

DIPLOMADOLGOZAT

Hegedüs Vivien

2025



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Gödöllői Campus

Növényvédelmi intézet

Növényorvosi mesterképzési szak

**A ligeti szőlő (*Vitis sylvestris*) viromjának vizsgálata HTS-
sel és molekuláris módszerekkel**

Készítette: Hegedüs Vivien

Konzulensek:

Dr. Bán Rita

**Egyetemi tanár
Növényvédelmi intézet
Integrált Növényvédelmi tanszék**

Dr. Várallyay Éva

Tudományos tanácsadó

Dr. Jaksa-Czotter Nikoletta

Tudományos munkatárs

**Gödöllő
2025**

Tartalom

Tartalom	3
1. Bevezetés és célkitűzések.....	1
2. Szakirodalmi áttekintés	2
2.1. A <i>Vitis sylvestris</i> -ről általában	2
2.1.1. A ligeti szőlő (<i>Vitis sylvestris</i>) történelmi jelentősége	2
2.1.2. A ligeti szőlő (<i>Vitis sylvestris</i>) rezisztencia nemesítésben való szerepe	2
2.2. Vírusok általános jellemzése	3
2.2.1. Vírusok és viroidok	3
2.2.2. Növényeket fertőző vírusok	4
2.2.3. Vírusok fertőzési mechanizmusa	4
2.3. Szőlő vírusbetegségei	5
2.3.1. A szőlő fertőző leromlása.....	5
2.3.2. Szőlő levélsodródás.....	5
2.3.3. Faszöveti barázdáltság.....	6
2.3.4. Grapevine Fleck Virus	7
2.4. Kevésbé ismert szőlővírusok	7
2.4.1. Grapevine Virus T és Grapevine Foveavirus A	7
2.5. Szőlő vírusdiagnosztika	8
2.5.1. PCR-teszt.....	9
2.5.2 A Sanger-szekvenálás és a nagy áteresztőképességű szekvenálás (HTS) alapú vírusdiagnosztika.....	10
3. Anyag és módszer	11
3.1. Mintavétel.....	11
3.2 Bioinformatikai elemzés.....	11
3.3. Primer illesztés és tervezés	12

3.4. cDNS minőségének ellenőrzése - aktin teszt.....	13
3.5. Gradiens PCR a GFVA primer optimizálására	13
3.6. RT-PCR reakció	14
3.7. PCR termék tisztítása.....	15
3.8. PCR termék klónozása.....	16
3.8.1. Ligálás	16
3.8.2. Transzformálás	17
3.8.3. Plazmid izolálás baktériumtenyészetből	17
3.9. Sanger Szekvenálás és szekvenciák elemzése.....	18
4. Eredmények.....	19
4.1. Bioinformatikai elemzés eredményei	19
4.2. Vírusok visszaigazolása.....	20
4.2.1. Aktin teszt eredménye	20
4.2.2. A GRSPaV kimutatása	21
4.2.3. A GFVA kimutatása.....	22
4.3. PCR termékek tisztítása és klónozás	24
4.4. Filogenetikai elemzés	26
5. Következtetések és javaslatok	29
6. Összefoglalás.....	30
7. Irodalomjegyzék.....	32
8. Nyilatkozatok	37
.....	38

1. Bevezetés és célkitűzések

Magyarországon a szőlő évezredek óta fontos gazdasági növény, de termesztésének nem csak gazdasági jelentősége, hanem kulturális vonzata is van. Jelenleg a szőlőtermesztésben az egyik legnagyobb kihívást a vírusos megbetegedések jelentik, mivel egyenlőre csak preventív jellegű növényvédelmi technikákat tudunk ellenük alkalmazni, mint a rezisztens fajták alkalmazása, vagy a fertőzésmentes szaporítóanyag. A vírusos fertőzések gyakran látensek, vagy a tüneteket nem is egy adott fitopatogén okozza, hanem egyszerre több.

A kutatást, melyhez csatlakoztam, 2019-ben kezdte meg a MATE NVI Genomikai Kutatócsoport. A kutatás célja az volt, hogy feltérképezzék a *Vitis sylvestris*, a ligeti szőlő szerepét, mint vírusrezervoár növény, nemcsak hagyományos diagnosztikai módszerekkel (például PCR-teszt), hanem újgenerációs szekvenálási technikákkal is. Jövőbeli növényorvosként számomra igazán izgalmasnak ígérkezett ez a kutatás, mivel betekintést nyerhettem a növényvédelem laboratóriumi és genetikai hátterébe, illetve megvizsgálhattam a ligeti szőlő viromját, mely akár régi vírusok jelenlétét is igazolhatja.

Kutatásom egyik célja az volt, hogy a MATE Genomikai Kutatócsoport által szedett *Vitis sylvestris* mintákból előállított kisRNS könyvtár szekvenálási adatait bioinformatikai módszerekkel elemezzem és a mintákban lévő vírusokat azonosítsam.

Az azonosított vírusok jelenlétét RT-PCR módszerrel igazoljam vissza.

A visszaigazolt vírusok variánsainak rokonsági kapcsolatait vizsgáljam, a szekvenciák filogenetikai elemzésével.

Levonni a következtetést, hogy esetlegesen milyen vírusok lehettek jelen Magyarországon a filoxéra járvány előtt, illetve hogy az általam vizsgált ligeti szőlő minták ténylegesen vírusrezervoárként funkcionálnak-e.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A *Vitis sylvestris*-ről általában

2.1.1. A ligeti szőlő (*Vitis sylvestris*) történelmi jelentősége

A szőlő termesztésbe vétele 5-6000 éve kezdődött a ligeti szőlő (*Vitis sylvestris*) gondozásával, majd később szaporításával. E folyamat során alakult ki a kerti szőlő (*Vitis vinifera*), amely a termesztés során mára már jelentősen megváltozott (Fabrizio és Arroyo-Garcia, 2020). Ezen trendekhez hasonlóan hazánkban is, a szőlőtermesztés az egyik legnagyobb múltra tekint vissza a gazdasági növények közül. A Kárpát-medencében már a honfoglalás előtt is termelt szőlő. Annak ellenére, hogy az 1870-es évek közepén a filoxéra megtizedelte az ültetvényeket, tudatos termesztéssel és a nemesítők munkájának köszönhetően jelenleg is nagy értéket képviselnek a magyar szőlő ültetvények. Napjainkra a *Vitis sylvestris* C. C. Gmel. állományai igen lecsökkentek a természetes élőhelyek degradációja, illetve az invazív fajok behurcolása miatt, mára fokozottan védetté nyilvánították. Magyarországon elsősorban ártereken, ligeterdőkben fordul elő, például a Duna, Tisza és Dráva folyók mentén, és a Kiskunság ligetesebb részein.

2.1.2. A ligeti szőlő (*Vitis sylvestris*) rezisztencia nemesítésben való szerepe

A filoxéra vagy szőlőgyökértetű (*Viteus vitifoliae*) őshazája Amerika. Európában először az 1860-as években jelent meg Franciaországban, majd az 1800-as évek végére az egész kontinensen elterjedt. Magyarországon először 1874-ben, az Osztrák-Magyar Monarchia területén jelent meg a kártevő (Majdán, 2008). A termesztők nagy erőfeszítésekkel próbáltak védekezni a filoxéra ellen, de a kezdeti próbálkozások a növényvédőszerrel (szénkénegezéssel) és öntözéssel, vagy árasztással közel hatástalannak bizonyultak. A későbbiekben a szőlőhajtásokat homokos talajba ültették, mivel a kártevő nem képes életben maradni ilyen körülmények között. Ezzel párhuzamosan észak-amerikai kutatók és nemesítők a filoxérának ellenálló gyökerű állományokat találtak Amerikában, melyekhez hasonlóan tökéletes alanynak bizonyult a *Vitis sylvestris*, mivel genetikailag nagy változatosságot mutat, illetve számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik a rezisztencia nemesítők részére (Hajdu, 2019).

A filoxéra ellen való védekezést megnehezítette, hogy akkoriban a termesztők nehezen ismerték ki a károsító élettanát és szaporodásbiológiáját. A filoxéra életciklusainak több változata is ismert, Európában a holociklikus fejlődés a legelterjedtebb. A telelő petéből kikelő fundatrix (szárnyatlan nőstény) szűznemzéssel hozza létre az első nemzedéket. A növény vegetációs időszak alatt 4-5 nemzedék is létrejöhet. Ősszel kialakulnak az ivaros formák, melyek lerakják a telelő petéket (Forneck et al. 2019). A filoxérának egy levél- és egy gyökérlakó alakja van. A levéllakó alak Európában ritkán jelenik meg, és ha még meg is található néhány helyen, ott sem okoz súlyos problémákat (Forneck és Huber, 2009). A legnagyobb kárt a gyökérlakó alakok okozzák a szívogatásukkal, olyan nagy mértékben, hogy az 1800-as évek végére Magyarországon a kötött talajokon termesztett állományok nagyrészt kipusztította. A gyökereken ejtett sebek helyén először golyvák keletkeznek, és a sérülések utat nyitnak a másodlagos kórokozók számára is. A gyökér tápanyag és víz felvétele romlik, minek következtében a növény elhal.

A *Vitis sylvestris* fontos szerepet játszott a kerti szőlő rezisztencia nemesítésében is. A szőlő egyik másodlagos metabolitja a sztilbén, mely valamilyen biotikus vagy abiotikus stressz hatására szintetizálódik. Egy kísérlet során bizonyították, hogy az alacsonyabb sztilbén koncentrációval rendelkező populáció fogékonyabb volt a szőlő peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) által okozott fertőzésre, mint az ugyan ilyen körülmények között nevelt, magas sztilbén koncentrációval rendelkező populáció (Duan et al., 2015). A *Vitis sylvestris* ilyen téren kiváló alanynak bizonyult, mert természetes védelmet nyújtott a szőlő peronoszpóra ellen a magasabb sztilbén tartalma miatt.

2.2. Vírusok általános jellemzése

2.2.1. Vírusok és viroidok

A vírus elnevezés a latin *virus* szóból ered, melynek jelentése „méreg”. A vírusok olyan kisméretű organizmusok, melyek önálló mozgásra nem képesek, illetve önállóan funkcionáló anyagcserével sem rendelkeznek. A megtámadott sejtet használják fel arra, hogy saját örökítőanyagukat felszaporítsák, hogy később elterjedhessenek a gazdaszervezetben, gyakorlatilag parazitálva azt (Gergerich és Dolja, 2006). A sejten kívüli vírusrészecskéket virionnak nevezik, melyek az örökítőanyagból -mely a legtöbb növényi vírus esetében RNS alapú- és kapszidból (fehérjeburokból) állnak (Geng et al., 2021).

A viroidok olyan parányi méretű, kizárólag növényi kórokozók, melyek a gazdaszervezetben saját, önálló szaporodásra képesek. Fehérjeburokkal nem rendelkeznek, és egy körré záródott (cirkuláris) egyszálú RNS-ből állnak (Martelli, 2017). Méretük még a vírusokénál is jelentősen kisebbek, az egész genomjuk 246-375 nukleotid (nt) hosszúságú. Jelenleg két családba, az *Avsunviroidae* és a *Pospiviroidea* családba sorolhatjuk őket, melyen belül gazdakörük és szekvenciájuk alapján 33 fajt különítettek el.

2.2.2. Növényeket fertőző vírusok

A növényeket megfertőző vírusok döntő többségében egyszálú RNS (ssRNS), de előfordulnak egyszálú DNS (ssDNS) és kétszálú RNS vagy DNS (dsRNS vagy dsDNS) vírusok is. Közös tulajdonságuk, hogy kisméretű örökítő anyagot hordoznak, melyek az alapvető életműködésükhöz szükséges géneket kódolják. Ezek közül a három legfontosabb a replikáz, a köpenyfehérje és a mozgási fehérje. Amennyiben létrejön a kompatibilis növény-kórokozó kapcsolat, akkor a vírusok megváltoztatják a megfertőzött növény metabolizmusát és jelenlétük számos gén működését érinti, és ezek összességében később a kórokozó jelenlétének jellegzetes tüneteit eredményezik (Pallas és García, 2011).

2.2.3. Vírusok fertőzési mechanizmusa

A növényeket megfertőző vírusok nem tudnak aktívan bejutni a gazdasejtbe. Ez annak köszönhető, hogy a növényi sejtet a kutikula és maga a sejtfal is védi a külső környezeti tényezőkkel szemben. A vírusok a növényi gazdába legtöbbször valamilyen sérülésen keresztül jutnak be, melyet okozhat ember (pl: oltás, metszés), természeti tényező (pl: jégverés). Bejuthatnak vektorok által létrehozott nyílásokon, sebeken keresztül, vagy a vektorok a növényi szállítóelemekhez való kapcsolódása során és terjedhetnek fertőzött szaporító anyaggal. A leggyakoribb vírusvektorok közé a levéltetvek, tripszek, pajzstetvek és a fonálférgék tartoznak (Hull, 2014).

A növényi gazdába bejutott fitopatogének a kapszid segítségével hozzákötődnek az élő sejthez, majd a kapszidban tárolt nukleinsav bejut a gazdasejtbe, ahol az megváltoztatja az adott sejt metabolizmusát. A megtámadott gazdasejt elkezd replikálni a vírus nukleinsavait és fehérjéit, majd azok sejtről sejtre terjedve, vagy a szállítószövetrendszerbe jutva szisztemikusan megfertőzik az egész növényt (Manfred, 2015).

2.3. Szőlő vírusbetegségei

Jelenleg több, mint 100 olyan vírus patogént tartanak számon, amely képes megfertőzni a szőlőt, de csupán 31 olyan vírust azonosítottak, melyek a 4 legjelentősebb betegség-komplex kialakulásáért felelősek és komoly károkat, így gazdasági veszteségeket okoznak szőlőben (Martelli, 2017). Az elmúlt években egyre több és több vírust és viroidot fedeznek fel a kutatók, a ma használt, a vizsgált növényben jelenlévő összes virális patogén kimutatását lehetővé tevő technológiának köszönhetően. A jelenleg használt, vírusok megkülönböztetésére alkalmas szekvenálási technológiákkal már lehetséges teljes terjedelmében meghatározni a kórokozók RNS-ének nukleotid sorrendjét, mellyel konkrétan képet kaphatunk a különböző vírusok genomjának szerveződéséről, lehetséges morfológiájáról, illetve taxonómiai besorolásukról is (Fall et al., 2020).

2.3.1. A szőlő fertőző leromlása

A szőlő fertőző leromlása betegség komplexet több vírus okozza. A betegség már a filoxéra járvány előtt is jelen volt hazánkban. Legfontosabb okozója a grapevine fanleaf virus (GFLV), de az arabis mosaic virus (ArMV), a cherry leafroll virus (CLRV, Cseresznye levélsodródás vírus), a tobacco ringspot virus (TRSV, Dohány gyűrűsfoltosság vírus), a tomato ringspot virus (ToRSV, Paradicsom gyűrűsfoltosság vírus) és a grapevine deformation virus (GDefV) is közrejátszanak a betegség kialakulásában. A szőlő fertőző leromlásáért felelős vírusok elsősorban fonálférges közvetítésével terjednek, illetve a fertőzött vetőmag jelent veszélyforrást. A betegség jelenleg a legnagyobb kihívást okozza a szőlőtermesztésben, világszerte elterjedt (Várallyay, 2023).

2.3.2. Szőlő levélsodródás

A szőlő levélsodródásáért felelős víruscsoport esetében eddig 11 olyan vírust írtak le, melyek felelősek lehetnek a betegség kialakulásáért. Az ide tartozó vírusokat gyűjtőnéven grapevine leafroll-associated virus-nak (GLRaV) nevezzük, és számozással különböztetjük meg őket. A legjelentősebb és legelterjedtebb a Grapevine leafroll-associated virus-3 (GLRaV-3, Szőlő levélsodródás vírus-3, *Ampelovirus trivitis*), mely a *Closteroviridae* családba és az *Ampelovirus* nemzetségbe tartozik. A vírus fő vektorai a levéltetvek és liszteskék, de fertőzött

szaporítóanyaggal is terjed (Maree et al, 2013). Magyarországon a leggyakrabban a GLRaV-1 volt kimutatható, de jelen vannak még a GLRaV-3, -6, és -7 vírusok is. Egyetlen esetben a GLRaV-2-t is ki tudták mutatni (Magyarmezőgazdaság.hu, 2014).

A szőlő levélsodródás betegsége világszerte elterjedt, és a szőlő egyik legfontosabb betegsége. A terjesztésért főleg a pajzstetvek (*Coccoidea* öregcsalád) és a levéltetvek (*Aphidoidea* öregcsalád) felelősek (Cabaleiro és Segura, 1997). A GLRaV-2 és -7 vírusok kivételt képeznek, mivel még nincs bizonyított vektor, mely terjeszti őket (Naidu et al., 2014).

2.3.3. Faszöveti barázdáltság

A faszöveti barázdáltság tünetegyüttes (Grapevine rugose wood) kialakulásáért is több vírus felel, legjelentősebbek a grapevine virus A (GVA, *Vitivirus alphavitis*), a grapevine virus B (GVB, *Vitivirus betavitis*) és a grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV). Ez a betegség oltással átvihető, és az is a leggyakoribb terjedési módja, de pajzstetvekből (*Coccoidea* öregcsalád) is kimutatták már a vírus jelenlétét. A fertőzést 4 elváltozással lehet jellemezni: a *Rupestris stem pitting*, melyet főleg a GVA és a GRSPaV okoznak, a *Kober stem grooving* nem bizonyítottan vírus eredetű, az *LN33 stem grooving*, és a *Corky bark* elváltozásokat főként a GVB okozza (Havitt, 1954).

A szőlőtőke rupestris szárbarázdáltsággal összefüggő vírust (GRSPaV) először 1998-ben fedezték fel, a vírus a *Foveavirus* nemzetségbe, azon belül a *Tymovirales* rendbe tartozik (Meng, 2017). A vírus pozitív értelmű, 1 szálú RNS vírus, a vírus részecskéi általában 800-950 nm hosszúak. A betegség általában vegetatív szaporítással, emberi mechanikai munkákkal terjed, természetes vektorát még nem találtak. A fertőzött tőkéken barázdáltságot okozhat, a növények növekedése gyenge és akár termés kiesést is okozhat, esetlegesen oltási összeférhetetlenség léphet fel az alany és a nemes növény között. A betegség azonban sokszor látens, főleg bizonyos fajtáknál és bizonyos környezeti tényezők mellett. A tünetek gyakran nagyon minimálisak vagy lappanganak, ami nagy mértékben megnehezíti a betegség felismerését.

2.3.4. Grapevine Fleck Virus

A grapevine fleck virus (GFkV, Szőlő látens foltosság vírus, *Maculavirus vitis*) az egész világon elterjedt vírus. A kórokozó szerkezetileg egyszálú RNS vírus, a *Tymoviridae* családba tartozik.

A vírus a látens foltosság betegség komplexet okozza, mely az európai szőlőfajtákon gyakran látens, inkább az amerikai szőlőültetvényeken okoz gondot. A GFkV ha egyedüli kórokozó, akkor gyakran semmilyen tünet nem jelentkezik a növényen, azonban egy másik vírusfertőzéssel társulva már komoly gondokat tud okozni. Legjellemzőbb tünete a leveleken megjelenő foltok, az úgynevezett „fleck”-ek. Főbb tünetei közé még növényi vitalitás csökkenése és a termés hozam visszamaradása sorolható.

A betegség nem terjed mechanikai úton. Elsősorban vegetatív szaporításnál fordul elő a fertőzés. Jelenleg ismert rovarvektora nincs (Martelli és Boudon-Padieu, 2006).

2.4. Kevésbé ismert szőlővírusok

2.4.1. Grapevine Virus T és Grapevine Foveavirus A

A grapevine virus T (GVT) viszonylag újonnan felfedezett, egy szálú RNS vírus, mely a *Foveavirus* nemzetségbe tartozik. A vírust először 2017-ben írták le, azonosítása már újgenerációs szekvenálási technológiákkal történt. Hazánkban is leírták már, és a 15 vizsgált ültetvényből 11-ben jelen volt. A különböző szőlőültetvényekből vett mintákból a GVT törzsek közt jelentős volt az eltérés. A betegség az esetek többségében látens volt, de a vírus valószínűsíthetően már régóta jelen van Európában (Demian et al. 2021).

A betegség vegetatív szaporítással terjed, vagy mechanikai munkák által. Jelenleg még nem bizonyított a rovarvektorokkal való terjedése. Azonosítását a fertőzött tőkén nehezíti, hogy nincsenek egyértelműen elkülöníthető tünetei, a beteg növények általános vírusfertőzésre utaló jeleket mutatnak, például klorotikus foltok a levélen vagy visszamaradt növekedés, termés csökkenés. Sokszor más vírusokkal együtt fordul elő. Ilyenkor sokkal erősebb tünetek és fertőzések is kialakulhatnak, emiatt a vírus további vizsgálata elengedhetetlen. (Jo et al., 2017).

A grapevine foveavirus A (GFVA) hasonlóan a GVT-hez, a *Foveavirus* nemzetségbe tartozik. Genomja egyszálú RNS genom. A vírust először 2020-ban, Svájcban írták le, azóta pedig csak egyszer, 2023-ban, Franciaországban. A fertőzött növények nem közvetlen egymás mellett helyezkedtek el az ültetvényen belül, hanem szórtan, véletlenszerűen.

Újgenerációs szekvenálási technológiákkal kimutatták, hogy a GFVA egy különálló faj, azonban így is nagymértékű hasonlóságot mutat a GVT referencia genomjaihoz (81-89%-os egyezés).

Eddigi vizsgálatok alapján a betegség önmagában látens, nem okoz tünetek a megfertőzött növényen. Ezzel szemben, ha már más vírusokkal együtt lép fel, akkor általános vírustünetek jelentkezhetnek a fertőzött növényeken, például az ízközők nagymértékű rövidülése, vagy a növények vigorának romlása (Hily et al. 2024).

2.5. Szőlő vírusdiagnosztika

A szőlőtermesztők napjainkban több nehézséggel küzdenek. Az éghajlat változás nagymértékben befolyásolja a termesztést, mivel a hosszabb ideig tartó meleg időszakok miatt nem csak a növények általános kondíciója romlik, hanem egyre több fitopatogén és kártevő jelenik meg.

A molekuláris módszerek előtt a növényi vírusdiagnosztika tünetmegfigyeléseken alapult. Ez magában foglalta az ültetvény leveleinek, ágainak és a körülöttük lévő növényeknek rendszeres ellenőrzését, különböző betegségek tüneteire odafigyelve. Hátránya az volt, hogy a különböző vírusbetegségeket csak megfigyelésre alapuló vizsgálattal sokszor lehetetlen megkülönböztetni egymástól (Portela et al., 2024).

A vírusokkal szembeni védekezés egyetlen módja a megelőzés, amelynek alapja a patogénmentes szaporítóanyag előállítás. A sikeres szaporítóanyag előállításban nagy szerepet játszanak a különböző vírusdiagnosztikai módszerek.

A bioteszt, vagy biológiai indexelés az első módszerek közé tartozik, mellyel növényi vírusokat tudtak kimutatni. Az eljárás során feltételezetten fertőzött növényi anyagból (pl: levélnedv) származó mintát inokulálnak egy tesztnövényre. A tesztnövény az adott betegségre fogékony, jellegzetes tüneteket (pl: mozaikfoltosság, nekروزis) produkál, ezeket figyelik meg a teszt során. Gyakran használnak pozitív és negatív kontrollokat is, hogy növeljék a teszt megbízhatóságát (Rott et al, 2017).

Az ELISA-tesztet (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 1971-ben, Svédországban találták fel. A teszt az antigén-antitest kölcsönhatásra épül, de több változata is ismert. Legtöbbször az antitestet rögzítik egy szilárd fázishoz (ez leggyakrabban mikrotiter-lemez), majd hozzáadják a vizsgálandó antigént. A mintát lemossák, hogy a szabadon maradt antigének ne maradjanak bent, majd hozzáadnak enzimmel jelölt további antitesteket, melyek kötődés

után úgynevezett „szendvics-komplexet” képeznek. A nem kötődött antitesteket megint lemossák, majd ez után egy enzimszubsztrátot adnak a mintához. A keletkező színváltozás arányos az antigének mennyiségével (Alhajj et al., 2023). Az ELISA-teszt hatékony, pontos, és könnyen automatizálható volt, illetve specifikus vírusokra is lehetett alkalmazni, ezért gyorsan elterjedt diagnosztikai módszerré vált. A tesztet a szőlő vírusdiagnosztikánál is alkalmazzák, már több vírusra készültek speciális kit-ek, mint például az ArMV, GFLV, GPGV, GFkV, GVA és több GLRaV változatra is (Biobera, 2017).

2.5.1. PCR-teszt

A Polimeráz Láncreakció (PCR) lehetővé teszi, hogy rövid idő alatt nagymértékben sokszorosítsanak adott DNS szakaszokat. A PCR-teszthez szükséges egy DNS-minta, primerek, melyek illeszkednek az általunk vizsgálni kívánt DNS-szakasz végeihez, DNS-polimeráz, mely az új DNS-szálakat szintetizálja, nukleotidok (dNTP), melyek a DNS építőkövei és végül egy puffer, egy olyan oldat, mely biztosítja a reakcióhoz szükséges optimális körülményeket. A PCR-teszt meghatározó korlátja az, hogy csak ismert vírusok kimutatására alkalmas.

A PCR több hűtési és fűtési ciklust foglal magában, melyet egy thermal cycler készülék végez el. A folyamat 3 fő lépése a denaturáció (kettős-szálú DNS szétválasztása két egyszálú szálra), a kötődés (primerek kötődése a szekvenciákhoz) és az elongáció (a polimeráz nukleotidokat kapcsol egymáshoz, ezzel létrehozva az új DNS szálakat).

A PCR-nek jelenleg több változata is ismert, de a diagnosztikában rutinszerűen az reverz transzkripció polimeráz-láncreakciót (RT-PCR) alkalmazzák, mivel a folyamat gyors, és érzékeny. Az „RT” a reverz transzkriptáz enzimet jelöli, mely az RNS szálból egy ahhoz komplementer DNS szálakat készít, majd ezeket felszaporítva egy olyan PCR terméket kapunk, amely alapján már meg tudjuk határozni az adott vírus nukleotid sorrendjének egy szakaszát (Massart et al., 2017). A vizsgálatnak az a hátránya, hogy a kapott eredmény előfordul, hogy hamisan negatív, mivel ha a vírus-koncentráció túl alacsony, a teszt nem biztos, hogy kellő mennyiségű DNS-t tud felszaporítani ahhoz, hogy pozitív eredményt kapjunk.

A valós idejű, kvantitatív PCR (qPCR), lényege, hogy a DNS sokszorosítást valós időben, kvantitatívan tudjuk nyomon követni, így meg tudjuk határozni a DNS templát kiindulási mennyiségét. A valós idejű RT-qPCR módszer változatát ma már valamennyi szőlő vírus kimutatására alkalmazzák (Fajardo et al., 2017).

2.5.2 A Sanger-szekvenálás és a nagy áteresztőképességű szekvenálás (HTS) alapú vírusdiagnosztika

A Sanger-szekvenálást Frederick Sanger dolgozta ki 1977-ben. A módszer segítségével a DNS-t felépítő nukleinsavak bázissorrendjét, szekvenciáját lehet meghatározni egy adott szakaszon. A Sanger-szekvenálás sokáig egyedülálló technika volt, pontos eredményeket produkált. Hátránya volt azonban, hogy csak egy molekula nukleinsavsorrendjét tudta olvasni egyszerre, és a folyamat is igen költséges volt (Jaksa-Czotter et al., 2024).

Az új generációs vagy nagy áteresztőképességű szekvenálás (HTS) a 2000-es évek közepétől vált elérhetővé. Egyszerre sok millió nukleinsav molekula nukleotid sorrendjét képes meghatározni. Az új generációs szekvenálás során a DNS-t kisebb darabokra, úgynevezett fragmentumokra bontják, majd adaptereket ligálnak hozzájuk. Az így kapott fragmentumokat amplifikálják (általában PCR-rel) és szekvenálják. Ez a folyamat rendkívül gyors, és nagy mennyiségű adat előállítását teszi lehetővé (Emiyu, 2022). A szekvenálás eredményeként a minta egészében található összes nukleinsav bázissorrendjét megtudhatjuk. Az új generációs szekvenálások diagnosztikai eszközként való alkalmazásával potenciálisan a vizsgált mintában levő összes nukleinsav szekvenciája meghatározható. Ugyan a Sanger-szekvenáláshoz képest minimálisan nagyobb a hibaaránya, de a nagymértékű lefedettség miatt pontossága megbízható. Hátránya, hogy bioinformatikai ismereteket, és nagyobb laboratóriumi erőforrásokat igényel (Nizamani et al., 2023).

A legelterjedtebb HTS programok közé tartozik az Illumina, vagy az Ion Torrent, melyek rövid olvasathosszúságú technológiák, illetve az újabb hosszú olvasathosszúságú rendszerek, mint az Oxford Nanopore és a PacBio.

A vírusfertőzések során a növény védekezőrendszere váltja ki azt az siRNS („*small interfering*” RNS, mely gyakorlatilag a kisRNS egyik fajtája) folyamatot, amelynél vírus eredetű, és a vírus bázissorrendjével megegyező, 21-25nt hosszúságú kis RNS-ek keletkeznek nagy számban (Akbar et al., 2012).

3. Anyag és módszer

3.1. Mintavétel

A ligeti szőlő mocsaras területeken, vadon élő növény. Ezen a természetes állományok mintavételezését a MATE Genomikai kutatócsoport (korábbi NAIK-MBK) munkatársai végezték 2019. június 27.-én. A minták több helyről származnak: a Feketeerdő területéről 6 db, melyeket egy térségből, de nem ugyan onnan szedtek, ezért az 1-3 és 4-6-ig minták különböznek, és a Hédervár-Kimle közötti területről pedig 3 db ligeti szőlőről szedtek levél és kacs mintákat. A szedett növényi részeket alufóliába csomagolták és hűtőtáskába helyezték, majd felhasználásukig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolták.

A mintákból RNS-t izoláltak és kisRNS szekvenáló könyvtár is készült, melyet az UD-Genomed cég, Illumina szekvenáló platformon szekvenált meg. Munkám során ezen kisRNS könyvtár szekvenálási eredményét elemeztem és igazoltam vissza.

3.2 Bioinformatikai elemzés

A kis RNS nagyáteresztő képességű szekvenálási adatok tartalmazzák a mintában előforduló valamennyi szervezt, így mind a növényi, mind a virális kórokozók RNS-ét, a HTS eredménye pedig lehetővé teszi ezek kimutatását. A kapott szekvenciák elemzéséhez a CLC Genomics Workbench (Qiagen) programot használtam. A bioinformatikai elemzés első lépéseként az összegyűjtött minták FASTQ fájljait importáltam a CLC Genomics Workbench programba. A kis RNS olvasatokból (read) eltávolítottam a hozzájuk ligált adapter szekvenciákat (trimmelés). Ennek eredményeként kaptam egy listát, melyben minden egyedi kis RNS szekvencia ismétlődő kópiái is szerepelnek (redundáns read lista). A következő lépésben eltávolítottam a redundáns adatokat, így kapva egy nem-redundáns listát, melyben már csak az egyedi szekvenciák szerepeltek. Az itt szereplő kis RNS olvasatokból *de novo* hosszabb szakaszokat, kontigoka építettem, mely során az átfedő kis RNS olvasatokról hosszabb szakaszokat építettem. Az így kapott kontig szekvenciákat az NCBI vírus referenciagenom adatbázisához illesztettem BLAST algoritmus segítségével. Az így kapott találatokat az E-érték (E-value, expected value) alapján rendeztük, eredményül egy listát kaptam a mintákban potenciálisan előforduló vírusokról, mely során pozitív találatként értékeltük az E^{-5} értékű eredményeket.

3.3. Primer illesztés és tervezés

Kevésbé vizsgált, vagy még ismeretlen vírusok esetén nem állnak rendelkezésre primerek. Ebben az esetben a HTS-ből származó szekvenciaadatok alapján kell megtervezni a vizsgálni kívánt mintára illeszkedő primereket (Kutnjak et al., 2021).

A primertervezés során figyelembe kell venni a célvírus genetikai változatosságát. A primerek hossza általában 18-22 bázispár, mivel ez a hosszúság már megfelelően specifikus a vizsgálni kívánt mintára. A primer GC-tartalma (guanin és citozin bázispárok) a primer teljes bázisszámához viszonyítva 40-60% kell legyen, hogy a primer megfelelően tudjon kapcsolódni a vizsgált mintához. Az olvadáspont pedig a primerek specifikus kapcsolódását határozza meg (Borah, 2011). Fontos, hogy a tervezett primerekben ne legyen túl sok nukleotid ismétlődés, vagy bármelyik nukleotidból túl sok, vagy túl kevés. Szem előtt tartottuk még azt is, hogy a tervezett primerek a lehető legközelebb helyezkedjenek el a replikáz enzimet és a köpenyfehérjét kódoló szakaszokhoz. A jól megtervezett primerek nemcsak a magas érzékenységet és specificitást biztosítják, hanem lehetővé teszik a kvantitatív PCR és egyéb fejlett diagnosztikai eljárások alkalmazását is.

A nagyáteresztő képességű szekvenálási eredmények független módszerrel (RT-PCR) való visszaigazolásához vírus specifikus primereket terveztem a GRSPaV és GFVA vírusokra. A GRSPaV kimutatásához a kutatócsoport már korábban megtervezett primereit használtam. Első lépésben ezeket a primer párokat hasonlítottam össze a kontigokkal, amiket a bioinformatikai elemzés során építettünk és az adott vírusra való találatként azonosítottunk. A primer szekvenciák kontigra való illeszkedésüket az az NCBI oldalán tudtam ellenőrizni, BLAST funkcióval. A GFVA esetében nem találtam olyan primereket, melyen pontosan illeszkedtek volna a kontigokkal, ezért azokra új primereket terveztem. A 22 nukleotid hosszú primer párunkat, 2 különböző kontigra (contig_14273 és a contig_7470) tudtuk tervezni, mivel a 4 különböző kontigunk különböző szakaszokat fedett le a referencia genomból (**1. táblázat**).

	Primer neve	Primer szekvencia (5'-3')
GRSPaV	RSPaV-F/6904	agaggcacatttcatcaagtcaa
	RSPaV-R/8445	tctgagcacttkaacytcaaaag
GFVA	GFVA_7486F	gcttgtcacctaataccttgcg
	GFVA_8531R	cgttagcaagagttccaactag

1. táblázat: GRSPaV primerek és szekvenciáik (Czotter et al., 2008), és a tervezett GFVA primerek és szekvenciáik. (Forrás: saját munka).

3.4. cDNS minőségének ellenőrzése - aktin teszt

A cDNS-ek olyan egyszálú DNS-ek, amik reverz transzkriptáz enzim segítségével az RNS-ről szintetizálódnak és bázissorrendjük komplementere az RNS bázissorrendjének. Ezeket készen biztosította számomra a Genomikai kutatócsoport, mivel a mintavétel után egyből el is készítették a cDNS mintákat. Annak érdekében, hogy megbizonyosodjak róla, hogy a cDNS szintézis rendben lezajlott és megfelelő minőségű, aktin tesztet végeztem.

A 15 µl végtérfogatú reakcióba, 0,5 µl cDNS templáthoz mintánként a következőket mértem hozzá: 3 µl 5x Phire buffer, 0,75 µl Vvactin forward primert, 0,75 µl Vvactin reverz primert, 0,3 µl 10mM dNTP, 0,3 µl-t a Phire Hot Start II DNA Polymerase enzim (Thermo Fisher Scientific) és 9,4 µl MQ víz. A reakcióelegyhez 0,5 µl 10x hígításban lévő cDNS-t adtam.

A PCR reakció az alábbi protokoll alapján készült:

- elő-denaturáció: 98 °C, 30 másodpercig,
 - denaturáció: 98 °C, 10 másodpercig,
 - anelláció: 55 °C, 10 másodpercig (primerek bekötődése történik),
 - elongáció: 72 °C, 20 másodpercig (enzim működés),
 - végső elongáció: 72 °C-on, 1 percig.
- } 40x ismétlődik

Az elkészült PCR termékeket 1,2%-os agaróz gélen gélelektroforézissel ellenőriztem. A gélbe 1 µl etírbium-bromidot (EtBr) kevertem. A „zsebekbe” 5-6 µl PCR terméket vittem fel. Méret markerként GeneRuler 100bp plus DNA Ladder-t (Thermo Fisher Scientific) használtam.

3.5. Gradiens PCR a GFVA primer optimalizálására

Az általam tervezett primerek annelálási hőmérsékletének optimalizálását gradiens PCR segítségével végeztem el. Az RT-PCR reakciókhoz Q5 Hot Start DNS (New England Biolabs) polimerázt használtam, mely egy rendkívül pontos, hibajavítási funkcióval is rendelkező polimeráz.

PCR reakció elegy összemérése 50µl végtérfogatra vonatkoztatva:

- MQ víz: 32 µl

- 5x Q5 buffer: 10 µl
- 10 mM dNTP: 1 µl
- Q5 enzim: 1 µl
- reverz primer: GFVA_8531R: 2,5 µl
- forward primer: GFVA_7486F: 2,5 µl

A reakcióelegyhez 1 µl templátot adtam. Az 50 µl végtérfogatú reakcióelegyet 5 PCR csőbe mértem szét, majd ezeket különböző annealálási hőfokokra (58°C, 60,5°C, 62,5°C, 64,5°C és 66°C) állított PCR készülékbe helyeztem. A PCR terméket 1,2%-os agaróz gélen futattam meg.

A gradiens PCR reakció az alábbi protokoll alapján készült:

- elő-denaturáció: 98 °C, 30 másodpercig,
 - denaturáció: 98 °C, 30 másodpercig,
 - annealáció: 58°C, 60,5°C, 62,5°C, 64,5°C és 66°C), 30 másodpercig
 - elongáció: 72 °C, 1 percig,
 - végső elongáció: 72 °C-on, 2 percig.
- } 40x ismétlődik

3.6. RT-PCR reakció

A gradiens PCR során meghatározott optimális annealálási hőmérséklettel RT-PCR reakciót végeztem a GRSPaV és GFVA vírusok kimutatására.

Az elkészített cDNS-eket tízszeresére hígítottuk, melyeket az RT-PCR vírusesztekben használtunk fel. A vírusok detektálására a **1. táblázatban** feltüntetett primereket használtam.

A GFVA esetében Q5 Hot Start DNS polimeráz enzimmal végzett PCR reakcióelegy (végtérfogat: 15µl) összetétele:

- MQ víz: 9 µl
- 5x Q5 Buffer: 3 µl
- 10 mM dNTP: 0,3 µl
- GFVA_8531R primer: 1 µl
- GFVA_7486F primer: 1 µl
- Q5 enzim: 0.2 µl
- 10x híg t cDNS templát: 0,5 µl

A PCR reakciót az alábbi kondíciók mellett végeztük:

- elő-denaturáció: 98 °C, 30 másodpercig,
- denaturáció: 98 °C, 30 másodpercig,
- anelláció: 66°C, 30 másodpercig
- elongáció: 72 °C, 1 percig,
- végső elongáció: 72 °C, 2 percig.

} 40x ismétlődik

A GRSPaV esetében Phusion green DNS polimeráz enzimmal végzett PCR reakció elegy összetétele:

- MQ víz: 15,6 µl
- 5x Phusion Buffer: 5 µl
- 10 mM dNTP: 0,5 µl
- RSPaV-F/6904: 1,25 µl
- RSPaV-R/8445: 1,25 µl
- PHUSION enzim: 0,4 µl
- 10x híg t cDNS templát: 1 µl

A kapott PCR terméket agaróz gélen (1.2%) méret szerinti elválasztással, gélelektroforézissel ellenőriztük. A reakció ellenőrzéséhez negatív kontrollként MQ vizet, pozitív kontrollként pedig a pool templátot alkalmaztuk.

3.7. PCR termék tisztítása

A PCR során pozitív eredményt mutató minták gélből való tisztításához a kapott PCR-termékeket steril szikével UV fény alatt kivágtam. A termékek visszaizolálását NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztem el, a gyártó utasításait követve. A PCR termék tisztítás folyamatánál az RT-PCR alapján pozitív mintáimat gélen újra megfuttattam. A megfuttatott gél UV asztalra helyeztem, mert az UV fény alatt jól láthatóak az etídium-bromid által megfestett DNS szakaszok. Ezeket steril szikével, precízen kivágtam a gélből, majd külön mikrocentrifuga csőbe helyeztem őket. A kivágott gél darabokhoz Binding

NTI buffert adtam, majd 10 percig, 50 °C-on inkubáltam, hogy a géلكocla teljesen feloldódjon. Ezt követően a mintát egy nitrocellulóz szűrővel ellátott oszlopra pipettáztam át és 30 másodpercig 13.000 rpm-en centrifugáltam, mely során a DNS a filterhez kötődött. A filteren átfolyt folyadékot eltávolítottam a csőből, majd 700 µl Buffer NT3 alkoholos mosópuffert pipettáztam és 30 másodpercig centrifugáltam 13.000 rpm-en. Az átfolyó folyadékot eltávolítottam, és ezt a lépést megismételtem. Az átfolyó ismételt eltávolítása után, 2 percig üresen centrifugáltam, 13.000 rpm-en a mintát tartalmazó csöveket, hogy a mintákból a maradék etanolos mosópuffert is eltávolítsam. Utolsó lépésként egy steril mikrocentrifuga csőbe helyeztem át a szűrőt, és leoldottam a szűrőről a DNS-t 30 µl 65°C-ra előmelegített elúciós puffer segítségével, centrifugáltam 1 percig. Az elúciós pufferrel történő lépést, még egyszer megismételtem, hogy növeljem a hatékonyságot. A kapott termékből 5 µl-t, 3 µl DNS festék hozzáadásával 1,2%-os agaróz gélen futtattam meg ellenőrzésként.

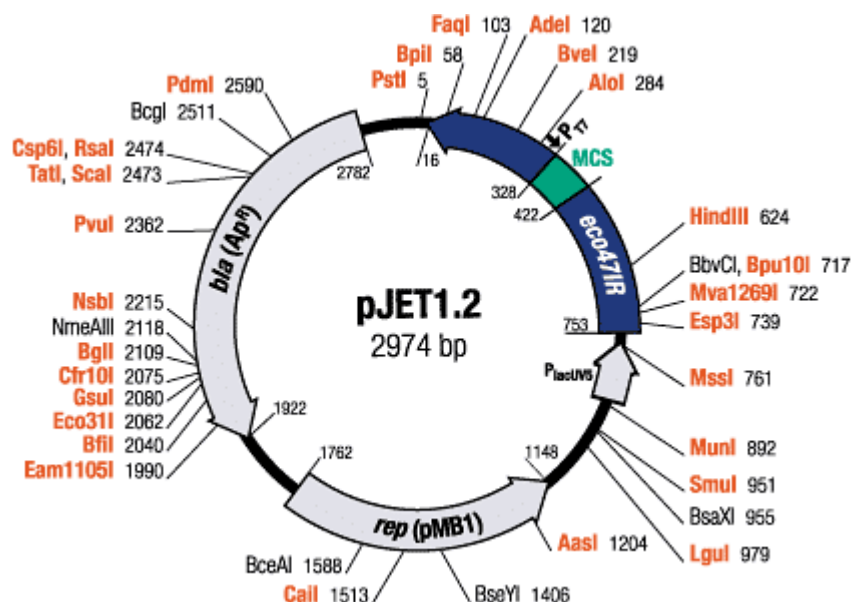
3.8. PCR termék klónozása

3.8.1. Ligálás

A gélből tisztított PCR termékeket CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) segítségével PJET1.2/blunt vektorba (**1. ábra**) klónoztam. A ligálást a gyártó utasításai szerint végeztem el.

A ligáláshoz a reakcióelegy a következőket tartalmazta:

- MQ víz: 1 µl
- pJET vektor: 0,5 µl
- T4 DNA ligáz enzim: 0,5 µl
- 2x ligáz buffer (NaOCl-ion): 5 µl
- tisztított PCR termék: 2,5 µl



1. ábra: PJET1.2/blunt vektor (Forrás: [http1](http://1)).

A reakcióelegyet szobahőmérsékleten inkubáltam 15 percig.

3.8.2. Transzformálás

A ligátumokat *E. coli* DH5 α kompetens baktériumsejtbe transzformáltam. Ehhez a kompetenssejtet jégen hagytam lassan kiolvadni. 100 μ l kompetens sejthez 5 μ l ligátumot adtam. Az így kapott szuszpenziót 20 percig jégen hagytam, majd 42 °C-os vízfürdőben hősokkoltam 30 másodpercig, hogy felvegye a rekombináns DNS-eket, majd azonnal jégre tettem pár percre. Ezt követően 500 μ l folyékony SOC táptalajt adtam hozzá, és 37 °C-on 40 percen keresztül rázattam. 200-250 μ l-nyi baktérium szuszpenziót ampicillin antibiotikum tartalmú szilárd LB táptalajra szélesztettem, majd a lemezeket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltam. A táptalajon csak azok a baktériumok képesek felnőni, melyek tartalmazzák az inzerttel ligálódott vektort. A táplemezeiről 4–6 különálló telepet oltottam le 3 ml folyékony, ampicillin tartalmú LB tápoldatba, majd egy éjszakán át 37 °C-on rázattam.

3.8.3. Plazmid izolálás baktériumtenyészetből

A baktérium sejtéből a rekombináns plazmid DNS tisztításához Plazmid DNA Purification Kit-et (Macherey-Nagel) használtam a gyártó utasításai szerint. A tisztítás magában foglalta a sejtek lízisét, a plazmid DNS elkülönítését, majd tisztítását és koncentrációját szűrőoszlopokon keresztül. A plazmid DNS-t végül 50 μ l MQ tisztaságú vízben oldottam vissza.

Az klónozott DNS darabok jelenlétének ellenőrzését a XhoI és XbaI (Thermo Fisher Scientific) restrikciós enzimekkel való emésztéssel végeztem.

A reakció elegy a következőket tartalmazta:

- MQ: 31,4 μ l
- 10x Tango buffer: 12 μ l
- XH01: 1,2 μ l
- XBa1: 2,4 μ l

A reakcióelegyhez 2 μ l plazmidot tartalmazó mintát adtam, majd 1 órán át 37 °C-on inkubáltam vízfürdőben. A hasítás termékeit 1.2 %-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

3.9. Sanger Szekvenálás és szekvenciák elemzése

A minták szekvenciáinak meghatározása Sanger szekvenálással történt, melyet a BIOMI Kft. végzett el. A minták szekvenálása mindkét, forward és reverz irányból is megtörtént. A kapott eredményeket először a Chromas programban ellenőriztem, melyet kifejezetten a Sanger-szekvenálás eredmények kezelésére lett kifejlesztve. Ebből a programból FASTA formátumban másoltam ki a szekvenciákat. A forward és reverz irányból megszekvenált szekvenciák összeillesztését az NCBI adatbázisában BLAST algoritmussal végeztem. Az összeillesztett szekvenciákat az NCBI adatbázisában található referencia szekvenciákkal (GFVA: NC_0770040, GRSPaV: NC_001948), illetve az adatbázisban megtalálható szekvenciákkal hasonlítottam össze.

A filogenetikai fa elkészítéséhez a Mega11 bioinformatikai programot használtam, mely kifejezetten filogenetikai elemzésekre lett kifejlesztve. Első lépésben az NCBI adatbázisából összegyűjtöttem a GVT, GFVA és GRSPaV referencia szekvenciákat, illetve az általam vizsgált szekvenciákat és fasta formátumban mentettem le őket. A szekvenciákat azonos méretre vágás után a Clustel Omega online programba illesztett szekvenciáimnak megkerestem a kezdő- és vég szakaszait, majd méretre vágás után összeillesztettem őket. A Mega11 programmal készítettem a filogenetikai fákat, és 1000 bootstrap beállítást alkalmaztam, mely azt mutatja meg, hogy az adott szekvenciák közötti rokonság mennyire valószínű.

4. Eredmények

4.1. Bioinformatikai elemzés eredményei

Kutatásom során a *Vitis sylvestris* kisRNS könyvtárat elemeztem ki. A szekvenálás minőségét a FastQC programmal ellenőriztem, mely megfelelő volt, így folytattam az elemzést. A *Vitis sylvestris* szekvenálás eredményeinek kezdeti statisztikai adatait az **2. táblázat** mutatja.

Könyvtár száma	Nyers olvasatok száma	Trimmelt olvasatok száma(redundáns)	Nem redundáns olvasatok száma	Kontigok száma
213_FR36_VS	14 800 988	14 615 543	1 569 099	4121

2. táblázat: A ligeti szőlő kisRNS könyvtárának kezdeti statisztikája. (Forrás: saját munka).

A nem redundáns kis RNS szekvenciák összeillesztésével kapott hosszabb kontig szekvenciákat az NCBI adatbázisában szereplő növény vírusok referencia szekvenciáihoz illesztettem a BLAST algoritmussal. Az itt kapott eredmények alapján készítettem egy vírustalálati listát, melyen az szerepelt, hogy potenciálisan milyen vírusokról keletkezhetnek a kis RNS-ek (2. táblázat). A kapott találatok valószínűségét az E-érték (E-value) alapján határoztam meg úgy, hogy pozitív találatnak értékeltem az $E \leq 10^{-5}$ értékű találatokat.

A bioinformatikai elemzés során a grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) és a grapevine fovea virus A (GFVA) kaptam találatot (**3. táblázat**).

E-ÉRTÉK	VÍRUS NEVE
6,5254E10 ⁻¹⁶⁶	Grapevine foveavirus A, complete genome
1,8324E ⁻⁸⁷	Grapevine foveavirus A, complete genome
1,53567E ⁻⁵⁶	Grapevine foveavirus A, complete genome
5,68887E ⁻¹⁷	Rupestris stem pitting associated virus-1, complete genome
6,93046E ⁻¹⁶	Rupestris stem pitting associated virus-1, complete genome

3. táblázat: Az $E \leq 10^{-5}$ értékű találatok szőlővírusokra. (Forrás: saját munka).

4.2. Vírusok visszaigazolása

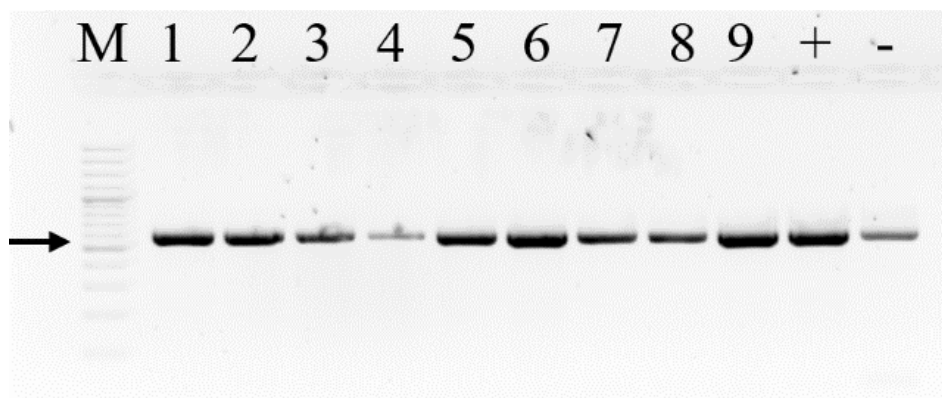
A *Vitis sylvestris* kisRNS könyvtár elemzése során 6 darab GRSPaV specifikus kontig szekvenciát kaptam, majd ezekhez ellenőriztem a rendelkezésre álló primereket. A találatokat az NCBI oldalán tudtam ellenőrizni a BLASTn funkcióval, mely lehetővé teszi, hogy 2 szekvenciát illesszünk egymásra.

A *Vitis Sylvestris* kisRNS könyvtár elemzése során 1 darab GFVA specifikus kontig szekvenciára kaptam találatot. A GFVA esetében jelenleg kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. A bioinformatikai elemzések során a kapott olvasatokból épített kontigokat az NCBI adatbázison található referencia genomhoz illesztve (BLAST) primereket terveztem a GFVA PCR-rel való visszaigazolásához. Első lépésben ellenőriztük, hogy a GFVA-hoz genetikailag legközelebb álló GVT vírus primer szekvenciái, mellyel a genomikai csoport már rendelkezett, illeszkednek-e a 4 GFVA kontigra. A GRSPaV vírus esetében bemutatott módon ellenőriztem a primerek illeszkedését, melyeknél egy esetben kaptam találatot.

Mivel csak egy primer illeszkedett, ezért következő lépésben a GVT referencia genomra illesztettük a GFVA referencia genomját, majd megkerestük a GVT primereket, hogy a GFVA-ra tervezett primereket is hasonló helyekre tudjuk tervezni. Ezután a 4 GFVA specifikus kontigot illesztettük rá a GFVA referencia genomra, hogy primereket tervezhessünk.

4.2.1. Aktin teszt eredménye

Az aktin tesztet a cDNS-ek minőségének ellenőrzésére és kifejeződésének kimutatására alkalmaztam. A kilenc mintán elvégzett teszt mindegyike pozitív eredményt mutatott, ami igazolja a cDNS minták jó minőségét. Az eredmények a várt mérettartományban jelentek meg (2. ábra).



2. ábra: A cDNS-ek minőségének ellenőrzése aktin teszttel. Jelmagyarázat: M: marker 100 bp + DNS marker, 1-3 minták: Feketeerdő/1 minták, 4-6: Feketeerdő/2 minták, 7-9 minták: Hédervár-Kimle közötti minták, +: pozitív kontroll, -: negatív kontroll. A nyíllal jelölt méret tartományban (1000 bp) vártam az eredményt. (Forrás: saját munka).

Mivel az aktint testben a negatív kontroll enyhe pozitív eredményt mutatott, ezért ezt a további vizsgálat során figyelembe vettem, de mivel a jel erőssége elmaradt a mintákétól, ezért nem ismételt meg a tesztet.

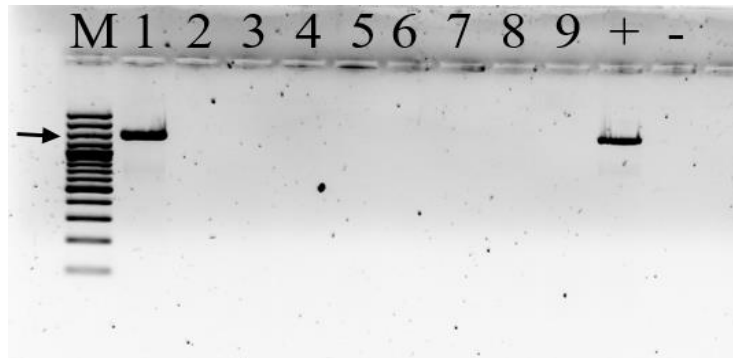
4.2.2. A GRSPaV kimutatása

A *Vitis sylvestris* kis RNS könyvtárból 6 darab GRSPaV specifikus vírus kontigot találtam. Ezekre a találatokra két primerpárt illesztettem, hogy ellenőrizsem, hogy megfelelőek-e a GRSPaV visszaigazolásához az én szekvenciáim esetében (**4. táblázat**).

	RSPaV F	RSPaV R	RSPaV-F/6904	RSPaV-R/8445
	Gambino et al., 2006.		Czotter et al., 2008.	
contig_397	nem	nem	nem	nem
contig_398	igen	igen	nem	igen
contig_399	igen	igen	igen	igen
contig_1860	nem	nem	nem	nem
contig_1861	nem	igen	nem	igen
contig_2445	nem	nem	nem	nem

4. táblázat: Primerek illesztése a GRSPaV kontig szekvenciákra. (Forrás: saját munka).

A találatok alapján Czotter et al. (2008) által tervezett RSPaV-F/6904 és RSPaV-R/8445 primer párt használtam, mivel azok már rendelkezésre álltak, és a 399-es kontigra mindkét irányból illeszkedtek. A PCR-teszt során az 1. számú mintánál kaptunk pozitív eredményt, a negatív kontrol tiszta volt (**3. ábra**).



3. ábra: GRSPaV jelenlétének visszaigazolása RT-PCR reakcióval. Jelmagyarázat: M: 100 bp + DNS marker, 1-6 minták: feketeerdei minták, 7-9 minták: Hédervár-Kimle közötti minták, +: pozitív kontroll, -: negatív kontroll (MQ víz). A nyíllal jelölt méret tartományban vártam az eredményt. (Forrás: saját munka).

4.2.3. A GFVA kimutatása

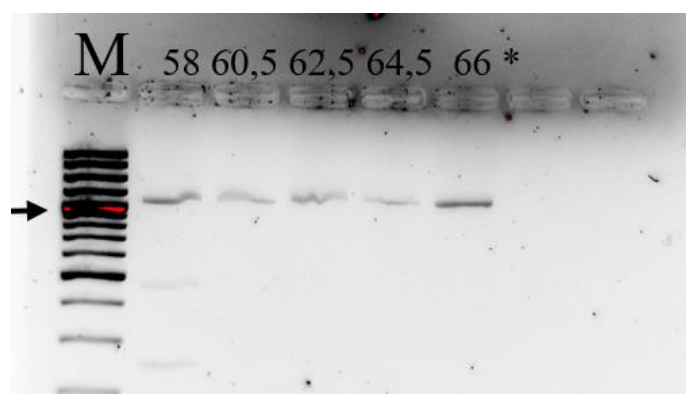
A grapevine fovea virus A-ra 4 specifikus vírus kontigot találtam. A GFVA-t először 2023-ban írták le, irodalomban publikált primert nem találtunk. A GFVA nukleinsav sorrendje nagymértékben hasonlít a GVT nukleinsav sorrendjéhez, azért, mert mind a két vírus a *Betaflexiviridae* családba, és a *Vitivirus* nemzetségbe tartoznak. Nukleotid és aminosav szekvenciáik, illetve a fő fehérje kódoló génjeik (replikázt, köpenyfehérje és mozgásfehérje) nagyon hasonlóak. Első lépésként a kontig szekvenciákat összevettem a Genomikai kutatócsoport munkatársai által tervezett GVT_7630/F és GVT_8534/R primerekkel (**5. táblázat**).

	GVT_7630/F	GVT_8534/R
contig_4156	nem	nem
contig_7470	nem	nem
contig_14273	nem	igen
contig_26760	nem	nem

5. táblázat: GVT primerpárok illesztése a GFVA kontig szekvenciákra. Nem kaptam olyan találatot, mely illeszkedett volna a GFVA kontig szekvenciákra mind a két irányból. (Forrás: saját munka).

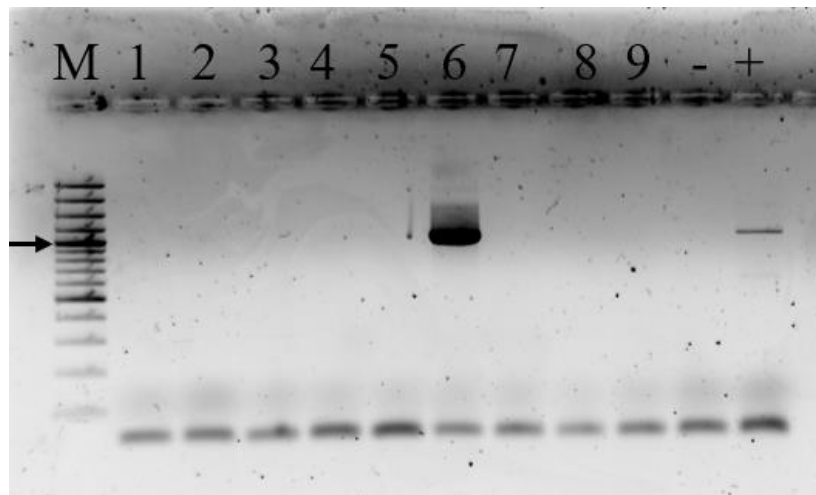
Mivel a rendelkezésre álló primerek (1 kivételével) nem illeszkedtek a GFVA contig szekvenciákra, ezért új primereket terveztem, melyeket GFVA_9531/R-nek és GFVA_7486F-nek neveztem el.

A visszaigazolás első lépésként végeztem egy Gradiens PCR-tesztet, mellyel meghatároztam az optimális annealing hőmérsékletet az újonnan tervezett primerpárok számára. Öt különböző hőmérsékleten futtatuk a PCR reakciót: 58 °C, 60,5 °C, 62,5 °C, 64,5 °C és 66 °C-on. A **4. ábrán** jól látszik, hogy a legjobb eredményt 66 °C-on kaptuk, ezért a továbbiakban ezen a hőmérsékleten végeztem el GFVA specifikus PCR reakciót (**4. ábra**).



4. ábra: Gradiens PCR-teszt eredménye. Jelmagyarázat: M: 100 bp + DNS marker. A nyíllal jelölt méret (1000 bp) tartományban várjuk az eredményt *A számokkal történő jelölések °C-ban értelmezhetőek. (Forrás: saját munka).

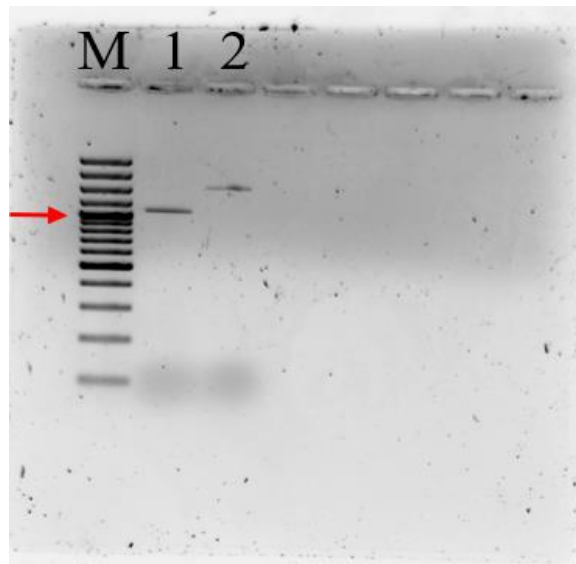
A gélképen jól megfigyelhető, hogy a legerősebb pozitív eredményt 66 °C-nál kaptuk. Miután meghatároztuk az ideális hőmérsékletet a primerpárok számára, elvégeztük a PCR-tesztet a *Vitis sylvestris* mintákon a GFVA primerekkel. A meglévő 9 mintából 1 adott pozitív eredményt (**5. ábra**), ezt GFVA_6-nak neveztem el, és a későbbiekben ezzel dolgoztam tovább.



5. ábra: GFVA jelenlétének visszaigazolása RT-PCR reakcióval. Jelmagyarázat: M: 100 bp + DNS marker, 1-6 minták: feketeerdei minták, 7-9 minták: Hédervár-Kimle közötti minták, +: pozitív kontroll, -: negatív kontroll MQ víz. A nyíllal jelölt mérettartományban (1000 bp) várjuk az eredményt. (Forrás: saját munka).

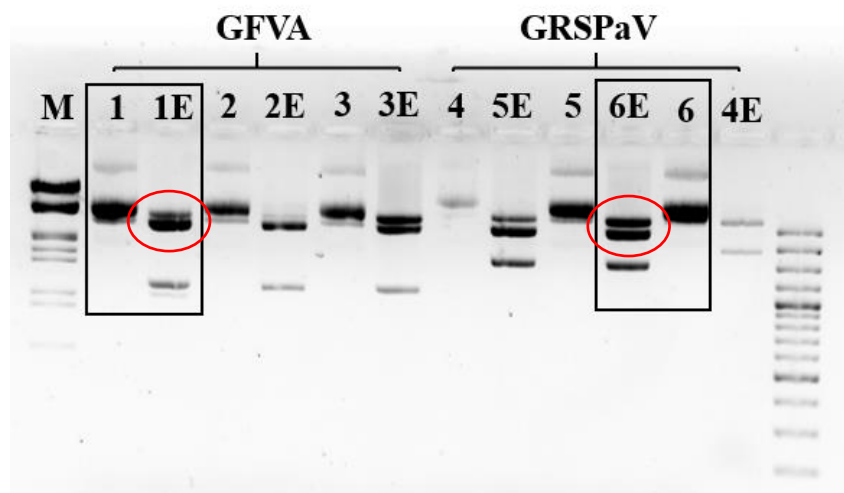
4.3. PCR termékek tisztítása és klónozás

A PCR során pozitív eredményt mutató 1-1 GRSPaV és GFVA termékeket 1,2%-os agaróz gélen megfuttattam, majd a megfuttatott gélekből steril szikével, UV fény alatt kivágtam az etídium-bromid által megfestett szakaszokat (**6. ábra**). A mintákat 1,2%-os agaróz gélen futtattam meg hogy ellenőrizzem a tisztítás eredményességét. A gélkép eredménye alapján mind az 5 minta PCR termékének tisztítása sikeresnek bizonyult.



6. ábra: Tisztított GFVA és GRSPaV minták (insert). Jelmagyarázat: M: 100 bp + DNS marker, 1: tisztított GFVA minta, 2: tisztított GRSPaV minta. (Forrás: saját munka).

A gélbő tisztított mintákat pJET plazmidba ligáltam, majd a ligátumokat kompetens DH5 α baktérium törzsbe transzformáltam a 3.8.3. fejezetben leírtak szerint. A ligálás sikerességét a plazmidok restrikciós emésztésével ellenőriztem az XbaI és XhoI enzimeket használva. Az emésztés sikerességét 1,2%-os agaróz gélen futtatással ellenőriztem. Az emésztett (E) és az emésztetlen termékeket egymás mellett futtattam az agaróz gélen (**7. ábra**), így láthatóvá vált a klónozó helyre beépült DNS szakasz. A gélképek alapján sikeres volt a ligálás, így a minták alkalmasak voltak a Sanger szekvenálásra, amit a Biomi Kft. végzett el.



7. ábra: Az emésztett (E) és emésztetlen plazmid gélelektroforetikus elválasztása. A beépült, vektorból kihalászott plazmidot a piros karika jelzi. Jelmagyarázat: M: marker, E: emésztett plazmid, 1-3E: a GFVA minták plazmidjai, 4-4E: a GRSPaV minták plazmidjai. A 4.

mintánál elcsúsztam, emiatt került a 4. minta emésztett plazmidja a gélkép végére, és cserélődtek fel az 5-ös és a 6-os mintáknál az emésztett és az emésztetlen plazmidok sorrendjei. (Forrás: saját munka).

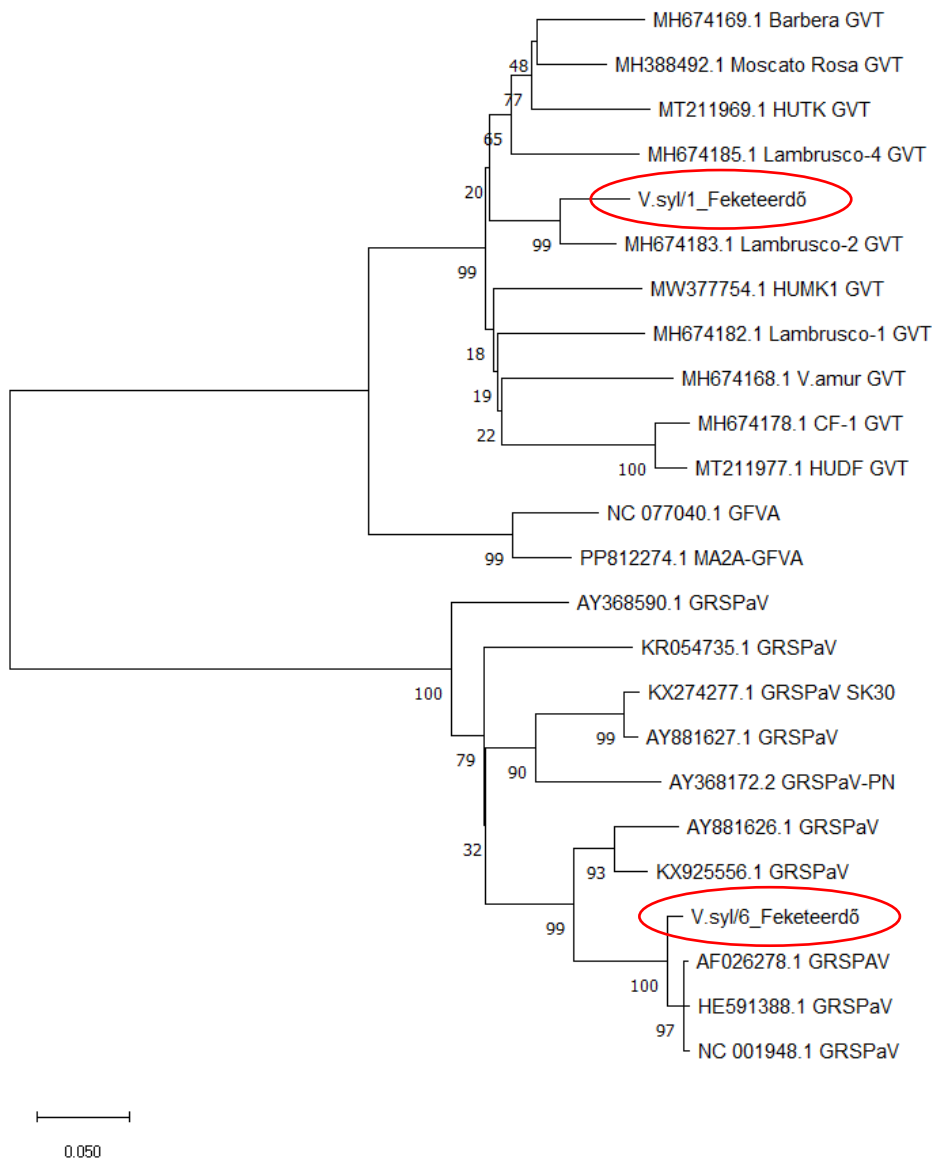
4.4. Filogenetikai elemzés

A GRSPaV és GFVA mintákat szekvenálás után az NCBI adatbázisában szereplő referencia szekvenciákkal (GFVA: NC_0770040, GRSPaV: NC_001948) összevetve a GRSPaV 98%-os egyezést mutatott, ezzel szemben a GFVA-nak vélt minta csak 72%-ban egyezett a GFVA referencia genommal. Ezt az eredményt követően összevetettem a GVT referencia genomjával is, melynél már 96%-os egyezést kaptam.

A filogenetikai elemzést Mega11 programmal végeztem, bootstrap 1000 beállítással. A bootstrap 1000 értékek eredményei a filogenetikai fa ágain találhatóak, az értékeket a feltűntetett számok jelölik (**6. táblázat**) (**8. ábra**).

Bootstrap érték	Magyarázat
90-100	erős kapcsolat a szekvenciák között
70-89	megfelelő kapcsolat a szekvenciák között
50-69	gyenge kapcsolat a szekvenciák között
<50	nincs statisztikailag bizonyítható kapcsolat a szekvenciák között

6. táblázat: Bootstrap értékek magyarázata. (Forrás: saját munka).



8. ábra: Filogenetikai törzsfá. Az ábrán az általam vizsgált *Vitis sylvestris* mintákat a piros karikák jelzik. Jelmagyarázat: V.syl/1_Feketeerdő: a Feketeerdőből szedett, GFVA-t

tartalmazó minta, V.syl/6_Feketeerdő: a Feketeerdőből szedett GRSPaV-t tartalmazó minta.

(Forrás: saját munka).

Ahogy az a filogenetikai törzsfán is látható, a grapevine rupestris stemppitting-associated virus-t tartalmazó minta nagymértékű egyezést mutatott más GRSPaV genomokkal. Ezzel szemben a minta, melyről eddig azt gondoltuk, hogy grapevine fovea virus A-val fertőzött, az valójában a grapevine virus T-hez állt közelebb. A **2. táblázatban** feltüntetett találatok nagy valószínűséggel azért mutattak találatot GFVA vírusra, mivel a GFVA-ról és a GVT-ről általánosságban elmondható, hogy nagymértékben (körülbelül 70%-ban) egyezik a genomjuk.

5. Következtetések és javaslatok

A Grapevine Virus T-t és a Grapevine Fovea Virus A-t nemrégiben írták le először, és mind a két vírust kizárólag Európában mutatták ki eddig, mely arra enged következtetni, hogy a vírusok európai eredete igen valószínű (Demian et al., 2021).

Az 1870-es években bekövetkezett filoxéravész miatt a szőlőültetvények nagy része kipusztult. Ezzel szemben a ligeti szőlő populációk élőhelyüknél fogva fent maradtak. A mocsaras, magas vízállású területek nem kedveztek a filoxérának, ezért a növények nem csak fennmaradtak, de vírusrezervoár növényként is szolgálhatnak. A MATE Genomikai Kutatócsoport munkatársai által tervezett kísérletben a Hédervár-Kimle és Feketeerdőből származó a ligeti szőlő minták és vírusfertőzöttségük feltérképezése kisRNS alapú új generációs szekvenálási módszerekkel történt.

Az általam vizsgált mintából az első bioinformatikai elemzések alapján GRSPaV és GFVA vírusokat tudtam kimutatni, de a nagy-áteresztőképességű szekvenálás eredményének RT-PCR-rel való visszaigazolása és a PCR termék Sanger szekvenálása után kiderült, hogy a feketeerdei mintában jelenlévő, eddig GFVA-nak vélt vírus, az valójában a GVT egyik változata. Ez az eredmény annak tudható be, hogy a Grapevine Virus T és a Grapevine Fovea Virus A közeli rokonságban állnak, eredetük valószínűsíthetően közös. Egyes kutatások szerint a GFVA a GVT-nek egy erősen divergáló izolátuma (Demian et al., 2021), ám jelenleg még nem áll rendelkezésünkre elegendő adat ahhoz, hogy ezt biztosan kijelenthessük.

A továbbiakban fontos lenne több ligeti szőlő populációt megvizsgálni Európában, hogy pontosabb képet kapjunk a GVT és a GFVA előfordulása és genetikai diverzitása kapcsán, kiemelt figyelmet fordítva a két vírus közötti filogenetikai viszonyokra is. A ligeti szőlő szerepét vírusrezervoárként érdemes további vizsgálatokkal is alátámasztani. A kapott eredmények alapján az újabban azonosított vírusok jelenlétét fontos lenne figyelembe venni a szaporítóanyagok kiválasztásánál, illetve javasolt az ehhez kapcsolódó monitoring kialakítása is.

6. Összefoglalás

A szőlőtermesztésben a vírusok okozzák a legtöbb nehézséget a termesztők számára. Genetikai diverzitásuk és terjedési mechanizmusuk jelentősen meghatározza az ellenük való védekezést. A szakdolgozatom célja a *Vitis sylvestris* feketeerdei és hédervár-kimlei populációk vírusfertőzöttségének feltérképezése volt, kiemelt figyelmet fordítva a GRSPaV, GFVA és a GVT vírusokra, valamint ezek filogenetikai elemzésére, hogy a köztük lévő evolúciós kapcsolatot jobban megérthessük.

A kísérlethez 3 helyről, a Feketeerdőben két részről és a Hédervár-Kimle közötti részről, 2019. június 27-én begyűjtött *Vitis sylvestris* mintákat vizsgáltam. A minták RNS kivonataiból az RNS-eket és a kisRNS-eket szekvenálták, majd ezekből készítettek egy RNS és kisRNS könyvtárat.

Először a nagy-áteresztőképességű szekvenálás eredményeit bioinformatikai módszerekkel elemeztem, és az E-érték alapján 2 vírus jelenlétét tudtam igazolni, a Grapevine Rupestris Stem-pitting Associated Virus-t (GRSPaV) és a Grapevine Fovea Virus A-t (GFVA). Ezt követően a rendelkezésre álló GRSPaV primereket ráillesztettem a kapott vírus specifikus kontig szekvenciákra. Mivel a GFVA esetében nem állt rendelkezésre specifikus primerpár a PCR-teszt elvégzéséhez, azért először GVT primereket GVT illesztettem a GFVA kontigokra, mivel a két vírus genomja nagyon hasonló. A primerpárok nem illeszkedtek, azért a következő lépésben a kapott GFVA specifikus kontigokra primereket terveztem.

A tervezett primerek optimális annealálási hőmérsékletét gradiens-PCR-el állapítottam meg, majd elvégeztem az RT-PCR-reakciót. A kapott terméket tisztítottam, majd pJET-vektorba ligáltam és *E. coli* DH5 α kompetens baktériumsejtbe transzformáltam. A klónokból plazmid DNS-t izoláltam, majd tisztítás után szekvenáltattam őket.

A szekvenálás eredményeit az NCBI adatbázisában szereplő GRSPaV és GFVA referencia genomokkal összevettem. A kapott eredmények azt igazolták vissza, hogy a GRSPaV a referencia genommal nagymértékű egyezést mutatott, ezzel szemben a GFVA nem egyezett a referencia genommal, helyette a GVT referencia genomhoz állt közel. Ennek oka az lehet, hogy a GFVA a GVT vírustól mutálódott.

Utolsó lépésben filogenetikai törzsfát készítettem, mely jól szemlélteti a minták rokonságát más szőlővírusokkal.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni a belső témavezetőimnek, Dr. Várallyay Évának és Dr. Jaksa-Czotter Nikolettának a kitartó munkájukat és szakami javaslatukat, melyekkel segítettek a diplomadolgozat megírását. Köszönöm a türelmüket, és azt, hogy a felmerülő kérdéseimet készséggel, szakszerűen megválaszolták. Köszönettel tartozom a MATE NVI Genomikai Kutatócsoport munkatársainak is, akik segítettek a laboratóriumi munkáimat.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bán Rita Tanár Nőnek a támogatásáért, hatékony segítség nyújtásáért minden kérdéssel kapcsolatban.

Nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a szüleimnek és barátaimnak, akik végig támogattak a diplomadolgozat megírása során.

8. Irodalomjegyzék

1. **Alhadj M. et al. (2023):** Mandy Alhadj; Muhammad Zubair; Aisha Farhana: Next-Generation Sequencing (NGS). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Elérhető: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922>
2. **Akbar et al. (2022):** Akbar S, Wei Y, Zhang M-Q. RNA Interference: Promising Approach to Combat Plant Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(10):5312. <https://doi.org/10.3390/ijms23105312>
3. **Biobera AG (2017):** Pathogens of Grapevines – 2nd Edition. Bioreba AG, Reinach, Switzerland. Elérhető: https://www.bioreba.ch/saas/CustomUpload/37403570340037003560369035003210360036603690356035303520350032003260/Pathogens_of_grapevines_2.pdf
4. **Borah, P. (2011):** Primer designing for PCR. *Science Vision*, 11(3), 134-136. Elérhető: <https://sciencevision.org/storage/journal-articles/February2019/aPFH6nHcXUQRMoYOsaBl.pdf>
5. **Cabaleiro és Segura (1997):** Cabaleiro C, Segura A. Field Transmission of Grapevine Leafroll Associated Virus 3 (GLRaV-3) by the Mealybug Planococcus citri. *Plant Dis*. 1997 Mar;81(3):283-287. DOI: 10.1094/PDIS.1997.81.3.283. PMID: 30861771.
6. **Demian E. et al., 2021:** Demian, E.; Holczbauer, A.; Galbacs, Z.N.; Jaksa-Czotter, N.; Turcsan, M.; Olah, R.; Varallyay, E. Variable Populations of Grapevine Virus T Are Present in Vineyards of Hungary. *Viruses* 2021, 13, 1119. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13061119>
7. **Duan et al. (2015):** Duan D, Halter D, Baltenweck R, Tisch C, Tröster V, Kortekamp A, Hugueney P, Nick P. Genetic diversity of stilbene metabolism in *Vitis sylvestris*. *J Exp Bot*. 2015 Jun;66(11):3243-57. DOI: 10.1093/jxb/erv137. Epub 2015 Apr 6. PMID: 25873669; PMCID: PMC4449542.
8. **Emiyu K. (2022):** Review on Illumina Sequencing Technology. Austin Publishing Group. Elérhető: <https://austinpublishinggroup.com>
9. **Fabrizio C. & Arroyo-García, R. (2020):** The Complexity of Grapevine Virus Diseases: A Multilayered Interaction. *Frontiers in Plant Science*, 11:1176. DOI: 10.3389/fpls.2020.01176

10. **Fajardo et al., (2017):** Fajardo, Thor & Vanni, Marcos. (2017). Absolute quantification of viruses by TaqMan real-time RT-PCR in grapevines. *Ciência Rural*. 47. DOI: 10.1590/0103-8478cr20161063.
11. **Fall et al., (2020):** Fall, M.L.; Xu, D.; Lemoyne, P.; Moussa, I.E.B.; Beaulieu, C.; Carisse, O. A Diverse Virome of Leafroll-Infected Grapevine Unveiled by dsRNA Sequencing. *Viruses* 2020, 12, 1142.
12. **Forneck A. et al. (2019):** Forneck, A., Mammeler, R., Tello, J. et al. First European leaf-feeding grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) survey in Swiss and German commercial vineyards. *Eur J Plant Pathol* 154, 1029–1039 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01723-0>
13. **Forneck A. & Huber, L. (2009):** (A) Phylloxera – a review of current research. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131(1): 1–10. DOI: 10.1111/j.1570-7458.2008.00811.x
14. **Geng et al. (2021):** Geng G, Wang D, Liu Z, Wang Y, Zhu M, Cao X, Yu C, Yuan X. Translation of Plant RNA Viruses. *Viruses*. 2021 Dec 13;13(12):2499. doi: 10.3390/v13122499. PMID: 34960768; PMCID: PMC8708638.
15. **Gergerich és Dolja (2006):** Gergerich, R.C., and V. V. Dolja. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01
16. **Hajdu (2019):** Hajdu Edit: „*A magyar csemeszőlőnemesítés története*”, *Kertgazdaság* 51 (2019) 4. szám. Elérhető: https://real-j.mtak.hu/20471/4/KG_2019_51_04_.pdf
17. **Havitt M. F. (1954):** Studies on grapevine virus diseases.
18. **Hily et al. (2024):**
Hily, J.M., Martin, I.R., Rhalloussi, W., Froehly, A., Klingenstein, M., Lemaire, O. et al. (2024) First report of grapevine foveavirus A in France. *New Disease Reports*, 50, e12306. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12306>
19. **Hull R. (2014):** *Plant Virology*. 5th edition. Academic Press, London. Elérhető: <https://books.google.hu/books?id=PYrZAAAAQBAJ>

20. **Jaksa-Czotter et al. (2024):** Jaksa-Czotter N, Nagyné Galbács Z, Jahan A, Demián E, Várallyay É. Viromes of Plants Determined by High-Throughput Sequencing of Virus-Derived siRNAs. *Methods Mol Biol.* 2024;2732:179-198. doi: 10.1007/978-1-0716-3515-5_13.
21. **Jo Y. et al. (2017):** Jo Y, Song MK, Choi H, Park JS, Lee JW, Lian S, Lee BC, Cho WK. Genome Sequence of Grapevine Virus T, a Novel Foveavirus Infecting Grapevine. *Genome Announc.* 2017 Sep 14;5(37):e00995-17. doi: 10.1128/genomeA.00995-17. PMID: 28912330; PMCID: PMC5597771.
22. **Kutnjak D. et al., 2021:** Kutnjak, D.; Tamisier, L.; Adams, I.; Boonham, N.; Candresse, T.; Chiumenti, M.; De Jonghe, K.; Kreuzer, J.F.; Lefebvre, M.; Silva, G.; et al. A Primer on the Analysis of High-Throughput Sequencing Data for Detection of Plant Viruses. *Microorganisms* 2021, 9, DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040841>
23. **Magyar Mezőgazdaság (2014):** A leggyakoribb vírusbetegségek hazai szőlőültetvényekben. Elérhető: <https://magyarmezogazdasag.hu/2014/07/15/leggyakoribb-virusbetegsegek-hazai-szoloultetvenyekben>
24. **Majdán Z. (2008):** Szőlőfajták és vírusfertőzöttségük. *Növényvédelem*, 44 (6): 265–271. Elérhető: <https://epa.oszk.hu/00400/00458/00141/majdan.html>
25. **Manfred H. (2015):** Manfred Heinlein. Plant virus replication and movement. *Virology*. Volumes 479–480. 2015, pages 657-671, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.025>.
26. **Maree et al (2013):** Maree H.J., Almeida R.P., Bester R., Chooi K.M., Cohen D., Dolja V.V., Fuchs M.F., Golino D.A., Jooste A.E., Martelli G.P., Naidu R.A., Rowhani A., Saldarelli P., Burger J.T., Grapevine leafroll-associated virus 3. *Front Microbiol.* 2013 Apr 16;4:82. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00082.
27. **Martelli G. P. & Boudon-Padieu E. (2006):** Grapevine Viruses: Diseases and Control. Options Méditerranéennes B: 55. CIHEAM, Bari. Elérhető: <https://om.ciheam.org/ressources/om/pdf/b55/00800521.pdf>
28. **Martelli G. P. (2017):** An Overview on Grapevine Viruses, Viroids, and the Diseases They Cause. In: Meng B., Martelli G. P., Golino D., Fuchs M. (eds) *Grapevine Viruses:*

Molecular Biology, Diagnostics and Management. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-57706-7_2

29. **Massart et al. (2017):** Massart S, Candresse T, Gil J, Lacomme C, Predajna L, Ravnikar M, Reynard JS, Rumbou A, Saldarelli P, Škorić D, Vainio EJ, Valkonen JP, Vanderschuren H, Varveri C, Wetzel T. A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Front Microbiol.* 2017 Jan 24;8:45. doi: 10.3389/fmicb.2017.00045. PMID: 28174561;
30. **Meng B. (2017):** Meng, B. & Rowhani, Adib. (2017). Grapevine rupestris stem pitting-associated virus. DOI: 10.1007/978-3-319-57706-7_12.
31. **Naidu et al. (2014):** Naidu, R. A., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D. A., & Martelli, G. P. (2014). Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease*, 98(9), 1172–1185. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0880-FE>
32. **National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2025):** Advancing Vineyard Health: Insights and Innovations for Combating Grapevine Red Blotch and Leafroll Diseases. The National Academies Press, Washington, DC. DOI: 10.17226/27472
33. **Nizamani et al. (2023):** Nizamani, Mir Muhammad & Zhang, Qian & Muhae ud Din, Ghulam & Wang, Yong. (2023). High-throughput sequencing in plant disease management: a comprehensive review of benefits, challenges, and future perspectives. *Phytopathology Research*. 5. 10.1186/s42483-023-00199-5.
34. **Pallas V., García JA. (2011):** How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol.* 2011 Dec;92(Pt 12):2691-2705. doi: 10.1099/vir.0.034603-0
35. **Portela F. et al. (2024):** Grapevine Virus A detection using portable sensors. *Sensors*, 24(24): 8172. DOI: 10.3390/s24248172
36. **Rott M. et al. (2017):** Detection and characterization of grapevine viruses by high-throughput sequencing. *Plant Disease*, 101(12): 2083–2089. DOI: 10.1094/PDIS-03-17-0306-RE

37. **Várallyay É. (2023):** Vírusbetegségek a szőlőben. Borászati Füzetek, 2023.

Internetes hivatkozások:

http1: Malik, Zafar. (2014). Genes that underlie natural variation in growth rate and flowering time in local accessions of *Arabidopsis thaliana*. Elérhető: https://www.researchgate.net/figure/pJET-12-blunt-vector-map-http-abocompl-pl-p-CloneJET-PCR_fig4_292450059

9. Nyilatkozatok

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréseről és eredetiségéről

A hallgató neve:	Hegedüs Vivien
A Hallgató Neptun kódja:	MJQNGM
A dolgozat címe:	A ligeti szőlő (<i>Vitis sylvestris</i>) viromjának vizsgálata HTS-sel és molekuláris módszerekkel
A megjelenés éve:	2025
A konzulens intézetének neve:	Növényvédelmi intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Integrált Növényvédelmi 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. Továbbá kijelentem, hogy a dolgozat elkészítése során alkalmazott mesterséges intelligencia-eszközök (pl. szöveggenerálás, nyelvi javítás, fordítás, adatelemzés) használata nem helyettesítette a saját kutatási és alkotói munkámat, azok alkalmazását a források között vagy a módszertani részben feltüntettem, és a szakmai-etikai elvárásoknak megfelelően jártam el.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, 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 tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. 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 könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Gödöllő, 2025. 11. 03

Hegedüs Vivien
Hegedüs Vivien
Hallgató aláírása

Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

1. Általános adatok

Hallgató neve:	HEGEDŰS VIVIEN
Neptun-kódja:	MJQNGM
Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):	<input type="checkbox"/> BSc/BA <input checked="" type="checkbox"/> MSc/MA <input type="checkbox"/> Doktori (PhD) <input type="checkbox"/> Egyéb:
Tantárgy neve/kódja*:	Diplomadolgozat
A munka címe:	A ligeti szőlő (<i>Vitis sylvestris</i>) viromjának vizsgálata HTS-sel és molekuláris módszerekkel

* doktori értekezés esetén nem kitöltendő

2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)

B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Kérjük, töltsse ki a vonatkozó táblázatokat!)

3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

I. TÁBLÁZAT: Asszisztensi vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrekció, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)
Tudományosan elismert és akkreditált magyar nyelvű és nemzetközi források felkeresésére	ChatGPT, GPT-5	

II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka mellékletében való csatolása szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott eszköz verziója, elérhetősége	MI-neve,	Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-naplót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma

3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

.....

.....

.....

.....

4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: Gödöllő, 2025. november hó 3 nap

Hegedűs Vivien

Hegedűs Vivien
Hallgató aláírása

Várallyay Éva

Dr. Várallyay Éva
Témavezető aláírása

Jaksa-Czotter

Dr. Jaksa-Czotter Nikoletta
Témavezető aláírása

Bán Rita

Dr. Bán Rita
Témavezető aláírása

NYILATKOZAT

HEGEDÜS VIVIEN (név) (hallgató Neptun azonosítója: MJQNGM) 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 javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt:Gödöllő, 2025 év , november hó 3 nap

Jaksa-Czotter

Dr. Jaksa-Czotter Nikoletta
belső konzulens

Várallyay Éva

Dr. Várallyay Éva
belső konzulens

Bán Rita

Dr. Bán Rita
belső konzulens