájszurony mindegyikre jellemző, ez fajokonként eltérő, de a szájból kilőve mindegyiké képes a növényi sejtet megsérteni. Az első kártevő fonálférget a búzáról írták le 1743-ban, ez volt a búza-fonálféreg (*Anguina tritici*), követte ezt a 20. század második felében több gazdaságilag fontos nematoda csoport leírása, mint a gyökérgubacs képző fonálféreg (*Meloidogyne* spp.), a cisztaképző fonálféreg (*Heterodera* spp.) és a levélfonálféreg (*Aphelenchoides* spp.). Vírusvektorként ismertek azok a fajok, melyek hosszú szájszuronnyal rendelkeznek, ilyenek a *Longidorus* spp., *Xiphinema* spp. és a *Trichodorus* spp.. Kizárólag a *Dorylaimida* rendbe tartozó fitonematodák képesek vírusterjesztésre és két asszociációs forma alakult ki az átvihető vírusok és a fonálféreg között. Poliédrikus, illetve izometrikus partikulummal rendelkező vírusok átvitelére csak a *Longideridae* családba tartozó *Xyphinema* és *Longidorus* fajok képesek, míg a megnyúlt, pálcika alakú, illetve tubuláris partikulummal rendelkező vírusokat a *Trichoderidae* családba tartozó *Trichodorus* fajok képesek terjeszteni. Azt, hogy mely rendbe tartozó fajok képesek vagy nem alkalmasak vírusok átvitelére összefüggésben van a különböző fonálféreg fajok eltérő szájszervi felépítésével. Mutatkozhatnak eltérések a vírusátviteli képességben az eltérő ivarú fonálféreg és a különböző fejlődési stádiumban lévő egyedek között is (Andret-Link et al., 2017; Daragó, 2014).

2.3 A szőlőt fertőző vírusok, viroidok és az általuk okozott tünetek

A világ számos részén vizsgálják a szőlő betegségeinek eredetét, így a vírusokat, viroidokat is, melyek komoly gazdasági kárt okozhatnak. Az egészséges szaporítóanyag fontos alapja a vírusok elleni védekezésnek, mivel növényvédőszer ellenük nem áll rendelkezésre. Napjainkig több mint 100 különböző vírust azonosítottak a szőlőből, legyen az *Vitis* vagy *Muscadinia* nemzetségbe tartozó növény. Közülük közel 30 vírust hoznak kapcsolatba a négy nagy tünetcsoport komplexszel: a szőlő korai vírusos leromlását okozó (grapevine degeneration and decline) 12 eurázsiai/európai/mediterrán- és négy amerikai nepovírust; a levélsodródást (leafroll) okozó öt; a faszöveti barázdáltságot okozó (grapevine rugose wood) hat, és a látens foltosságot (grapevine fleck) okozó négy vírust (Martelli, 2017).

Összehasonlításképp 7 szőlőt fertőző viroidról van tudomásunk, azonban ezek közül csak kettő esetén tapasztalunk elváltozást a növényeken.

A szőlőt fertőző vírusok többsége pozitív vagy negatív egyszálú RNS genommal rendelkezik. Néhányan közülük duplaszálú RNS genommal rendelkeznek és nemrégiben DNS genommal rendelkező vírusok is megjelentek. Vektorok között tartjuk számon a talajlakó fonálférgeket, a kagylós- és viaszos pajzstetveket, az atkákat és a kabócákat (Martelli, 2017).

A tünetek számos módon jellemezhetők. Többek között deformáltsággal a leveleken és a vesszőkön, elszíneződésekkel a leveleken – mint vörösödés, sárgulás, klorózis- vagy világos foltosság, gyűrűsfoltosság és vonalas mintázottság –, barázdáltsággal és/vagy gödrösödéssel a faszövetben, a pártasapok lehullásának késleltetése, a törpülés és a leromlás szintén vírusfertőzésre utalhatnak. Megrövidíthetik a szőlőültetvény életképességét és negatívan hathatnak a termés minőségére és mennyiségére is (Cseh et al., 2008; Várallyay, 2023).

A három fő betegségkomplex (fertőző leromlás, levélsodródás és faszöveti barázdáltság) főbb kórokozói vagy izometrikus virionnal rendelkező vírusok, amelyek közül a legfontosabbakat a fonálférgek terjesztik (nepovírusok), vagy fonál szerű virionnal rendelkező vírusok, amelyeket a teknős- vagy viaszos pajzstetvek terjesztenek (closterovírusok és vitivírusok). A negyedik tünetcsoport (grapevine fleck) vírusainak nem ismertek a vektorai (Martelli, 2017).

A fertőzött szőlő-szaporítóanyagok a felelősek a szőlőt fertőző növényi vírusok és a rokon kórokozók nagy távolságra történő terjedéséért. Közülük több faj már világszerte elterjedt, és olyan területekre is eljutott, ahol a szőlőművelés terjeszkedik. További 50 vírusnak

bizonyított jelenléte a szőlőben, azonban ezek megismeréséhez, biológiájuk megértéséhez további kutatások és vizsgálatok szükségesek.

2.3.1 A szőlő korai vírusos leromlása (grapevine degeneration and decline)

A fertőző leromlás feltételezett kórokozóiként a *Nepovirus* nemzetségbe sorolt izometrikus virionnal rendelkező vírusokat (kivéve a *Strawberry latent ringspot virus*-t, amely a *Secoviridae* család nem meghatározott tagja) ismerik el, amelyek közül soknak (a szőlőt fertőzők közül nyolcnak) van ismert fonálféreg vektora. E vírusok genomja osztott, két, egyszálú, pozitív irányultságú RNS molekulával rendelkeznek.

Közülük eddig 16 faj teljes genomszekvenciáját határozták meg: *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leafroll virus* (CLRV), *Grapevine Anatolian ringspot virus* (GARSV), *Grapevine Bulgarian latent virus* (GBLV), *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV), *Grapevine deformation virus* (GDefV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Artichoke Italian latent virus* (AILV), *Grapevine Tunisian ringspot virus* (GTRSV), *Peach rosette mosaic virus* (PRMV) és *Blueberry leaf mottle virus* (BLMoV) (Várallyay, 2023). E szekvenciák összehasonlító elemzése feltárta, hogy az RNS2 szintjén történő rekombináció hatékony evolúciós mechanizmusa ezeknek a vírusoknak, ami interspecifikus hibridek és új vírusfajok kialakulását eredményezi (Martelli, 2014). Ez utóbbira példa a GCMV, amely a TBRV és a GARSV közötti rekombináns (Digiaro et al., 2015), valamint a GDefV, amely a GFLV és az ArMV közötti rekombináns (Elbeaino et al., 2012).

A degeneratív betegségekben szerepet játszó vírusokat óvilági nepovírusoknak nevezzük, mivel – a GFLV kivételével, amelynek elterjedése az emberi tevékenység miatt világméretű – ezen a földrajzi területen fordulnak elő, és vektoraik azonos területi elterjedésűek. Így a degeneratív betegségek és a hozzájuk kapcsolódó kórokozók a kontinentális és mediterrán Európában uralkodnak, ahonnan valószínűleg származnak, míg más, „szőlőhanyatlásnak” nevezett betegségek esetében a kiváltó vírusok és vektorok elsősorban Észak-Amerikában találhatók. A szőlő korai vírusos leromlása amerikai gyökereit az bizonyítja, hogy szinte kizárólag az Egyesült Államok északi részén és Kanadában termesztett *Vitis vinifera* és *V. labrusca* fajtáknál fordulnak elő. A kiváltó vírusok (ToRSV, PRMV és ToRSV) eredete, más földrajzi területeken való jelenléte visszavezethető véletlenszerű behurcolásukra, és a vektorok elterjedése, amelyek nagyrészt Észak-Amerikára korlátozódnak (Martelli, 2017).

A *Nepovirus* nemzetség (*Picornavirales* rend, *Secoviridae* család, *Comovirinae* alcsalád) tagjait három alcsoportba (A, B, C) sorolják szerológiai tulajdonágok, az RNS2 becsomagolódása, hossza és genomszerveződése, a proteináz hasítási helyek specificitása és a köpenyfehérje (CP) gén szekvencia filogenetikai elemzése alapján (Elbeaino et al., 2012).

2.3.1.1 *Arabid mosaic virus* (ArMV)

Az ArMV az A típusú tökesatnyulás betegség kórokozója, szerológailag rokon vírus a szőlő fertőző leromlás kórokozójával. A világon először a volt Jugoszlávia területén azonosították 1963-ban, szőlőről először 1964-ben írták le (Panjan and Saric, 1963). A fertőző leromláshoz nagyon hasonlítanak a kórokozó által előidézett tünetek, rendszerint együtt fordulnak elő a szőlőben. Az ArMV széles gazdanövénykört tudhat magának, ebbe beletartozik számos különböző gyomnövény is. Fonálférgek vesznek részt a vírus terjesztésében, elsősorban a *Longidorus caespiticola*, a *Xiphinema coxi* és a *Xiphinema diversicaudatum*, valamint ezen kívül ismeretes még a maggal, oltással és fertőzött szaporítóanyaggal való terjedése is. Hagyományos virológiai vizsgálatoknál alkalmazott legfontosabb tesztnövénye a *Nicotina glutinosa*, amelyen pettyeket és feltűnő klorotikus gyűrűzöttséget okoz. Fás szárú indikátornövényei a *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir, az FS 4 (Siegfriedrebe) és a *Vitis rupestris* cv. St. George (Cseh et al., 2008).

2.3.1.2 *Grapevine fanleaf virus* (GFLV)

A *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) a szőlő fertőző leromlás kórokozója. Osztott genomja két pozitív egyszálú RNS-ből áll. A világ már minden szőlőtermesztő területén megjelent a vírus. Az összes fajtát képes fertőzni, a szőlő legjelentősebb vírusa. Nemcsak a tőkék élettartamára, de a produktivitásukra is hatással van. Egyszerre több törzse is jelen lehet a szőlőben és rendkívül változatos tüneteket okozhat. Fertőzést követően megfigyelhető a tőkén a néhány éven belüli leromlás vagy a gyors pusztulás. A következő tünetek jelennek meg a vesszőkön: az ízköz rövid, szalagos, ellaposodott hajtások és fürtök, villás elágazások és dupla nóduszok kialakulása. Jellemzőek a különböző levéldeformációk, páfránylevélre emlékeztető lefutású levelek, a levél széle erősen fogazott, aszimmetrikus levéllemez, valamint gyakori a klorotikus foltok megjelenése. Két törzse ismert, a *Grapevine fanleaf virus* – yellow mosaic strain (GFLV-YM), vagyis a sárga mozaik törzs és a *Grapevine fanleaf virus* – vein banding strain (GFLV-VB), azaz az ér menti szalagosodás törzs. Azon tőkék, melyek a sárga mozaik törzsszel fertőzöttek krómsárga elszíneződést mutatnak és ez már kora tavasszal megmutatkozik. Teljesen elsárgulhat a levéllemez vagy az érközi és érmenti területeken kiterjedt foltok jelenhetnek meg. Ér mellett végigfutó, sárga, szalagszerű, hosszanti lefutású klorotikus

mintázat, illetve sárga foltok figyelhetők meg az ér menti szalagosodás törzsnél. Nyáron és ősszel különösen jól látszanak ezek a tünetek. A sárga mozaik és az ér menti szalagosodás törzsek enyhe levéldeformációt is okoznak, a világossárga elszíneződésen felül. A fertőzött egyedeken kisebb és kevesebb lesz a rügyek száma. A fertőzött bogyókban gyakran nem fejlődik mag, vagy kicsik maradnak, összeaszalódnak, kiszáradnak. A GFLV elsősorban fonálférgekkel terjed, *Xiphinema index* vagy *X. italiae* egyedekkel. Az átvitel szemiperzisztens nem cirkulatív. De ismert a maggal és a szaporítóanyaggal történő terjedése is. Fás szárú indikátornövényei a *Vitis rupestris* cv. St George, az FS 4 (Siegfriedrebe) és a *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. Legfontosabb lágyszárú tesztnövénye a *Chenopodium quinoa*, melyen levéldeformációt, szisztémikus klorotikus pontokat és ritkán lokális léziókat idézhet elő (Cseh et al., 2008).

2.3.1.3 Grapevine deformation virus (GDefV)

A Grapevine deformation virust először Törökországban írták le 2003-ban *Vitis vinifera* cv. Kara Dimrit fajtáról (Cigsar et al., 2003). A GDefV egy nemrégiben felfedezett rekombináns vírus. A GFLV és az ArMV rekombinációjából jött létre, szerológiailag távoli rokonságot mutat az ArMV-vel, a GFLV-vel viszont nem (Elbeaino et al., 2012). A vírusgenom RNS1 szál szekvenciáját 2012-ben (Elbeaino et al., 2012), az RNS2 szálét pedig 2005-ben (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2005) határozták meg. (Cigsar et al., 2003) megállapították, hogy az általuk vizsgált négy különböző növény család 12 növényfajából 10-et tudott megfertőzni. A *C. foetidum* kivételével, amely tünetmentesen volt fertőződött, minden *Chenopodium* fajnál klorotikus vagy nekrotikus lokális elváltozásokat okozott, amelyeket később a levelek szisztémikus foltosodása és deformálódása követett. A *C. amaranticolor* reakciója feltűnően hasonló volt az ArMV és a GFLV által kiváltott reakciókhoz. Ezekkel a vírusokkal ellentétben azonban nem okozott tüneteket a *Gomphrena globosa* és a legtöbb vizsgált *Nicotiana* fajon. A közelmúltban végzett vizsgálatok rámutattak a GDefV feltételezett „szülői szerepére” egyes amerikai GFLV-izolátumokban előforduló interspecifikus rekombinációs eseményekben, különösen a homing (2AHP) és a mozgásfehérje (2BMP) doménekben (Mekuria et al., 2009). A nepovírusok 2Ccp doménjében a fajok közötti rekombinációs események előfordulása valószínűtlennek tűnt, mivel egy olyan doménról van szó, amely a vírus és a vektor közötti kapcsolatok meghatározásában is szerepet játszik. Egyenőre tisztázatlan, hogy a GDefV terjedésében *Xiphinema* vagy más fonálféregfajok részt vesznek-e, de a GDefV és az ArMV CP-jének hasonlósága miatt a *X. diversicaudatum* egy potenciális vektorfaj lehet. Bár a nepovírusoknál nem ritkák az interspecifikus rekombinációk,

ezek általában olyan genomi régiókat érintenek, amelyek nem befolyásolják a fajok rendszertani hovatartozását. Ezért a GDefV esete elég szokatlan, hiszen a rekombinációs események hatására egy új vírusfaj keletkezett (Elbeaino et al., 2012; Vigne et al., 2008).

2.3.2 Levélsodródás (leafroll)

A levélsodródás betegség szőlőről szőlőre történő átvihetőségét először Németországban bizonyították (Scheu, 1936). Egy évtizeddel később Harmon és Snyder (1946) Kaliforniában leírtak egy szőlő oltványokkal átvihető betegségét az 'Emperor' szőlőfajtán, melyet „White Emperor” betegségnek neveztek el (Harmon and Snyder, 1946). Ez a betegség további egy évtized múlva, ismét Kaliforniában, a levélsodródás betegséggel azonosnak bizonyult. Így az 1960-as évek elején a levélsodródás betegség fertőző jellegét megállapították, de kórokozója még mindig ismeretlen volt. A fertőzött német szőlőkben felfedezett fonál alakú vírusszerű részecskék jelentőségét figyelmen kívül hagyták, annak ellenére, hogy feltűnő hasonlóság mutatkozott egy *Closterovirus* a *Citrus tristeza virus* (CTV) által fertőzött citrusfélékkel. Az áttörés néhány évvel később következett be, amikor Japánban closterovírus-szerű részecskéket találtak levélsodródás tüneteket mutató szőlőben, és jelenlétüket összefüggésbe hozták a betegséggel. A levélfodrosodással összefüggő két, szerológiailag eltérő tulajdonságú closterovírust 1984-ben Svájci kutatók részleges jellemezték. Ezeket a vírusokat „I. típusú” és „II. típusú” vírusoknak nevezték el. Az ezt követő években a levélsodródással fertőzött szőlőkben talált, feltételezhetően új closterovírus-fajok száma gyorsan nőtt, ami szükségessé tette státuszuk és nevezéktanuk felülvizsgálatát. A vírusfajok számát hatra csökkentették, és nevüket a *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) elnevezésben határozták meg, amelyet egy arab szám követ, pl. GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 és így tovább (Boscia et al., 1995).

Sok éven át úgy gondolták, hogy a levélsodródás nem terjed az ültetvényben, és a különböző országokból származó, ezzel ellentmondó jelentések nem kaptak elég figyelmet. Akkor történt előrelépés, amikor kiderült, hogy a *Grapevine virus A-t* (GVA), amelyet akkoriban a „rövid closterovírus” kategóriába soroltak, a *Pseudococcus longispinus* viaszos pajzstetű terjeszti (Rosiglion et al., 1983).

A *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) vektora a *Planococcus ficus*. Később megállapították, hogy az átvitel nem fajspecifikus (több vektor) és semi-perzisztens. A closterovírusok hajlékony, fonál alakú virionnal rendelkeznek, a *Closteroviridae* család fajai négy nemzetségbe sorolhatók: *Closterovirus* (vektorai a levéltetvek), *Ampelovirus* (vektorai a viaszos- és egyéb pajzstetvek), *Crinivirus* (vektorai a liszteskék) és *Velarivirus* (vektor

ismeretlen). A szőlőt fertőző clostervírusok a *Clostervirus*, *Ampelovirus* és *Velarivirus* nemzetségekbe tartoznak, és genomjuk mérete (13 700 és 18 500 nukleotid közötti) valamint szerkezete (6 és 12 gén között) eltérő (Martelli, 2014). Ezek a különbségek feltehetően egy primitív replikálódó vírusszekvencia evolúciójára vezethetők vissza. A szekvencia sorozatos, egymást követő módosulásokon, úgymint nukleotidok delécio miatti elvesztésén, idegen forrásból származó szekvenciák megszerzésén, génduplikáción, majd diverzifikáción és genom-bipartíción ment keresztül (Dolja et al., 2006). Bár a levélsodródás ma a szőlő egyik legelterjedtebb vírusos betegsége a világon, úgy tűnik, hogy az Óvilágból származik, ahol a betegség valószínűleg már jóval a filoxéra megjelenése előtt is előfordult.

2.3.3 Faszöveti barázdáltság (rugose wood)

A faszöveti barázdáltság egy oltással terjedő betegség, amelyet először Olaszországból (Graniti and Martelli, 1965), majd nem sokkal később Magyarországról (Martelli et al., 1967) jelentettek. Egy összetett betegségről van szó, amellyel kapcsolatban a *V. rupestris* LN33 és Kober 5BB indikátorokon megjelenő eltérő reakciók alapján négy különböző tünetegyüttest azonosítottak: *Rupestris* törzsrothadás (RSP), *Kober* törzsrothadás (KSG), *Corky bark* (CB) és LN33 törzsrothadás (LNSG). A faszöveti barázdáltság etiológiája sokáig bizonytalan maradt, mígnem egy tüneteket mutató szőlőből mechanikus inokulációval sikerült egy olyan vírus izolálása, amelynek részecskéi hasonlítanak a clostervírusokéhoz. Ez alátámasztotta a feltételezett vírusos jelleget. E vírus nevét, amelyet eredetileg *Grapevine stem pitting-associated virus*nak neveztek el, később *Grapevine virus A*-ra (GVA) változtatták. Hamarosan más hasonló vírusokat is azonosítottak a fertőzött szőlőkben, amelyek közül négyet, a *Grapevine virus B* (GVB), a *Grapevine virus D* (GVD), a *Grapevine virus E* (GVE) és a *Grapevine virus F* (GVF) a GVA-val együtt a *Vitivirus* nemzetségbe, míg egy további fajt, a *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*-t (GRSPaV), az új *Foveavirus* nemzetségbe soroltak. A faszöveti barázdáltság és feltételezett kórokozói közötti kapcsolat alapján a GRSPaV és a GVA a Kober törzshorrszolással, a GVB és a GVD a *Corky bark*kal hozható összefüggésbe, míg az LN33 törzsrothadáshoz nem társul specifikus vírus. Egyelőre nincs bizonyíték az ok-okozati összefüggésre két további vitivírus esetében, amelyeket a közelmúltban olyan szőlőtőkékben találtak, amelyek vagy törzshorrszolást (GVE), vagy oltvány-összeférhetetlenséget (GVF) mutattak. Áttörést jelentett a faszöveti barázdáltság járványtanában, amikor kísérleti úton megállapították, hogy a GVA-t a *Pseudococcus longispinus* terjeszti (Martelli, 2014). Ez jelentette az első bizonyítékot arra, hogy az addig DNS-vírusok vektoraiként ismert viaszos pajzstetvek képesek RNS-vírusokat is átvinni.

Később megállapították, hogy a clostrovírusokhoz hasonlóan a vitivírusok átvitele is semiperezisztens, és nem fajspecifikus. A vitivírusok vektorai gyakran azonosak az ampelovírusok esetében azonosított fajokkal (Martelli, 2014).

A vitivírusok és a foveavírusok rendkívül hajlékony, fonálszerű virionnal rendelkeznek, amelyek morfológiája hasonlít a clostrovírusokéra, amelyekkel hasonló evolúciós úton fejlődtek, ugyan úgy, mint a *Trichovirus* nemzetség fajai. Ez utóbbi vírusok azonban nem vesznek részt a faszöveti barázdáltság tünetegyütteseinek kialakításában sem, de két különböző faj, a *Grapevine berry inner necrosis virus* (GINV) és a *Grapevine pinot gris virus* (GPGV), amelyeket atka vektor terjeszt, patogén a szőlőre. A GRSPaV a faszöveti barázdáltságot okozó vírusok közül a legelterjedtebb, a *Foveavirus* nemzetség egyik meghatározó faja. A GRSPaV mechanikusan nem terjed, a pollenszemekben való jelenléte ellenére nem bizonyított a magról való terjedése, és nincs ismert vektora sem. Egy carlavírus és egy potexvírus közötti ősi rekombinációs eseményből fejlődhetett ki. A múltban különböző *Vitis*-fajokban maradhatott fenn, és miközben alkalmazkodott hozzájuk, több változatscsoportja alakult ki. A négy fő variáncsoport közül kettő a *V. riparia* és a *V. rupestris* (amerikai fajok), míg a másik kettő a *V. sylvestris* és a *V. vinifera* fajokhoz (óvilági fajok) köthető (Martelli, 2017).

2.3.4 Látens foltosság (grapevine fleck)

Azon vírusos betegségek tartoznak ebbe a tünetcsoportba, melyek okozói látens formában jelennek meg az amerikai alanyokban és európai szőlőfajtákban, így ezeken szabad szemmel tünetek nem láthatók, a fertőzés azonban indikátorfajokkal kimutatható. A betegséget először 1962-ben írta le Kaliforniában Hewitt (Hewitt et al., 1972). Magyarországon elsőként Lehoczky és Farkas igazolták előfordulását 1981-ben (Lehoczky and Farkas, 1981). A kórokozó a *Grapevine fleck virus* (GFkV), a *Maculavirus* nemzetség típusfaja, a *Tymoviridae* családba tartozik. A vírus a floémában lokalizálódik, mechanikailag nem, szaporítóanyaggal azonban terjed (Cseh et al., 2008), és kísérleti úton aranka-fajokkal átvihető (Martelli et al., 2002). A *Vitis rupestris* cv. St. George növényekre oltással átvihető és ezen tüneteket okoz. A harmad- és negyedrendű erek közelében jelennek meg áttetsző foltok, ezek a leveleket a fény felé tartva jól kivehetőek. Az intenzíven foltosodó levelek fölfelé pöndörödnek, csavarodottak, ráncosak és eltorzulhatnak (Cseh et al., 2008). A virion 30 nm átmérőjű, izometrikus szimmetriájú, a vírusgenom egy pozitív egyszálú RNS-ből áll (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2003). Ezen tulajdonságokkal osztozik három további vírus a *Grapevine rupestris vein feathering virus*

(GRVfV) a *Grapevine asteroid mosaic-associated virus* (GAMaV) és a *Grapevine redglobe virus* (GRGV), ezek a GfKV-val közösen a „fleck-komplexet” alkotják (Martelli, 2014).

2.3.5 Pararetrovírusok és a DNS vírusok megjelenése a szőlőben

Egészen néhány évvel ezelőttig csak néhány nem RNS genommal rendelkező vírust fedeztek fel a szőlőnövényekben. Az áttörés akkor következett be, amikor az újgenerációs szekvenálás során kiderült, hogy az USA közép-nyugati régiójában a vesszők pusztulása és hanyatlása által érintett szőlőültetvényekben egy badnavírust, a *Grapevine vein clearing virus*-t (GVCV) sikerült kimutatni (*Caulimoviridae* család). Ezt hamarosan követte a *Geminiviridae* család egy feltételezett tagjának, a *Grapevine red blotch-associated virus* (GRBaV) jelenlétének a felfedezése – először az Egyesült Államokban (12 különböző államban) és Kanadában, majd Svájcban –, olyan szőlőben, amely levelei vörös foltos elszíneződést mutattak, illetve egy másik badnavírus, a *Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus* (GRLDaV) azonosítása a lombozat elszíneződésével érintett görög szőlőben és egy dél-olaszországi, tünetmentes borszőlőben. E vírusok epidemiológiájáról nem sokat tudunk, kivéve azt, hogy a GRBaV-t a virginiai kabóca (*Erythroneura ziczac*) és a lucernakabóca (*Spissistilus festinus*) terjeszti. Ez utóbbi vektor valószínűleg epidemiológiai jelentőséggel bír Közvetett bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy a GRBaV terjed, amint azt vadon élő *Vitis* fajokban, például *V. californica* x *V. vinifera* hibridekben való kimutatása mutatja (Perry et al., 2016). Bizonyítékok vannak a GRLDaV és a GRBaV fertőzött szőlőkre gyakorolt káros hatására is (Martelli, 2017).

2.3.6 Viroidok

A viroidok a gazdaszervezetben autonóm replikációval rendelkező szubvirális kórokozók. Fehérjeburokkal nem rendelkeznek, cirkuláris RNS-sel bírnak, ez 246-375 nt nagyságú lehet, mely sokkal rövidebb, mint a legkisebb vírusgenom. Hasonlóan a vírusokhoz a viroidok is családokba, nemzetségekbe és fajokba sorolhatók. Két család ismert, a *Pospiviroidae* és az *Avsunviroidae*, amelyeknek megkülönböztető jellemzőik vannak. A *Pospiviroidae* családra jellemző a központi konzervált régió jelenléte a másodlagos szerkezetben és a nukleáris replikáció, míg az *Avsunviroidae* család fajai egy elágazó másodlagos szerkezettel rendelkeznek, amelyből hiányzik a központi konzervált régió, jellemző a ribozimek jelenléte és a plasztidális replikáció. Egészen a közelmúltig öt szőlőfertőző viroidot ismertek, amelyek mindegyike a *Pospiviroidae* családba tartozik: *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1), *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2), *Australian grapevine viroid* (AGVd), *Hop stunt viroid* (HSVd) és *Citrus exocortis viroid* (CEVd). A szőlőviroidok

listájának legújabb kiegészítései a *Grapevine latent viroid* (GLVd) és egy viroidszerű RNS, amely szerkezeti hasonlóságot mutat az *Avsunviroidae* család tagjaival, ezek biológiai szerepe a szőlőben még nem tisztázott. Csak a GYSVd-1 és a GYSVd-2 patogén a szőlőre, és sárga foltnak nevezett betegséget okoznak. Egy másik, „érsávózódás” (vein banding) néven ismert betegség bizonyítottan ezen viroidok és a GFLV együttes fertőzésének eredménye (Martelli, 2017).

2.4 RNS rekombináció

A rekombináció és mutáció fontos forrásai a változékonyságnak. Az RNS vírusok evolúciójában jelentős szerepe van a rekombinációnak (replikáció során okozott hibák kijavítása; adaptáció; defektív interferáló RNS-ek keletkezése). Elkülönítünk interspecifikus és intraspecifikus rekombinációt, előbbi a vírusok makroevolúciójában játszott fontos szerepet, utóbbi a fajon belüli genetikai változékonysághoz közvetlenül hozzájárul. Két eltérő RNS molekula asszociálódása történik meg az RNS rekombináció során, ennek következtében létrejöhetnek új genetikai kombinációk. Az RNS rekombinációnak három típusát különböztetjük meg: 1. Homológ: két olyan hasonló vagy közeli rokon RNS molekula között megy végbe, melyek szekvenciája erősen homológ, a létrejött rekombináns molekula pedig a szülői molekulák szerkezeti felépítését és szekvenciáját megőrzi. 2. Aberráns-homológ: két szekvenciájában hasonló RNS molekula között jön létre, a rekombináns molekula duplikációt vagy deléciót hordoz, szerkezetében eltér a szülői molekuláktól. 3. Nem-homológ: szekvenciájukban eltérő RNS molekulák között történik meg. Leggyakrabban templát cserével valósul meg az RNS vírusoknál a rekombináció. Természetes körülmények között homológ és nem-homológ rekombinációt is számos növényi vírusnemzetségnél feljegyeztek. A nepovírusok között számos kritériumnak kell megfelelni, hogy a nemzetségbe soroljanak egy vírust. Fajok elkülönítésének több kritériuma van. A *Picornovirales* rend, *Sarcoroviridae* család tagjainál e kritériumok közé tartozik többek között a 70-80% közötti köpenyfehérje (CP) aminosav szekvencia azonosság és a 75-85% közötti konzervált proteáz-polimeráz régió szekvencia azonosság (ICTV, 2011). Fontos feltétele az RNS rekombináció bekövetkeztéhez, hogy ugyanazon sejtben helyezkedjenek el a rekombinálódó RNS-ek (Lai, 1992; Nagy and Simon, 1997; Simon and Bujarski, 1994)

2.5 Hazai szőlőültetvények vírusfertőzöttsége

Nehéz következtetni a hazai szőlőültetvények vírusfertőzöttségére a filoxéra vész előtti időkből. Azelőtt az ültetvények vegyes összetételűek voltak és a szőlőt dugványokról szaporították. A kutatók a ligeti szőlőt (*Vitis sylvestris*) vizsgálatával tudnak következtetni arra, hogy a járvány előtti időben milyen lehetett a hazai szőlőket fertőző vírusok faji összetétele, mivel a ligeti szőlő magas vízállású, mocsaras élőhelyénél fogva nem volt kitéve az 1875-ben lezajlott filoxéra járványnak. Azonban a legújabb kutatások sem tudtak az utóbbi 10-15 évben leírt vírus fajokat kimutatni ebből a fajból (Fábián, 2020). A filoxéravész óta oltványokkal szaporítotják a szőlőt, így fontossá vált az egészséges szaporítóanyag használata. Hazánkban a 60-as években kezdték meg a szőlővírusok kutatását Lehoczky János és munkatársai, számos kórokozó első leírását tették meg Magyarországon. A kutatások főként a patogének kimutatására, jellemzésükre, életmódjuk megismerésére irányultak, mindezek ismerete lehetőséget nyújtott egy, a fertőzött szőlőtőkék kiszűrésére szolgáló rendszer kidolgozására. Azonosították eddig hazánkban: a GFLV, az ArMV, a TBRV, a GCMV, a GBLV, az AMV, a GFkV, a GPGV, a GSyV-1, a GLRaV 1-4, a GVA, a GVB és a GRSPaV vírusokat. Érdekesség, hogy a GLPV kórokozót szőlőn még csak Magyarországon írták le. Magyarországon ezen munkáknak köszönhetően a szaporítóanyag előállítás során a szőlővirológiai vizsgálatok kötelezővé váltak. A szaporítóanyagok ellenőrzését a 87/2006.(XII.28) FVM rendeletben foglaltak szerint kell végezni. Annak ellenére, hogy több mint 100 vírus előfordulása ismert a szőlőben, nagyon kevés a vizsgálatköteles patogének száma, csupán ArMV-, GFLV-, GLRaV1-, GLRaV3-, GVA- és GVB-mentesnek kell lennie a szaporítóanyagoknak. A közeljövőben számítani lehet egyes vírusok hazai megjelenésére, mint például a RpRSV, a SLRSV, a TRSV vagy a ToRSV. Ezek egyre nagyobb veszélyt jelentenek a szőlő szaporítóanyag vírusmentességének elérésében. Azáltal, hogy folyamatosan kutatjuk és azonosítjuk az újonnan megjelenő növényi vírusokat, illetve tökéletesítjük a kimutatásukra használt módszereket, a jövőben időben fel tudjuk ismerni a fertőzéseket. Mindennek eredményeképpen, a termelőknek a legkisebb kárt okozva, a fertőzött tőkéket időben ki tudjuk vonni az ültetvényekből (Cseh et al., 2012, 2008; Jaksa-Czotter, 2019).

2.6 Nagy áteresztőképességű szekvenálás a vírusdiagnosztikában

A nagy áteresztőképességű szekvenálási technikák (HTS – High Throughput Sequencing) a molekuláris genetikai vizsgálatok területén új lehetőségeket teremtettek. Ezek az eddigieknél jóval érzékenyebb módszerek, melyek alkalmasak növényi vírusok kimutatására. A vírusdiagnosztikában a legelterjedtebb vizsgálati módszereknek eddig a szerológiai és a PCR-alapú tesztek számítottak. Ezeket a független módszereket jelenleg is széleskörben használják és a kutatások fontos módszertani alapját képezik megbízhatóságuknak és kedvező árúknak köszönhetően. A HTS előnye abban rejlik, hogy míg a szerológiai módszerek esetében egy adott kórokozó kimutatásához specifikus ellenanyagra van szükség, a PCR során pedig a patogén szekvenciájának legalább egy részét ismernünk kell a primertervezés érdekében, addig a HTS használatához semmilyen előzetes információra nincs szükségünk. Képes meghatározni a gazdaszervezet viromját, azaz a mintában lévő összes vírust és viroidot. Antitest vagy speciális primerek nélkül is alkalmas a teljes genom megszekvenálására, így nem csak célzottan, már ismert patogének kimutatására alkalmas, hanem azonosíthatók vele akár eddig ismeretlen vírusok, viroidok, illetve új vírus variánsok is. Nagymértékben felgyorsult az új vírusok és viroidok szekvenciáinak meghatározása és leírása az utóbbi években a HTS használatának következtében. Nem szabad elfelejtenünk, hogy a HTS csak a patogének szekvenciáiról ad információt, így csak további vizsgálatokkal állapítható meg a kórokozók jelentősége, pontos biológiájuk és az általuk esetleg okozott tünetek. Több platformon is elvégezhető a HTS, melyek közül az Illumina a legnépszerűbb, ezzel lehetséges akár több száz millió nukleinsav sorrendjének a meghatározása is egy időben, azonban bioinformatikai programok, programcsomagok szükségesek az eredmények kiértékeléséhez. A szőlő esetében a vírus eredetű kis RNS-ek mélyszekvenálására első esetben 2010-ben került sor, mely során a *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir ENTAV 115 klón különböző szerveiből izolált kis RNS-ek elemzésével azonosították a szőlőben jelen lévő vírusokat (Pantaleo et al., 2010). A HSVd és GYSVd-1 viroidakat ugyanezzel a kis RNS alapú módszerrel írták le 2009-ben. Ezzel megerősítették, hogy más taxonok kórokozóinak kimutatásában is alkalmazhatók az nagy áteresztőképességű szekvenálási technikák (Navarro et al., 2009). Azonban minden esetben szükséges független módszerekkel visszaigazolni a HTS során kapott eredményeket (Jaksa-Czotter, 2019; Lebas et al., 2022; Massart et al., 2017)

3. Alkalmazott módszerek (anyag és módszer)

3.1 Vizsgálatok helye

Vizsgálatainkat 2022. decemberétől 2024. szeptemberig Gödöllőn a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Növényvédelmi Intézet Genomikai Kutatócsoportjának laboratóriumában végeztük. A PCR-termékek, klónok nukleotid sorrendjének meghatározását Gödöllőn a BIOMI Kft. végezte.

3.2 Vizsgálat anyaga

3.2.1 A vizsgált minták

Vizsgálataink alapját két szőlőtőkéről származó minta szolgáltatta: az egyik a MATE Szőlészeti és Borászati Intézet Kecskeméti Kutató Állomásának üvegházából, 'Furmint' fajtájú szőlőtőkéről, a másik egy Zala vármegyei, szabadföldi szőlőültetvényből, 'Szilváni' fajtájú tőkéről származott. Az RNS kivonás és a kisRNS könyvtárak elkészítése már korábban megtörtént. Az RNS kivonás mindkét növényegyed esetén hajtattott vesszőkön fejlődött hajtások alsó-, illetve felső leveleiből, a hajtáscsúcsból, a bimbóból és a kacsából történt. A kivonatokból egyedenként RNS keverék készült, majd megtörtént a kisRNS tisztítás, melyből szekvenálható könyvtár készült. Kísérleteinkhez a poolozott tisztított RNS kivonatot használtuk. A vizsgálatokba diplomamunkám készítése során az elkészült kisRNS könyvtárak szekvenálási eredményeinek elemzésének kezdetekor kapcsolódtam be.

3.2.2 A vizsgálat során alkalmazott enzimek, kitek

A reverz transzkripcióhoz egyrészt RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kitet (Thermo Fisher Scientific), másrészt Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kitet (Thermo Fisher Scientific) használtuk. A polimeráz láncreakcióhoz Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase (2X) (Takara) és DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) polimeráz enzimeket használtunk. A méretük megállapításához GeneRuler 100 bp Plus DNA (Thermo Fisher Scientific), illetve Lambda DNA/EcoRI plus Hind III (Thermo Fisher Scientific) markereket alkalmaztunk. A PCR termékek gélből való tisztításához NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kitet (Thermo Fisher Scientific), a PCR-termékek klónozásához a CloneJET PCR Cloning Kitet (Thermo Fisher Scientific) használtuk. A klónozott PCR-termékek baktérium sejtekből való tisztításához a Plasmid DNA Purification Kitet (Thermo Fisher Scientific), az inzert beépülésének ellenőrzéséhez *XhoI* és *XbaI* restrikciós endonukleázokat (Thermo Fisher Scientific) használtunk.

3.2.3. Felhasznált primerek

Vizsgálatunk során saját tervezésű és egy darab szakirodalmi primert is alkalmaztunk (1-2. táblázat).

1. táblázat: A nepovírusok kimutatására használt saját tervezésű primerpárok

Vírus/ Növény	Primer elnevezése	Primer szekvencia (5'-3')	Pozíciója a referencia genomon	Referenciagenom	Termék mérete	Anellálás hőmérséklete	Elongáció ideje	Végső elongáció ideje	Felhasználás	Hivatkozás
NepoRNS1	NepoRNS1_300F	GCGGAGGCTAAGGAACTCCGC	300-320	NC_003615_GFLV_RNA1	7017 bp	Nem működött	5, ill. 7 min	3, ill. 10 min	Furmint RNS1 egész	Ebben a munkában
	NepoRNS1-2_7317R	GACAAACAACACACTGTCGCC	7317-7297	NC_017939_GDefV_RNA1						
NepoRNS2	NepoRNS2_674F	AGAGCTGCGGCACTCTTTGCC	674-694	NC_003623_GFLV_RNA2	3078 bp	66 °C	1 min	2 min	Furmint, Szilváni RNS2	Ebben a munkában
	NepoRNS1-2_7317R	GACAAACAACACACTGTCGCC	3752-3732	NC_006056_ArMV_RNA2						
NepoRNS1	NepoRNS1_2684F	GCTAGATGAGATGAACCTTCC	2684-2704	NC_017939_GDefV_RNA1	1583 bp	62,5 °C	3 min	10 min	Furmint, Szilváni RNS1 középe	Ebben a munkában
	NepoRNS1_4261R	GGAAATTCCACGAAGCCTTTG	4261-4245	NC_017939_GDefV_RNA1						
NepoRNS1	NepoRNS1_300F	GCGGAGGCTAAGGAACTCCGC	300-320	NC_003615_GFLV_RNA1	3961 bp	66 °C	7 min	10 min	Furmint RNS1 5' vég	Ebben a munkában
	NepoRNS1_4261R	GGAAATTCCACGAAGCCTTTG	4261-4245	NC_017939_GDefV_RNA1						
NepoRNS1	NepoRNS1_4191F	CAAAGGCTTCGTGGAATTTCC	4191-4198	NC_003615_GFLV_RNA1	3126 bp	58,2 °C	3 min	10 min	Furmint, Szilváni RNS1 3' vég	Ebben a munkában
	NepoRNS1-2_7317R	GACAAACAACACACTGTCGCC	7317-7297	NC_017939_GDefV_RNA1						
NepoRNS1	NepoRNS1_300F	GCGGAGGCTAAGGAACTCCGC	300-320	NC_003615_GFLV_RNA1	4081 bp	Nem működött	3 min	10 min	Szilváni RNS1 5' vég	Ebben a munkában
	NepoRNS1_4381R	CAACACTTAACCGCGACGTTG	4381-4368	NC_017939_GDefV_RNA1						
NepoRNS2	NepoRNS2_21F	CTTACGTTACCGTGATTTAC	21-41	NC_003623_GFLV_RNA2	3749 bp	Nem működött	3 min	10 min	Szilváni RNS2	Ebben a munkában
	NepoRNS2_3770R	CTAGGCAAGTGTGTCCAAAGG	3770-3752	NC_006056_ArMV_RNA2						
NepoRNS2	NepoRNS2_674F	AGAGCTGCGGCACTCTTTGCC	674-694	NC_003623_GFLV_RNA2	3096 bp	50,5 °C	4 min	10 min	Szilváni RNS2	Ebben a munkában
	NepoRNS2_3770R	CTAGGCAAGTGTGTCCAAAGG	3770-3752	NC_006056_ArMV_RNA2						
NepoRNS1	NepoRNS1_249F	CGAAGGATCCCAGTGCTGCTG	249-262	NC_006057_ArMV_RNA1	2923 bp	60,5 °C	3 min	10 min	Szilváni RNS1 5' vég	Ebben a munkában
	NepoRNS1_3172R	GCAACAGCCTCACTTGGAGTG	3172-3156	NC_017939_GDefV_RNA1						
Vitis vinifera	Vvactin-601s	ACTGGTATTGTGCTGGATTC			599 bp	55°C	20 s	1 min	Aktin próba	(Fábián, 2020)
	Vvactin-1200as	GGATGCAAGAATTGATCCTC								

2. táblázat: A nepovírusok további Sanger szekvenáláshoz használt saját tervezésű primerek

Vírus	Primer elnevezése	Primer szekvencia (5'-3')	Pozíciója a referencia genomon	Referenciagenom	Felhasználás	Hivatkozás
NepoRNS2	NepoRNS2_1292F	GGACCTTCTACCAGAGCCAAC	1292-1311	NC_003623_GFLV_RNA2	Sanger Furmint	Ebben a munkában
	NepoRNS2_2979R	GTGTTTCGGTGATATGGAGAAC	2979-2961	NC_006056_ArMV_RNA2		
NepoRNS1	NepoRNS1_779F	CCTATCTGAGGGCGCGAAGAG	779-799	NC_006057_ArMV_RNA1	Sanger Furmint	Ebben a munkában
	NepoRNS1_3690R	CAATGCGGATCTGACACAATC	3690-3673	NC_017939_GDefV_RNA1		
NepoRNS1	NepoRNS1_4884F	GATGAAGTGGCAGGTGACATG	4884-4904	NC_006057_ArMV_RNA1	Sanger Furmint	Ebben a munkában
	NepoRNS1_6364R	CCTGCAATTGACAAACCAGGG	6364-6344	NC_017939_GDefV_RNA1		
NepoRNS1	NepoRNS1_1504F	CAGATGGCTAAAGGTGTTGGC	1504-1516	NC_006057_ArMV_RNA1	Sanger Furmint	Ebben a munkában
	NepoRNS1_2766R	CTTGCCTGGCATAACCACTCC	2766-2746	NC_017939_GDefV_RNA1		
NepoRNS1	NepoRNS1_4834F	GCATGAAGAAGTTTGCTGAAC	4834-4854	NC_006057_ArMV_RNA1	Sanger Szilváni	Ebben a munkában
	NepoRNS1_6594R	CAATATAAGGCCTTTCATCAC	6594-6574	NC_017939_GDefV_RNA1		
NepoRNS1	NepoRNS1_2457R	CTTCTAGCAATTTGGCAATAG	2457-2437	NC_017939_GDefV_RNA1	Sanger Szilváni	Ebben a munkában

3.2.4. A bioinformatikai elemzések során használt bioinformatikai programok

A kapott kisRNS szekvenciák adatfeldolgozását a CLC Genomic Workbench (Qiagen) szoftverrel végeztük. A primerek tervezéséhez és a filogenetikai elemzéshez a Genious Prime programcsomagot használtuk. A szekvenciák olvasásához a Chromas Lite (Technelysum) bioinformatikai programot, egyszerű elemzésükhöz és szerkesztésükhöz pedig az Ape segédprogramot alkalmaztuk.

3.3 Vizsgálatok módszere

3.3.1 Bioinformatikai elemzések

3.3.1.1 KisRNS szekvenálás bioinformatikai elemzése

Első lépésként a szekvenálás eredményeképpen kapott 50 bp hosszúságú szekvenciák trimmelését végeztük el, mely azt jelenti, hogy a szekvenciákról levágtuk a kis-RNS-ekhez ligált adapterek szekvenciáit (Illumina sRNSseq adapter), amik a kis RNS könyvtár készítéshez és a szekvenáláshoz szükségesek voltak. Eredményként egy listát kaptunk, amely tartalmazta a mintában levő összes kis RNS szekvenciáját, akár ismétlődő kópiában (ezek a redundáns readok, vagyis szekvencia olvasatok). Ezután a kis RNS szekvenciák közül a redundáns adatokat eltávolítottuk, így kaptuk meg a nem redundáns read listát, amiben már csak egyedi szekvenciák szerepeltek. A kis RNS szekvenciákat átfedő régióik segítségével *de novo* hosszabb olvasatokká rendeztük össze, így úgynevezett kontigokat kaptunk, melyek legalább 30 bp hosszúak voltak. A BLAST algoritmus segítségével a kapott kontig szekvenciákat az NCBI RefSeq adatbázis növény vírus referencia szekvenciáihoz illesztettük (NCBI-ből letöltve: 2022.02.17), és az eredmények alapján vírus találati listát készítettünk. Az E-érték (expect value, e-value), a vírusokra kapott találatok valószínűsége, alapján rangsoroltuk a találatokat. Előzetes tapasztalatok alapján azon eredményeket értékeltük pozitív találatnak, ahol az E-value $\leq 10^{-5}$ volt.

3.3.1.2 RNS szekvenálás (RNAseq) bioinformatikai elemzése

Első lépésként a szekvenálás eredményeképpen kapott 150 bp hosszúságú szekvenciák trimmelését végeztük el, levágtuk a RNS-ekhez ligált adapterek szekvenciáit (NOVOGEN RNAseq adapters). Eredményként megkaptuk a szekvenált RNS-ek szekvenciáit. A szekvenciákat átfedő régióik segítségével *de novo* hosszabb olvasatokká rendeztük össze és így legalább 300 bp hosszú kontigokat kaptunk. A BLAST algoritmus segítségével a kapott kontig szekvenciákat az NCBI RefSeq adatbázis növény vírus referencia szekvenciáihoz illesztettük (NCBI-ből letöltve: 2023.07.31), és az eredmények alapján vírus találati listát készítettünk. A BLAST algoritmus segítségével a kapott kontig szekvenciákat az ArMV, GFLV és a GDefV

mindkét RNS-ének referencia szekvenciáihoz illesztettük. Csak az E-value = 0 eredményeket értékeltük pozitív találatnak.

3.3.2 cDNS szintézis

A kísérletek során két különböző módszerrel szintetizált cDNS-sel dolgoztunk. Az egyiknél a RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kitet használva készítettünk az RNS templátokról reverz transzkripcióval cDNS-t random primert alkalmazva. Templátként minden csőbe 2,75 µl RNS mennyiséget pipettáztunk, majd minden mintához hozzáadtunk 0,25 µl random primert. Keverés után a minták denaturációja volt szükséges, ez 5 percig tartott 65°C-on, majd utána azokat legalább 5 percig jégen tartottuk. Eközben reakciós mixet készítettünk, ami mintánként 1 µl 5X RT puffert, 0,5 µl 10 mM dNTP-t, 0,25 µl Ribolock RNáz inhibitor (20 U/µl) és 0,25 µl RevertAid reverz transzkriptáz enzimet (200 U/µl) tartalmazott. A mixből a jégen lévő denaturált mintákhoz 2-2 µl-t pipettáztunk, majd a reakció a következő protokoll szerint folytatódott:

25°C 10 perc

42°C 60 perc

45°C 10 perc

70°C 10 perc

A keletkezett cDNS-ből tízszeres hígítást készítettünk, és ezt használtuk fel templátként a PCR alapú vírusesztelések során.

A másik módszernél a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kitet használtuk, hogy az RNS templátokról reverz transzkripcióval cDNS-t készítsünk, szintén random primert használva. Templátként minden csőbe 3 µl RNS-t adtunk, majd minden mintához 1 µl random primert pipettáztunk, végül még hozzáadtunk 9,5 µl MilliQ tisztaságú vizet. Ezt követően került sor a minták denaturációjára, ami 5 percig tartott 65°C-on, ezután azokat legalább 5 percig jégen tartottuk. Ez idő alatt reakciós mixet készítettünk, ami mintánként 4 µl 5X RT puffert, 1 µl 10 mM dNTP-t, 0,5 µl Ribolock RNáz inhibitor (20 U/µl) és 1 µl Maxima H Minus reverz transzkriptáz enzimet (200 U/µl) tartalmazott. Az említett mixből a jégen lévő denaturált mintákhoz 6,5-6,5 µl-t pipettáztunk, majd a reakció a következő protokoll szerint folytatódott:

25°C 10 perc

50°C 30 perc

65°C 10 perc

85°C 5 perc

A keletkezett cDNS-eket hígítatlanul használtuk fel templátként a PCR alapú vírusesztelések során.

3.3.3 cDNS minőségének ellenőrzése PCR-rel

A RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kittel készült cDNS minőségének ellenőrzésére úgynevezett aktin tesztet végeztünk annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk a szintézis sikerességéről. A kísérlet alapját az adta, hogy a totál RNS kivonat, melyet a cDNS szintézishez használtunk, a szőlő növény összes RNS-ét tartalmazta, többek között az mRNS-eket is. Az aktin gén egy olyan konstans génexpressziós aktivitással rendelkező gén, melyről feltételezhetően folyamatos az mRNS szintetizálódása, így ezt a totál RNS kivonat tartalmazza. A PCR során templátként a szintetizált cDNS-eket használtuk, valamint egy a szőlő aktin génjére specifikus primerpárt (Vvactin-601s és Vvactin-1200as) (1. táblázat) alkalmaztunk. A PCR teszt eredményéből lehet következtetni a lezajlott reverz transzkripció sikerességére. A teszt abban az esetben tekinthető pozitívnak, ha az aktin mRNS-ről készült cDNS megtalálható a mintákban. Így valószínűsíthetjük, hogy minden további RNS-ről, tehát az összes virális RNS-ről is szintetizálódott cDNS.

3.3.4 Primertervezés

A vírusesztelésekhez használt primerek tervezéséhez a Geneious bioinformatikai szoftvert alkalmaztuk. A CLC Genomic Workbench szoftverből fasta formátumban exportáltuk a vizsgálatainkba vont három vírus kisRNS könyvtár szerinti szekvenciáit és egymás alá rendeztük azokat. Fontos szempont volt számunkra, hogy olyan primereket tervezzünk, amelyeket mind a három vírus amplifikálására fel tudunk használni mindkét minta esetében és minél hosszabb szakaszt tudunk velük megsokszorozni. Ezért minél inkább az illesztett szekvenciák 5' és a 3' végén kerestünk olyan régiókat, melyek megfelelően konzerváltak a vizsgált vírusok szekvenciáin. Figyelembe vettük primertervezés alapvető szabályait a folyamat során, vagyis 20–21 bp hosszú oligonukleotidokat terveztünk. A megtervezett primerek illeszkedését az NCBI adatbázis BLAST algoritmusának segítségével ellenőriztük le mindhárom vizsgált vírus esetén azok referenciagenomjait vizsgálva. Később a kísérleteinkhez ugyanezzel a módszerrel újabb primereket terveztünk a vizsgált vírus RNS-ek belsőbb szakaszaira, valamint a felszaporított DNS szakaszok Sanger szekvenálásához. Ez utóbbira azon szekvenciák esetén volt szükség, ahol a PCR-termék hosszabb volt, mint amilyen hosszú

szekvencia a vektor klónozó helyeire specifikus primerek használatával a két irányból meghatározható. Ebben az esetben a megszekvenált variáns szekvenciája alapján terveztük a primereket. Ezeknek a primereknek az illeszkedését is az NCBI adatbázis BLAST algoritmusának segítségével ellenőriztük le mindhárom vírus referenciagenomjára.

3.3.5 RT-PCR

A PCR alapú vírusesztelésekhez használt reakcióelegyekhez (A és B) a következő összetevőket mértük össze, mintánként 50 µl végtérfogattal számolva, és a PCR-ek során az alábbi paramétereket állítottuk be:

A) reakcióelegy:

Steril MilliQ víz: 32 µl

5X Q5 reakció puffer vagy 5X Phire reakció puffer: 10 µl

*10 µM forward primer: 2,5 µl

*10 µM reverz primer: 2,5 µl

10 mM dNTPs: 1 µl

Q5 High-Fidelity DNS polimeráz (2000 U/µl) vagy Phire Hot Start II DNS polimeráz:
1 µl

Templát DNS (10x hígított RevertAid cDNS vagy Maxima H Minus cDNS): 1 µl

*: A PCR reakcióhoz tartozó forward és reverz primereket az 1-2. táblázatban tüntettük fel.

Az A) reakcióelegyet felhasználva végzett PCR-ek során alkalmazott paraméterek:

1. elődenaturáció: 98 °C – 30 s
 2. denaturáció: 98 °C – 30 s
 3. *anelláció: 58–66 °C – 30 s
 4. *elongáció: 72 °C – 20 s–7 min
 5. *végső elongáció: 72°C – 1–10 min
- } 40X

*: A csillaggal jelölt anelláció hőmérséklete, az elongáció és a végső elongáció ideje primerpáronként változó lehet, így ezeket az információkat az 1-2. táblázatban ismertettük.

B) reakcióelegy:

Steril MilliQ víz: 19 µl

*10 µM forward primer: 2,5 µl

*10 µM reverz primer: 2,5 µl

TaKaRa Ex Premier DNA polimeráz (2X): 25 µl

Templát DNS (Maxima H Minus cDNS): 1 µl

*: A PCR reakcióhoz tartozó forward és reverz primereket az 1. táblázatban tüntettük fel.

A B) reakcióelegyet felhasználva végzett PCR során alkalmazott paraméterek:

1. elődenaturáció: 98 °C – 30 s
 2. denaturáció: 98 °C – 10 s
 3. *anelláció: 50–60 °C – 10 s
 4. elongáció: 68 °C – 7 min
 5. végső elongáció: 68°C – 10 min
- } 40X

*: A csillaggal jelölt anelláció hőmérséklete változó, az információt az 1. táblázatban ismertettük.

C) reakcióelegy:

Steril MilliQ víz: 37,3 µl

10X DreamTaq puffer: 5 µl

*10 µM forward primer: 2,5 µl

*10 µM reverz primer: 2,5 µl

10 mM dNTPs: 1 µl

DreamTaq DNA polimeráz (5 U/µl): 0,3 µl

Templát DNS (Maxima H Minus cDNS): 1 µl

*: A PCR reakcióhoz tartozó forward és reverz primereket az 1. táblázatban tüntettük fel.

A C) reakcióelegyet felhasználva végzett PCR során alkalmazott paraméterek:

1. elődenaturáció: 95 °C – 3 min
 2. denaturáció: 95 °C – 30 s
 3. *anelláció: 44–52 °C – 1 min
 4. elongáció: 72 °C – 4 min
 5. végső elongáció: 72°C – 10 min
- } 40X

*: A csillaggal jelölt anelláció hőmérséklete változó, az információt az 1. táblázatban ismertettük.

3.3.6 Gélelektroforézis

A PCR-termékek méret szerinti elkülönítése etídium-bromidot tartalmazó 1,2%-os TBE agaróz gélben (1,2 g agaróz, 100 ml 1X TBE) gélelektroforézis segítségével történt. A DNS szakaszokat UV fény alatt tettük láthatóvá, méretük megállapításához GeneRuler 100 bp Plus DNA, illetve Lambda DNA/EcoRI plus Hind III markereket alkalmaztunk.

3.3.7 PCR termék tisztítása agaróz gélből

A megfelelő méretű PCR-termékeket steril szikével UV asztalon védőszemüvegben kivágtuk a gélből és steril Eppendorf csőbe helyeztük azokat. A folyamat során megmértük a kivágott gélseletek tömegét digitális mérlegen. A PCR-termékek gélből való tisztításához NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kitet használtunk a gyártó utasításainak megfelelően.

100 mg gélseletenként 200 µl NTI puffer oldatot mértünk az Eppendorf csövekbe, majd 50 °C-on 10 percig inkubáltuk azokat. Ezt követően addig vortexeltük az Eppendorfokat, amíg a gélseletek teljesen fel nem oldódtak. A mintákat átmértük a kitben található csövekbe. A csöveket 11 000 x g fordulatszámon 30 másodpercig centrifugáltuk, az átfolyó részt elöntöttük. A membrán mosásához 700 µl NT3 puffert használtunk, majd 11 000 x g fordulatszámon 30 másodpercig centrifugáltuk, az átfolyó részt elöntöttük. Ezt a folyamatot még egyszer megismételtük, így a csöveket 11 000 x g fordulatszámon további 1 percig centrifugáltuk, annak érdekében, hogy az esetlegesen a membránban maradt NT3 puffer oldat maradékát is eltávolítsuk. A membránról a DNS-t 25 µl NE puffert felhasználásával Eppendorf csőbe oldottuk ki. A membránt a pufferrel 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 11 000 x g fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk a csöveket.

Az izolált PCR-termékekből 2 µl-nyi mennyiséget 1,2 %-os TBE agaróz gélen újra megfuttattuk marker jelenlétében.

3.3.8 PCR-termék klónozása

A PCR-termékek klónozásához a CloneJET PCR Cloning Kitet használtuk. Első lépésként a gélből izolált PCR-termékeket a Clone JET plazmidba ligáltuk, melyhez a következő reakcióelegyet mértünk össze, mintánként 10 µl végtérfogattal számolva:

2X reakció puffer: 5 µl

pJET plazmid (50 ng/µl): 0,5 µl

T4 DNS ligáz (5U/µl): 0,5 µl

Izolált, tisztított PCR-termék: 4 µl

Az összemért komponenseket 5–10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Utána 14 ml-es steril polisztiREN csőbe 5 µl ligátumot pipettáztunk és ráértünk 100–200 µl DH5alpha *E. coli* kompetens sejtet, majd 20 percig jégen inkubáltuk az elegyet. Ezután hősokknak tettük ki, 30 másodpercig 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd azonnal jégre tettük. A hősokkolt elegyhez 0,5 ml antibiotikum-mentes folyékony SOC (super optimal broth with catabolite repression) táptalajt pipettáztunk, majd 40 percig 37 °C-on ráztunk. A folyamat végén 150–200 µl szuszpenziót ampicillin (250 µl Amp / 250 ml LB) tartalmú szilárd LB táptalajon (LB + Amp) szélesztettünk. Az agar lemezeket egy éjszakára 37 °C-os termosztátba helyeztük. 24 óra elteltével 1–3 különböző baktérium telepet ampicillin tartalmú folyadék kultúrába oltottunk át és újra egy éjszakán keresztül ráztunk 37 °C-on.

3.3.9 Miniprep

A klónozott PCR-termékeket tartalmazó plazmidok baktérium sejtekből történő tisztítását a Plasmid DNA Purification Kittel végeztük a gyártó utasításainak megfelelően kivéve az első lépésnél, ahol nem 11 000 x g fordulatszámon centrifugáltuk le a baktérium sejteket az Eppendorf csőben, hanem 3 percig 9 000 x g fordulatszámon. A centrifugálást követően a felülúszót elöntöttük. A sejtek lízisét 250 µl A1 puffer hozzáadásával végeztük. Az összegyűjtött baktérium sejteket pipettával addig szuszpendáltuk az oldatban, amíg homogén elegyet nem kaptunk. Utána 250 µl A2 puffert adtunk a csövekhez, melyeket 6–8 kézi forgatás után 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. Az idő letelte után 300 µl A3 puffert pipettáztunk a mintákhoz, majd 6–8 kézi átforgatással történt elegyítést követően a mintákat 11 000 x g fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót átpipettáztuk a kitben található szűrőt tartalmazó csövekbe, majd 1 percig 11 000 x g fordulatszámon centrifugáltuk a mintákat, a membránon átfolyó részt elöntöttük. Az opcionális mosási lépést is elvégeztük, mely során a

membránra 500 µl AW puffert mértünk, majd 1 percig 11 000 x g fordulatszámon centrifugáltuk, és végül az átfolyó részt elöntöttük. A továbbiakban 600 µl A4 puffert pipettáztunk a membránra, majd szintén 11 000 x g fordulatszámon 1 percig tartó centrifugálást követően az átfolyó részt elöntöttük. Az üres csöveket még egyszer 2 percig 11 000 x g fordulatszámon centrifugáltuk, annak érdekében, hogy ne maradjon etanol a membránban. A membránról a DNS-t 50 µl AE puffer hozzáadásával Eppendorf csövekbe oldottuk le. A puffer hozzámérése után 1 percig tartó inkubáció következett, majd 11 000 x g fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk a mintákat.

Az inzertek plazmidba való beépülésének ellenőrzését restrikciós hasítással végeztük. A reakcióelegyhez a következő összetevőket mértük össze, mintánként 8,4 µl végtérfogattal számolva:

10X Tango puffer: 2 µl

*Xho*I endonukleáz: 0,2 µl

*Xba*I endonukleáz: 0,2 µl

Steril MilliQ: 6 µl

2 µl miniprephez 8,4 µl reakciós elegyet mértünk, majd 40 percig vizes termosztátba helyeztük a csöveket. A hasítás után keletkezett DNS-szakaszokat Lambda DNA/EcoRI plus Hind III marker jelenlétében fluoreszcens festéket tartalmazó 1,2 %-os agaróz gélben futtattuk meg és UV fény alatt tettük láthatóvá. Az eredmény alapján kiválasztottuk azon mintákat, melyeket tartalmaztak a klónozott DNS szakaszt, és ezeket Sanger szekvenálásra küldtünk.

3.3.10 Sanger szekvenálás és szekvenciaelemzés

A klónozott tisztított plazmidok szekvenálását a BIOMI Kft. végezte. A szekvenciák olvasásához a Chromas Lite bioinformatikai programot használtuk, egyszerű elemzésükhöz, szerkesztésükhöz pedig az ApE segédprogramot. A kapott szekvenciákat az NCBI adatbázis BLAST algoritmusának segítségével hasonlítottuk össze a három vizsgálatba vont vírus referenciagenomjával.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Bioinformatikai elemzések

4.1.1 KisRNS könyvtárak elemzésének eredményei

A kisRNS könyvtár elemzésének eredményeként a Szilváni könyvtárban 16 278 830 readet kaptunk, ez a szám trimmelés után 15 810 672-re csökkent. A Furmint könyvtár esetén 19 025 202 olvasatot kaptunk, melyből a trimmelést követően 15 938 475 read maradt. A readekből létrehozott kontigokat az NCBI adatbázisban található referenciagenomokhoz illesztettük, ennek eredményeként vírustalálati listákat generáltunk. A 3-4. táblázatban szerepelnek a 10^{-5} -nél nagyobb E-value értéket eredményül kapott vírusok.

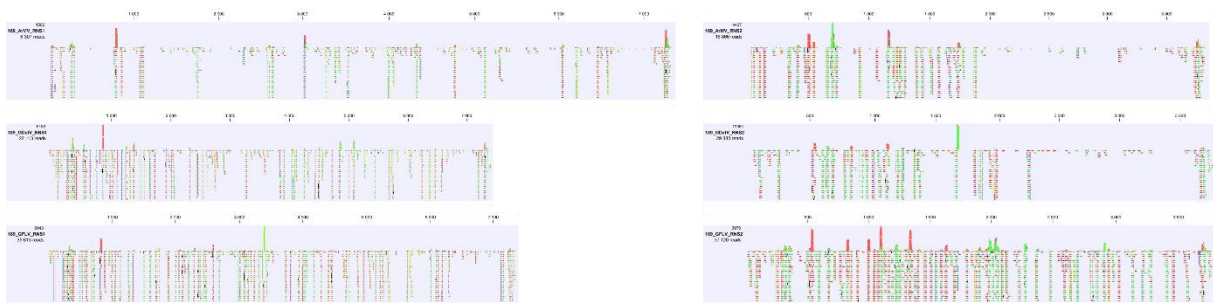
3. táblázat: A kisRNS könyvtár bioinformatikai elemzése során kapott vizsgálatba vont vírusok (E-value > 10^{-5})

kisRNS könyvtár		ArMV RNS1	ArMV RNS2	GDefV RNS1	GDefV RNS2	GFLV RNS1	GFLV RNS2
Szilváni	A vírus genomjára illeszkedő kontigok száma	6	7	33	7	60	55
	A vírus readekkel való lefedettsége (%)	48,42	49,95	60,3	59,02	64,7	85
Furmint	A vírus genomjára illeszkedő kontigok száma	7	14	58	2	23	34
	A vírus readekkel való lefedettsége (%)	32,71	41,6	55,5	32,45	46,43	59,49

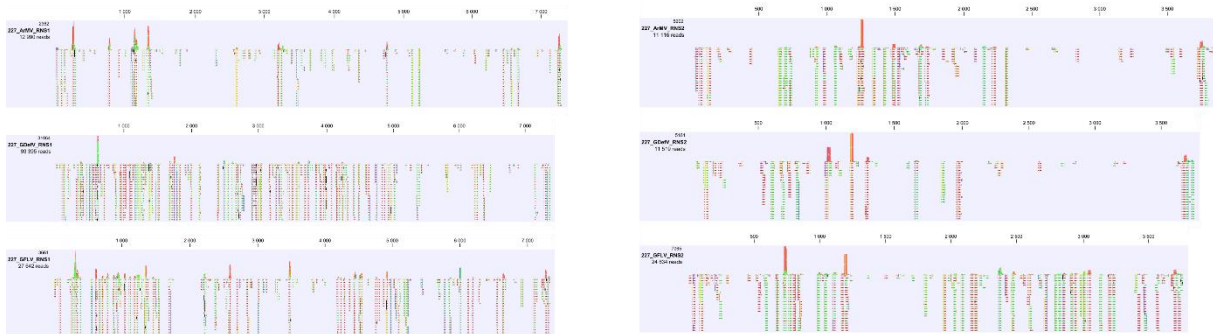
4. táblázat: A kisRNS könyvtár bioinformatikai elemzése során kapott egyéb vírusok, viroidok és szatellit RNS (E-value > 10^{-5})

kisRNS könyvtár		GRSPaV-1	GFkV	GPGV	GRVFV	GSyV-1	GYSVd-1	GYSVd-2	HSVd	GFLV satRNS
Szilváni	A vírus genomjára illeszkedő kontigok száma	2	61	151	3	1	5	1	6	-
	A vírus readekkel való lefedettsége (%)	92,2	86,54	98,65	53,7	35,4	91,8	79,89	100	-
Furmint	A vírus genomjára illeszkedő kontigok száma	2	-	-	-	-	7	-	-	14
	A vírus readekkel való lefedettsége (%)	32,4	-	-	-	-	83	-	-	58

A továbbiakban a Szilváni és Furmint mintáiban csak a ArMV, GDefV és GFLV vírusok visszaigazolását végeztük el. A kisRNS readeket illesztettük az NCBI adatbázisból letöltött referenciagenomokhoz, ennek eredményeként megkaptuk az adott vírusgenomok lefedettségét (3-4. ábra). A virális lefedettség a vizsgálatba vont vírusok esetén 32,45-85% közötti volt.



3. ábra: Szilváni kisRNS könyvtár alapján az ArMV, GDefV és a GFLV lefedettségi ábrája



4. ábra: Furmint kisRNS könyvtár alapján az ArMV, GDefV és a GFLV lefedettségi ábrája

4.1.2 RNAseq elemzések eredményei

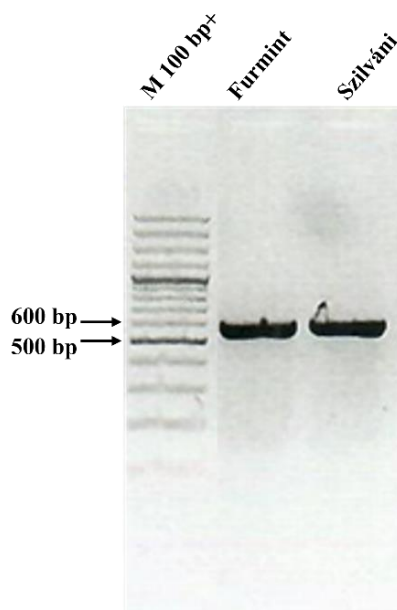
A Szilváni kisRNS könyvtárral azonos RNS-ből készült Szilváni minta RNS szekvenálásának eredményeképpen kapott 21 969 658 párosított readok száma a trimmelést követően 21 822 698-ra csökkent, melyekből 58 711 kontigot építettünk. A kontigokat az ArMV, GFLV és a GDefV referenciagenomjaira illesztve (BLAST algoritmussal) három olyan találatot kaptunk, ahol az E-value 0 értékű volt (5. táblázat): egy-egy találatot a GFLV RNS1 és RNS2-re és egy találatot a GDefV RNS1-re.

5. táblázat: a Szilváni minta bioinformatikai elemzése során kapott vírusok (E-value = 0)

Találat	HSP-k száma	Legalacsonyabb E-value	Referenciagenom hivatkozás (E-value)	Referenciagenom leírás (E-value)	Legnagyobb azonosság %
VV_SZIL_22_contig_145	5	0	NC_017939_GDefV_RNA1	Grapevine deformation virus RNA1, complete genome.	100
VV_SZIL_22_contig_54	2	0	NC_003623_GFLV_RNA2	Grapevine Fanleaf virus (GFLV-F13) RNA2 encoding capsid protein.	95,45455
VV_SZIL_22_contig_5	1	0	NC_003615_GFLV_RNA1	Grapevine fanleaf virus RNA 1, complete sequence.	82,55434

4.2 cDNS szintézis – aktin teszt eredménye

Annak érdekében, hogy a bioinformatikai elemzés eredményét RT-PCR-rel vissza tudjuk igazolni az RNS kivonatból cDNS szintézisére volt szükség. „Aktin tesztet” végeztünk a cDNS minőségének ellenőrzésére a 3.3.3 alfejezetben leírtak szerint. A cDNS minősége a kísérlet alapján megfelelő volt, az „aktin teszt” során a vizsgált minták esetében a megfelelő méretű PCR-termék keletkezett (5. ábra).

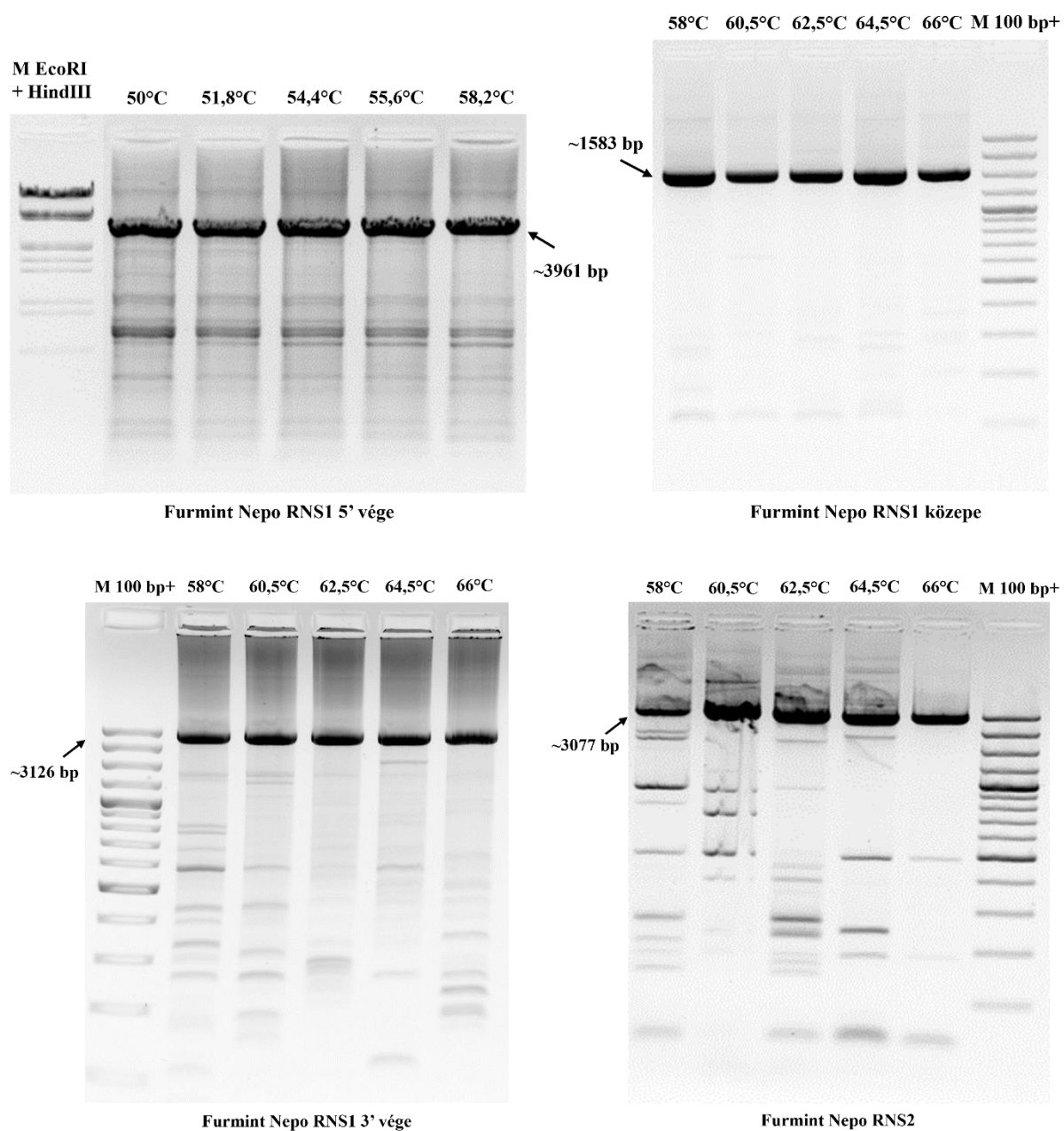


5. ábra: A Furmint és Szilváni mintákból szintetizált cDNS aktin tesztje

4.3 RT-PCR eredménye

4.3.1 Nepovírus kimutatása a Furmint mintában a HTS alapján tervezett primerekkel

Nepovírus RNS-ének jelenlétét sikeresen visszaigazoltuk RT-PCR segítségével a kecskeméti Furmint mintából. A vírus RNS1 szálát nem tudtuk egy darabban amplifikálni a primereinkkel ezért további primerek tervezésére volt szükség a középső régióban, így csak több részletben sikerült kimutatni, az RNS2 szálát egyben sikerült amplifikálnunk a primereinkkel (1. táblázat). A primerek optimális anellálási hőmérsékletének megállapításához minden esetben gradiens PCR-t végeztünk (6. ábra). Az RNS1 3' végi és középső szakaszának kimutatásához a 3.3.5 alpontban ismertetett A, reakcióelegyet használtuk Q5 polimerázzal Maxima cDNS templáttal, míg az 5' végi szakaszának felszaporításához a B, reakcióelegyet. Az RNS2 szálnál pedig az A, reakcióelegyet Phire Hot Start polimerázzal, RevertAid cDNS templátot használva.

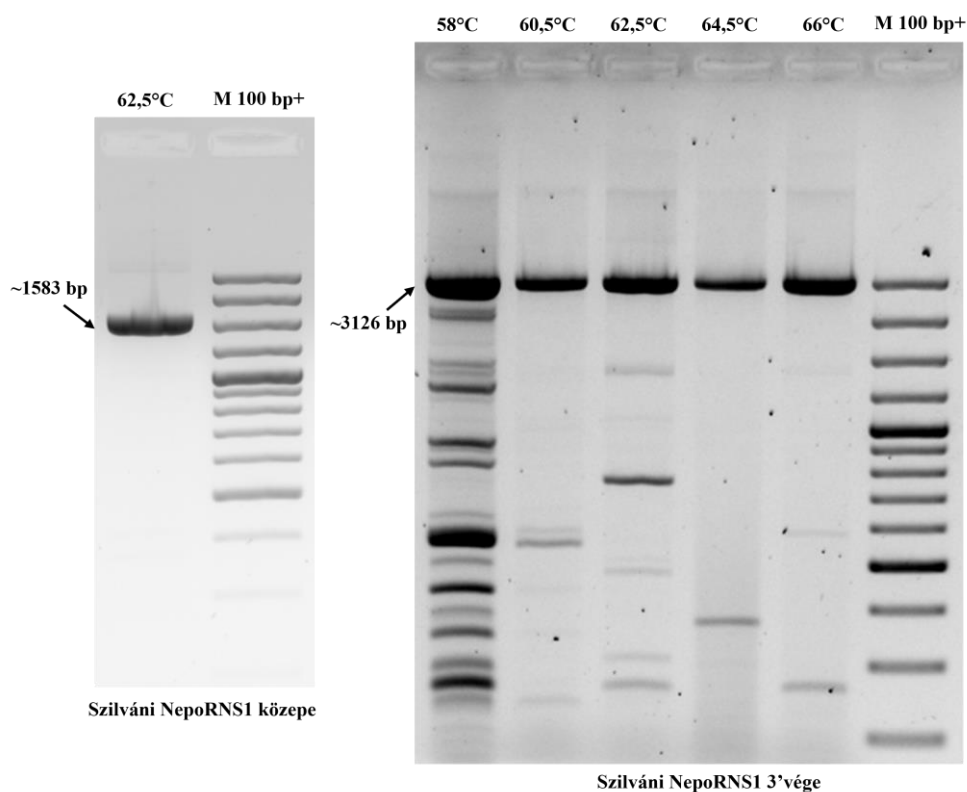


6. ábra: A tervezett primerek anellálási hőmérsékletének meghatározása a Furmint minta esetén

A Furmint mintában lévő nepovírus kimutatására tervezett primerek anellálási hőmérsékletének optimalizálását követően az amplifikált termékek mérete az RNS1 5' végi szakasza esetében 3961 bp, a középső szakasznál 1583 bp, a 3' végi szakaszé pedig 3126 bp volt. Az RNS2 amplifikálása során 3077 bp nagyságú terméket kaptunk.

4.3.2 Nepovírus kimutatása a Szilváni mintában a HTS alapján tervezett primerekkel

A Szilváni minta esetén az RNS1 szál egy hosszú szakaszát sikerült kimutatnunk, de nem az egészet. Az RNS2 szál esetén nem jártunk sikerrel a kimutatással, bár keletkeztek PCR termékek, de a szekvenálás során kiderült, hogy ezek nem vírus eredetű szekvenciák. Először ugyanazokat a primereket használtuk a nepovírus kimutatására, mint amit a Furmint mintához is használtunk korábban (1. táblázat). Később az RNAseq kontigok alapján terveztünk új primereket az RNS1 szál 5' szakaszára és az RNS2 szál egészére. Minden esetben a primerek optimális anellálási hőmérsékletének megállapításához gradiens PCR-t végeztünk. Az RNS1 5' végi, középső és 3' végi szakaszára a 3.3.5 alpontban ismertetett A, reakcióelegyet használtuk Q5 polimerázzal Maxima cDNS templáttal. Az RNS2 szálnál pedig az B, reakcióelegyet Q5 polimerázzal Maxima cDNS templátot használva számos alkalommal megismételve, majd később a C, reakció elegyet is kipróbáltuk.

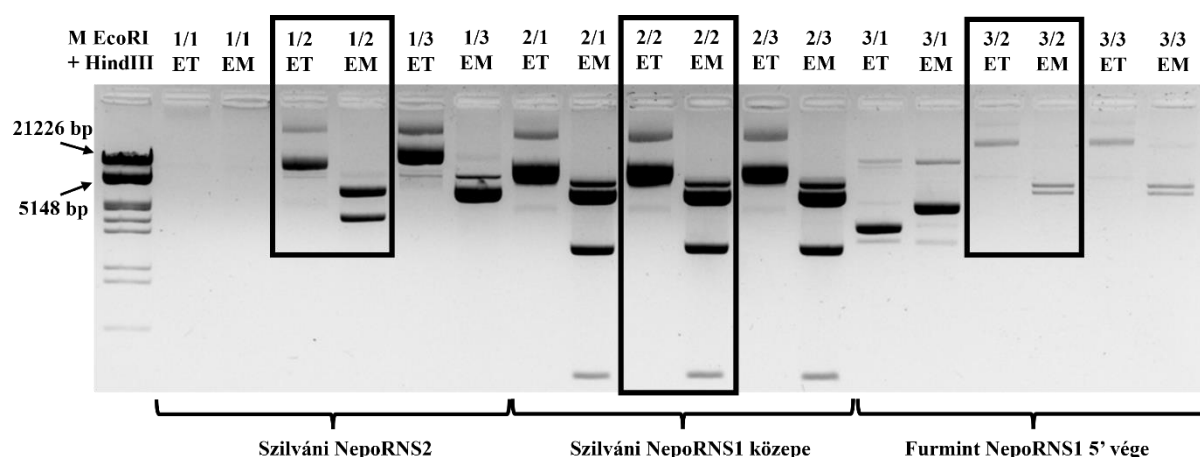


7. ábra: Nepovírus RNS1 visszaigazolása a Szilváni mintából RT-PCR segítségével

Bár a Szilváni minta kimutatására legtöbbször ugyanazokat a primereket használtuk az RT-PCR során, mint a Furmintnál, így is szükséges volt gradiens PCR-t is csinálnunk. A Szilváni NepoRNS1 középső szakaszánál 1583 bp méretű, míg az RNS1 szál 3' végi szakaszára 3126 bp nagyságú terméket vártunk (7. ábra).

4.4 Klónozás és a restrikciós hasítás eredménye

A kapott PCR-terméket az agaróz gélből tisztítottuk, majd klónoztuk a 3.3.7 és 3.3.8 alfejezetek alapján. A klónozás sikerességét restrikciós enzimekkel (*Xba*I és *Xho*I hasítóhelyek találhatóak a klónozó hely két oldalán) való hasítással ellenőriztük a 3.3.9 elfejezetben leírtak alapján. A gélelektroforézis során az emésztetlen (ET) és emésztett (EM) mintákat a zsebekbe egymást váltva vittük fel (8. ábra). A gélkép alapján ítéltük meg a ligálás és klónozás sikerességét, a plazmidba beépült inzertek szekvenciáját Sanger szekvenálással a BIOMI Kft. határozta meg.



8. ábra: A Szilváni nepovírus RNS2, valamint RNS1 közepének, illetve a Furmint nepovírus RNS1 5' végi szakaszának ligálását ellenőrző restrikciós emésztés

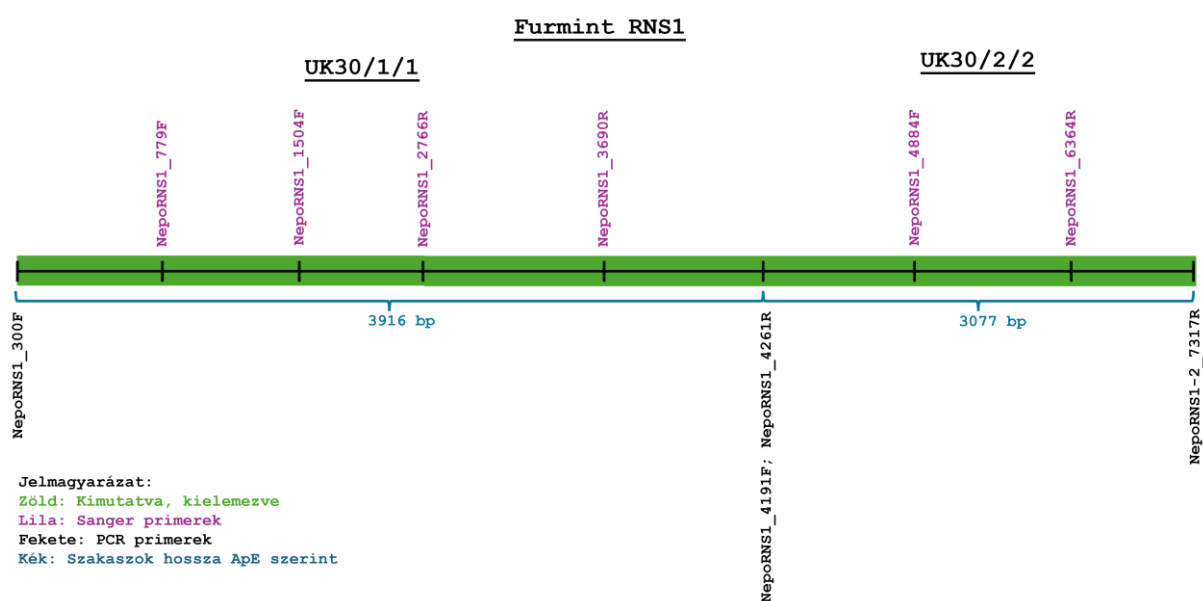
4.5 Sanger szekvenálás elemzésének eredménye

A Furmint RNS1 és Szilváni RNS1 szálát több részletben sikerült csak kimutatnunk, a Furmint RNS2 szálát egyben amplifikáltuk, a Szilváni RNS2 szálát pedig nem sikerült kimutatni. Az alábbiakban mintáink Sanger szekvenálásának eredményeit szeretnénk bemutatni ábrákkal szemléltetve.

4.5.1 A Furmint mintában található nepovírus szekvenciájának elemzése

A Furmint RNS1 szálát három darabban sikerült amplifikálnunk. A vírus RNS1 5' végi szakasza (UK30/1/1) esetében a PCR-től a klónozásig tartó lépéseket háromszor kellett megismételnünk, mire szekvenálásra sikerült küldeni a mintát. A szakasz teljes hosszának Sanger szekvenálásához további négy primer tervezésére volt szükség (2. táblázat). A PCR primereink alapján (1. táblázat) 3961 bp hosszú szakaszt vártunk, az elemzések és összeillesztések után az ApE segédprogram alapján az általunk kimutatott valós hossza 3916 bp volt (9. ábra). Annak érdekében, hogy kiemeljük az RNS1 3' végi szakaszát (UK30/2/2) és

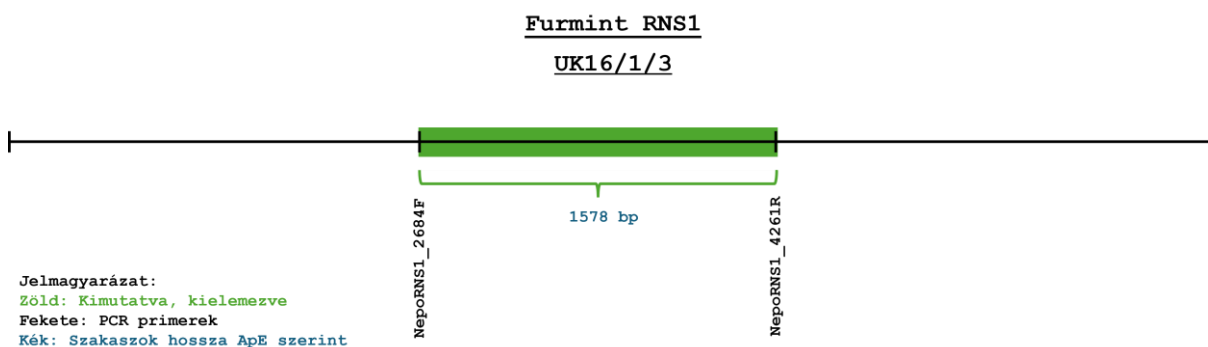
elkerüljük az átfedő régiókat az 5' vég felszaporításához használt reverz primert megrendeltük forward primerként, (NeopRNS1_4191F; NepoRNS1_4261R) (1. táblázat) a primer neve azért tér el, mert más referenciagenomot használtunk az elnevezésénél. A szakasz teljes hosszának Sanger szekvenálásához további két primer tervezésére volt szükség (2. táblázat). A PCR primerek alapján (1. táblázat) 3126 bp méretű szakaszt vártunk, az elemzések és az összeillesztéseket követően az ApE segédprogram alapján az általunk felszaporított szakasz valós hossza 3077 bp méretű volt (9. ábra). Az 5' és 3' végi szakaszokat összeillesztettük, így megkapva az általunk amplifikált szakasz teljes hosszát, mely a várt 7017 bp helyett 6973 bp lett.



9. ábra: A Furmint RNS1 szál 5' végi és 3'végi szakaszának sematikus ábrázolása

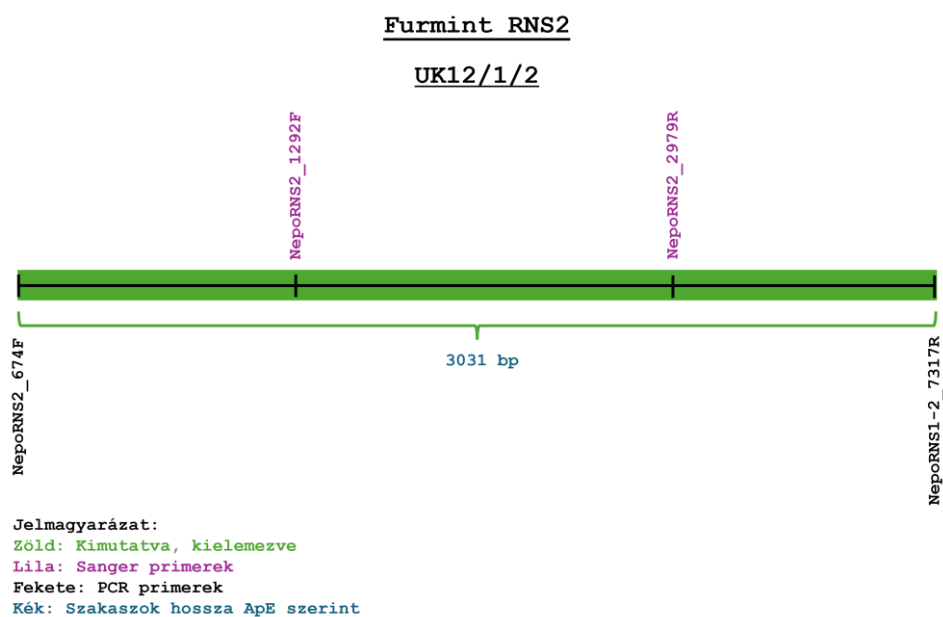
A Furmint RNS1 szál középső szakaszának (UK16/1/3) kimutatásához új PCR primerek tervezésére volt szükség. A Sanger szekvenáláshoz is ezeket a primereket alkalmaztuk. A kapott szekvenciákat elemeztük és összeillesztettük. A PCR primerek alapján (1. táblázat) 1583 bp hosszúságú szakaszt vártunk, elemzésünk és összeillesztés után az ApE segédprogram alapján szakaszunk valós mérete 1578 bp volt (10. ábra).

Ezt a középső szakaszt az NCBI adatbázis BLAST algoritmusával összehasonlítottuk az 5' végi és 3' végi összeillesztett szakasszal, mellyel 1576/1578 (99%) hasonlóságot mutatott, gapeket (hiányzó nukleotidokat) nem tartalmazott. Az igen magas fokú hasonlóság miatt a későbbi filogenetikai elemzésnél a Furmint RNS1 középső szakaszát nem vettük külön figyelembe.



10. ábra: A Furmint RNS1 szál középső szakaszának sematikus ábrázolása

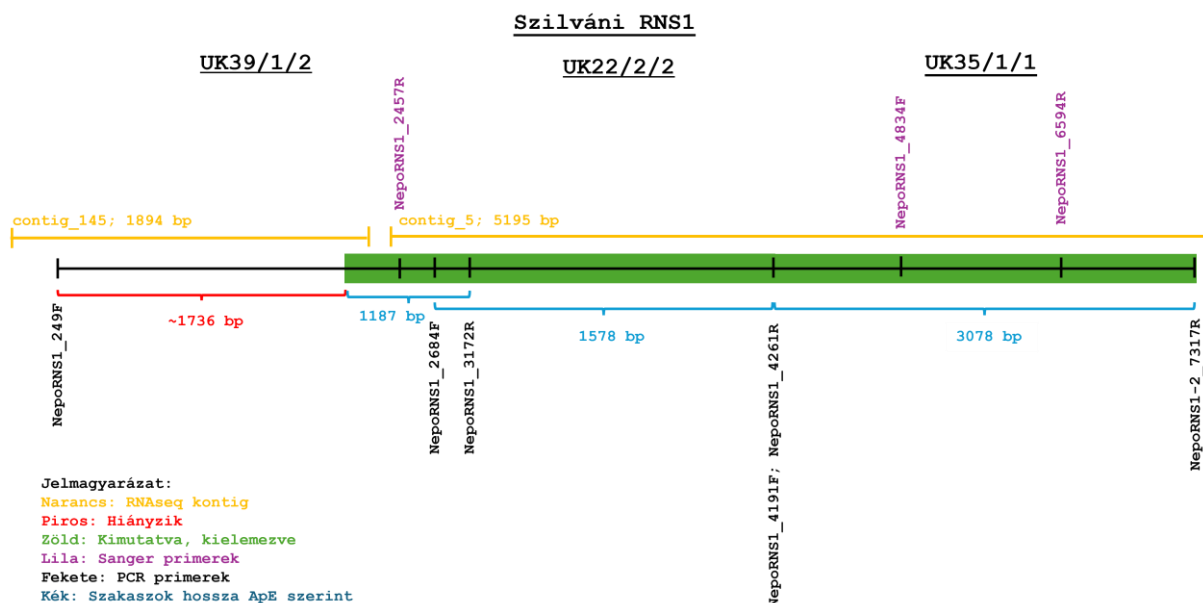
A Furmint RNS2 szálát (UK12/1/2) egy darabban sikerült amplifikálnunk. A szakasz teljes hosszának Sanger szekvenáláshoz további két primert terveztünk (2. táblázat). A PCR primerek alapján (1. táblázat) 3078 bp méretű szakaszt vártunk, az elemzéseket és az összeillesztést követően az ApE segédprogram alapján az általunk kiemelt szakasz valós hossza 3031 bp hosszú volt (11. ábra).



11. ábra: A Furmint RNS2 szálának sematikus ábrázolása

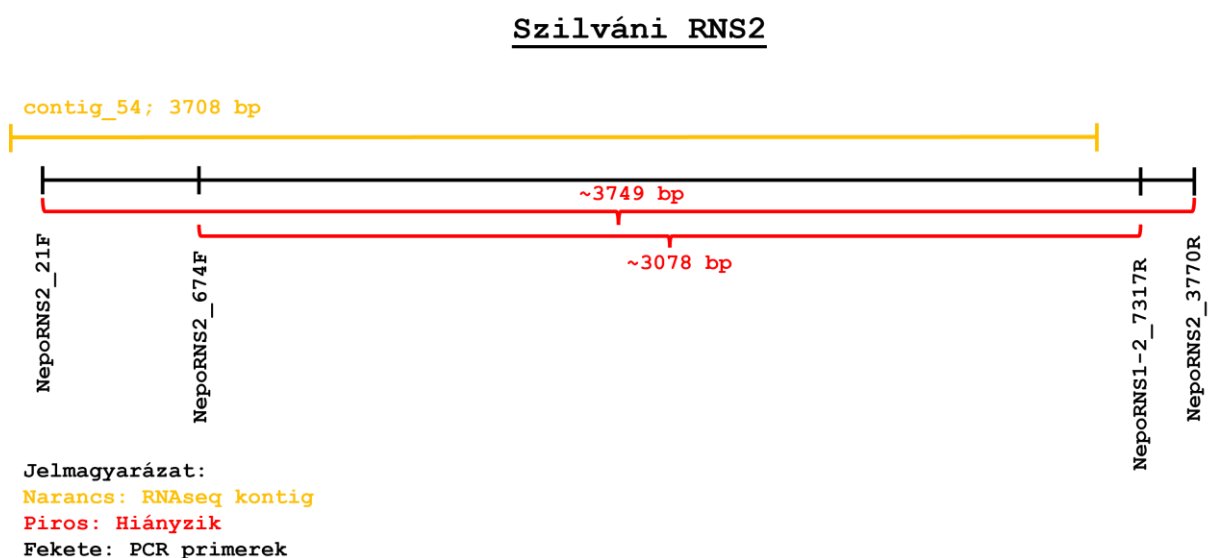
4.5.2 A Szilváni mintában található nepovírus szekvenciájának elemzése

A Szilváni RNS1 szálát három részletben próbáltuk amplifikálni. A vírus RNS 5' végi szakaszának kimutatását (UK39/1/2) kétszer ismételtük meg. A PCR reakcióhoz az RNAseq kontigok alapján két új primert terveztünk (1. táblázat). A Sanger szekvenálás elemzése során kiderült, hogy a PCR-termék fordítva épült be a vektorba a ligálás során. Először azt terveztük, hogy további reverz primerekkel folytatjuk a Sanger szekvenálást. Azonban, miután megterveztük a szekvenáláshoz az első primerünket (2. táblázat), az elemzést során azt tapasztaltuk, hogy a szekvencia egyik fele nepovírus, másik fele klónozó vektor. A PCR primerek alapján 2923 bp hosszúságú szakaszt vártunk, azonban az elemzések és az összeillesztés után az általunk megszekvenált szakasz valós hossza 1187 bp volt. Az RNS1 szál középső szakaszának (UK22/2/2) kimutatása során a PCR reakcióhoz ugyanazt a primerpárt (1. táblázat) használtuk, mint a Furmint mintánál erre a régióra. A Sanger szekvenáláshoz nem volt szükség új szekvenáló primerek tervezésére, a szekvenciát elemeztük és összeillesztettük. A PCR primerek alapján 1583 bp nagyságú szakaszt vártunk, az elemzést és összeillesztést követően az ApE segédprogram alapján szakaszunk valós hossza 1578 bp volt. A Szilváni RNS1 szál 3' végi szakaszának (UK35/1/1) kimutatásánál ugyanazokat a primereket (1. táblázat) használtuk a PCR reakció során, melyeket a Furmint mintánál is használtunk ezen szakasz esetében az átfedő régiók elkerülése érdekében. A Sanger szekvenáláshoz újabb két primert terveztünk (2. táblázat). A PCR primerek alapján 3126 bp hosszú szakaszt vártunk, az elemzéseket és összeillesztést követően az ApE segédprogram alapján az általunk kimutatott szakasz valós hossza 3078 bp méretű volt. Az 5' végi, középső és 3' végi szakaszokat összeillesztettük, így megkapva az RNS1 szál általunk felszaporított szakaszát, mely a várt 7017 bp helyett csak 5333 bp méretűnek bizonyult, a hiányzó szakasz hossza nagyjából 1736 bp nagyságú (12. ábra).



12. ábra: A Szilváni RNS1 szál 5' végi, középső és 3'végi szakaszának sematikus ábrázolása

A Szilváni RNS2 szálát (13. ábra) többször próbáltuk meg egy darabban amplifikálni, azonban nem jártunk sikerrel. Kezdetben többször megismételtük a PCR reakciót a Furmint RNS2 szálánál is használt primerekkel (1. táblázat). De a nukleotidszekvencia elemzése során mindig más eredményt kaptunk. Kaptunk eredményt gombára, *Vitis vinifera* kromoszómára és baktériumra, nepovírusra azonban nem. Az RNAseq kontig alapján tervezett primerekkel (1. táblázat) végzett PCR során sem sikerült a mintában levő nepovírus RNS2-t amplifikálnunk.



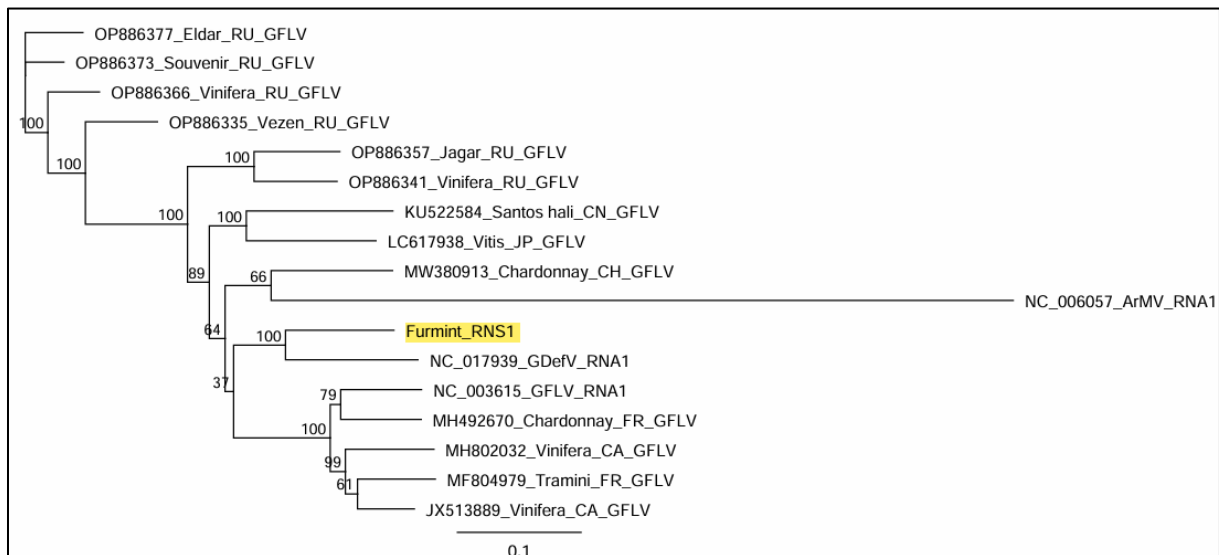
13. ábra: A Szilváni RNS2 szálának sematikus ábrázolása

4.6 A mintákban található nepovírusok filogenetikai elemzése

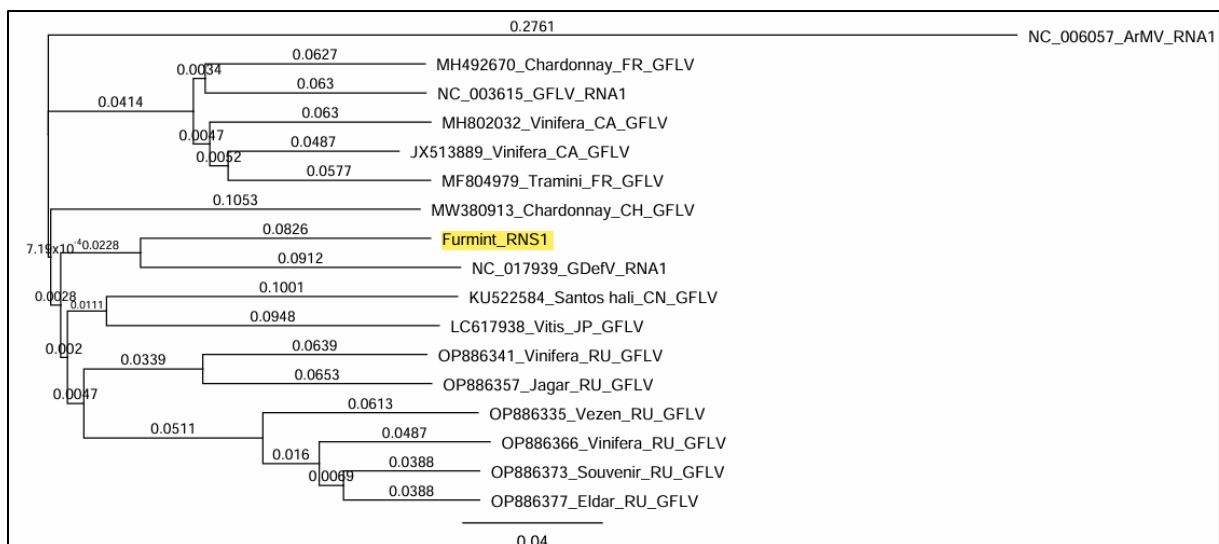
4.6.1 Furmint mintában található nepovírus filogenetikai elemzésének eredményei

A filogenetikai fa elkészítéséhez először a Furmint RNS1 és RNS2 szekvenciáinkat BLAST algoritmussal összehasonlítottuk az NCBI adatbázisban található GFLV és ArMV referenciagenomokkal. Ennek eredménye alapján szemrevételezéssel a szekvenciákat azon helyeken, ahol nagyobb eltérések mutatkoztak feldaraboltuk. Az RNS1 szál esetén 15 szegmenst, míg az RNS2 esetében 7 szegmenst különítettünk el. Mindegyik szegmenst külön BLAST algoritmussal összehasonlítottuk az NCBI adatbázis összes nepovírus szekvenciájával. Az összehasonlítás alapján a Geneious bioinformatikai rendszerbe letöltöttük a szegmensekhez talált legnagyobb azonosságot mutató különböző gazdanövényekből és földrajzi régiókból izolált nepovírus szekvenciákat, egymáshoz illesztettük (alignment), és egyforma méretűre vágtuk azokat. A fákon a teljes RNS1 és RNS2 szekvenciákat ábrázoltuk a referenciagenomokkal összehasonlítva, külön további szegmensensekre osztásuk nem volt szükséges. Kétféleképpen, a PhyML és a Neighbor-joining eljárásokkal készítettünk filogenetikai fákat, 100-as ismétlést alkalmazó bootstrap-analízist végezve.

A Furmint RNS1 szál szekvenciája mindkét módszerrel készült fa esetén (14-15. ábra) a GDefV referenciaizolátum ugyanezen régiójával volt leginkább azonos, vele együtt csoportosult.

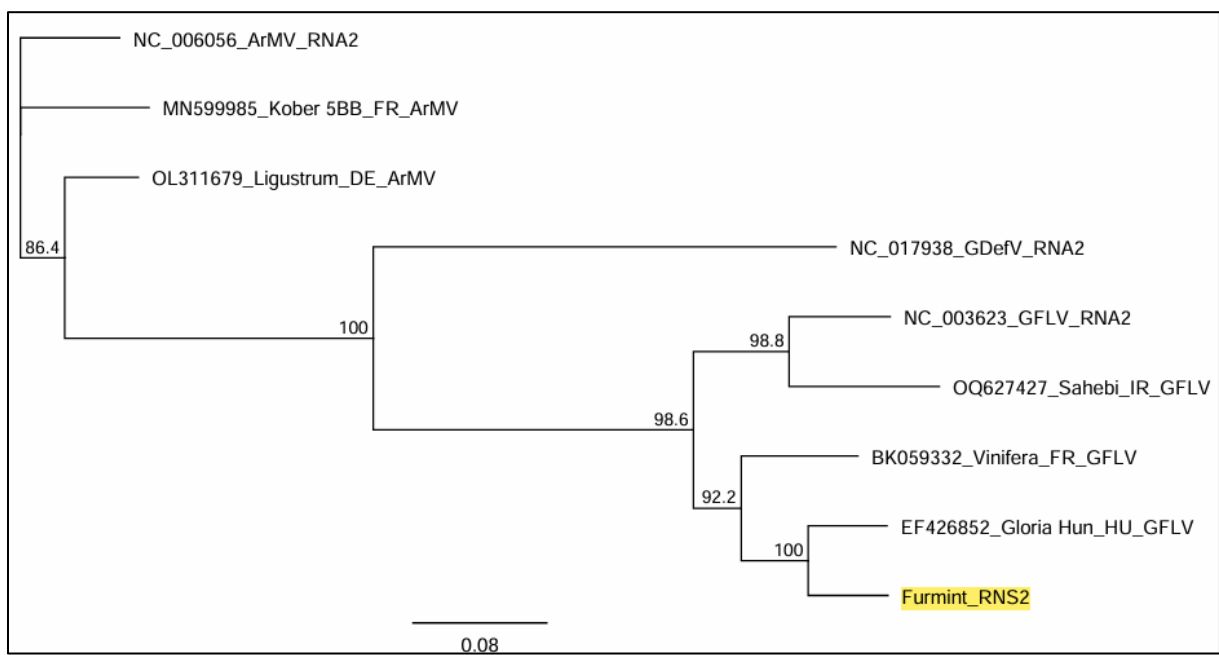


14. ábra: PhyML filogenetikai fa a Furmint RNS1 rokonsági kapcsolatairól

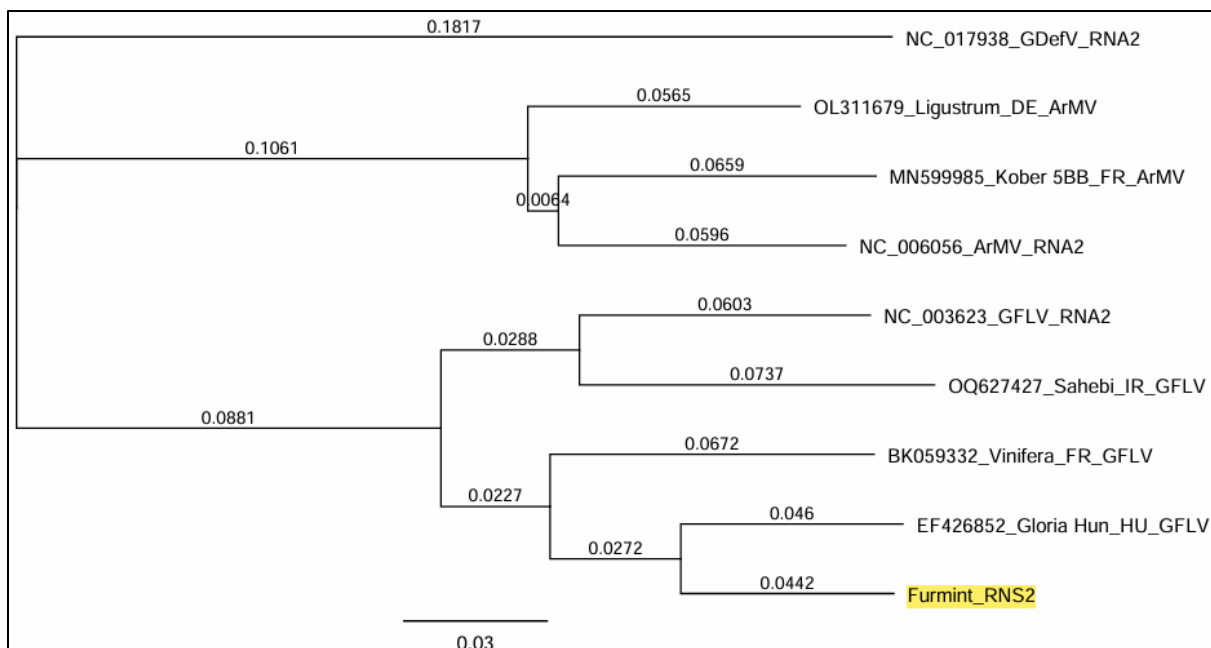


15. ábra: Neighbor-joining filogenetikai fa a Furmint RNS1 rokonsági kapcsolatairól

A Furmint RNS2 szála esetén a kapott filogenetikai fák alapján elmondható, hogy az mindkét esetben (16-17. ábra) egy magyar izolátummal, egy *Vitis vinifera* cv. Gloria Hungariae szőlőből meghatározott szekvenciával klasztereződik együtt.



16. ábra: PhyML filogenetikai fa a Furmint RNS2 rokonsági kapcsolatairól

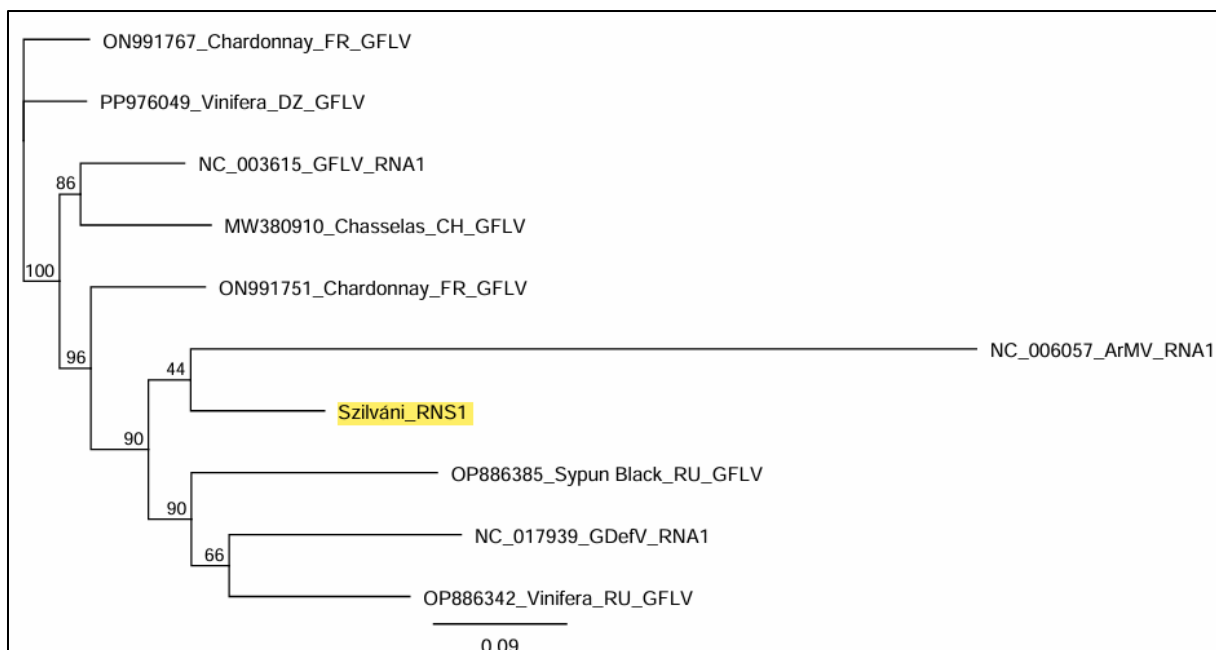


17. ábra: Neighbor-joining filogenetikai fa a Furmint RNS2 rokonsági kapcsolatairól

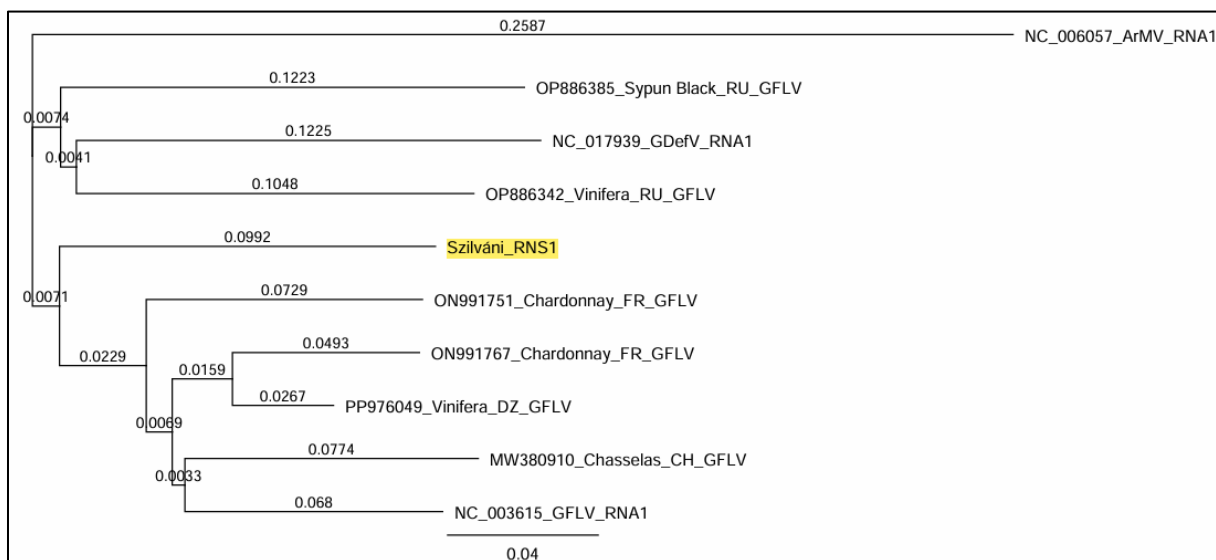
4.6.2 Szilváni mintában található nepovírus filogenetikai elemzésének eredményei

A filogenetikai fa elkészítéséhez először szintén BLAST algoritmussal összehasonlítottuk a Szilváni RNS1 szekvenciánkat az NCBI adatbázisban található GFLV és ArMV referenciagenomokkal. Ennek eredménye alapján szemrevételezéssel a szekvenciákat azon helyeken, ahol nagyobb eltérések mutatkoztak feldaraboltuk. Az RNS1 szál esetén 6 szegmenst különítettünk el. Mindegyik szegmenst külön BLAST algoritmussal összehasonlítottunk az NCBI adatbázis összes nepovírus szekvenciájával. Az összehasonlítás alapján a Geneious bioinformatikai rendszerbe letöltöttük a szegmensekhez talált legnagyobb identitást mutató különböző gazdanövényekből és földrajzi régiókból izolált nepovírus szekvenciákat, egymáshoz illesztettük (alignment), és egyforma méretűre vágtuk azokat. Kétféleképpen, a PhyML és a Neighbor-joining eljárásokkal készítettünk filogenetikai fákat, 100-as ismétlést alkalmazó bootstrap-analízist végezve.

Az eredményül kapott két filogenetikai fa nagymértékben eltért egymástól. A PhyML eljárással készült fa alapján a Szilváni RNS1 szekvenciája az ArMV-hez áll legközelebb (18. ábra). A Neighbor-joining eljárással készült fa szerint pedig egyes GFLV-hez hasonló szekvenciákkal klasztereződik (19. ábra).



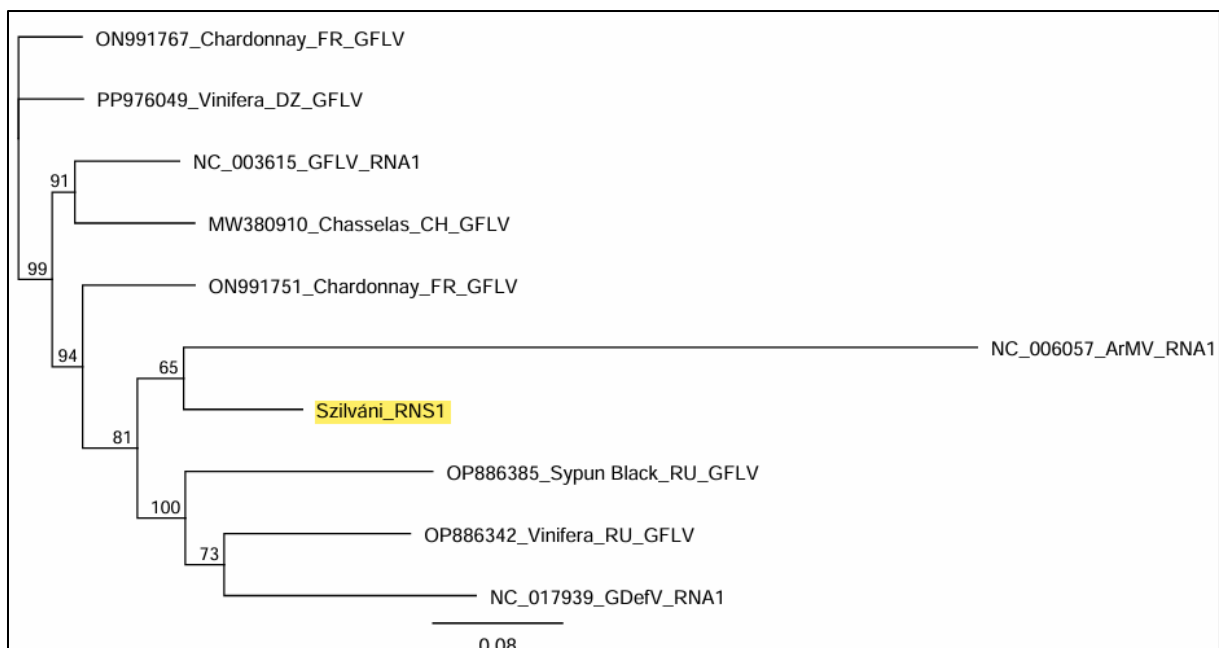
18. ábra: PhyML filogenetikai fa a Szilváni RNS1 rokonsági kapcsolatairól



19. ábra: Neighbor-joining filogenetikai fa a Szilváni RNS1 rokonsági kapcsolatairól

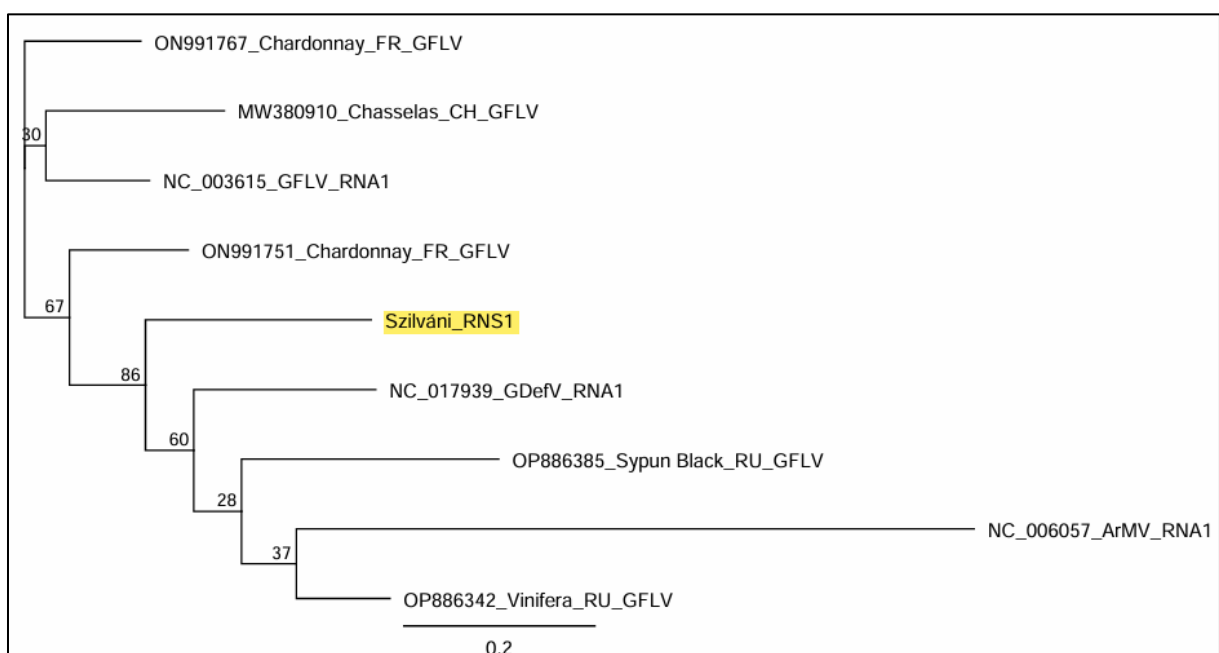
Mivel a két módszerrel elkészített filogenetikai fa nagyfokú eltérést mutatott egymástól, a Szilváni RNS1 szálát három szegmensre osztottuk. A szegmensek szekvencia-illesztéseit méretre vágtuk és PhyML eljárással filogenetikai fát készítettünk, 100-as bootstrap-analízist alkalmazva.

A Szilváni RNS1 1. szegmense szekvenciájának vizsgálata során nem tapasztaltunk eltéréseket a szekvenciák klasztereződésében a teljes szálról készített PhyML fához képest (20. ábra).



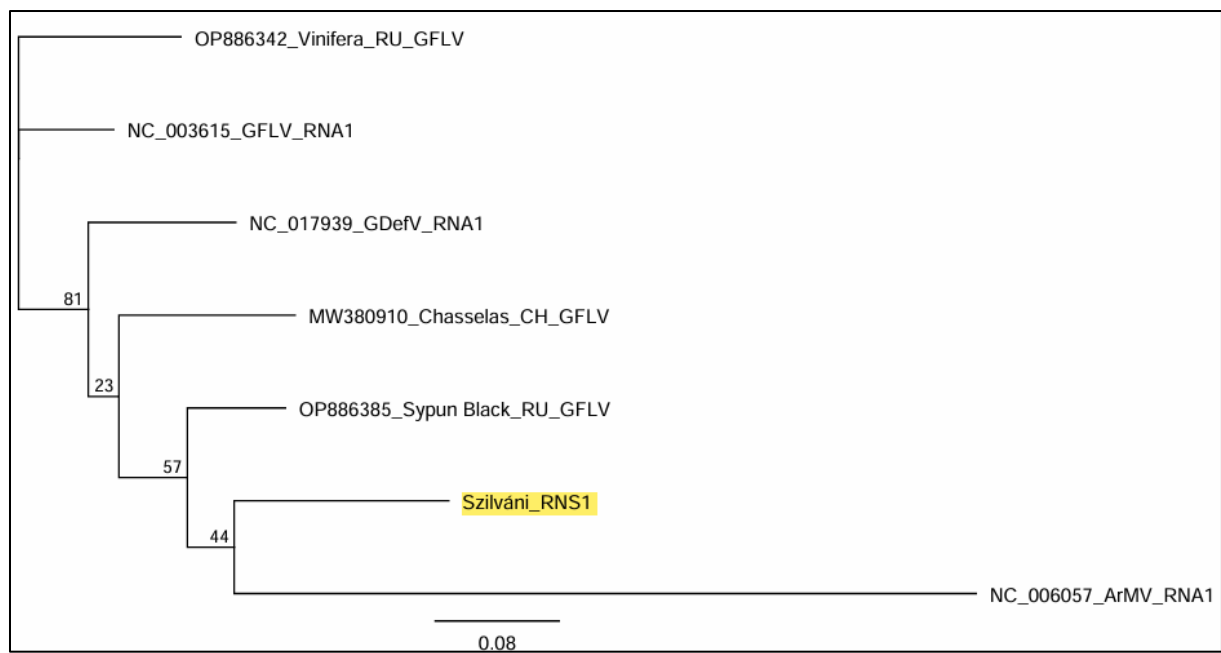
20. ábra: PhyML filogenetikai fa a Szilváni RNS1 1. szegmens rokonsági kapcsolatairól

A Szilváni RNS1 2. szegmense szekvenciája a PhyML fán azonban a GDefV-hez áll filogenetikailag a legközelebb (21. ábra).



21. ábra: PhyML filogenetikai fa a Szilváni RNS1 2. szegmens rokonsági kapcsolatairól

A 3. szegmens szekvenciája alapján készült PhyML filogenetikai fan pedig az ArMV-vel mutatja a legnagyobb rokonságot (22. ábra).



22. ábra: PhyML filogenetikai fa a Szilváni RNS1 3. szegmens rokonsági kapcsolatairól

5. Következtetések és javaslatok

Az általunk vizsgált 'Furmint' és 'Rizlingszilváni' szőlőfajtákon észlelt tünetekhez hasonló elváltozásokat figyeltek meg Törökországban, Anatóliában a 'Kara Dimrit' szőlőfajtán is, és itt írták le a világon először a GFLV és a ArMV rekombinációjából származó GDefV-t (Cigsar et al., 2003). A rekombináció a vírus esetében azért lehetett könnyebb, mert potenciálisan együtt tudnak létezni közös gazdaszervezetükben, a szőlőben, még hozzá hosszú ideig, ami növeli az esetleges találkozásuk valószínűségét ugyanabban a sejtben (Hily et al., 2021). A GFLV és az ArMV már régebb óta ismert vírusok, a GenBank adatbázisban is számos szekvencia adat áll rendelkezésre, amihez vissza lehet nyúlni az összehasonlításokhoz. Bár a GDefV-ről, nemrégiben történt felfedezése miatt, kevesebb adat áll rendelkezésre, az RNS1 (Elbeaino et al., 2012) és az RNS2 (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2005) nukleotid-szekvenciája is ismert és feltérképezett, ami lehetővé teszi elemzésekbe való bevonását.

A Szilváni mintánk RNS1 szálát nem sikerült teljes egészében kimutatnunk, az RNS2 szálát pedig egyáltalán nem. Eredményeink alapján nem kaptunk egyértelmű választ arra a kérdésünkre, hogy a három vizsgálatba vont nepovírus közül melyik van jelen ebben a fajtában. A filogenetikai elemzést követően van szegmens, amelynek szekvenciája a GFLV-hez, van, amelynek nukleotid sorrendje a GDefV-hez, és van, amely az ArMV-hez áll filogenetikailag a legközelebb. Annak eldöntésére, hogy a mintában levő nepovírus hogyan, esetlegesen milyen rekombinációs folyamatok eredményeképpen alakulhatott ki további vizsgálatok szükségesek.

A Furmint minta esetében eredményeink alapján elmondható, hogy a mintában levő nepovírus a GDefV és a GFLV egy közös variánsa. A filogenetikai fán való klasztereződéséből megállapítható, hogy az RNS1 szála az NCBI adatbázisban található GDefV referenciagenommal, míg az RNS2 szál egy magyar *Vitis vinifera* cv. Gloria Hungariae szőlőből származó izolátummal áll legközelebbi rokonságban. A magyar izolátum RNS2 szálát szintén rekombinációs vizsgálatokba vonták Franciaországban, eredményeik alapján a rekombinációk csak egyes szegmenseket érintenek (Vigne et al., 2008). Azonban a GDefV egy rekombináns vírus és jelenleg még nem bizonyított, hogy önállóan képes terjedni. Így további vizsgálatok szükségesek arra vonatkozóan, hogy ez a variáns vajon ArMV hiányában is képes-e önállóan replikálódni és terjedni.

További lehetséges kísérletek, vizsgálatok:

Érdekes további vizsgálatokat végezni mindkét minta esetében. A Szilváni RNS1 és RNS2 esetében a fennmaradó szakaszok kimutatásához és későbbi elemzésükhöz a kísérletek

folytatása szükséges. A már rendelkezésre álló és a kísérletek folytatásaként kapott eredmények ismeretében rekombinációs vizsgálatok elvégzése a mintákban jelenlévő nepovírusok és az adatbázisban fellelhető nepovírus szekvenciák bevonásával.

A szőlőt fertőző vírusokkal sajnos nehéz mechanikai úton fertőzni, gyakran vektorok szükségesek ehhez. Szemzéssel és oltással ugyan átvihetők, de a kísérletek értékelhetősége szempontjából ennek egy nagyon fontos előfeltétele, hogy az alanyra, amire átviesszük a vírust vírusmentes legyen. A Kecskeméti Kutatóintézetben rendelkezésre állnak olyan szőlő növények, amelyekkel ennek kivitelezése megoldható lenne.

Érdemes lehet a mintákat a jövőben szerológiai vizsgálatoknak is alávetni.

Mivel az ArMV és a GFLV vektorai fonalférgek, így a talajból vett mintából tisztítva tesztelni lehetne ezek vírusfertőzöttségét is az ültetvényekben.

Jelen kutatásunk során mintáinkban csupán három vírusra vonatkozóan folytattuk kísérleteinket. A jövőben a bioinformatikai elemzések során felmerült további vírusok, viroidok és szatellit RNS visszaigazolása és vizsgálata további kutatások célja lehet.

6. Összefoglalás

A szőlőültetvények vírusokkal és viroidokkal való fertőzöttsége nagymértékben befolyásolja azok egészségügyi állapotát és élettartamát. Igencsak nehéz feladat az ilyen fás szárú vegetatívan szaporított növények esetén a kórokozómentes, egészséges állapot fenntartása. Az ellenük való védekezést csupán kórokozómentes szaporítóanyagot használva, esetleg rezisztens fajtákat termesztve, valamint a vírusvektor kártevők és gyomok elleni védekezéssel, a zöldmunkák alatt pedig a higiénia betartásával lehet. A növényekben már jelen lévő kórokozók pontos kimutatását az újgenerációs vizsgálati módszerek, mint a nagy áteresztőképességű szekvenálási technikák (HTS) fejlődése, további vírusok diagnosztikai vizsgálatát és kutatását teszik lehetővé a szőlőben.

Dolgozatomban két szőlőtőkéről származó mintát vizsgáltunk: az egyik 'Furmint' fajtájú szőlőtőkéről a MATE Szőlészeti és Borászati Intézet Kecskeméti Kutató Állomásának üvegházából, a másik 'Rizlingszilváni' fajtájú tőkéről egy Zala vármegyei, szabadföldi szőlőültetvényből származott. Korábban már megtörtént az RNS kivonás és a kisRNS könyvtárak elkészítése. Az RNS kivonás mindkét növényegyed esetén hajtattott vesszőkön fejlődött hajtások alsó-, illetve felső leveleiből, a hajtáscsúcsból, a bimbóból és a kacsából történt. A kivonatokból egyedenként RNS keverék készült, majd megtörtént a kisRNS tisztítás, melyből szekvenálható könyvtár készült. Kísérleteinkhez a poolozott tisztított RNS kivonatot használtuk. A vizsgálatokba diplomamunkám készítése során az elkészült kisRNS könyvtárak szekvenálási eredményeinek elemzésének kezdetekor kapcsolódtam be. CLC programban végeztük el a szekvenálási eredmények elemzését. Több lehetséges vírus jelenlétét mutatta ki a bioinformatikai elemzés, melyek közül három organizmusra vonatkoztatva végeztük a kísérleteket: GFLV, ArMV és GDefV. Ezek jelenlétét független módszerekkel, mint RT-PCR alapú tesztel igazoltuk vissza saját tervezésű és diagnosztikai primerekkel. A PCR termékeket ezután baktériumban klónozzuk tovább (*E. coli*). A klónozott termékeket Sanger szekvenálásnak vetettük alá és a kapott eredményeket a NCBI adatbázisban található hasonló vírusokkal hasonlítottuk össze. Ezek alapján filogenetikai családfát készítettünk a Geneious bioinformatikai programban két módszerrel.

Eredményeink alapján a Furmint mintának RNS1 és RNS2 szálát is sikeresen tudtuk amplifikálni. Filogenetikai elemzését követően a kapott filogenetikai fák alapján elmondható, hogy a Furmint RNS1 szál szekvenciája a legnagyobb identitást a GDefV referenciagenomjával mutatja a Furmint RNS2 száláról pedig elmondható, hogy egy magyar izolátummal, egy *Vitis vinifera* cv. Gloria Hungariae szőlőből meghatározott szekvenciával klasztereződik együtt.

A Szilváni minta esetén, nem jártunk ilyen nagy sikerrel, az RNS1 szálnak csak egy jelentős darabját sikerült kimutatnunk. A filogenetikai elemzés után generált filogenetikai fák nem adnak egyértelmű választ arra a kérdésre, hogy a vizsgálatba vont vírusok közül melyik van jelen a mintában. Az két filogenetikai fa nagymértékben eltért egymástól, egyik szerint a Szilváni RNS1 szekvenciája az ArMV-hez áll közelebb másik alapján pedig a GFLV-vel hasonló szekvenciákkal klasztereződik. Így 3 szegmensre osztottuk tovább a szekvenciánkat: Az 1. szegmense a klasztereződésben nem mutat eltéréseket a szekvenciák a teljes szálról készített fához képest, a 2. szegmense alapján már a GDefV-hez mutat nagyobb hasonlóságot, a 3. szegmens pedig az ArMV-vel mutatja a legnagyobb rokonságot.

Tehát annak érdekében, hogy a három vizsgálatba vont vírus közül melyik van jelen a tőkében, esetleg milyen variáns, további vizsgálatok szükségesek a megalapozott következtetések levonásához.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Várallyay Évának és Koósne dr. Szathmáry Erzsébetnek támogatásukért, iránymutatásukért, szakmai javaslataikért és kitartó munkájukért, mindezek hozzásegítettek diplomadolgozatom megírásához. Köszönöm nekik, hogy mindig készséggel és szakszerűen válaszoltak felmerülő kérdéseimre és türelemmel viseltettek irántam.

Szeretném megköszönni a MATE Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék, Genomikai Kutatócsoport munkatársainak a laboratóriumban nyújtott segítségét. Különösen Nagyné dr. Galbács Zsuzsannának, akinek vigyázó szemei alatt tehettem meg első lépéseimet a laborban és ismerkedhettem meg a különböző kísérletekkel kutatásom elején. Majd később is fordulhattam hozzá bizalommal a legapróbb kérdésemmel is.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom barátaimnak, akik diplomadolgozatom megírása során végig támogattak és lelkesítettek.

8. Irodalomjegyzék

- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Digiario, M., Martelli, G.P., 2005. Complete Nucleotide Sequence of the RNA-2 of Grapevine Deformation and Grapevine Anatolian Ringspot Viruses. *Virus Genes* 30, 335–340. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-6776-5>
- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Martelli, G.P., 2003. Sequence analysis of the 3' end of three Grapevine fleck virus-like viruses from grapevine. *Virus Genes* 27, 11–16. <https://doi.org/10.1023/A:1025164200412>
- Andret-Link, P., Marmonier, A., Belval, L., Hleibieh, K., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., 2017. Ectoparasitic Nematode Vectors of Grapevine Viruses, in: Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., Fuchs, M. (Eds.), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing, Cham, pp. 505–529. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_25
- Boscia, D., Greif, C., Gugerli, P., Martelli, G.P., Walter, B., Gonsalves, D., 1995. Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closteroviruses. *VITIS - Journal of Grapevine Research* 34, 171–175. <https://doi.org/10.5073/VITIS.1995.34.171-175>
- Cigsar, I., Digiario, M., Gokalp, K., Ghanem-Sabanadzovic, N.A., Stradis, A.D., Boscia, D., Martelli, G.P., 2003. Grapevine deformation virus, a novel Nepovirus from Turkey. *Journal of Plant Pathology*.
- Cseh, E., Lázár, J., Takács, A., Kazinczi, G., Gáborjányi, R., 2008. A szőlő magyarországon előforduló és várhatóan megjelenő vírusos betegségeinek és kórokozóinak áttekintése. *Növényvédelem* 44, 535–544.
- Cseh, E., Takács, A., Kocsis, L., Gáborjányi, R., 2012. General properties of grapevine viruses occurring in Hungary. *j. cent. eur. agric.* 13, 44–57. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/13.1.1013>
- Daragó Á., 2014. Tűfonálféreg fajok elterjedése egyes hazai borvidékeken és az ellenük való védekezés újabb lehetőségei. <https://doi.org/10.18136/PE.2014.565>
- Digiario, M., Yahyaoui, E., Martelli, G.P., Elbeaino, T., 2015. The sequencing of the complete genome of a Tomato black ring virus (TBRV) and of the RNA2 of three Grapevine chrome mosaic virus (GCMV) isolates from grapevine reveals the possible recombinant origin of GCMV. *Virus Genes* 50, 165–171. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1094-4>

- Dolja, V.V., Kreuze, J.F., Valkonen, J.P.T., 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.02.002>
- Elbeaino, T., Digiario, M., Ghebremeskel, S., Martelli, G.P., 2012. Grapevine deformation virus: Completion of the sequence and evidence on its origin from recombination events between Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. *Virus Research* 166, 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.03.011>
- Fábián, R., 2020. Szőlő vírus - viroid fertőzöttség kimutatása RT-PCR alapú teszt és újgenerációs szekvenálási technika alkalmazásával (Diplomadolgozat). Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő.
- Graniti, A., Martelli, G.P., 1965. Further investigations on legno riccio (rugose wood), a graft-transmissible stem-pitting of grapevine. In *Proceedings international conference on virus and vector on perennial hosts with special reference to vitis*. Davis, USA.
- Harmon, F.N., Snyder, E., 1946. Investigations of the occurrence, transmission, spread, and effect of “white” fruit color in the Emperor grape. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 190–194.
- Hewitt, W.B., Goheen, A.C., Cory, L., Luhn, C., 1972. Grapevine fleck disease, latent in many varieties, is transmitted by graft inoculation. *Annales de Phytopathologie* No. hors série, 43–47.
- Hily, J.M., Poulicard, N., Kubina, J., Reynard, J.S., Spilmont, A.S., Fuchs, M., Lemaire, O., Vigne, E., 2021. Metagenomic analysis of nepoviruses: diversity, evolution and identification of a genome region in members of subgroup A that appears to be important for host range. *Arch Virol* 166, 2789–2801. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05111-0>
- Jaksa-Czotter N., 2019. Magyar szőlőültetvények vírusdiagnosztikája új, nagyérzékenységű diagnosztikai módszerrel és kajszi ültetvények fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata. <https://doi.org/10.18136/PE.2019.718>
- Lai, M.M.C., 1992. Genetic Recombination in RNA Viruses, in: Holland, J.J. (Ed.), *Genetic Diversity of RNA Viruses, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 21–32. https://doi.org/10.1007/978-3-642-77011-1_2
- Lebas, B., Adams, I., Al Rwahnih, M., Baeyen, S., Bilodeau, G.J., Blouin, A.G., Boonham, N., Candresse, T., Chandelier, A., De Jonghe, K., Fox, A., Gaafar, Y.Z.A., Gentit, P., Haegeman, A., Ho, W., Hurtado-Gonzales, O., Jonkers, W., Kreuze, J., Kutjnak, D.,

- Landa, B., Liu, M., Maclot, F., Malapi-Wight, M., Maree, H.J., Martoni, F., Mehle, N., Minafra, A., Mollov, D., Moreira, A., Nakhla, M., Petter, F., Piper, A.M., Ponchart, J., Rae, R., Remenant, B., Rivera, Y., Rodoni, B., Roenhorst, J.W., Rollin, J., Saldarelli, P., Santala, J., Souza-Richards, R., Spadaro, D., Studholme, D.J., Sultmanis, S., Van Der Vlugt, R., Tamisier, L., Trontin, C., Vazquez-Iglesias, I., Vicente, C.S.L., Vossenbergh, B.T.L.H., Wetzels, T., Ziebell, H., Massart, S., 2022. Facilitating the adoption of high-throughput sequencing technologies as a plant pest diagnostic test in laboratories: A step-by-step description. *EPPO Bulletin* 52, 394–418. <https://doi.org/10.1111/epp.12863>
- Lehoczky, J., Farkas, G., 1981. A szőlő látens foltosságának előfordulása Magyarországon. *Kertgazdaság* 13, 15–25.
- Martelli, G.P., 2017. An Overview on Grapevine Viruses, Viroids, and the Diseases They Cause, in: Meng, B., Martelli, Giovanni P., Golino, D.A., Fuchs, M. (Eds.), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing, Cham, pp. 31–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_2
- Martelli, G.P., 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology* 96, 1–136. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I1SUP>
- Martelli, G.P., Lehoczky, J., Quacquarelli, A., Sarospataki, G., 1967. A disorder resembling “legno riccio” (rugose wood) of grapevine in Hungary. *Phytopathologia Mediterranea* 6, 110–112.
- Martelli, G.P., Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Saldarelli, P., 2002. Maculavirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology* 147, 1847–1853.
- Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnkar, M., Reynard, J.-S., Rumbou, A., Saldarelli, P., Škorić, D., Vainio, E.J., Valkonen, J.P.T., Vanderschuren, H., Varveri, C., Wetzels, T., 2017. A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00045>
- Mekuria, T.A., Gutha, L.R., Martin, R.R., Naidu, R.A., 2009. Genome Diversity and Intra- and Interspecies Recombination Events in *Grapevine fanleaf virus*. *Phytopathology*® 99, 1394–1402. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1394>
- Nagy, P.D., Simon, A.E., 1997. New Insights into the Mechanisms of RNA Recombination. *Virology* 235, 1–9. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8681>
- Navarro, B., Pantaleo, V., Gisela, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., Di Serio, F., Burgián, J., 2009. Deep Sequencing of Viroid-Derived Small RNAs from Grapevine Provides

- New Insights on the Role of RNA Silencing in Plant-Viroid Interaction. PLoS ONE 4, e7686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007686>
- Panjan, M., Saric, A., 1963. Seroloska dijagnostika Arabis mizaik virusa iz vinoe loze I tresnje geldifuzinom metodom. Agronomski Glasnik 204–206.
- Pantaleo, V., Saldarelli, P., Miozzi, L., Giampetruzzi, A., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., Burgyan, J., 2010. Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine. Virology 408, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.09.001>
- Perry, K.L., McLane, H., Hyder, M.Z., Dangl, G.S., Thompson, J.R., Fuchs, M.F., 2016. Grapevine red blotch-associated virus is Present in Free-Living *Vitis* spp. Proximal to Cultivated Grapevines. Phytopathology® 106, 663–670. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-16-0035-R>
- Rosciglione, B., Cannizzaro, G., Castellano, M.A., Martelli, G.P., Savino, V., 1983. Mealybug transmission of grapevine virus A. Vitis 22, 331–347.
- Scheu, G., 1936. Mein Winzerbuch. Reichmährstand Verlag, Berlin.
- Simon, A.E., Bujarski, J.J., 1994. RNA–RNA recombination and evolution in virus infected plants. Annual Reviews of Phytopathology 337–362.
- Várallyay É., 2023. Aktuális helyzetkép a szőlőt fertőző vírusokról. Borászati füzetek 33–37.
- Vigne, E., Marmonier, A., Fuchs, M., 2008. Multiple interspecies recombination events within RNA2 of Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. Arch Virol 153, 1771–1776. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0182-y>

Internetes hivatkozások:

87/2006. (XII.28) FVM rendelet a szőlő szaporító anyag előállításáról, minősítéséről és forgalomba hozataláról.

Hegyközségek Nemzeti Tanácsa (HNT); Területi adatok borvidéki bontásban (2024): <https://www.hnt.hu/wp-content/uploads/2024/10/Teruleti-adatok-borvideki-bontasban-2024.07.31..pdf>

International Organisation of Vine and Wine (OIV): <https://www.oiv.int/>

Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses, The 9th Report of the ICTV (2011): https://ictv.global/report_9th/RNApos/Picornavirales/Secoviridae

9. NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Utassy Kristóf
A Hallgató Neptun kódja: WEUF7J
A dolgozat címe: Egyedi tüneteket okozó GFLV és ArMV fertőzések molekuláris vizsgálata szőlőn
A megjelenés éve: 2024
Belső konzulens: Dr. Várallyay Éva
A konzulens intézetének neve: MATE Növényvédelmi Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Növénykórtani Tanszék, Genomikai Kutatócsoport
Belső konzulens: Koós dr. Szathmáry Erzsébet
A konzulens intézetének neve: MATE Növényvédelmi Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Növénykórtani Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottnak, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

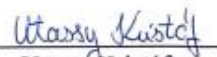
A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumába. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumában.

Kelt: Budapest, 2024. 10. 31.


Utassy Kristóf
Hallgató aláírása

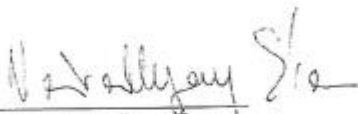
NYILATKOZAT

Utassy Kristóf (hallgató Neptun azonosítója: WEUF7J) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Gödöllő, 2024. 10. 31.


Dr. Várallyay Éva
belső konzulens

NYILATKOZAT

Utassy Kristóf (hallgató Neptun azonosítója: WEUF7J) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Budapest, 2024. 10. 31.


Koósné dr. Szathmáry Erzsébet
belső konzulens